

## ***Streptomyces* sp. Suşlarından Amilolitik Enzim Üretimi**

### ***Production of Amilolytic Enzyme from Streptomyces sp. Strains***

**Kadriye ÖZCAN\*<sup>a</sup>, Cengiz ÇORBACI<sup>b</sup>**

*Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 28200, Giresun*

• Geliş tarihi / Received: 06.05.2017 • Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 22.12.2017 • Kabul tarihi / Accepted: 31.12.2017

#### **Öz**

Amilaz enzimi, amilolitik aktiviteden sorumlu bir enzimdir ve bu aktiviteyi nişastayı glukozaya parçalayarak gerçekleştirmektedir. Amilazların, birçok endüstride yoğun olarak kullanılmasından dolayı bu çalışmada, Karadeniz deniz sediment örneğinden izole edilen iki aktinomiset suşunun amilaz enzimi üretme kapasiteleri ve üretilen enzimlerin optimum aktivite koşulları ile pH ve sıcaklık stabiliteyi araştırılmıştır. Bu kapsamda, enzim ekstratlarının maksimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık değerleri saptanmış ve en yüksek aktivite koşullarının pH 7.0 ile 37°C olduğu bulunmuştur. Bunların yanı sıra, her iki organizma tarafından üretilen amilaz enzimlerinin, pH 2-10 ve 20-70°C değerleri arasında geniş bir stabiliteye sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bulgular ışığında, bu organizmaların endüstriyel kullanımlar için birer potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Amilolitik aktivite, Stabilite, *Streptomyces*

#### **Abstract**

Amylase is an enzyme responsible for amilolytic activity and this activity is accomplished by digesting starch to glucose. Due to the intensive use of amylases in numerous industries, in the present research, we determined the amylase enzyme production capacities of two actinomycetes strains isolated from marine sediments of Black Sea and the optimum activity conditions, and pH and temperature stabilities of the enzymes produced were investigated. In this context, maximal pH and temperature values of enzymes extracts were determined and the highest activity conditions were found to be pH 7.0 and 37°C. Also, amylase enzymes produced by both organisms were found to have wide range stability between pH 2-10 and 20-70°C. In the light of these findings, it is thought that these organisms have potential for industrial usage.

**Keywords:** Amilolytic activity, Stability, *Streptomyces*

\*<sup>a</sup> Kadriye ÖZCAN; kadriye.ozcan@giresun.edu.tr; Tel: (0454) 310 17 40; orcid.org/0000-0002-4913-6035

<sup>b</sup> orcid.org/0000-0001-8697-0945

## 1. Giriş

Son yıllarda, organik sentez, klinik analiz, farmasötikler, deterjanlar ve gıda üretimi gibi çeşitli alanlardaki uygulamalarından ötürü hidrolitik enzimlere karşı yoğun bir ilgi bulunmaktadır. Enzimler, çeşitli endüstriyel süreçlerde kullanılan kimyasallara güçlü bir alternatif teşkil etmektedir. Enzimlerin reaksiyon spesifitesi, minimum yan ürün oluşumunu sağlamakta ve bu nedenle enzim uygulamaları, çevre sağlığı için minimal düzeyde risk oluşturmaktadır (Bisht vd., 2013).

Amilazlar, kompleks polisakkaritlerin  $\alpha$ -1,4-glukosidal bağlarını koparan nişasta parçalayıcı enzimlerdir (Pandey vd., 2000; Reddy vd., 2003) ve gıda, fermentasyon, tekstil, kağıt, deterjan ile farmasötik endüstrilerinde potansiyel uygulamalara sahiptirler (Tonkova, 2006; Souza ve Magalhaes, 2010; Yalçın ve Çorbacı, 2013). Günümüzde, Dünya'daki enzim üretiminin yaklaşık olarak %30'unu bu enzim gurubu oluşturmaktadır (Vander vd., 2002). Mikroorganizmalarda, alfa-amilaz ve glukoamilaz olarak isimlendirilen iki amilaz sınıfı bulunmakta ve amilazların hem sabit hem de çalkalamalı koşullar altında katı (Ramachandran vd., 2004) ve sıvı ortamlarda (Francis vd., 2003) mikrobiyal üretimleri konusunda kayda değer bilgiler bulunmaktadır. Mikrobiyal amilazlar, kimyasal hidrolize karşı bir alternatif oluşturmaktadırlar ve enzim üretimi konusundaki düşük verim her zaman amilazların ticari üretiminde sorun teşkil etmektedir.

Mikroorganizmalar, kısa sürede yüksek verim ile üretim yapma ve termostabilite gibi çeşitli teknolojik avantajlarından dolayı endüstriyel enzim ihtiyacını karşılamak için başvurulan ilk kaynaklardan bir tanesidir (Godfrey ve West, 1996). Endüstriyel olarak amilaz enzimi, bakteriler ve funguslar tarafından yoğun bir şekilde üretilmektedir; *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus halobius* gibi organizmalar iyi birer amilaz üreticisi olarak bilinmektedir. Bununla beraber, bitki ve hayvanlar ile bazı aktinomisetler de endüstriyel amilaz üreticisi konaklar olabilmektedir (Hoque vd., 2006; Kar ve Ray, 2008). Aktinomisetler karasal organizmalar olarak bilinmelerine rağmen tatlı sulardan deniz sedimentlerine, organik materyal kompostlarından canlı bitkiler ve diğer organizmalara kadar uzanan geniş bir yelpazede doğal olarak yaşam göstermektedirler (Gonzalez vd., 2005). Aktinomisetler, özellikle de

*Streptomyces* cinsi, sekonder metabolit üretim kapasitesi yüksek organizmalar olarak bilinmekte ve bilinen antibiyotiklerin üreticileri olarak funguslardan sonra ikinci sırada yer almaktadırlar. Bu sebeple aktinomisetler üzerine yapılmış çalışmaların çoğu antibiyotik keşfi ve üretimi üzerine yoğunlaşsa da birçok deneysel çalışmada aktinomisetlerin amilaz, selülaz, kitinaz gibi pek çok hücre dışı enzimleri de etkin bir şekilde ürettikleri belirlenmiştir (Suriya vd., 2016).

Mikrobiyal kaynaklı amilazlar, nişastanın kimyasallarla parçalanmasına alternatif olarak kullanılma potansiyeline sahip olması nedeniyle değerlidir (Shaw vd., 1995). Bu nedenle farklı kaynaklardan enzimlerin izolasyonu ile ilgili çalışmalar önem arz etmekte ve enzim üretim kapasitesi yüksek olan mikroorganizmaların keşfedilmesi konusunda yoğun bir istek bulunmaktadır (Yalçın vd., 2014).

Bu çalışmada, Karadeniz deniz sedimentlerinden izole edilmiş iki *Streptomyces* suşunun amilaz enzimi üretim koşulları ve stabiliteilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1. Organizmalar

Bu çalışmada, Karadeniz sediment örneklerinden daha önceden izole edilmiş ve moleküler olarak tanımlanmış iki aktinomiset suşu (*Streptomyces* sp. K22 ve K30) kullanılmıştır. Organizmalara ait NCBI kayıt numaraları sırası ile KX674565 ve KX674567'dir. Organizmalar, çalışma boyunca +4°C'de aktinomiset izolasyon agar (AİA) ortamında muhafaza edilmiştir.

### 2.2. Amilaz Aktivite Tarama ve Büyüme Kinetikleri

Aktinomisetlerin amilaz enzimi üretim kapasiteleri, katı nişasta besiyeri (g/L: nişasta, 20; maya özütü, 3; pepton, 5; NaCl, 10 ve agar, 20, pH 7.0) içeren petrilere incelenmiştir. 28°C'de 4 günlük inkübasyondan sonra, petrilere lügol solüsyonu (Gram iyodür solüsyonu: %0.1 I<sub>2</sub> ve %1.0 KI) ile boyanmış ve koloni etrafında açık zon oluşumunun gözlenmesi, bu suşların amilaz enzim üreticileri olduklarını göstermiştir (Yalçın ve Çorbacı, 2013).

İnkübasyon zamanının amilaz enzim üretimi ve büyüme üzerine etkisinin incelenmesi için her iki aktinomiset suşu, 250 ml erlen içerisinde hazırlanmış sıvı nişasta besiyerine [g/L: nişasta,

10; maya özütü, 3; pepton, 5; NaCl, 3 ve MgSO<sub>4</sub>, 0.5, pH 7.0 (Deljou ve Arezi, 2016)] süspansiyon edilmiş ve erlenler 28°C'de 9 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında her gün fermentasyon sıvısından örnek alınmış ve fermentasyon sıvısı 14000 rpm'de santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısmı amilaz aktivite tayininde kullanılmıştır. Santrifüj sonrası çöken pellet kısmı ise 55°C'de 1 gün kurutulduktan sonra kültür ortamının litresi başına kuru biyokütle olarak kullanılmıştır (Bhasin ve Modi, 2012).

### 2.3. Enzim Üretimi

Hücre dışı amilaz, batık kültür fermentasyon tekniği ile üretilmiştir (Jadoon vd., 2014; Raplong vd., 2014). İlk olarak, aktinomiset suşlarının kullanılan besiyerine adaptasyonu için iki aktinomiset suşu, 100 ml erlen içerisinde hazırlanmış 25 ml sıvı nişasta besiyerine süspansiyon edildikten sonra erlenler 28°C ve 120 rpm'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, enzim üretimi için kullanılacak taze besiyerinin %5'i olacak şekilde bu fermentasyon sıvısından alınan hücre süspansiyonu, 250 ml erlen içerisinde hazırlanmış 50 ml taze besiyerine aşılanmıştır. Erlenler, 28°C ve 120 rpm'de 4 gün inkübe edildikten sonra hücrelerden arındırma için fermentasyon sıvısı, +4°C ve 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve hücre içermeyen kültür sıvısı sonraki denemeler için kullanılmıştır.

### 2.4. Aktivite ve Total Protein Tayini

Amilaz enzimi aktivite tayini, Rick ve Stegbauer (1974) tarafından önerilen metot modifiye edilerek spektral yöntemle belirlenmiştir. Kısaca, 0.5 ml örnek, 0.5 ml %1 nişasta solüsyonu ile muamele edilmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübasyondan sonra 1 ml dinitrosalisilik asit (DNS; 500 mg 3,5-Dinitrosalisilik asit ve 15 g sodyum potasyum tartarat, 10 ml 2 M NaOH içerisinde çözündürülmüş ve solüsyon distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır) reaktifi ilave edilmiştir. Tüpler, kaynayan su içerisinde 5 dakika inkübe edilmiş, sonrasında tüplerin oda sıcaklığına düşmesi beklenmiş ve her bir tüpe 8 ml distile su ilave edilmiştir. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 546 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü alınmış ve maltoz standardı kullanılarak elde edilen absorbans değerleri mg maltoza dönüştürülmüştür. Bir amilaz enzim birimi, belirtilen koşullar altında dakikada çözünmüş nişastanın 1.0 mg maltoza dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Örnekleredeki total protein içeriği, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976).

### 2.5. Optimum Aktivite Koşullarının Belirlenmesi

*pH'nin Aktivite Üzerine Etkisinin Saptanması.* Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri pH koşullarını saptamak için önce nişasta solüsyonu farklı pH değerlerindeki tamponlarda çözündürülmüş ve aktivite ölçümü yukarıda belirtilen şekilde 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için, 0.1 M sitrik asit-sodyum sitrat tamponu (pH 5.5 ve 6.0), 0.1 M sitrat fosfat tamponu (pH 6.5 ve 7.0) ve 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 7.5 ve 8.0) kullanılmıştır (Yassien ve Asfour, 2012; Deljou ve Arezi, 2016).

*Sıcaklığın Aktivite Üzerine Etkisinin Saptanması.* Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık koşullarını saptamak için nişasta solüsyonu 0.1 M sitrat fosfat tamponunda (pH 7.0) çözündürülmüş ve yukarıda belirtilen şekilde aktivite ölçümü farklı sıcaklıklarda (25, 30, 37, 40, 50 ve 60°C) gerçekleştirilmiştir (Yassien ve Asfour, 2012; Deljou ve Arezi, 2016).

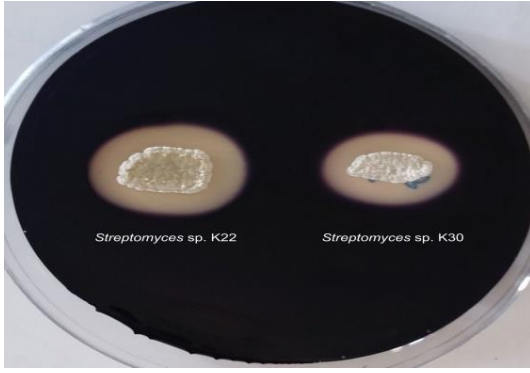
### 2.6. Stabilite

*pH Stabilitesinin Belirlenmesi.* Farklı pH derecelerinde amilaz enzim stabilitesinin değerlendirilmesi için fermentasyon sıvıları, uygun miktarda 0.2 M HCl ve 1 M NaOH ilave edilmesi ile 3.0-10.0 arasında değişen pH derecelerine ayarlanmış ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası aktivite, yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Yassien ve Asfour, 2012; Deljou ve Arezi, 2016).

*Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi.* Amilaz enzimlerinin sıcaklık stabilitesinin saptanması için fermentasyon sıvıları, 2 saat boyunca 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C'de inkübe edilmiş ve aktivite, yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Yassien ve Asfour, 2012; Deljou ve Arezi, 2016).

## 3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmamızda, sediment örneklerinden izole edilmiş *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşlarının amilaz enzimi üretilip üretmedikleri nişasta içeren katı besiyerinde incelenmiş ve 28°C'de 4 günlük bir inkübasyon sonrasında her iki suşun da önemli bir hidroliz zonu oluşumuna sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1). Böylelikle, her iki aktinomiset suşu daha sonraki denemelere alınmıştır.



**Şekil 1.** Aktinomiset suşları amilaz aktivitelerinin petride görünümü.

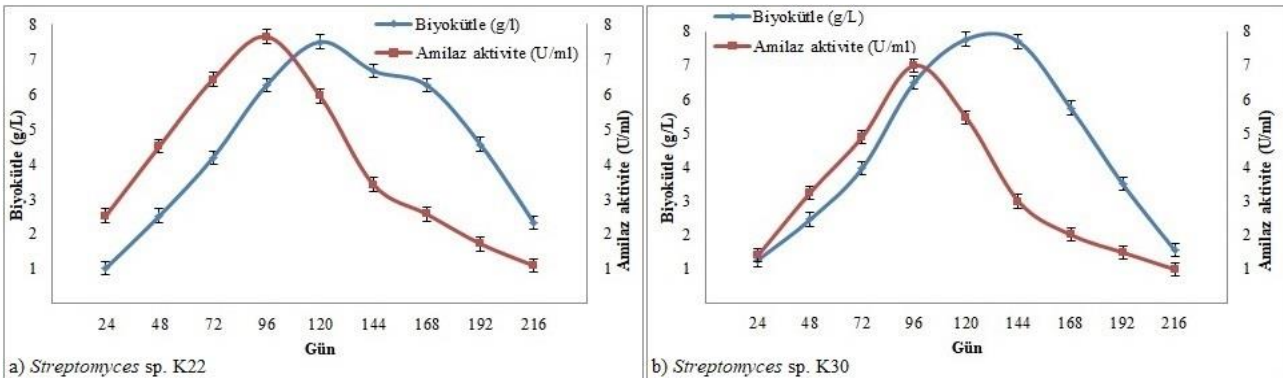
*Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşlarının kullanılan enzim üretim besiyerinde göstermiş oldukları büyüme kinetikleri, Şekil 2’de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, enzim üretiminin en iyi 4 günlük bir inkübasyon sonrasında gerçekleştiği saptanmıştır.

Batık kültür fermentasyon tekniği ile çalkalamalı olarak 28°C’de 4 günlük bir inkübasyon sonucunda elde edilen kültür sıvıları ilk olarak santrifüj işlemine tabi tutularak hücrelerden arındırılmış ve hücre içermeyen sıvılar ham enzim preparatları olarak değerlendirilmiştir. Enzim preparatlarının amilaz aktiviteleri, metot kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiş ve sonuçta *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşları sırası ile 7.65 ve 6.99 U/ml aktivite göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlar çeşitli literatürler ile karşılaştırıldığında, denememizde kullandığımız organizmaların oldukça iyi birer amilaz üreticileri oldukları göze çarpmaktadır. Örneğin, Raplong ve arkadaşları (2014) tarafından *Bacillus cereus* türü kullanılarak batık kültür fermentasyon tekniği ile gerçekleştirilen bir amilaz enzimi üretim çalışmasında araştırmacılar, en yüksek üretim koşullarının pH 6.5 ve 35°C olduğunu bulmuşlar ve neticesinde 2.46 U/ml enzim aktivitesi elde

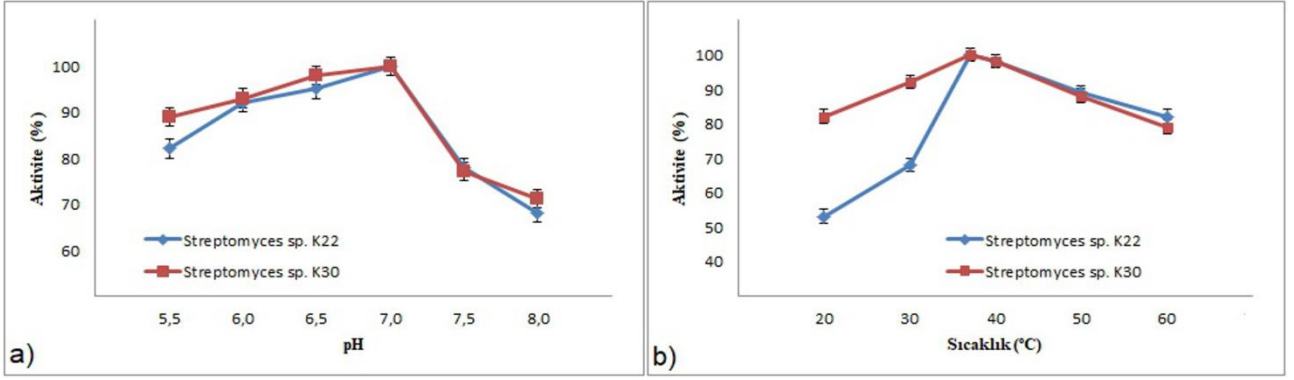
etmişlerdir. Yine aynı şekilde, Tang-um ve Niamsup (2012) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, endofitik *Streptomyces griseoflavus* P4 şusu ile hücre dışı amilaz enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve optimizasyon çalışmaları sonucunda araştırmacılar yaklaşık olarak 1.8 U/ml aktivite değerine ulaşabilmişlerdir.

Amilaz aktivitesinin optimal koşullarının değerlendirilmesi için denemeler farklı pH ve sıcaklık derecelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için ilk olarak, sıcaklık değeri sabit tutulmuş, nişasta solüsyonu farklı pH derecelerine sahip tamponlarda çözündürülmüş ve maksimum aktivite saptanmıştır. Sonuçta, 37°C’de pH 5.5 ile 8.0 arasında amilaz aktivitesinin olduğu belirlenmiş ve en yüksek aktivite pH 7.0’da gözlenmiştir (Şekil 3a). Daha sonra, pH 7.0 değeri sabit tutulup farklı sıcaklık derecelerinin aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. Yine, denenen bütün sıcaklık değerleri altında amilaz aktivitesi gözlenmiş olup, en yüksek aktivite 37 ila 40°C’de saptanmıştır (Şekil 3b).

Elde edilen optimal koşullar literatür verileri ile karşılaştırıldığında, sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Tang-um ve Niamsup (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada araştırmacılar, *Streptomyces griseoflavus* P4 şusu için maksimal aktivite koşullarının 40°C ve pH 7.0 olduğunu bulmuşlardır. Yine aynı şekilde Hoque ve arkadaşları (2006) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, *Streptomyces clavifer* türü tarafından amilaz aktivite koşulları araştırılmış ve sonuçta, optimum pH ve sıcaklık değerinin sırası ile 7.0 ve 45°C olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar, optimum koşullar altında en yüksek aktivitenin yaklaşık olarak 4.0 U/ml değerine karşılık geldiğini belirtmişlerdir.



**Şekil 2.** İnkübasyon süresinin enzim üretimi ve biyokütle üzerine etkisi

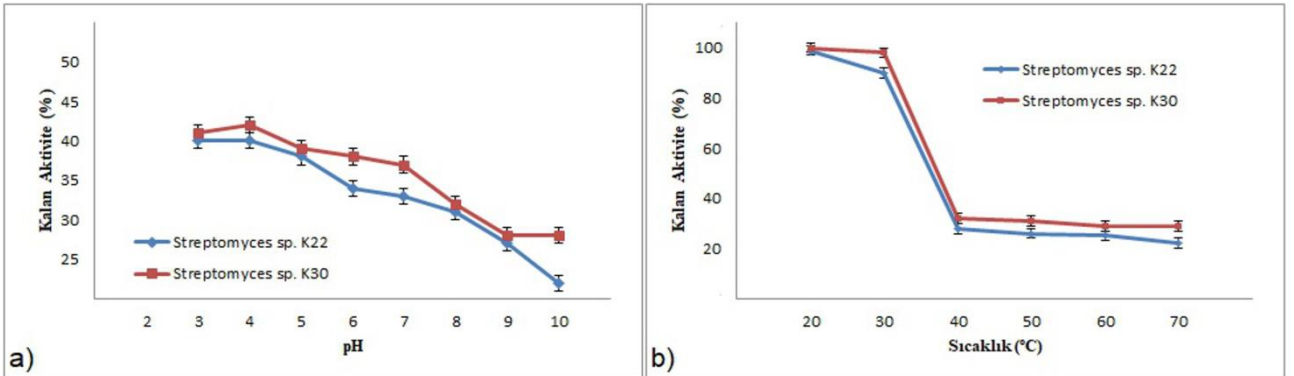


Şekil 3. (a) pH ve (b) sıcaklığın amilaz aktivitesi (%) üzerine etkisi

Çalışmamızın son kısmı, enzim preparatımızın çeşitli pH ve sıcaklık değerlerine karşı göstermiş oldukları stabilitenin saptanmasını içermektedir. Bu amaç doğrultusunda, HCl ve NaOH solüsyonları kullanılarak fermentasyon sıvıları arzu edilen pH değerlerine getirilmiş ve 2 saat 37°C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda aktivite analizi, optimum koşullar altında gerçekleştirilmiş ve her iki suş tarafından üretilen amilaz enzimlerinin geniş bir pH aralığında (pH 3.0-10.0) belirli oranlarda stabil kalabildikleri saptanmıştır (Şekil 4a). Benzer şekilde, farklı sıcaklık değerlerinde 2 saatlik bir inkübasyon sonucunda elde edilen sonuçlar göstermiştir ki her iki suş tarafından üretilen amilaz enzimi geniş bir sıcaklık aralığında da stabil kalabilmektedir (Şekil 4b). Burada önemli bir ayrıntı, pH stabiliteilerinin aksine her iki suş tarafından üretilen enzimler, 20 ve 30°C'de 2 saatlik inkübasyon sonucunda neredeyse hiç aktivite kaybına uğramamışlardır.

Literatürde stabilite çalışmaları ile ilgili birçok farklı yöntem ve sonuç bulunmaktadır. Çalışmamıza benzer şekilde gerçekleştirilmiş çalışmalar değerlendirildiğinde, nispeten benzer sonuçların elde edildiği, bazı durumlarda ise elde ettiğimiz enzimlerin stabiliteilerinin literatüre kıyasla daha iyi oldukları görülmektedir. Örneğin,

Yang ve Wang (1999) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Streptomyces rimomus* suşu proteaz ve amilaz enzimlerinin batık ve katı kültürde üretimleri ve stabiliteileri incelenmiştir. Araştırmacılar, amilaz enzimi için 60 dakikalık bir inkübasyon periyodu belirlemişler ve 40, 50, 60 ve 70°C'de stabilite denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Bir saatlik bir inkübasyon sonucunda, 40 ve 50°C'de sırasıyla yaklaşık olarak %20 ve 75 oranında bir aktivite kaybının meydana geldiği gözlemlenmiş ve 60 ila 70°C'de ise aktivitenin 20-30 dakikalık bir inkübasyon sonucunda tamamen kaybolduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, Kaneko ve arkadaşları (2005) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, değirmen fabrikasından izole edilmiş *Streptomyces* sp. suşundan amilaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve araştırmacılar enzimin pH stabilitesini de incelenmişlerdir. Farklı pH değerlerinde 50°C'de 1 saatlik bir inkübasyon sonucunda aktivite tayini gerçekleştirilmiş ve sadece pH 6.0 civarında %100'e yakın bir aktivite gözlenmiştir. Onun dışında kalan değerlerden sadece pH 5.0'de hala kayda değer bir aktivite gözlenirken, diğer pH değerlerinde %80'e varan kayıplar dikkat çekmektedir.



Şekil 4. (a) pH ve (b) sıcaklığın amilaz stabilitesi (%) üzerine etkisi

#### 4. Sonuç

Yeni enzimlerin keşfedilmesinde en etkili ve başarılı metotlardan bir tanesi, doğal habitatlardan mikroorganizmaların izolasyonu ve endüstriyel enzim üretimleri açısından araştırılmalarıdır. Bu yüzden, arzu edilen bir metabolitin üretimindeki anahtar basamaklardan bir tanesi, biyoteknolojik öneme sahip olan suşun seçimidir. Enzimler arasından amilazlar, yıllar boyunca hem bilim adamları hem de endüstriyel araştırmacılar tarafından yoğun ilgi görmüşlerdir. Mevcut çalışma, bu açıdan önem arz etmektedir. Araştırmamızda kullanılan *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşlarının amilaz enzimi aktivite ve stabilite sonuçları bir bütün halinde değerlendirildiğinde, bu organizmalar yüksek oranda enzim üretimine sahiptirler. Ayrıca, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında hem aktivite hem de stabilite gösterebilmektedirler. Bu açıdan, bu organizmaların endüstriyel olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: FEN-BAP-A-220413-59 ve FEN-BAP-A-140316-79) tarafından desteklenmiştir.

#### Kaynaklar

Bhasin, S. ve Modi, H.A., 2012. Optimization of fermentation medium for the production of glucose isomerase using *Streptomyces* sp. SB-P1. *Biotechnology Research International*, 1-10.

Bisht, D., Yadav, S.K. ve Darmwal, N.S., 2013. An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *P. aeruginosa* mutant: downstream processing and biochemical characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (4), 1305-1314.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), 248-254.

Deljou, A. ve Arezi, I., 2016. Production of thermostable extracellular  $\alpha$ -amylase by a moderate thermophilic *Bacillus licheniformis*-AZ2 isolated from Qinarje Hot spring (Ardebil prov. of Iran). *Periodicum Biologorum*, 118 (4), 405-416.

Francis, F., Sabu, A., Namkpothiri, K.M., Ramachandran, S., Ghosh, A., Szakacs, G. ve Pandey, A., 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Engineering Journal*, 107, 115-119.

Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to industrial enzymology. *Industrial Enzymology*. Godfrey, T. ve West, S. (eds.), 2nd Edition, Stockton Pres, New York, pp.1-8.

Gonzalez, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. ve Genilloud, O., 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 401-415.

Hoque, M.M., Khanam, M. ve Sheekh, M.A., 2006. Characterization and optimization of alpha amylase activity of *Streptomyces clavifer*. *Pakistan journal of Biological Sciences*, 9 (7), 1328-1332.

Jadoon, M.A., Ahmad, T., Rehman, M.M.U., Khan, A. ve Majid, A., 2014. Optimization of the conditions for submerged fermentation (SMF) of the *Thermoactinomyces sacchari* isolated from azad jammu and kashmir pakistan to produce maximum amylase enzyme. *Global Veterinaria*, 12 (4), 491-498.

Kaneko, T., Ohno, T. ve Ohisa, N., 2005. Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (6), 1073-1081.

Kar, S. ve Ray, R.C., 2008. Statistical optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Polish Journal of Microbiology*, 57 (1), 49-57.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V.T. Singh, D. ve Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152.

- Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C.R. ve Pandey, A., 2004. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian Archive of Biology Technology*, 47, 309-317.
- Raplong, H.H., Odeleye, P.O., Hammuel, C., Idoko, M.O., Asanato, J.I. ve Odeke, E.H., 2014. Production of alpha amylase by *Bacillus cereus* in submerged fermentation. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 3 (3), 124-130.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A. ve Sambasiva Rao, K.R.S., 2003. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 645-648.
- Rick, W. ve Stegbauer, H.P., 1974.  $\alpha$ -amylase measurement of reducing groups. *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H.U. (ed.), Academic Press, New York, pp. 55-56.
- Shaw J.F., Lin F.P., Chen S.C. ve Chen H.C., 1995. Characterization and optimization of amylase producing bacteria isolated from solid waste. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 36, 195-200.
- Souza, P.M. ve Magalhaes P.O., 2010. Application of microbial amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4), 850-861.
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Manivasagan, P. ve Kim, S. K., 2016. Enzymes from rare actinobacterial strains. *Advances in Food and Nutrition Research*. Se-Kwon, K. ve Fidel, T. (eds.), Volume 79, Academic Press, pp. 67-98.
- Tang-um, J. ve Niamsup, H., 2012. Extracellular amylase activity from endophytic *Streptomyces griseoflavus* P4. *Chiang Mai Journal of Science*, 39 (2), 346-350.
- Tonkova, A., 2006. Microbial starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Microbial Biotechnology in Horticulture*. Ray, C.R. ve Words, O.P. (eds.), Volume 1, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, pp. 421-472.
- Vander, M.M., Vander, V.B., Clitehaag, J.C.M., Leemuhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and application of starch converting enzymes of the alpha amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 37-55.
- Yalçın, H.T. ve Çorbacı, C., 2013. Isolation and characterization of amylase producing yeasts and improvement of amylase production. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38 (1), 101-108.
- Yalçın, H.T., Çorbacı, C. ve Uçar, F.B., 2014. Molecular characterization and lipase profiling of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 85-92.
- Yang, S-S. ve Wang, J-Y., 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40, 259-265.
- Yassien, M.A.M. ve Asfour, H.Z., 2012. Improved production, purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces clavifer*. *African Journal of Biotechnology*, 11(80), 14603-14611.