

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI FAZ FERMENTASYONU (KSF) TEKNİĞİ İLE *Bacillus subtilis* ATCC6051'DEN α -AMİLAZ ÜRETİMİ

Yusuf ÖNEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Temmuz 2011

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Yusuf ÖNEN tarafından yapılan “*Katı Faz Fermantasyon (KSF) Tekniği ile Bacillus subtilis ATCC6051’den α -Amilaz Üretimi*” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Veysel TOLAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 30 / 06 / 2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

..../ 07 /2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü müdürü

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma Dicle Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, sayın hocam Doç. Dr. Fikret UYAR danıŐmanlıđında yapılmıŐtır. ÇalıŐmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemediğinden dolayı kendilerine sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca bilgi ve tecrübesiyle laboratuvar çalıŐmalarımnda bana yol gösteren, sabırlı dikkatiyle destek olan, aynı zamanda ikinci tez danışman hocam Sayın. Yrd. Doç. Dr. Nurullah AKCAN'a teŐekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıŐmalarım sırasında gerekli imkanları sağlayarak desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL'a teŐekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıŐmalarımnda bana yardımcı olan yüksek lisans arkadaŐım Sedat KAYA ve laboratuvar arkadaşlarım BarıŐ ENEZ, Mehmet KAZAYLEK'e teŐekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca çalıŐmam boyunca sağladıkları manevi katkılarından, Bitlis Devlet Hastanesinde biyolog olarak çalıŐmakta olan değerli dostum Abdulhakim KAMÇI'ya ve Biyoloji Öğretmeni Seda TAMAN'a teŐekkürlerimi sunarım.

Yoğun alıŐma sürecimde her zaman yanımda olan ve bana her türlü desteği veren sevgili aileme en içten duygularımıla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
KISALTMA VE SİMGELER.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. α -Amilaz.....	1
1.2. Nişasta.....	4
1.3. Nişastayı Parçalayan Enzimler.....	6
1.4. Katı Faz Fermantasyon (Solid State Fermentation; SSF).....	7
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
2.1. Genel Bilgiler.....	9
2.2. α -Amilazların Endüstrideki Kullanım Alanları.....	11
2.2.1. Ekmekçilikte ve İçecek Endüstrisinde α -amilazın Kullanımı.....	11
2.2.2. α -Amilazın Nişastanın Sıvılaştırılmasında ve Şekerlemede Kullanımı.....	12
2.2.3. α -Amilazın Tekstil Endüstrisinde Kullanımı.....	12
2.2.4. α -Amilazın Kağıt Endüstrisinde Kullanımı.....	13
2.2.5. α -Amilazın Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	13
2.2.6. α -Amilazın Sağlık Alanında Kullanımı.....	14
2.3. SSF'in Tarihi Gelişimi.....	14
2.4. SSF'in SmF'e Göre Avantajları, Dezavantajları.....	17
2.5. SSF'te Dikkat Edilecek Hususlar.....	18
2.5.1. Mikroorganizma Seçiminin Önemi.....	18

2.5.2.	Nem içeriği ve Su Aktivitesinin Önemi.....	19
2.5.3.	pH'nın Önemi.....	19
2.5.4.	Sıcaklığın Önemi.....	19
2.5.5.	Ekim(İnokülüm) Miktarının Önemi.....	20
2.5.6.	Substrat Seçimi Önemi.....	20
2.5.7.	Substratın Partikül Büyüklüğünün Önemi.....	21
2.5.8.	Karbon /Azot Kaynağı Oranı Önemi.....	21
2.6.	<i>Bacillus subtilis</i>	21
2.7.	Önceki Çalışmalar.....	22
3.	MATERYAL ve METOT	29
3.1	Biyolojik Materyal.....	29
3.2	Kimyasal Maddeler.....	29
3.2.1.	Azot Kaynakları.....	29
3.2.2.	Karbon Kaynakları.....	29
3.2.3.	Metal İyonları.....	29
3.2.4.	Deterjanlar.....	29
3.3.	Besi yerleri.....	29
3.3.1.	Katı Besi yeri.....	29
3.3.2.	Sıvı Besi yeri.....	30
3.3.2.1.	Nutrient Broth (NB) Besi yeri.....	30
3.3.2.2	Luria Broth (LB) Besi yeri.....	30
3.3.3.	SSF Besi yeri.....	30
3.4.	Çözeltiler.....	30
3.4.1.	Tampon Çözelti.....	30
3.4.2.	Nişastanın Hazırlanması.....	30
3.4.3.	Alkalin Çözeltisi.....	31
3.4.4.	Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması.....	31

3.5.	Kullanılan Cihazlar.....	31
3.6.	Bakteri Üretimi.....	32
3.7.	SSF Besi yerinden Enzim Üretimi.....	32
3.8.	Enzim Aktivite Tayini.....	32
3.8.1.	α -Amilaz Enzim Aktivite Tayini.....	32
3.8.2.	Protein Miktar Tayini.....	33
3.9.	Enzimlerin Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi.....	33
3.9.1.	Optimum Substratın Saptanması.....	33
3.9.2.	Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	33
3.9.3.	Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması.....	33
3.9.4.	Optimum Ekstraksiyon Ortamının Saptanması.....	33
3.9.5.	Başlangıç pH'nın Saptanması.....	34
3.9.6.	Optimum Aktivite Sıcaklığının Saptanması.....	34
3.9.7.	Uygun Ekim Miktarının Saptanması (İnokülüm Hacmi).....	34
3.9.8.	Uygun Substrat (Nem) Miktarının Saptanması	34
3.9.9.	En İyi Aktivite Gösteren Substratların Saptanması.....	34
3.9.10.	En İyi Enzim Aktivitesi için Çalkalama Hızının Saptanması.....	35
3.9.11.	Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi.....	35
3.9.12.	Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi.....	35
3.9.13.	Enzim Üretimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi.....	35
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1.	Enzim Üretimi Üzerine Substratın Etkisine Ait Sonuçlar.....	37
4.2.	Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızına Ait Sonuçlar.....	39
4.3.	Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisine Ait Sonuçlar.....	40
4.4.	Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi.....	42
4.5.	Enzim Üretimi İçin Ekstraksiyon Ortamının Belirlenmesi.....	43
4.6.	Enzimin Optimum Başlangıç pH'sının Belirlenmesi.....	45

4.7.	Enzim Üretimi İçin Parça Büyüklüğünün Belirlenmesi.....	46
4.8.	Enzim Üretimi Üzerine Nem Miktarının Belirlenmesi.....	48
4.9.	Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Miktarının Belirlenmesi.....	49
4.10.	Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımlarının Etkisi.....	50
4.11.	Enzim Üretimi Üzerine Metallerin Etkisinin İncelenmesi.....	51
4.12.	Enzim Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi.....	53
4.13.	Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi.....	56
4.14.	Enzimin Optimum Termal Stabilitesinin Belirlenmesi.....	56
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
6.	KAYNAKLAR.....	63
	ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

KATI FAZ FERMENTASYONU (KSF) TEKNİĞİ ile *Bacillus subtilis* ATCC 6051'DEN α -AMİLAZ ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf ÖNEN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

En önemli enzim grubunu oluşturan amilazlar, biyoteknolojide de büyük önem kazanmaktadır. Amilazlar gıda dahil ilaç, deterjan, tekstil ve hayvan yemi gibi farklı endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir (Wang 2011).

Bu çalışmadaki amacımız Katı Faz Fermentasyon yöntemi ile *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den α -amilaz üretimi ile ilgili parametrelerin optimizasyonu ile ilgili çalışmalar yapmaktır. Enzim üretimi için en iyi inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve pH'sı belirlendi edilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH sırasıyla 50 °C ve 6.5 olarak tespit edilmiştir. Enzim için uygun inokülüm (ekim) miktarı % 30, başlangıç nem miktarı % 20 olarak tespit edilmiştir. Enzim üretimi için kullanılan substrat karışımlarından en iyi aktivite 0.5g pamuk+4.5g pirinç kabuğu karışımlarında elde edilmiştir. Enzim için en iyi ekstraksiyon medyumu çeşme suyu olarak tespit edilmiştir. Enzim üretimi için en iyi çalkalama hızı 150 rpm'de tespit edildi. Farklı azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi incelendi. Amonyum sulfat, amonyum nitrat, amonyum klorür ve malt ekstraktın enzim üretimini artırdığı, ancak kazein, pepton ve triptonun üretimi azalttığı tespit edildi. Karbon kaynaklarından ise fruktozun enzim üretimini artırmakla birlikte galaktoz ve laktozunda üretimi % 55 civarında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bazı metal tuzlarının enzim üzerindeki etkisine bakıldı. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun enzim üretimini artırdığı, ancak $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 'nun üretimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis*, α -Amilaz, Pirinç kabuğu, Biyoteknoloji, SSF

ABSTRACT

α -AMYLASE PRODUCTION FROM *Bacillus subtilis* ATCC 6051 WITH SOLID STATE FERMENTATION (SSF)

MSc THESIS

Yusuf ÖNEN

DEPARTMENT OF BIOLOGY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF DICLE

2011

Amylase are one of the most important and great significance in the present industry of biotechnology. Amylase have several different industrial applications including foods, pharmaceuticals, detergents, textile, and animal foods.

The main goal of the present study is to realize the optimization parameters of the α -amylase obtained from *Bacillus subtilis* ATCC 6051 by solid phase fermentation method.

The best incubation temperature, incubation time and pH were determined. Optimum enzyme activity. Enzyme showed optimum activity at 50 °C and pH 6.5. Amount of inoculum and initial moisture content suitable for enzyme production were found to be 30 % and 20 % respectively. The tap water was the best extraction medium. The best shaking speed for enzyme production was determined as 150 rpm. The effect of nitrogen one carbon sources on the enzyme production was examined. Ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium chloride and malt extract were increased the production of enzyme, but casein, pepton and tripton were reduced the enzyme production. Fructose as a carbon sources was enhanced the enzyme inhibited the enzyme production by 55 %. The effect of metal ions on enzyme production was also examined. It was observed that $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$ and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ were caused on increase in the enzyme production but $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ were strongly inhibited the enzyme production.

Key words: *Bacillus subtilis*, α -Amylase, Wheat Bran, Biotechnology, SSF

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	.	Sayfa
Çizelge 2.1.	Bazı enzimlerin kullanım alanları ve elde edildikleri mikroorganizmalar	10
Çizelge 2.2.	SSF'nin tarihi gelişiminin özeti	16
Çizelge 2.3.	SmF ve SSF'nin bazı önemli özellikleri ve farklılıkları	18

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1.1 α -amilazların yapı organizasyonları	3
Şekil 1.2. a-Amilazın kimyasal yapısı	5
Şekil 1.3.Amilopektinin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.4. Amilolitik enzimlerin nişastayı hidroliz şekilleri ve oluşturdukları ürünler	6
Şekil 4.1. Enzim Üretimi Üzerine Substratın Etkisi	37
Şekil 4.2. Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi	39
Şekil 4.3Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	41
Şekil 4.4. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi	42
Şekil 4.5.Enzim Üretimi İçin Ekstraksiyon Ortamının Belirlenmesi	44
Şekil 4.6. Enzimin Optimum Başlangıç pH'sının Belirlenmesi	46
Şekil 4.7. Enzim Üretimi İçin Partikül Büyüklüğünün Belirlenmesi	47
Şekil 4.8.Enzim Üretimi Üzerine Substrat (Nem)Miktarının Belirlenmesi	48
Şekil 4.9. Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm (Ekim) Miktarının Belirlenmesi	49
Şekil 4.10. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımlarının Belirlenmesi	51
Şekil 4.11. Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi	52
Şekil 4.12.1. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	54
Şekil 4.12.2. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	55
Şekil 4.13. Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi	56
Şekil 4.14. Enzimin Optimum Termal Stabilitesinin Belirlenmesi	57

KISALTMALAR ve SİMGELER

KSF:	Katı faz fermentasyonu,
SSF:	Solid State Fermentation,
SmF:	Submerged Fermentation,
WB:	Wheat Bran,
RH:	Rice Husk,
YE:	Yeast Extract,
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat,
LB:	Laura Broth,
NB:	Nutrient Broth,
DNS:	Dinitrosalisilik Asit,
FCR:	Folin Ciocalteu Reagent,
LKF:	Loquat Kernels Dried

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler; biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan bazı katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç genellikle protein yapısında olan kimyasal moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Kıran ve ark. 2006). Enzimler mikrobiyal kaynaklar aracılığıyla insan gereksinimleri için elde edilen en önemli ürünler arasında yer almaktadır. Endüstriyel, çevresel ve gıda biyoteknolojisi gibi bir çok önemli alanlarda enzimler kullanılmaktadır (Pandey ve ark. 1999). Enzimlerin küresel pazardaki payı 2004 yılında yaklaşık 2 milyar dolara ulaşmıştır. Yıllık büyüme oranının ortalama % 3.3 olması tahmin edilmektedir (Sivaramakrishnan ve ark. 2006). Enzim piyasasındaki bu hızlı artışın devam edeceği ve 2015 yılında 4 milyar doları bulacağı tahmin edilmektedir (<http://www.enzim-teknolojisi.com>). Amilazlar, izomerazlar, pektinazlar ve sellülozları içeren karbohidrazların enzim piyasasına katılım payı yaklaşık % 40'tır. Gıda ve içecek sektörlerinde karbohidraz ürünlerinin % 90'ı kullanılmaktadır (Sivaramakrishnan ve ark. 2006).

Ticari olarak kullanılan enzimlerin % 59'unu proteazlar, % 28'ini karbohidrazlar, % 3'ünü lipazlar ve % 10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren α -amilaz üretimi % 13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman 1987, Kıran ve ark. 2006).

1.1. α -Amilaz

Nişastanın hidrolizinde merkezi bir rol üstlenen amilazlar; nişastanın glikoz, maltoz, maltotrioz, oligosakkarit (alfa-limit dekstrin) ve alfa 1-6 glikozidik bağları gibi ürünlere parçalanmasını sağlayan büyük öneme sahip hidrolitik enzimlerdir (Gubta ve ark. 2003, Taniguchi ve Honnda 2009). α -Amilazlar düz amiloz molekülü ve dallanmış amilopektin molekülündeki α -1,4 glikozidik bağlarını parçalayan ekstraselüler enzimlerdir (Kandra 2003, Vishnu ve ark. 2006).

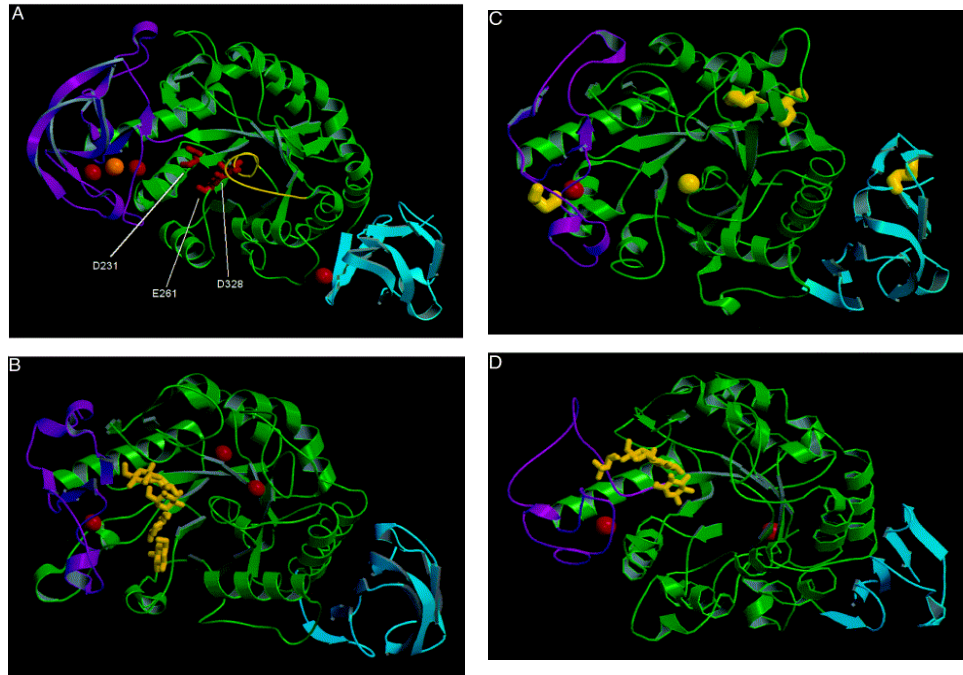
Amilazların keşfedilmesi ilk defa 1811'de Kirchoff'un nişastayı parçalayan enzimi bulması ve bunu izleyen çalışmalarda sindirim amilazları ve malt amilazlarının bulunmasıyla sürdürülmüştür (Pandey ve ark. 2000). Daha sonra 1930 yılında Ohlsson

enzim reaksiyonu sonucu meydana gelen şekerlerin anomerik formlarına göre α ve β -amilazlar şeklinde malt içindeki nişastayı parçalayan enzimleri sınıflandırmıştır (Gupta ve ark. 2003, Pandey ve ark. 2000). Amilazlar nişastadaki mevcut glikozidik bağlarını parçalama durumuna göre endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Endoamilaz (iç taraftan etkiyen) grubunda yer alan α -amilaz (E.C 3.2.1.1; α -1,4 glukon, glukonhidroksilaz) en çok kullanılan bir hidrolaz olup nişastanın linear zincirini oluşturan amiloz zinciri içindeki komşu 1,4- α -D-glukosidik bağlarını rastgele yerlerden kırar (Pandey 1999, Taniguchi ve Honda 2009). Ekzoamilaz (dış taraftan etkiyen) grubunda yer alan β -amilaz (E.C 3.2.1.2; α -1,4 glukonmalthidrolaz) nişastanın indirgen olmayan ucundan başlayarak glikozoidik bağları parçalar. α -Amilazın aksine, γ -amilaz (E.C 3.2.1.3) gibi birçok glukozamilaz α -1,4 bağlarından daha yavaş şekilde amilopektin dallanma noktasındaki α -1,6 glikozidik bağlarını da hidroliz ederler (Pandey 1999, Sivaramakrishnan ve ark. 2006, Taniguchi ve Honda 2009).

Nişasta işlenmesi için kullanılan enzimlerin global piyasadaki değeri yaklaşık olarak 156 milyon dolardır ve sıvılaştırma işleminde kullanılan enzimlerin maliyeti toplam maliyetin % 24'ünü oluşturmaktadır. Dünya pazarındaki α -amilazların yıllık satış değerinin 11 milyon Amerikan doları olduğu tahmin edilmektedir. *Bacillus licheniformis* ve *Aspergillus sp.*'den α -amilazların dünya genelindeki yıllık saf enzim protein üretimi yaklaşık 300 tondur (Sivaramakrishnan ve ark. 2006). Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar dahil birçok kaynaktan elde edilmelerine karşın, endüstriyel amilazlar genellikle mikroorganizmalardan sağlanmaktadır. (Pandey ve ark. 2000, Gupta ve ark. 2003, Shaifei ve ark. 2010). Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmeleri, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları, daha az zaman gerektirmesi gibi birçok avantaja sahip olmasıdır (Wiseman 1987, Horikoshi 1999, Kıran ve ark. 2006). Bu mikroorganizmalar seçilirken enzim üretimlerinin yanında aynı zamanda toksik ve patojen olmamasına da dikkat edilmelidir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Kıran ve ark. 2006). *Bacillus* cinsine ait bakteriler, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldolyticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus acidocaldarius* ve

Bacillus thermoamyloliquefaciens termostabil α -amilazların ticari üretimleri için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Sivaramakrishnan ve ark. 2006, Couto ve ark. 2006, Vazquez ark. 2009).

Eğer enzimler uygun şekilde hazırlanırsa, mikrobiyal amilazlardan farmakoloji ve saf-kimyasal endüstrilerinde yararlanılabilir. Biyoteknolojide yeni ufukların ortaya çıkmasıyla beraber amilaz uygulamaları nişastanın şekerleştirilmesi kadar, kliniksel, tıbbi ve analitik kimya alanlarında, tekstil, kağıt, gıda, bira yapımı ve saflaştırma endüstrileri gibi diğer birçok alanda da artmıştır (Crabb ve ark. 1997, Pandey ve ark. 2000, Gouda ve Elbahloul 2008). Yeni özelliklere sahip amilolitik enzimleri keşfetmek için biyoteknolojide yeni metotlara ihtiyaç vardır. Termostabil (Kunamneni ve ark., 2005), nişastayı doğal olarak hidroliz eden (Wijbenga ve ark. 1991), halotolerant (Chessa ve ark., 1999) ve alkalın amilazlardan birçoğu endüstriyel uygulamalarda aktif olduklarından bu enzimlere olan ilgi fazladır (Pandey ve ark. 2000, Gouda ve Elbahloul 2008, Shaifei ve ark. 2010).

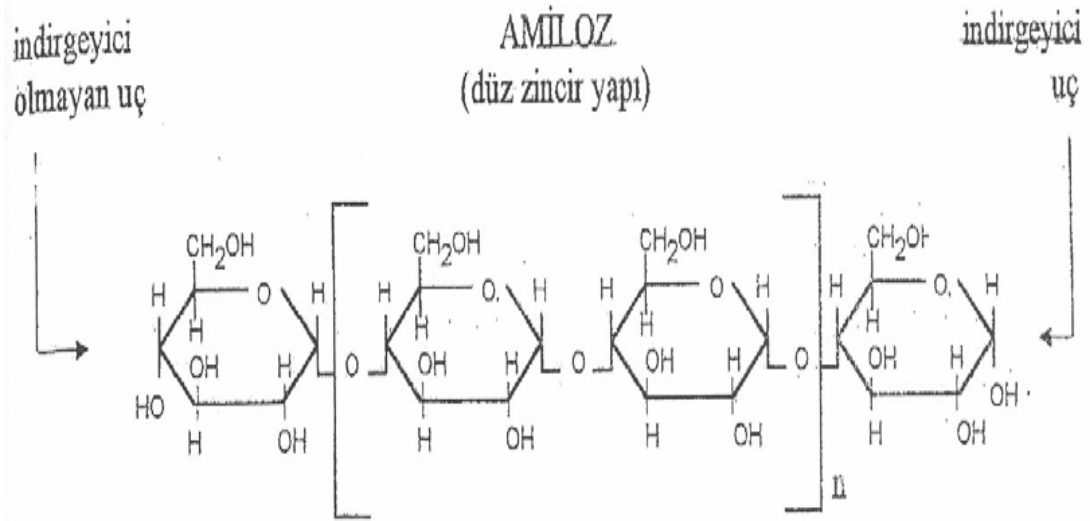


Şekil 1.1 α -amilazların yapı organizasyonları. A bölgesi yeşil, B bölgesi morumsu ve C bölgesi ise turkuaz renkleri ile belirtilmiştir. Kırmızı olan küreler kalsiyum ve turuncu olan küreler sodyum iyonlarını göstermektedir. (A) *Bacillus licheniformis* α -amilaz (PDB:1BLI). Aktif merkezde bulunan Asp231, Glu261 ve Asp328 amino asitleri kırmızı renkte görülmektedir. Sarı renkte gösterilen bölge lobun $\beta 7'$ den $\alpha 7'$ ye kadar olan bağlanmasını ifade eder. (B) *Bacillus subtilis* α -amilaz (PDB:1BAG). Sarı

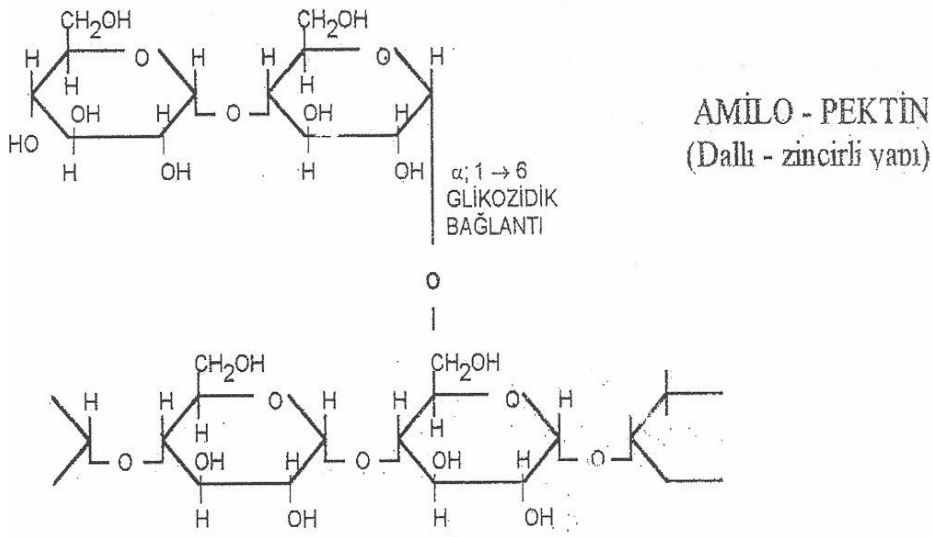
ile gösterilen yerler aktif bölgelere bağlanan maltopentoz'u göstermektedir. (C) *Alteromona haloplanctis* α -amilaz (PDB: 1AQH). Sarı yerler dört tane disülfid bağlarını ve klorid iyonunu göstermektedir. (D) *Pseudomonas stutzeri*'den elde edilmiş maltotetroz formundaki α -amylase (PDB:1JDC aktif bölgesine bağlanmış maltotetroz). Bu şekiller Molscript ve Raster 3D programları ile hazırlanmıştır (<http://www.avatar.se/molscript/>; Nielsen ve ark. 2000; <http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/>) Amilazların etki bölgelerinin gösterimi.

1.2. Nişasta

Nişasta amiloz (başlıca α -1,4 bağları içeren D-glukoz üniteleri) ve amilopektin (hem α -1,4 hem de α -1,6 D-glukoz üniteleri bağlanmalarını içeren) olmak üzere başlıca iki bileşenden oluşur. En çok bulunan polisakkaritlerden biri olan nişasta bitkiler tarafından üretilir ve yüksek moleküler ağırlığa sahip amiloz (%15-25) ve amilopektin (%75-85)'den meydana gelirler. Yüksek derecede amiloz içeren nişastalar düşük ortalama polimerizasyona sahiptirler (Muralikrishna ve Nimala 2005). Amiloz linear zincirdeki glukoz ünitelerinin alfa oryantasyonu ile C-1 ve C-4 bağlanmasından meydana gelir. Zincir ucu indirgen uç olarak adlandırılan serbest bir C-hidroksil grubu içerir. Amilopektin her 17-26 glukoz unitesi arasında bir noktadan α -1,4 ve α -1,6 dallanmalarını içeren dallı yapıda bir polimerdir. Doğadaki en büyük moleküllerden biridir ve $\geq 10^3$ moleküler ağırlığa sahip olabilir (Pandey ve ark. 2005). Nişasta bitkilerde depo polisakkaritleri şeklinde bulunan çok verimli bir bileşiktir ve etanol, aminoasitler, organik asitler ve diğer bileşiklerin üretimi için fermantasyon endüstrilerinde ucuz bir kaynak olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.2. Amilozun kimyasal yapısı (Ası 1996)



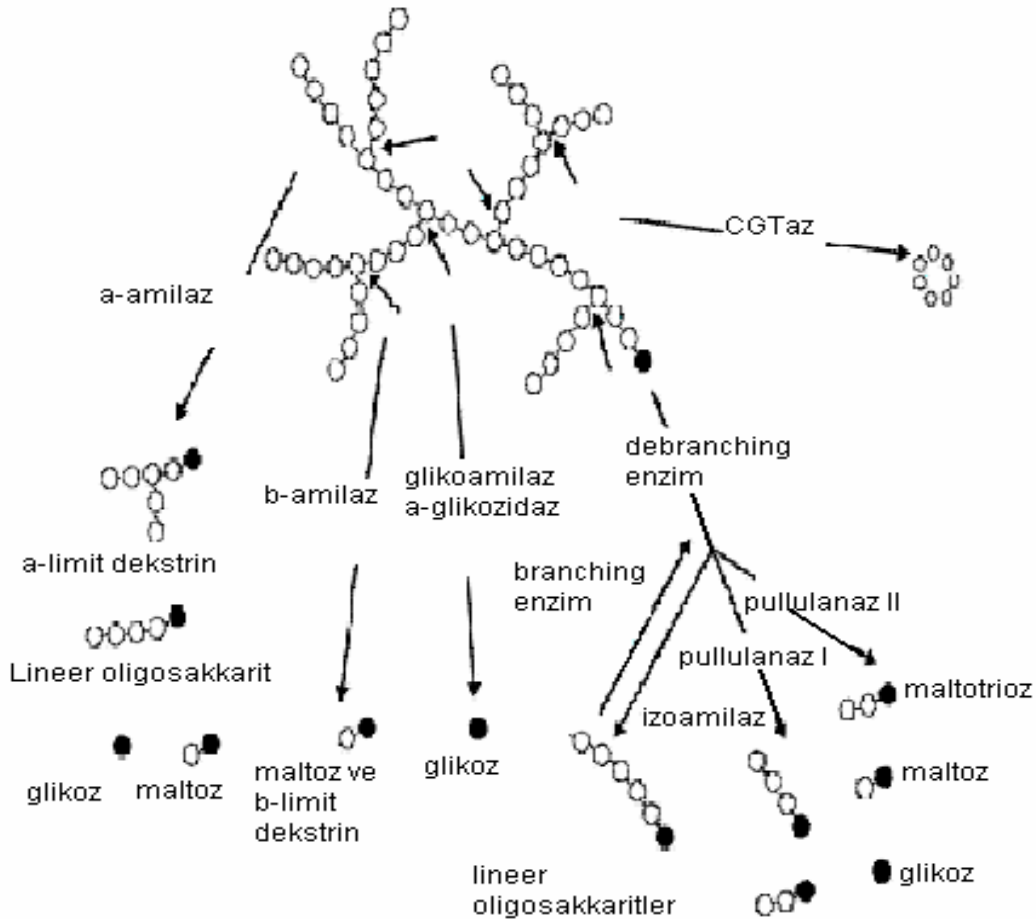
Şekil 1.3. Amilopektinin kimyasal şekli (Kalaycıoğlu ve ark. 2000)

Dünya genelinde yıllık olarak milyonlarca ton nişasta meydana gelmektedir ve bu nişasta, glukoz, fruktoz şurupları, glukoz kristalleri, siklodekstrinler, maltodekstrinler, dekstrinler ve modifiye nişasta gibi ürünlere dönüştürülmektedir. Teknolojik ilerlemeler ile nişasta endüstrisinde enzimlerin kullanılmasındaki artış özellikle gıda ve içecek endüstrilerinde büyük miktarlarda fruktoz şuruplarının glukoz

içeriğini artırma amacıyla kullanılan dönüşüm metotlarını daha ucuz hale getirmiştir (Pandey ve ark. 2004).

1.3. Nişastayı Parçalayan Enzimler

Mikroorganizmalar nişastayı parçalayan değişik enzimler üretirler. Bunlar endoamilazlar [α -1,4 glukon-glukanohidrolaz; EC. 3.2.1.1]; eksoamilazlar [β -amilaz (EC.3.2.1.2), glukoamilaz (α -1,4-D-glukanhidrolaz), α -galaktosidaz (EC.3.2.1.20), siklodekstrin glikosil-transferaz (2.4.1.19), maltogenik α -amilaz (EC. 3.2.1.133), maltooligosakkarit amilaz ve maltoheksoz amilaz (EC.3.2.1.98)]'dır. Dallı yapı göstermeyen enzimler özellikle α -1,6 bağlarını hidroliz ederler. İzoamilaz (EC. 3.2.1.168), pullulanaz (EC. 3.2.1.41) ve amilopullulanaz amilopektin dallarındaki α -1,6 glikozidik bağlarını kırarlar (Pandey ve ark. 2005).



Şekil 1.4. Amilolitik enzimlerin nişastayı hidroliz şekilleri oluşturdukları ürünler

1.4. Katı Faz Fermantasyon (Solid State Fermentation; SSF)

Katı faz (substrat) fermantasyonu (SSF) genel olarak suyun olmadığı veya az olduğu ortamda katı (nemli) metaryal üzerinde mikroorganizmaların gelişimi olarak tanımlanır. (Pandey ve ark. 2000, Singhanian ve ark. 2009, Hashemi ve ark. 2010). Tehlikeli bileşiklerin biyolojik olarak işlenmesi ve ayrıştırılması, tarım endüstrisi atıklarının biyolojik detoksifikasyonu, ekin ve ekin yan ürünlerinin besinsel değerinin artırılması için biyotransformasyon gibi işlemler ve antibiyotikler, alkaloidler, bitki büyüme faktörleri, enzimler (amilaz, proteaz, ksilanaz, galaktosidaz pullulanaz vb.), organik asitler, mikopestisitler ve biyoherbisidler içeren biyopestisitler, biyosurfaktantlar, biyoyakıtlar, aramı bileşikler vd. gibi biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin üretimini kapsayan biyolojik uygulamalardaki ilerlemeler ile SSF alanında sürekli bir gelişim görülmektedir (Pandey ve ark. 2004, Singhanian ve ark. 2009). Enzim üretimi geleneksel olarak SmF (Submerged Fermentation) ile yapılmaktadır. Ancak daha sonra Solid State Fermentation (SSF)'un bulunması ile birçok araştırmacı enzim üretimi için SSF'i kullanmaya başlamıştır. Pandey ve ark., (2001) enzim üretim işlemlerinde, SSF'in SmF'ye göre oluşan ürünün daha fazla olması ve daha ekonomik olması yönünden SSF'i kullanmışlardır. Ayrıca SSF'in SmF'e göre daha fazla kullanılması sadece bu avantajlara bağlı olmayıp aynı zamanda SmF'ye uygun olmayan endüstriyel atıkların SSF'te kullanılması ve SmF'de ciddi problem oluşturan katabolik represyon ve proteazlar tarafından proteinlerin yıkımı çoğunlukla SSF'te az oranda veya hiç meydana gelmediğinden kullanım alanı SmF'ye göre gittikçe artmaktadır (Kar ve ark. 2010).

Bugün çevremiz büyük bir değişim içerisindedir ve teknolojik gelişmelerdeki süreklilik bu yarışta katalizör rol oynamaktadır. SSF şimdilik laboratuvar boyutunda olmasına rağmen yüksek fermantasyon verimliliği, yüksek ürün konsantrasyonu, yüksek ürün stabilitesi, düşük katabolik represyon, daha az sterilite ve su aktivitesi gerektirmesi açısından birçok biyoteknolojik avantaja sahip görünmektedir (Xu ve ark. 2008, Serin 2009, Singhanian ve ark. 2009). SSF'te substrat kaynağı olarak buğday kepeği, pirinç kabuğu, buğday unu, pirinç unu, mısır unu, mercimek kabuğu, arpa sapı, nohut unu, muz kabuğu, soya kabuğu, buğday samanı, darı kepeği, asma tozu, fıstık unu elma püresi, şeker kamışı, çay kabuğu, manyok kökü gibi ekonomik değeri olmayan tarımsal sanayi artıkları kullanılır. Bu substratların yanında karbon ve azot kaynaklarına

da gereksinim duyulur (Pandey ve ark. 2008, Singhanian ve ark. 2009). SSF'te α -amilaz üretiminde daha çok *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgaris*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus licheniformis* gibi mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Sivaramakrishnan ve ark. 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Bilgiler

Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları kataliz eden genellikle protein yapısındaki moleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir (Kıran 2006). Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Pandey ve ark. 2005).

Günümüzde enzimler bira yapımında, meyve sularının berraklaştırılmasında, süt ürünlerinin üretiminde, maltoz ve fruktoz şurupların üretiminde, fırıncılıkta kaliteli ürünlerin elde edilmesinde, nişastanın şekerlemesinde, etlerin işletilmesinde, tekstilde, deterjan sanayisinde protein ve yağ lekelerinin uzaklaştırılmasında, kağıt sanayisinde selüloz üretiminde, deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesinde, sekonder metabolitlerin üretiminde, kliniksel, tıbbi ve analitik kimya gibi birçok uygulama alanlarında yararlanılmaktadır (Pandey ve ark. 2005, Kıran 2006, Saha ve Jordan 2009). Bazı enzimlerin kullanım alanları ve elde edildikleri mikroorganizmalar Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.1. Bazı enzimlerin kullanım alanları ve elde edildikleri mikroorganizmalar (Pandey ve ark. 2005, Saha ve Jordan 2009).

ENZİM	KULLANIM ALANI	MİKROORGANİZMA
α -Amilaz	Maltoz ve dekstrinin yıkılması, Leke çıkarıcı, Unun zenginleştirilmesi, Glikoz şurubu, Haşıl sökme.	* <i>Bacillus subtilis</i> * <i>Aspergillus oryzae</i> * <i>Bacillus amyloliquefacies</i> * <i>Bacillus licheniformis</i>
β -glukanaz	β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması, ekmekçilikte kullanılır.	* <i>Aspergillus oryzae</i> * <i>Bacillus subtilis</i>
Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önlemek için.	* <i>Aspergillus niger</i>
Selülaz	Deterjan katkı maddesi, Atıkların değerlendirilmesi.	* <i>Penicillium spp.</i>
Glikoz izomeraz	Glikoz, Fruktöz dönüşümü.	* <i>Aspergillus spp.</i> * <i>Streptomyces spp</i>
Glikoz oksidaz	Biyosensor, içecek, yumurta, şarap, meyve suyu	* <i>Aspergillus niger</i> * <i>Penicillium amagasakiense</i>
Laktaz	Laktoz: Glukoz+Galaktoz (Peynir altı suyu)	* <i>Kluyveromyces lactis</i>
Lipaz	Deterjan katkı maddesi, Yağların parçalanması, Peynir Endüstrisi.	* <i>Aspergillus oryzae</i>
Kitinaz	Antibiyotik üretimi.	* <i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Streptomyces sp.</i>
Proteaz	Deterjan katkı maddesi, Deri Endüstrisi, et ekstraksiyonu, Sindirime yardımcı.	* <i>Bacillus subtilis</i>
Selülaz	Meyve sularının berraklaştırılmasında, biyodizel uygulamalarında atıkların değerlendirilmesinde, tekstil, deterjan, hayvan yemi üretiminde.	* <i>Trichoderma reesei</i> * <i>Penicillium purpurogenum</i> * <i>Clostridium thermocellum</i>
Lakkaz	Oksitleme, kozmetik, bazı su arıtma sistemlerinde temizleme ajanı olarak kullanımı, anti kanser ilaçların üretiminde, tekstilde, detoksifikasyon, lignin işlenmesinde,	* <i>Coriolus versicolor</i>
Pektinaz	Meyve suyu ekstraksiyonu Şarap ve meyve suyu berraklaştırılması	* <i>Erwinia spp.</i>
β -amilaz	Maltoz şurubu, ekmekçilikte, içeceklerde.	* <i>Bacillus polymyxa</i>
Renin	Peynir endüstrisi.	* <i>Kluyveromyces lactis</i> , * <i>Mucor spp.</i>
B-galaktosidaz	Süt ürünlerinin işlenmesinde, yiyecekler	* <i>Aspergillus niger</i> * <i>Kluyveromyces fragilis</i> * <i>Candida pseudotropicalis</i>
Ksilanaz	Kağıt yapımında, meyve sularının berraklaştırılmasında, biyomas üretiminde, deterjan, tekstil gibi.	* <i>Trichoderma sp.</i> * <i>Aspergillus sp.</i>

Amilazlar nişastaya dayalı tüm endüstriyel alanlarda kullanılan en önemli hidrolitik enzimler olup α -amilazların ticari olarak kullanımı çok eskiye dayanmaktadır,

ilk defa 1984'te sindirim rahatsızlıklarının tedavisi için yardımcı bir ilaç olarak piyasa sürülmüşler. Amilazlar dünya enzim piyasasının büyük bir kısmını oluştururlar. Günümüzde amilazların gıda, tekstil, deterjan, kağıt, farmakoloji, klinik ve kimya gibi endüstriyel alanlarda önemli kullanım alanları bulunmaktadır (Gupta ve ark., 2003). α -Amilazlar ekonomik uygulamalardaki kullanımlarında jelatinleşme (100-110 °C) ve sıvılaşma (80-90 °C) gibi işlemlerde ve yüksek sıcaklıklarda aktif olmalıdırlar. (Sindhu ve ark. 1997). Bu nedenle yüksek termofilik ve termostabil α -amilazlara talep artmaktadır. Termostabil enzimlerin bulunması beraberinde endüstriyel uygulamalar için yeni olanakların bir kısmını ortaya çıkarmıştır (Haki ve Rakshit, 2003). Nişasta endüstrisinde yaygın olarak kullanılan termostabil enzimler amilazlardır (Crabb ve Mitchinson 1997). Termofilik organizmalardan elde edilen termostabil enzimler doğal stabilitelelerinden dolayı ticari uygulamaların önemli bir kısmını oluştururlar (Poonam ve ark. 1995).

Endüstriyel uygulamalarda nişastanın hidroliz edilmesinde kullanılan yöntemlerden asit hidrolizi yerine enzimatik hidrolizin tercih edilmesinin nedeni; reaksiyon spesifikliği sağlaması, meydana gelen ürünlerin kararlı olması, düşük enerji ihtiyacı ve nötralizasyon basamaklarında avantajlar sağlamasından dolayıdır (Gupta ve ark. 2003).

2.2. α -Amilazlar'ın Endüstrideki Kullanım Alanları

2.2.1. Ekmekçilikte ve İçecek Endüstrisinde α -amilazın Kullanımı

Piştirme endüstrisinde yüksek kalite ürünleri meydana getirmek için yüzbinlerce yıldır bu enzimler kullanılmaktadır. Yaklaşık on yıldır unlu gıdalarda mikrobiyal α -amilazlar yaygın bir şekilde kullanım alanı bulmuştur (Si 1999). Un içine eksojen fungal α -amilazların eklenmesi ile elde edilen yüksek aktiviteler bugünkü modern yaşamda ve sürdürülen fırınlama uygulamalarında yaygındır. α -amilazın un içine eklenmesi sadece fermentasyon oranını arttırmaz ve hamur viskozitesini azaltmaz (ürünlerin yapı ve yoğunluğunun artmasıyla sonuçlanır) aynı zamanda ekmeğin tadında, daha iyi kabarmasında, dış kabuk renginde ve kızarma kalitesinde artışa neden olan hamur içinde fazladan şeker oluşumunu sağlamasıdır (Gupta ve ark. 2003, Steinbüchel ve ark. 2005). Endüstride α -amilazın son kullanım alanlarından biri de unlu mamüllerin bayatlanmasını geciktirerek ürünlerin raf ömrünü uzatmasıdır. Geleneksel olarak ekmek

ürünlerinin bayatlamasını engellemek, tat ve yapı kalitesini arttırmak için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Son zamanlardaki araştırmalar örneğin α -amilaz, dallanma enzimleri ve dallanma yapmayan enzimler, maltogenik amilazlar, β -amilazlar, amiloglukosidazların, bayatlamayı engelleyen ajanlar gibi bu enzimlerin kullanımları üzerine yoğunlaşmıştır (Gupta ve ark. 2003).

2.2.2. α -Amilazın Nişastanın Sıvılaştırılmasında ve Şekerlemede Kullanımı

Piyasada bulunan birçok ürün için kullanılan α -amilazlar nişastayı glukoz, fruktoz ve maltoza dönüştürülmesini sağlarlar. Nişastayı sıvılaştırmada yüksek oranda termostabil α -amilazlar kullanılırlar (Gupta ve ark. 2003, Aiyer 2005). α -Amilazların en önemli pazarı, glukoz ve fruktozdur. Nişasta yüksek fruktoz şuruplarına dönüştürülmektedir. Bunların yüksek tatlandırıcı özelliklerinden dolayı alkolsüz içecek endüstrisinde fazla miktarlarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca alkol fermentasyonu için nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleşmesi için yüksek sıcaklıklarda aktif bir termostabil α -amilaz kullanımına gereksinim duyulmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde de, özellikle elma ve armut meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede bulunan nişastadan dolayı meyve suyunda bulanıklık oluşmaktadır. Bu sorun, ortama α -amilaz ilave edilerek çözülmektedir. (Ekşi 1988, Gupta ve ark. 2003, Pandey ve ark. 2005).

Ayrıca maltotetroz, gıdalardaki nem oranını koruma ve yapı özelliğini artırma amacıyla gıda katkı maddeleri gibi kullanılmaktadır. *Bacillus licheniformis* mezofilik bir bakteri olmasına rağmen bu bakteriden elde edilen α -amilaz termostabil özelliktedir. Bu enzim nişastayı hidroliz ederek dekstrinleri meydana getirir daha sonra glukoamilazların etkisiyle dekstrinler glukozlara dönüşür bu işlem alkol, şeker ve biracılık endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Reddy ve ark. 2003). Günümüzde; proteaz, lipaz, ksilanaz, pullulanaz, pentosenaz, sellülaz, oksidaz gibi pek çok enzim preparasyonları bu sektörde kullanılmakta ancak hiçbirisi α -amilazların yerini alamamaktadır (Gupta ve ark. 2003).

2.2.3. α -Amilazın Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler, nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Dokuma kumaşlarının modern olarak üretiminde kullanılan nişasta, haşılama işlemi için

kullanılır (Tarakçiođlu 1979). İpliğin sağlam ve dűzgűn olmasını sağlamak ve kırılmasını ۆnlemek amacı ile sonradan uzaklaştırılması kolay ipliklerin arasına koruyucu bir tabaka uygulanır. Bu şekilde nişastanın kolayca uzaklaştırılması sağlanır. Bu işleme haşıllama denir. Haşıllama dokuma esnasında tekstile herhangi bir zarar vermeden aksine direnç kazandırır. Nişastanın giderilmesi ise genellikle α -amilaz uygulaması ile suda çۆzűlebilen dekstrinlere parçalanarak uzaklaştırılması gerçekleştirilir (Gupta ve ark. 2003, Kıran 2006).

2.2.4. α -Amilazın Kađıt Endűstrisinde Kullanımı

Kağıt kaplama amacıyla kağıdın nişasta ile muamele olması gerekir. Kağıdın nişasta ile kaplanması, kağıdı işlem sırasında mekaniksel etkilere karşı korumakla kalmayıp aynı zamanda kağıdın sertliği, direnci ve kalitesinin de artması sağlanmış olur. Tutkal kağıdın sertliğini ve direncini arttırır. Niřasta kağıdın yapım işlemi sonunda iyi bir tutkal ajanıdır. Dođal nişastanın viskozitesi kağıt işlemleri için çok yűksektir. Nişastanın istenilen yoğunluğa ulaşması, amilaz enzimi kullanılarak nişastanın belirli dűzeyde hidrolizasyonu sonucu elde edilir. Kağıtle muamele edilen doğal nişastanın viskozitesi yűksek olduğu için fazla olan nişasta α -amilaz kullanılarak uzaklaştırılır (Gupta ve ark. 2003).

2.2.5. α -Amilazın Deterjan Endűstrisinde Kullanımı

Enzimler řu anda modern kompakt deterjanların en ۆnemli bileřenlerinden biridir. Deterjanlardaki enzim uygulamalarının en ۆnemli avantajı daha ılımlı kořullarda iř görmeleridir. Bařta niřasta olmak ۆzere bir çok kirliliđin uzaklařtırılmasında kullanılan deterjanlarda α -amilaz katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gűnűműzde piyasadaki sıvı deterjanların yaklařık % 90'ında amilaz enzimi mevcuttur. Enzimsiz olarak kullanılan deterjanlar çamařır ve bulařık makinelerine çok sert olmaları nedeniyle zarar veriyorlardı. Ancak gűnűműzde artık amilaz enziminin kullanılmaya bařlanması ile bu sorun özűlebilmektedir. Ayrıca deterjanlara ilave edilen enzimlerin en bűyűk avantajı normal deterjanlara gۆre daha iyi temizleme sađlaması ve ortam kořullarını yumuřatmasıdır (Gupta ve ark. 2003, Aygan 2008).

Son zamanlarda Novozymes ve Genencore International gibi iki ۆnemli deterjan firmasındaki bilim adamları protein műhendisliđini alanında amilazların ağartıcı

stabilitelerini arttırmak için çalışmışlardır. Onlar aynı zamanda oksidasyona duyarlı amino asitleri diğer aminoasitler ile yer değiştirmişlerdir. *Bacillus licheniformis* amilazında 197. pozisyonda bulunan methionin amino asidi ile leusin' in yer değiştirmesiyle oksidatif bileşiklere karşı daha dirençli olan bir amilaz elde edilmiştir (Gupta ve ark. 2003).

Ayrıca tüketiciler arasındaki eğilim çamaşır ve bulaşık yıkama işlemlerinde daha soğuk sıcaklıkların kullanılmasıdır. Yüksek sıcaklıklarda, porselen ve giysilerden nişastanın uzaklaştırılması çok problemli olmaktadır. Uygun sıcaklıklarda ve alkalın pH ta α -amilazların deterjan ile optimum iş görmesi bu problemi çözülebilmektedir (Gupta ve ark. 2003).

2.2.6. α -Amilazın Sağlık Alanında Kullanımı

Biyoteknolojide yeni ufukların ortaya çıkması ile amilaz uygulamalarının kullanımı klinik, tıp ve analitik kimya gibi diğer alanların birçoğunda artmıştır. Ayrıca spesifik maltooligosakkaritler doğada benzersiz olmaları ve özgün özelliklerinden dolayı gıda, eczacılık ve yararlı kimyasalların elde edildiği endüstrilerde potansiyel olarak geniş kullanım alanına sahiptirler. Maltopentoz böbrek yetersizliği bulunan hastalarda ve kaloriden yoksun olma durumunda besleyici gıda olarak kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2003).

2.3. SSF'in Tarihi Gelişimi

SSF'in ayrıntılı bilimsel ve gelişimsel tarihi zaman zaman bazı araştırmacılar tarafından tekrar incelenmiştir. Açıkçası gıda fermantasyonu ve enzimlerin üretimi SSF'in ilk ortaya çıktığı yerlerde gerçekleştirilmiştir. 18. yüzyıl boyunca ilk defa SSF elma ezmesinden sirke üretimi için kullanıldı. Bu dönemde aynı zamanda gallik asit kullanımıyla deri tabaklama işlemi yapıldı. Eski zamanlarda kullanılan tüm fermentasyon metotları katı faz fermentasyon teknolojisi prensiplerine dayalı olarak yapılmış, 1940'ta penisilinin çok önemli olmasından dolayı SmF (Submerged Fermentation) yöntemi ile bu bileşiğin üretilmesi batı ülkelerinde SSF'in ihmal edilmesine neden olmuştur. Ancak 1950-1960 yılları arasında mantar kültürlerinin kullanılmasıyla steroid transformasyonu gerçekleştirilmiş ve SSF kullanımıyla kanserde

önemli bir etkiye sahip mikotoksinlerin üretilmesi sağlanmış, böylece azda olsa SSF ile ilgili küçük çapta araştırmalar devam etmiştir. 19. yüzyılın sonlarında SSF işlemleri kullanılarak katı atık ıslahı ve tüketiminin geliştirildiği görüldü. 1960-1970 yılları arasında tarım endüstrisi atıklarının kullanılması SSF’te büyükbaş hayvan yemlerinin protein içeriğini artırma çalışmalarındaki ilerlemeler diğer bir kilometre taşı olmuştur. Böylece bazı alanlarda kirleticiler gibi dikkate alınan düşük maliyetli bu atıkların katkı değerlerini arttırmak için eşsiz bir yöntem ortaya çıkmıştır. 20. yüzyılın başlangıcında ise SSF’te mikroorganizmaların kullanılmasıyla enzimler ve organik asitler gibi primer metabolitlerin üretimine ilk defa tanık olundu (Singhania ve ark. 2009).

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.2 SSF'in tarihi gelişiminin kısaca özeti (Singhania 2009).

M.Ö 2000	Mısırlılar tarafından ekmek yapımı
H.z İsa'nın doğumundan önce Asya'da	Peynir yapımı için <i>Penicillium roquefortii</i> 'den yararlanılmıştır.
M.S 2500	Balık fermantasyonu/şeker, nişasta ve tuzlar ile koruma
M.S 2500	<i>Koji</i> işlemi
7. yüzyıl	<i>koji</i> uygulamasının Çin'den Japonya ya geçmesi
18. yüzyıl	Meyve ezmesisinden sirke yapımı
18. yüzyıl	tabaklama ve baskı uygulamalarında gallik asit kullanımı
1860-1900	Kanalizasyon ıslah işlemleri
1900-1920	Fungal enzimlerin üretilmesi, kojik asit
1920-1940	Fıçı tipi fermentör ile fungal enzimlerden olan gallik asit ve sitrik asit üretiminin geliştirilmesi
1940-1950	Fermantasyon endüstrisinde penicilin üretimi ile görülen olağanüstü gelişme
1950-1960	Steroid transformasyonu
1960-1980	Çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin üretimi, column tipi fermentörün geliştirilmesi, SSF kinetikleri ve modellerine yönelik çalışmalar
1980-1990	Çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin üretimi, column tipi fermentörün geliştirilmesi, SSF kinetikleri ve modellerine yönelik çalışmalar
1990-günümüze kadar	SSF'e yönelik temel yaklaşımlardaki gelişmeler, biyolojik uygulamalar/ elde edilen ürünlerdeki ilerlemeler:
A.Biyolojik uygulamalar	tehlikeli bileşiklerin ıslahı, biyolojik dönüşümü, tarım endüstrisi atıklarının detoksifikasyonu, biyotransformasyonlar
B. Ürünler	<i>Biyoaktif bileşikler:</i> alfatoksin, osiratoksin, bakteriyel endotoksinler, giberillik asit, zearalenon, çavdar alkaloidleri, penicilin, cephalosporin, cephalomycin C, tetrasiklin, klorotetrasiklin, oksitetrasiklin, iturin, aktinorhodin, metilenomisin, surfaktin, monordan, siklosporin A , ustiloksinler,antifungal uçucu bileşikler, destruksin A ve B, klavulanik asit, mikofenolik asit. <i>Enzimler:</i> Sellulaz, β - glukosidaz, CMCaz, lakkaz, ksilanaz, poligalakturonaz, ligninaz, β -ksilosidaz, α -arabinofuranosidaz, lakkaaz, Li-peroksidaz, Mn-peroksidaz, proteazlar (asidik, nötral ve alkalın), lipazlar, α -amilaz, β -amilaz, glukoamilaz, glutaminaz, inulinaz, fitaz, tannaz, feruloil para-kaumaroil esteraz. <i>Organik asitler:</i> Sitrik asit, fumarik asit, laktik asit, oksalik asit, gallik asit. <i>Diğer bileşikler:</i> L- glutamik asit, pigmentler, karotenoidler, xanthan gum, süksinoglikan, etanol, aramo bileşikleri, vitamin B-12, B-6, riboflavin, tiamin,biyosurfaktanlar, biyopestisitler/biyoherbisitler, antibiyotikler.

2.4. SSF'in SmF'e Göre Avantajları, Dezavantajları

Avantajlar

- *Düşük sermaye yatırımları ve masrafların azalması,
- *Az su tüketimi ve meydana gelen atık suyun göz ardı edilmesi,
- *Çalkalanma olmadığı için fermentasyon işlemi için az enerji gereksinimi,
- *Fazla su olmadığından köpük oluşumunun meydana gelmemesi,
- *Sonuçların yüksek oranda tekrar edilebilir olması,
- *Katabolit represyon ve son ürün inhibisyonunun düşük seviyelerde görülmesi,
- *Basit fermentasyon ortamı,
- *Daha az fermentasyon ortamı,
- *Çok fazla dikkat gerektiren kontrol tekniklerinin olmaması,
- *Her ölçekte uygulanabilmesi,
- *Ayrıntılı havalandırma ihtiyaçlarının olmaması,
- *Bakteriyel kontaminasyon kontrolünün basit olması,
- *Islak ve kuru fermente katıların doğrudan kullanılma olanağı,
- *Sporların kolay baskılanması ve indüklenebilmesi,
- *Üretim sürecinde daha düşük maliyetlerin olması

Dezavantajları

- *Arttırma işlemlerindeki problemler,
- *pH, sıcaklık, besin ve nem sağlanması kontrolü ve mikrobiyal aktivite sonucu meydana gelmesiyle istenen saflıktaki ürünleri elde etmedeki zorluklardır (Pandey 2005).

Çizelge 2.3. SmF ve SSF'in bazı önemli özellikleri ve farklılıkları (Anupama ve Ravindrab 2000)

Karakteristik özellik	SSF	SmF
Mikroorganizma ve substratın durumu	Statik	Hareketli
Substrat durumu	Ham	Rafine edilmiş
Mikroorganizmanın doğası	Fungal sistemler	-----
Su kullanımı	Sınırlı	Yüksek
Oksijen sağlanması	Difüzyon ile	Köpürme ve dağılma
Oksijenle etkileşim	Doğrudan	Suda çözünmeyle
Fermentasyon ortam gereksinimleri	Az	Çok fazla
Enerji gereksinimleri	Daha az	fazla
Kinetik araştırmaları	Kompleks	Kolay
Sıcaklık ve Konsantrasyon Gradyentleri	Aşırı	Az
Reaksiyon Kontrolü	Zor	Kolay
Bakteriyel kontaminasyon değişimleri	İhmal edilebilir	fazla
Sıvı karışımları	daha az	yüksek
Kirlenme Problemleri	daha az	yüksek

SSF'te mikrobiyal büyümeyi ve aktiviteyi etkileyen en önemli faktörler uygun bir mikroorganizma ve substrat seçimi, substratın ön işlemi, substratın parçacık büyüklüğü (parçacıklar arasındaki ve yüzey alanındaki değişim), substratın nem içeriği ve su aktivitesi, bağıl nem, inokülüm tipi ve hacmi, fermente maddenin sıcaklığı, solunum süresince meydana gelen metabolik ısının hareketi, kültürlenme periyodu, SSF ortamındaki stabilitenin sağlanması, oksijen tüketim oranı ve karbondioksitin oluşma oranı gibi atmosfer gazlarıdır (Graminha ve ark. 2008, Pandey ve ark. 2008).

2.5. SSF'te Dikkat Edilecek Hususlar

2.5.1. Mikroorganizma Seçimi ve Önemi

Mikroorganizmalar, hedeflenmiş ürünlerin ticari olarak uygun verimlerde olması, yan ürünlerin miktarı ve substrat üzerindeki üreme ve gelişim şekillerine göre seçilir. SSF'te daha çok filamentli funguslar, bakteri ve mayalar kullanılır (Pandey 2005).

2.5.2. Nem içeriği ve Su Aktivitesinin Önemi

Canlı hücreler ortamın % 70-80 nem içeriği ile karakterize edilir ve bu nedenle su içeriği yeni hücrelerin sentezini belirleyen bir faktördür (Pandey 2005). SSF sisteminde, nem içeriği önemli faktördür. Düşük nem içeriği mikroorganizmanın ortamdaki besinlere ulaşmasını engelleyerek mikrobiyal gelişimin yavaşlamasına neden olur. Ancak yüksek nem oranı substratların porlu yapısında bir gerilemeye neden olup sistemdeki oksijen transferini azaltmaktadır. Bu durum da sistemde kontaminasyon oranını artırarak mikrobiyal gelişimin engellenmesine neden olur (Singhania ve ark. 2009). Su aktivitesi substrat ile dengedeki atmosfer gazlarının nispi nemi gibi tanımlanır. Bakteriler için katı matriksin nem oranının % 70'ten fazla olması gerektiği belirlenmiştir. Mayalar için öncelikli olarak % 60-70 ve mantarlar % 20 ile % 70 aralıklarında olması gerekir (Pandey 2005).

Substrat konsantrasyonunun artması ile birlikte fermentasyon ortamındaki su miktarının azalmasından dolayı fermentasyon ortamında bulunan su miktarı substrat konsantrasyonunu doğrudan etkiler. Ortamdaki su miktarının az olması gaz ve çözücülerin difüzyonunun azalmasına bağlı olarak ortamda oluşan yüksek konsantrasyonlardaki metabolitler bakteriyel büyümenin yavaşlamasına hatta durmasına neden olur (Tanyıldızı ve ark. 2007).

2.5.3. pH'nın Önemi

Her mikroorganizmanın gelişip aktivite gösterdiği optimum bir pH değeri vardır. Substrat üzerinde mikroorganizmaların üreme ve gelişmesi bir pH değişimi ile meydana gelir. Bundan dolayı pH kontrolü, işlemin devam etmesi için gereklidir. Substratın yapısı heterojen olduğu için reaktördeki pH gradientleri iyi belirlenmelidir. pH kontrolü ve ölçüm için uygun bir donanımın olmayışı SSF'te bir engeldir. SSF'de pH değerini kontrol etmek ve ayarlamak çok zordur. Ancak kullandığımız katı substratlar sayesinde pH'nın kontrolü sağlanabilmektedir (Pandey ve ark. 2005, Pandey 2008)

2.5.4. Sıcaklığın Önemi

Biyolojik işlemler genelde belirli sıcaklık derecelerinde gerçekleştirilmektedirler. Bir biyolojik işlem geliştirilmesinde sıcaklığın önemi protein

denatürasyonu, enzimatik inhibisyon, belirli bir metabolit üretiminin indüklenme ve baskılanması veya hücrenin ölümü ve yaşayabilmesi gibi etkilerin belirlenmesi şeklindedir. Mikroorganizmaların psikofiller, mezofiller ve termofiller şeklinde sınıflandırılması sıcaklığı belirlenmiş bir işlem için spesifik bir tür mikroorganizmanın kullanılmasındaki engeli ortadan kaldırır.

Genellikle fermentasyon işlemi mezofilik (30-45°C) türler için geliştirilmiştir. Son zamanlardaki eğilimlerde işlemler termofil türler ile gerçekleştirilmiştir. Çünkü bu türler ısı artışından kaynaklanan problemlerin bir kısmını çözebilirler. SSF'in ekzotermik özelliklerinden dolayı sıcaklıktaki artış scale-up işlemindeki esas zorluktur ve sıcaklık kontrolü SmF ile karşılaştırıldığında SSF'te oldukça güçtür. Bu, sıcaklık gradiyentlerinin oluşmasıyla sonuçlanan reaktör içindeki katı substratların homojen olmamasından kaynaklanır. Bu homojen olmayan durum aynı zamanda ısı alış verişini de güçleştirir (Pandey ve ark. 2000, 2008, Sodhi ve ark. 2005).

2.5.5. İnokülüm (Ekim) Miktarı Önemi

İnokülüm hacmi katı ortamdaki biyomas üretim miktarını belirler. Biyomasın çok fazla ve çok az yoğunluğu genelde enzim üretiminde istenmeyen bir durumdur ve genellikle ürün için optimum bir seviye belirlenmelidir. Laboratuvar ölçeğinde inokülüm için eğik ağırlı ortamlarda bulunan sporlar kullanılır. Endüstriyel seviyelerde spor süspansiyonlarının hazırlanması onlara bir ayrıcalık kazandırır. Aynı zamanda inokülüm için küflü substratlarda kullanılır (Pandey 2005, Erdal ve ark. 2009).

2.5.6. Substrat Seçimi ve Önemi

SSF sürecini etkileyen en önemli faktörlerden biri katı substratın işlevidir. Maliyet ve bulunabilir olması SSF için substrat seçiminde en temel faktörlerden biridir. Uygun substratların seçimine yönelik yapılan çalışmalarda başlıca, maliyeti düşük olan tropikal tarım endüstrisi ürünleri ve atıkları üzerine odaklanılmıştır. Bunlar da manyok, soya, şeker kamışı, tatlı patates ve süpürge darısı gibi ürünler, buğday ve pirinç kepek ve samanları gibi ekin atıkları, şeker kamışı posası, kahve posası ve kabuğu gibi kahve işleme endüstriyel atıkları, üzüm ve elma püresi gibi meyve işleme endüstriyel atıkları, ananas ve muz atıkları, hindistan cevizi, soya, yer fıstığı, kanola ve hurma ağacı

yağlarının çıkarılmasında arta kalan parçalar gibi substratlardır (Pandey ve ark. 2001, Pandey 2005, Couto ve ark. 2006). SSF’te substrat sadece kültür ortamına besin desteği sağlamakla kalmayıp aynı zamanda mikrobiyal hücreler için barınma ortamı oluşturur (Serin 2009).

2.5.7. Substratın Partikül Büyüklüğünün Önemi

Genel olarak küçük substrat parçacıkları mikrobiyal büyüme için geniş bir yüzey alanı sağlar ve böylece arzu edilen bir durum oluşturur. Bununla birlikte çok küçük substrat parçacıkları substrat yığını oluşturabilir bu gibi hallerde en çok mikrobiyal solunum/havalanmayı engelleyen ve bu nedenle zayıf hücresel büyüme meydana getiren olay görülür. Aynı zamanda büyük parçacıklar iç kısımdaki parçalar arasındaki alan artığından daha etkili solunum/havalanmayı sağlayabilir, ancak mikrobiyal büyüme için sınırlı bir alan oluşmasına neden olur. Bu nedenle belirli bir işlemde parça büyüklüğünü belirlemek gereklidir (Pandey ve ark. 2008, Erdal ve ark. 2009).

2.5.8. Karbon-Azot Kaynağının Önemi

Karbon kaynakları mikroorganizmanın büyüme ve gelişimi için gerekli olan enerji kaynağı olarak iş görmektedir. Karbon hücresel biyokütlenin %40-60’ını oluşturan esas bileşenidir. Bu nedenle, herhangi bir fermantasyon ortamı oluşturulduğunda karbon kaynağına ayrı önem verilmelidir. Kinetik çalışmalarda bir ürün verimi genel olarak karbon kaynağının tüketimine bağlıdır.

Azot büyüme ve bir nükleik asit-amino asit bileşeni gibi protein sentezini belirler. Hücre biyokütlesinin %3-12’sini oluşturur. Karbon ve azot miktarı arasındaki ilişki spesifik bir ürünü elde etme işleminde çok önemlidir. SSF’te ortama organik ve inorganik azot bileşiklerin eklenmesiyle genelde enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Pandey 2000, Balkan ve Ertan 2007).

2.6. *Bacillus subtilis*

Bacillus cinsine giren türler, gram pozitif (+), aerobik, ısıya dirençli ve endospor oluşturan bir yapıya sahiptirler. Bu cinsin en fazla çalışılmış üyesi *Bacillus subtilis*’tir. Gram (+) bakteri grubu içinde genetik haritası en fazla tanımlanmış tür de *Bacillus subtilis*’tir. Bakteri; yaklaşık 1.5-3 µm boyunda, 0.5-0.8 µm eninde, çomakçık

şeklinde bir yapıya sahiptir. Patojenik olmaması genetik çalışmaların bu bakteri üzerinden yürütülmesi için iyi bir nedendir.

Bacillus subtilis termotoleran bir bakteridir. Bu gruba giren bakteriler termofil bakterilere göre daha düşük sıcaklıklarda yaşayan bakterilerdir. Toprakta, havada, suda ve kaplıca sularında 20-50°C sıcaklıklarda yaşarlar. Isıya dayanıklı olmaları onların doğada yaygın bu grup olmaları Öner ve ark. (1987) tarafından ileri sürülmüştür (Uyar 1997).

2.7. Kaynak Özetleri

Baysal ve ark. (2003) termotolerant *Bacillus subtilis*'ten SSF tekniğiyle α -amilaz elde etmişlerdir. Çalışmada buğday kepeği ve pirinç kabuğunu substrat olarak kullanılmış ve optimum enzim üretme şartları belirlenmeye çalışılmıştır. Enzim üretimi için inkübasyon süresini, nem miktarını, parçacık büyüklüğünü ve inokülüm konsantrasyonunu belirlemişlerdir. Maksimum ürün miktarı 159.520 ve 21.760 U/g ile sırasıyla buğday kepeği ve pirinç kabuğunda, 0.1 M ve pH 7 fosfat tamponunda % 30 nem miktarı ile 24. ve 48. saatlerde elde etmişlerdir. Partikül büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonunu sırasıyla 1000 μ m, % 20 ve 500 μ m, % 15 ile buğday kepeği ve pirinç kabuğunda tespit etmişlerdir. Enzim üretiminin buğday kepeğinde, pirinç kabuğundan 7 kat daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Sodhi ve ark. (2005) Hindistan-Manikaran sıcak su kaynağından izole ettikleri termotolerant *Bacillus PS-7*'den emaye kaplı metal tabaklar ve erlenmayer şişelerinde SSF tekniğiyle oldukça yüksek miktarda termostabil α -amilaz elde etmişlerdir. Katı substrat miktarı, nem miktarı, inkübasyon sıcaklığı, surfaktantın varlığı veya yokluğu, karbon, nitrojen, mineral, amino asit ve vitamin kaynaklarının enzim üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Gliserol (% 1.0 w/w), soya küspesi (%1.0 w/w), L-prolin (%0.1 w/w), vitamin B-kompleksi (% 0.01) ile desteklenmiş buğday kepeği, %1 Tween-40, 1/1.5 oranında 1mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, inkübasyon süresi 48. saat ve sıcaklık 37 °C gibi şartlarda maksimum enzim üretimi 464.000 U/g olarak elde edilmiştir. Enzimin, fenil hidrofobik etkileşim kromatografisinin ardından sephadex G-75 kolonu ile hazırlanmış jel filtrasyonu ve amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak 12.7 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Kısmen saflaştırılmış enzimin 60 °C ve pH 6.5'te maksimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ca^{+2} 'nin enzim üzerindeki etkisi sırasıyla 60 °C'de 6 saat

ve 70 °C'de 5 saat süreyle gözlemlenmiş, ancak enzimin aktivitesinde herhangi bir artışa rastlanmamıştır.

Kunamneni ve ark. (2005) termofilik mantarlardan olan *Thermomyces lanuginosus*'ten SSF tekniğiyle ekstrasellüler α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. Enzim üretimi için buğday kabuğu, melas kabuğu, pirinç kabuğu, mısır, darı, buğday samanı, arpa kabuğu, mısır koçanı ve ezilmiş buğday gibi katı substratlar kullanılmıştır. α -Amilaz aktivitesi en yüksek buğday kabuğunda saptanmıştır. İnkübasyon sıcaklığı 50°C, pH 6.0, inkübasyon süresi 120. saat, başlangıç nem konsantrasyonu %90, inokülüm konsantrasyonu %10 v/w, buğday kabuğu, tuz solüsyonu konsantrasyonu 1.5:10 v/w, substrat ağırlığının şişe (erlen mayer) hacmine oranı 1:100, %1(w/w) nişasta solüsyonu ve %1 pepton(w/w) içeren bir fermentasyon ortamı gibi optimum şartlar altında maksimum enzim aktivitesini 534 U/g olarak elde etmişlerdir.

Shukla ve Kar (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz üretmek için substrat olarak buğday kabuğunu ve patates kabuğunu kullanmışlar ve SSF için patates kabuğunda buğday kabuğuna göre daha iyi bir substrat kaynağı olarak tespit etmişlerdir. Optimum şartlar altında en yüksek enzim miktarı *Bacillus licheniformis*'ten patates kabuğunda 270 U/ml ve buğday kabuğunda 175 U/ml iken *Bacillus subtilis*'te ise patates kabuğunda 600 U/ml ve buğday kabuğunda 265 U/ml olarak bulmuşlardır. *Bacillus licheniformis*'ten 90°C'de ve pH 9.0'da en iyi enzim aktivesi elde edilirken *Bacillus subtilis*'ten ise 60°C'de ve pH 7.0'da elde edilmiştir.

Asgher ve ark. (2007) atık patates nişastasını içeren sıvı besiyeri ile *Bacillus subtilis* JS-2004'ten α -amilaz elde etmeye çalışmışlardır. 50°C'de, pH 7.0'de ve inkübasyon süresi olarak 48. saatte maksimum enzim (72U/ml) elde etmişlerdir. Kalsiyum ve yeast ekstrakt'ın mikrobiyal büyümeyi ve enzim aktivitesini artırdığını %1 glukozun ise azalttığını belirtmişlerdir. α -Amilaz için en iyi optimum aktiviteyi pH: 8 ve 70°C'de elde etmişlerdir. Enzimin 1 saatte 60 ve 70°C sıcaklıklarda yapısını oldukça koruduğunu; ancak 80 ve 90°C sıcaklıklarda % 12 ve % 48 aktivite kaybettiğini belirtmişlerdir. Ca^{2+} iyonlarının aktiviteyi yaklaşık olarak % 112 oranında artırdığını, Co^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının aktiviteyi tamamen inhibe ettiğini; ancak Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının da aktiviteyi kısmen inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. *Bacillus subtilis* JS-2004'ten oldukça yüksek miktarda termostabil α -amilaz ürettiğini

ve bu enzimin nişasta işleme ve gıda endüstrilerinin çeşitli uygulama alanları için uygun karakteristik özellikler taşıdığını rapor etmişlerdir.

Tanyıldızı ve ark. (2007) *Bacillus amyloliquefaciens*'ten SSF tekniğiyle α -amilaz elde etmeye çalışmışlardır. En iyi enzim aktivitesini elde etmek için hayvan yemi olarak kullanılan ve oldukça ucuz olan mısır küspesini yedi farklı konsantrasyonda incelemişlerdir. 5-40 g/l arasında değişen miktarlarda kullanılan CGM'de en iyi enzim aktivitesini 30 g/l'de bulmuşlardır. Farklı azot kaynaklarından pepton ve yeast ekstrakt üzerinde yapılan çalışmada en yüksek aktivite 10 g/l ile yeast ekstraktta tespit etmişlerdir. $MgSO_4$ ve $CaCl_2$ 'nin enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde herhangi önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Çalkalama hızının enzim üretimine etkisini incelemek için yaptıkları deneyde, 100-150-200 rpm çalkalama hızlarından en iyi aktiviteyi 150 rpm'de elde etmişlerdir. 25 ile 45°C arasında 6 farklı inkübasyon sıcaklığında en iyi aktivite 33°C'de ve pH: 5.0 ile 8.0 arasında yapılan 4 farklı pH çalışmalarında en iyi aktiviteyi pH: 7.0'da tespit etmişlerdir.

Kammoun ve ark. (2008) tek bir karbon kaynağı olarak buğday kepeğini kullanarak 3 deneysel tasarıma dayalı istatistiksel metod ile bir mantar türü olan *Aspergillus oryzae* CBS 819.72'den α -amilazın çeşitli parametrelerinin optimizasyonunu çalışmışlardır. Tepki yüzey metodu (RSM) altında Box Benken yöntemi kullanarak sıcaklık, agitasyon ve inokülüm miktarı gibi enzimin bazı parametrelerinin optimizasyonları ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Plackett-Burman yöntemi kullanılarak on dokuz tane besin maddesinin α -amilazın üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. KH_2PO_4 , üre, gliserol, $(NH_4)_2SO_4$, $CoCl_2$, kazein hidrozilatı, soya küspesi hidrozilatı ve $MgSO_4$ 'ün enzim formasyonu üzerinde pozitif etkiler yarattığını rapor etmişlerdir. Optimize edilmiş besin maddelerinin konsantrasyonu Taguchi metodu kullanılarak elde edilmiş ve bu verilerin analizi yapıldığında α -amilazın ekspresyonunu %73.2 (40.1 den 151.1 U/ml) kadar artırdığını teorik olarak ifade etmişlerdir. Bu koşullar deneysel yöntemlerle tasdik edilmiş ve α -amilaz verimini %72.7 oranında artırdığını kaydetmişlerdir.

Baysal ve ark., (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.*'den alkalın α -amilaz üretmişlerdir. Katı substrat kaynağı olarak buğday kabuğu ve mercimek kabuğu kullanarak 37 °C, 24. saat, pH 10 ve % 30 başlangıç nem oranı ile mercimek

kabuğunda 216.000 U/g ve buğday kabuğunda 172.000U/g değerlerinde maksimum enzim elde etmişlerdir.

Mükherjee ve ark. (2009) SSF tekniğiyle termofilik *Bacillus subtilis* DM-03'ten α -amilaz üretimi için substrat kaynağı olarak çeşitli tarımsal sanayi atıkları üzerinde çalışmalar yapmışlar ve α -amilaz üretimi için en iyi substrat kaynağını patates kabuğu olarak tespit etmişlerdir. Katabolik represyondan dolayı şeker içeriği yüksek olan substratların enzim sentezi üzerinde negatif etki yarattığını; ancak nişasta içeriği yüksek olan substratların α -amilaz sentezini artırdığını çok yönlü analizler sonucunda tespit etmişlerdir. İnkübasyon süresini 72. saat ve pH 7.5 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca bu bakteriden elde edilen α -amilaz'ın ticari çamaşır deterjan formülasyonlarında yüksek bir stabilite ve uyumluluk gösterdiğini de rapor etmişlerdir.

Elarbi ve ark. (2009) Aspir (*Carthamus tinctorius L.*) çiçeğinden α -amilaz elde etmeye çalışmışlardır. Ham ekstrakt %20-60 doygunlukta amonyum sülfat ile çöktürülerek daha sonra bu fraksiyon, affinite kromatografisine tabi tutularak enzim yaklaşık 131 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 35 kDa olarak hesaplamışlardır. Maksimal enzim aktivitesi için pH 6 ve sıcaklık 55°C olarak belirtmişlerdir. Ca^{2+} iyonlarının aktiviteyi artırmakla beraber Fe^{2+} iyonlarının ise aktiviteyi inhibe ettiğini bildirmişlerdir .

Roses ve ark. (2009) substrat kaynağı olarak şeker kamışı kullanarak SSF tekniğiyle *Aspergillus niger* UO-01'den amilaz sentezini gerçekleştirip deneysel modelleme ve RSM yöntemi ile bu enzimin bazı optimizasyonlarını elde etmişlerdir. Enzimin substrat partikül büyüklüğünü, inkübasyon sıcaklığını ve pH'sını, inokülüm konsantrasyonunu, substratın nem miktarını, total şeker, nitrojen ve fosfor konsantrasyonlarını belirlemeye çalışmışlardır. Yüksek konsantrasyondaki amilaz üretimi için: substrat miktarı 457.82 EU/g, partikül büyüklüğü 6-8 mm, inkübasyon sıcaklığı ve pH'sı, 30.2°C ve 6.0, substratın nem miktarı %75.3, inokülüm konsantrasyonu 1×10^7 spor/g, nişasta, yeast ekstrakt ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarını sırasıyla: 70.5, 11.59 ve 9.83 mg/g olarak hesaplamışlardır. Optimizasyondan sonra belirledikleri optimum şartlarda enzim üretimini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçların güvenilirlikleri deneysel modelleme RSM ile teyit edilmiştir.

Chen ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Saccharomycopsis fibeliger* A11'den yüksek amilaz üretimi için çeşitli parametrelerin optimizasyonunu merkezi kompozit programı (central composite design) ile belirlemeye çalışmışlardır. Nem miktarı 610.0 ml/kg, inokülüm 30.0 ml ($OD_{600nm} = 20.0$)/kg, buğday kepeğinin pirinç kabuğuna oranı 0.42, manyok nişastası konsantrasyonu 20.0 g/kg, sıcaklık 28°C ve normal pH gibi optimal parametreleri RSM ile elde etmişlerdir. Çalışmalar sonucunda manyok nişastasının amilaz ile monosakkaritlere ve oligosakkaritlere dönüşebileceğini belirtmişlerdir.

Bhat ve ark. (2010) muz kabuğu ve mısır gibi tarımsal sanayi artıklarının birçok biyokimyasal reaksiyonlar için substrat kaynağı olarak ekonomik kullanımı, endüstriyel biyoteknolojideki gelişmelere potansiyel fırsatlar sağlamaktadır. Zengin organik içeriklerinden dolayı α -amilaz gibi önemli enzimlerin üretiminde ideal substrat kaynağı olarak tercih edilmektedirler. Katı substrat kaynağı olarak mısır ve muz kabuğunu kullanarak *Bacillus subtilis*'ten amilaz üretimi ile ilgili birçok farklı parametrelerin optimizasyonu için Taguchi metodunu kullanmışlardır. Orthogonal array experiment'te dayalı Taguchi metodu ile amilaz üretimi üzerinde inkübasyon süresi, inokülüm miktarı, sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynaklarının etkilerini incelemek için kullanmışlardır. Taguchi S/N (sinyal/noize) oranı metodu ile muz kabuğunda 1799 U/ml ve mısırdaki 671 U/ml ile amilaz aktivitesi olduğu tahmin edilmiştir. Optimal şartlarda yapılan deneysel çalışmalar ile muz kabuğunda 1580U/ml ve mısırdaki 530.32 U/ml değerinde amilaz aktiviteleri ölçülmüştür. Tahmini değerler ile standart değerler arasındaki sapmanın küçük etkileri ihmal edilerek elde edilen tahmini sonuçlar deneysel veriler ile iyi doğruluğu kanıtlanmıştır.

Hashemi ve ark. (2010) substrat kaynağı olarak buğday kepeğinin kullanıldığı SSF tekniğiyle *Bacillus* sp. KR-8104'den kalsiyum'dan bağımsız ham α -amilaz elde etmeye ve enzim aktivitesi üzerinde düşük pH'nın sinerjistik etkisini araştırmışlardır. Katı substratın içerdiği nem oranı, parça büyüklüğü, inkübasyon sıcaklığını ve periyodunu, inokülüm, farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Maksimum enzim üretimi için 1:1.5 oranında çeşme suyu ile nemlendirilmiş buğday kepeği (140 U/g), %1 (NH_4NO_3), %1 laktöz, inkübasyon sıcaklığını 37 °C ve inkübasyon periyodunu 42.saat olarak belirlemişlerdir. 40 ve 45 °C sıcaklık aralıklarında enzim üretimi düşük olmasıyla birlikte canlı hücre sayısının

yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca enzim üzerindeki sıcaklık ve pH' nın optimum şartlarını belirlemek için tepki yüzey metodunu (RSM) da kullanmışlardır. Ezim aktivitesi tahmini için ikinci dereceden bir matematiksel denkleme dayalı central composite design kullanmışlardır. Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda daha yüksek sıcaklıklardaki enzim aktivitesi üzerinde düşük pH'nın sinerjistik etki gösterdiğini ve enzim aktivitesi için $R^2=0.90$ ($p<0.0001$) ifadesini yapılan deneylerle açıklamaya çalışmışlardır.

Hashemi ve ark. (2011) kuru ağırlık değişimine bağlı SSF tekniğiyle *Bacillus* KR-8104'den α -amilaz üretimi ve bakteriyel büyümenin değişik fazlarını matematiksel modelleme ile gösterimi ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bakteriyel hücrelerin büyümesi ve substrat olarak kullandıkları buğday kepeği ile elde ettikleri α -amilaz ile ilgili inkübasyon süresi üzerindeki kuru ağırlığın değişimi ve her bir fazın matematiksel tanımını basit modeller ile ifade etmeye çalışmışlardır. Deneysel gözlemlerle iyi bir şekilde uyarlanmış bu model SSF α -amilaz üretimi işlemlerinde ve bakteriyel hücrelerin gelişimi ile ilgili her iki durumda da başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Sharma ve Satyanarayana (2011) SmF tekniğini kullanarak yeni asidofilik bakteri *Bacillus acidicola* TSAS1'dan yüksek maltoz formundaki ve Ca^{2+} 'den bağımsız α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. En iyi enzim üretimi için önemli olan; nişasta miktarı, K_2HPO_4 , inokülüm miktarını ve sıcaklık gibi önemli parametreleri tespit etmek için Plackett ve Burman programını kullanmışlardır. Bu önemli değişkenlerin optimum değerlerin belirlemek için RSM programını kullanarak nişasta (% 2.75), K_2HPO_4 (% 0.01), inokülüm miktarını [% 2(v/v) 1.9×10^8 CFU ml⁻¹] ve sıcaklığı 33°C olarak belirlemişlerdir. Bir fermentasyon çeşidi olan fed-batc modelini kullanarak enzim üretimini 2.9 kat artırmışlardır.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Biyolojik Materyal

Yaptığımız çalışmada ticari olarak Microbiologist inc.'ten temin edilen *Bacillus subtilis* ATCC 6051 biyolojik materyal olarak kullanıldı.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. Azot Kaynakları

Malt özütü, maya özütü, sodyum nitrat ve amonyum sülfat Merck'ten; kazein, pepton ve et özütü Oxoid'den; tripton Difco'dan; amonyum nitrat ve amonyum klorid Riedel De Haen'den temin edilmiştir.

3.2.2. Karbon Kaynakları

Fruktoz, galaktoz, laktoz, mannoz ve ksiloz Sigma'dan; arabinoz ve sakkaroz Difco'dan; glukoz Merck'ten; temin edilmiştir.

3.2.3. Metal İyonları

MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O ve CaCl₂ Merck'ten; CuSO₄.5H₂O Riedel De Haen'den, ZnSO₄.7H₂O Analar'dan, temin edilmiştir.

3.2.4. Deterjanlar

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Tween40 Merck'ten, TritonX100 Sigma'dan temin edilmiştir.

3.3. Besiyerleri

3.3.1. Katı Besiyeri

8 g Nutrient Broth (Oxoid) ve 16 g agar (Merck), 1000 ml saf suya tamamlanarak çözüldükten sonra otoklava bırakıldı.

3.3.2. Sıvı Besiyeri

3.3.2.1. Nutrient Broth (NB) Besiyeri

8 g NB, 1000ml saf suya tamamlanıp çözünme işlemi tamamlandıktan sonra otoklava bırakıldı.

3.3.2.2 Luria Broth (LB) Besiyeri

10 g maya özütü, 5 g NaCl (Merck), 5 g tripton, 1000 ml saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklava bırakıldı.

3.3.3. SSF Besiyeri

Pamuk küspesi, mısır küspesi, mercimek kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve arpa sapı kurutularak blendırdan geçirildi. Farklı gözenek büyüklüğündeki eleklerden geçirilerek 500, 1000 ve 1500 µm, olmak üzere üç farklı parça büyüklüğünde substratlar elde edildi. 1500 µm büyüklüğünde olanlar alındı. 100 ml'lik erlenmayer içerisinde hacim % 30 olacak şekilde 3 g tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu eklendi. 121°C'de 15 dk otoklavda bekletilerek steril edildi. Soğuduktan sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden % 30 inokulum besi yerine katılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.4. Çözeltiler

3.4.1. Tampon Çözelti

30 ml 0.1 M Na₂HPO₄ ve 19 ml 0.1M NaH₂PO₄ hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.4.2. Nişastanın Hazırlanması

% 0.5'lik nişasta 0.1M pH 7.0 sodyum fosfat tamponu içinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

3.4.3. Alkalin Çözeltisi

% 4 Na₂CO₃, % 4 Na-K tartarat, % 2 CuSO₄.5H₂O

Bir beherde 100 ml için %4 oranında Na₂CO₃ hazırlandı. Ayrı tüplerde hazırlanan Na-K tartarat ve CuSO₄'ten 1'er ml ilave edilerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Alkalin çözeltisi protein miktar tayininde kullanıldı.

3.4.4. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

Bir beherde 20 g 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS veya DCA), 400 ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandı. Başka bir beherde 32 g NaOH çözeltisi 300 ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandı. DNS karıştırıcıda karışmaya devam ederken üzerine yavaş yavaş NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Üzerine 600 g Na-K tartarat azar azar eklendi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı. Bernfeld reaktifi α -amilaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı.

3.5. Kullanılan Cihazlar

Otoklav	(Hırayama)
Etüv	(Heraeus)
Steril Kabin	(Telstar AV 100)
Çalkalayıcı	(Selecta P)
Elektronik Terazı	(GEC Avery)
İnkübatör	(EN 400)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K 15)
pH Metre	(METTLER MP220)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Mikropipet	(Eppendorf)
Blendir	(Waring Commercial Laboratory Blender)
Spektrofotometre	(Varian)

Deep-Freeze	(Sanyo Medical Freezer)
Vorteks	(Fisons Whirli Mixer)
Küvet	(Light path)

3.6. Bakteri Üretimi

NB ve LB sıvı besiyerlerine katı besi yerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakıldı. 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakteri kolonilerinden SSF besiyerine ekim yapıldı.

3.7. SSF Besiyerinden Enzim Üretimi

SSF besiyeri 120. saate kadar inkübasyona bırakıldı. 24 saatte bir SSF besi yeri üzerine 10 ml çeşme suyu eklenip 30 dk çalkalandıktan sonra karışım steril gazlı bezle süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne aktarılarak soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite tayinlerinde kullanıldı.

3.8 Enzim Aktivite Tayini

3.8.1. α -Amilaz Enzim Aktivite Tayini

α -Amilaz enzim aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı (Bernfeld 1955). Bu yöntemde göre 150 μ l enzim çözeltisi ve 200 μ l % 0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M, pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda çözünmüş) 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 400 μ l DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) çözeltisi ilave edilerek 5 dk kaynar su banyosunda bekletildi. DNS, sıcakta indirgen şeker uçlarıyla tepkimeye girerek reaksiyonun durmasını ve renk oluşumunu sağlar. Örnekler soğuduktan sonra üzerine 8 ml saf su ilave edilerek seyreltme yapıldı. Daha sonra vorteksten geçirildi ve 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Bir enzim ünitesi deney şartları altında 1 μ mol nişastayı 30 dk'da maltoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.8.2. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry 1951). Tüplere 2.5 ml alkalın çözeltisi konulduktan sonra üzerine 25 µl enzim ve 225 µl saf su ilave edildi. Örnekler 15 dk 40°C'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 250 µl Folin Reaktifi (FCR, Sigma) ilave edilerek 30 dk karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen Bovin Serum Albumin'den (BSA) bir seri standart çözelti hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı.

3.9. Enzimlerin Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi

3.9.1. Optimum Substratın Saptanması

Pamuk küspesi, mısır küspesi, mercimek kabuğu, arpa sapı, pirinç kabuğu ve buğday kepeği 3 g tartılarak erlenlere aktarıldıktan sonra üzerine çeşme suyu eklenip otoklava bırakıldı. Daha sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden 3000 µl ekim yapılarak α-amilaz üretimi üzerine her birinden farklı substratların etkisi incelendi.

3.9.2. Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması

Hazırlanan SSF besi yerleri, sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra inkübasyona bırakıldı. 120. saate kadar 24 saatte bir enzim aktivite tayini yapılarak en uygun inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışıldı.

3.9.3. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması

SSF besi yerleri hazırlanıp otoklav işleminden sonra bakteri ekimi yapıldı. Örnekler 25, 30, 37, 40, 45, 50 ve 55°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayinine bakıldı.

3.9.4. Optimum Ekstraksiyon Ortamının Saptanması

50 mM NaCl, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween 40, saf su, pH 7 sodyum fosfat tamponu ve çeşme suyu (10 ml) kullanılarak enzim üretimi için en iyi ekstraksiyon ortamı tespit edilmeye çalışıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayinine bakıldı.

3.9.5. Başlangıç pH'nın Saptanması

Enzim üretimi üzerine başlangıç pH'nın etkisini incelemek için çeşme suyunun pH'sı 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olmak üzere farklı pH'lara 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile ayarlandı. Hazırlanan SSF besi yerlerine otoklavda sterilizasyonu sağlandıktan sonra ekim yapıldı. Daha sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayinine bakıldı.

3.9.6. Optimum Aktivite Sıcaklığının Saptanması

Enzimlerin üretimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'lerdeki sıcaklık aralıklarında 30 dk aralıklarla aktivite tayini yapılarak optimum aktivite sıcaklığı tespit edilmeye çalışıldı.

3.9.7. Uygun Ekim Miktarının Saptanması (İnokülüm Hacmi)

SSF besi yerlerine besi yeri hacminin %10, 20, 30, 40, 60 ve 80'i olacak şekilde 1000 µl'den 8000 µl'ye kadar değişen miktarlarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayini yapıldı.

3.9.8. Uygun Nem Miktarının Saptanması (Moisture Level)

α -Amilaz üretimi için en uygun nem miktarını tespit etmek için SSF besi yerine, besi yeri hacminin % 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ı olacak şekilde sırasıyla; 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 g ağırlığında pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10 ml çeşme suyu eklenerek otoklava bırakıldı. Daha sonra SSF besi yerlerine bakteri ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

3.9.9. En İyi Aktivite Veren Substratların Saptanması

α -Amilaz üretimi için en iyi aktiviteyi veren iki substrat 0.5-3.5, 1-3, 1.5-2.5, 2-2, 1.5-2.5, 1-3, 0.5-3.5 g olacak şekilde tartıldıktan sonra üzerine 10 ml çeşme suyu eklenerek otoklav işlemine tabi tutuldu. Elde edilen üst sıvıdan enzim aktivite tayini yapıldı.

3.9.10. En İyi Enzim Aktivitesi İçin Çalkalama Hızının Saptanması

α -Amilaz üretimi için 60, 100, 120, 150, 180 ve 200 rpm olmak üzere farklı çalkalama hızlarına bırakılan örneklerden 48. saat sonra alınan üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.

3.9.11. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besi yerleri hazırlandıktan sonra besi yeri hacminin % 1'i olacak şekilde azot kaynaklarından; sodyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorür, et özütü, tripton, pepton, maya özütü ve kazein SSF besi yerlerine eklendi. Örnekler 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra otoklava bırakıldı. Daha sonra ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayinlerine bakıldı.

3.9.12. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besi yerleri hazırlandıktan sonra besi yeri hacminin %1'i olacak şekilde karbon kaynaklarından; mannoz, arabinoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sakaroz ve ksiloz SSF besi yerlerine eklendi. Daha sonra ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

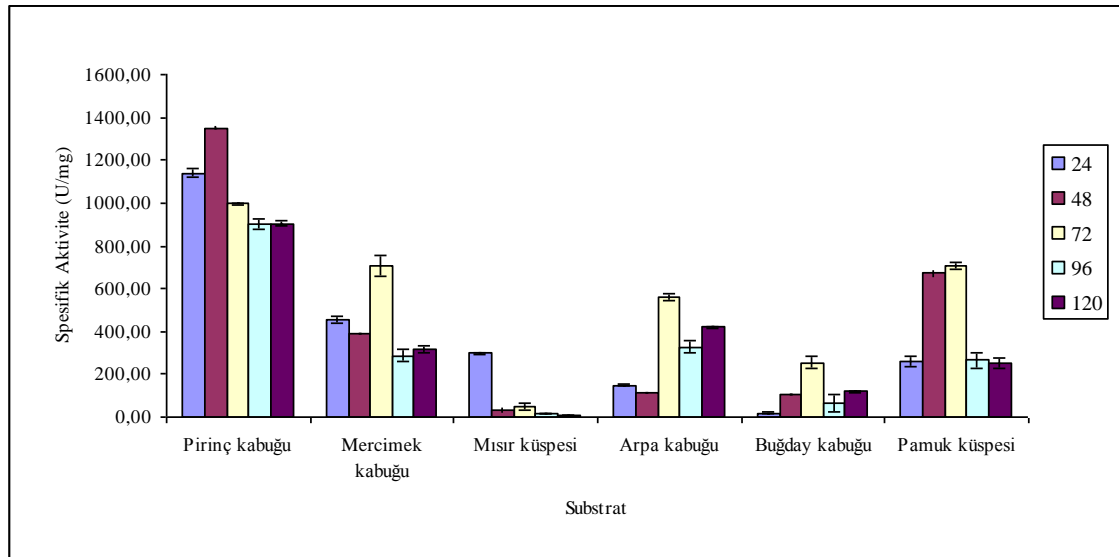
3.9.13. Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besi yerleri hazırlandıktan sonra besi yeri hacminin %0.1'i olacak şekilde metal iyonlarından CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ SSF besi yerlerine eklendi. 10 ml saf su ilave edilip sterilizasyon ve ekim yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Enzim Üretimi Üzerine Substratın Etkisi

Çalışmada SSF’te *Bacillus subtilis* ATCC 6051’in üremesi için pamuk küspesi, mısır küspesi, pirinç kabuğu, buğday kepeği, mercimek kabuğu ve arpa sapı gibi çeşitli endüstriyel atıklar kullanılarak bakteri için uygun substrat kaynağı belirlenmeye çalışıldı. Bakterimiz için en iyi substrat kaynağı olarak 48. saatte pirinç kabuğunda elde edildiğinden çalışmalara pirinç kabuğu kullanılarak devam edildi. Şekil 4.1.’de görüldüğü gibi en iyi aktivite 1349.5 U/mg değerinde pirinç kabuğunda elde edilmiştir. Elde edilen α -amilaz aktivitesine göre sıralama pirinç kabuğundan sonra sırasıyla pamuk küspesi, mercimek kabuğu, arpa sapı, buğday kabuğu, mısır küspesi şeklindedir. Kullandığımız katı substratlardan en iyi aktiviteyi pirinç kabuğu vermesinin nedeni besin içeriğinin daha fazla olması (www.acilforum.com), ya da kullandığımız *Bacillus subtilis* ATCC 6051’in bu substrata karşı özel bir spesifitesinin olabileceği düşünüldü. Buna karşın mısır küspesi ve buğday kabuğunda kayda değer oranda aktivite gözlemlenmedi.



Şekil 4.1. α -Amilaz üretimine uygun substratın etkisi

Mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu için fermantasyon sistemine uygun katı substratın belirlenmesi oldukça önemlidir. α -Amilazların substrat özgüllüğü mikroorganizmadan mikroorganizmaya farklılık gösterir. Genelde α -amilazlar ilk başta nişasta olmak üzere amiloz, amilopektin, siklodekstrin ve maltotriosa yüksek spesifite gösterirler (Gupta 2003).

SSF'te yaygın olarak kullanılan ve birçok araştırmacı tarafından uygun olarak belirlenen substratların başında pirinç ve buğday kabuğu darı, mısır, soya fasulyesi, muz kabuğu, manyok, kahve samanı ve patates artıkları gibi tarımsal ürünler başta gelmektedir (Krishna ve ark. 1996, Soccol ve ark. 2003).

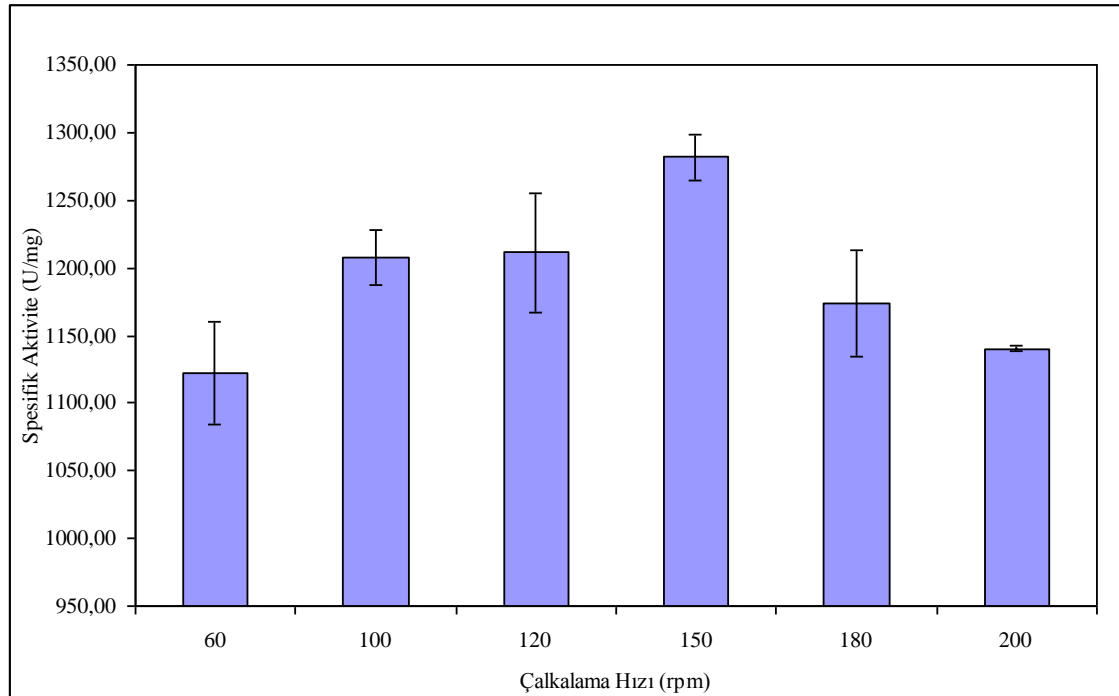
Sodhi ve ark. (2003) SSF tekniğiyle *Bacillus PS-7*'den α -amilaz elde etmek için katı substrat kaynağı olarak buğday kabuğunu, Kunamneni ve ark. (2005) SSF tekniğiyle termofilik fungus *Termomyces lanuginosus*'ten ekstrasellüler amilaz üretmek için SSF'te katı substrat buğday kepeğini, Gangadharan ve ark. (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23842)'den α -amilaz elde etmek için substrat kaynağı olarak 1:1 oranında buğday kabuğu ve groundnut oil cake (GOC) karışımını, Rajagopalan ve Krishan (2007) *Bacillus subtilis* (KCC103)'ten α -amilaz elde etmek için substrat olarak şeker kamışı posasını, Mukherjee ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis* (DM-03)'ten α -amilaz elde etmek için patates kabuğunu, Perez ve ark. (2009) SSF tekniğiyle *Aspergillus niger*'den α -amilaz elde etmek için katı substrat kaynağı olarak şeker kamışı küspesini, Hashemi ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Bacillus sp. KR-8104*'ten Ca^{2+} ye bağlı olmayan yüksek asidik pH da aktif hiper-termostabil α -amilaz elde etmek için substrat kaynağı olarak buğday kabuğunu kullandıklarını bildirmişlerdir.

Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.*'den alkalın α -amilaz elde etmek için katı substrat kaynağı olarak buğday kabuğu ve lentil husk (mercimek kabuğu) kullanarak buğday kabuğunda maksimum 216,000 U/gr ve lentil husk'ta ise 172,800 U/gr oranında ürün elde etmişlerdir.

Serin (2009) SSF tekniğiyle *Bacillus circulans*'tan α -amilaz ve β -Galaktosidaz üretiminde pirinç kabuğunu, Yoshizako ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Monascus anka*'dan α -amilaz üretiminde arpa ve pirinci, Bhat ve ark. (2010) Taguchi metodu kullanarak *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz üretiminde muz kabuğunu kullanarak en iyi aktivite elde etmişlerdir.

4.2. Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Otoklavdan çıkan SSF besiyerine steril kabinde 3 ml bakteri ekimi yapıldıktan sonra sıcaklık aynı olmak üzere sırasıyla 60, 100, 120, 150, 180 ve 200 rpm hızlarında enzim aktivite tayinine bakıldı. Aktivite tayini sonucunda maksimum enzim aktivitesi en yüksek şekil 4.2.'de görüldüğü gibi 1281.6 U/mg miktarında 150 rpm'de tespit edildi. Çalışmalara bu şekilde çalkalama hızı 150 rpm olarak devam edildi. 60 ve 200 rpm çalkalama hızlarında 1122,3 ve 1140.4 U/mg değerinde aktivitenin biraz daha düştüğü tespit edilmiştir. Bunun nedeni ortamdaki havanın transferinden aktivitenin etkilenmesinden dolayı olduğu düşünüldü.



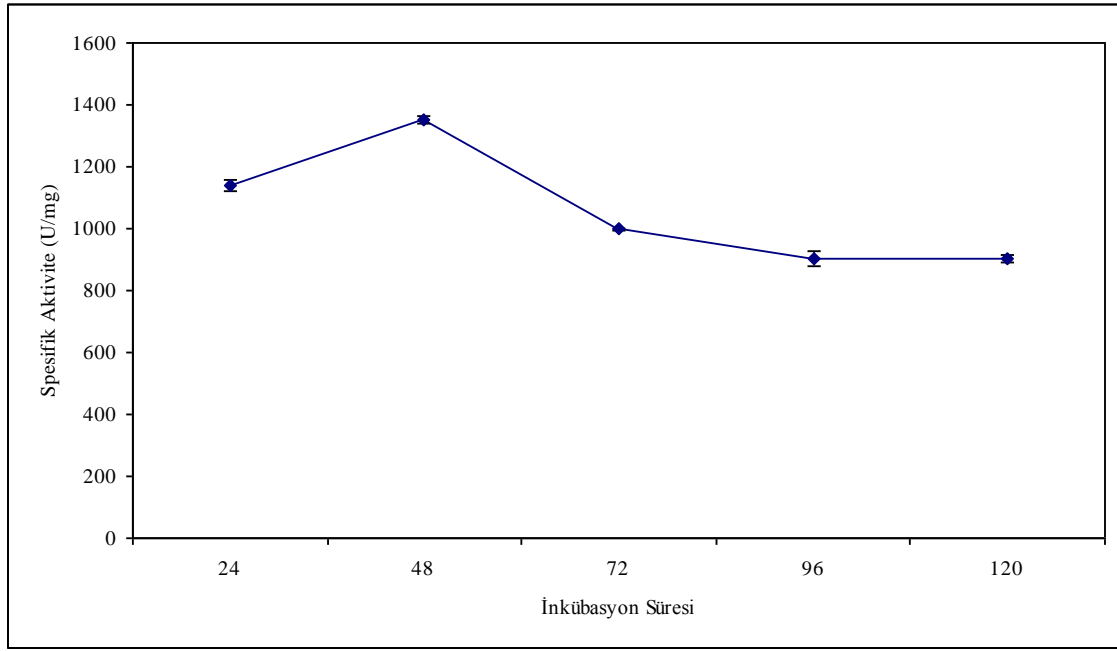
Şekil 4.2. α -Amilaz üretimine çalkalama hızının etkisi

Çalkalama birçok mikrobiyal fermentasyon işleminde karışım ve oksijen transfer oranını yoğun şekilde etkiler ve bu nedenle morfoloji meydana gelen ürünlerden etkilenir. Düşük hızlarda yeteri kadar oksijen transferi sağlanmadığından yüksek hızlarda ise bakteriyel büyüme olumsuz yönde etkilendiğinden dolayı enzim üretimi de azalmaktadır. 100-250 rpm arasındaki çalkalama oranlarının genellikle α -amilaz üretimini artırdığı tarafından rapor edilmiştir (Gubta 2003).

Rıaz ve ark. (2003) *Bacillus subtilis* GCBUCM-25'ten 200 rpm'de, Balkan ve Figen (2007) SSF tekniği ile *Penicillium chrysogenum*'dan 220 rpm'de, Tanyıldızı ve ark. (2007) SSF tekniğiyle *Bacillus amyloliquefaciens*'ten 150 rpm'de ve Hashemi ve ark. (2011) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.* KR-8104'den katı substrat kaynağı olarak buğday kabuğu kullanarak 180 rpm'de maksimum α -amilaz elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

SSF katı substrat kaynağı olarak pirinç kabuğu seçildikten sonra uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi için 120. saate kadar her 24 saatte bir enzim aktivite tayinine bakıldı. α -Amilaz için en uygun inkübasyon süresi 48. saatte 1349.5 U/mg değerinde maksimum aktivite tespit edildi. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi 48. saat olarak tespit edilmiş bu saatten sonra ise enzim aktivitesinde düşüş meydana gelmiştir. Gangadharan ve ark. (2006) mikrobiyal büyümenin düşmesinin nedeni ortamda substratın bitmesinden dolayı mikroorganizmanın durgunluk evresine girmesi ve dolayısıyla ortamda oluşan sekonder metabolitlerin oluşturduğu kontaminasyonun aktiviteyi düşürdüğünü ve enzim üretiminin azalttığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.3. α -Amilaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi

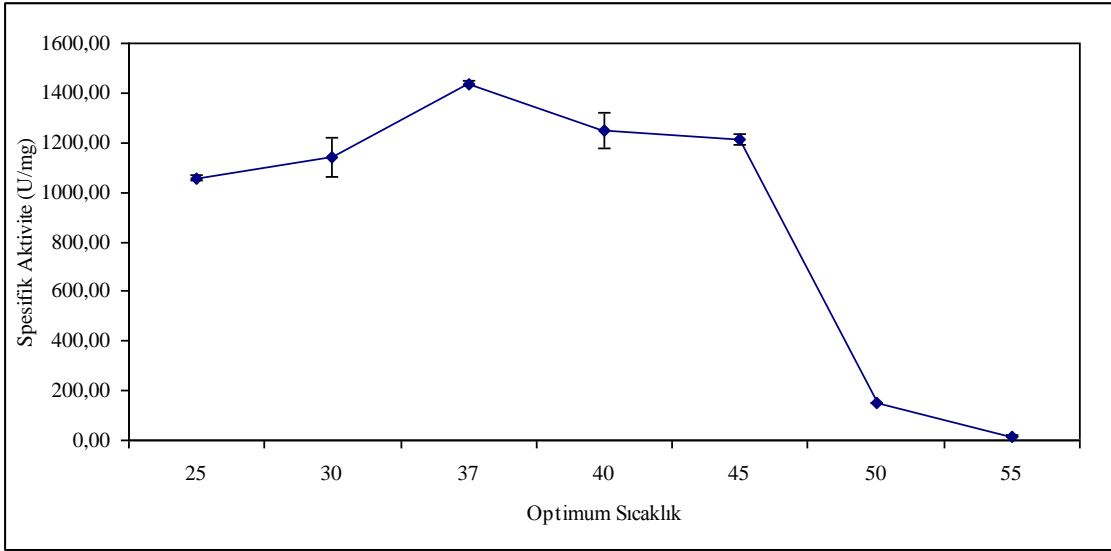
Baysal ve ark. (2008) fermantasyon ortamında meydana gelen diğer bileşiklerin etkileşim sonucu oluşan denatürasyonun, aktiviteyi ve dolayısıyla enzim üretimini düşürdüğünü ifade etmişlerdir.

SSF’te inkübasyon süresi, zaman ve kullanılabilirlik açısından oldukça önemlidir. İnkübasyon süresinin kısalığı hem zamandan tasarruf açısından hem de bakterinin daha az kontamine olması açısından önemlidir.

Sodhi ve ark. (2003) SSF tekniğiyle *Bacillus* PS-7’den yüksek termostabil özelliğine sahip α -amilazı 48. saatte, Tiwari ve ark. (2007) SSF tekniğiyle *Penicillium rugulosum*’dan α -amilazı 72. saatte, Gangadharan ve ark. (2007) *Bacillus amyloliquefaciens*’ten α -amilazı 42. saatte, Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.*’den alkalın α -amilazı 24. saatte, Mukherjee ve ark. (2009) SSF tekniğiyle termofilik *Bacillus subtilis* (DM-03)’ten α -amilazı 72. saatte, Hashemi ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.* (KR-8104)’ten Ca^{+2} ’ye bağlı olmayan termostabil α -amilazı 48. saatte ve Erdal ve Taşkın (2010) SSF tekniğiyle *Penicillium expansum* MT-1’den 6. günde maksimum enzim elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.4. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

Enzim üretimde optimum sıcaklığı belirlemek için SSF besiyerleri hazırlandı. Bunun için 3'er g pirinç kabuğu tartılarak 100'lük erlenmayerlere bırakıldı ve üzerine 10 ml musluk suyu ilave edilerek otoklav işlemine tabu tutuldu. Otoklavda sterilizasyonu sağlanan katı besiyerlerine steril kabinde ekim yapılarak her birisi 25, 30, 37, 40, 45, 50 ve 55°C olmak üzere farklı inkübasyon sıcaklıklarına bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından gerçekleştirilen enzim aktivite tayininde en iyi enzim aktivitesi için optimum inkübasyon sıcaklığının 37°C'de 1436.0 U/mg değerinde maksimum aktivite tespit edildi (Şekil 4.4). Ancak sıcaklığın yükselmesiyle enzim üretiminde düşüş gözlemlendi. 55°C' de herhangi bir aktiviteye rastlanamadı.



Şekil 4.4. α -Amilaz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisi

Tanyıldızı ve ark. (2007) fermentasyon sıcaklığı SSF'te mikrobiyal büyüme ve enzim üretimi ya da metabolitlerin belli bir sıcaklığa karşı hassasiyetleri açısından oldukça önemli yer tuttuğu belirtmişlerdir

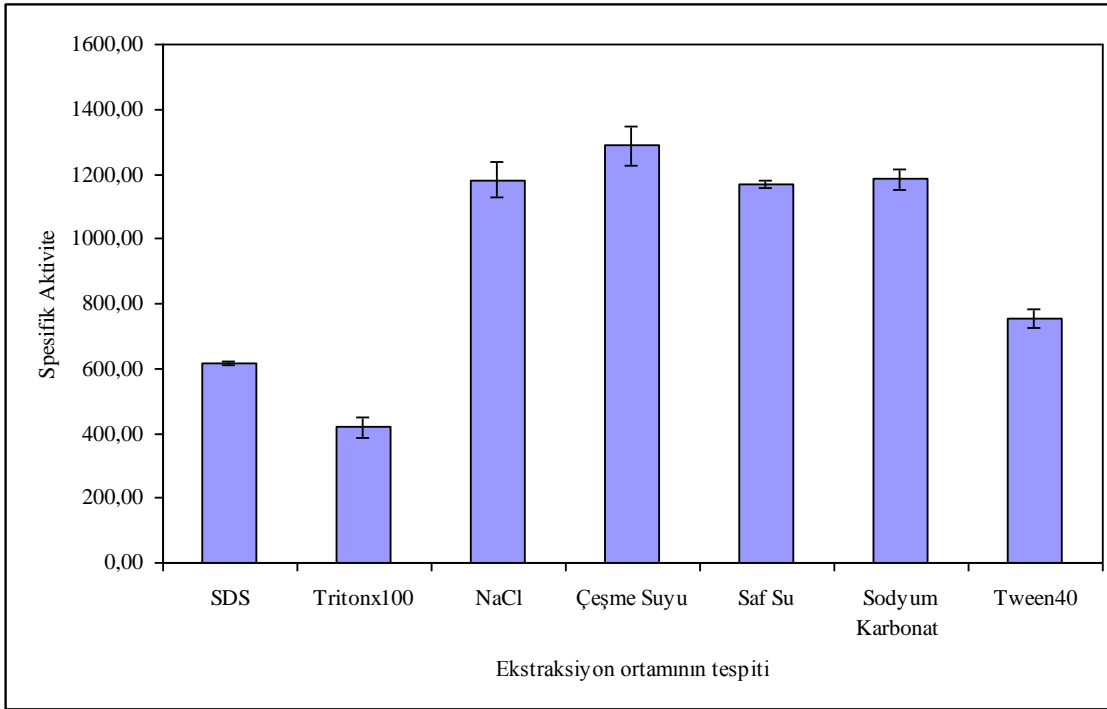
Pandey ve ark. (2008) sıcaklığı, biyolojik işlemler çok sınırlı sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilen bir olgu olarak ifade etmişlerdir. Ayrıca biyolojik bir uygulamanın gerçekleşmesinde sıcaklık; protein denatüresi, enzimatik inhibisyon, belirli bir metabolitin artışı, hücre ölümleri gibi önemli etkilerinden dolayı önemli olduğunu belirtmişlerdir. α -Amilaz aktivitesi için gerekli olan optimum sıcaklık mikroorganizmanın büyümesi ile ilişkilidir.

Yapılan çalışmalarda kullanılan *Bacillus* tiplerinin optimum büyüme sıcaklıkları 25-37°C arasında değişmektedir. Ancak termofilik olarak bilinen 75°C ve üstünde daha yüksek sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahip *Bacillus* türleri de bulunmaktadır.

Kunamneni ve ark. (2005) SSF tekniğiyle termofilik fungus *Termomyces lanuginosus*'ten 50°C'de, Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.*'den 37°C'de, Hashemi ve ark. (2011) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.* KR-8104'ten Ca⁺²'ye bağlı olmayan yüksek pH stabilitesinde aktif hiper-termostabil α -amilazı 37°C'de maksimum elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.5. Enzim Üretimi İçin Ekstraksiyon Ortamının Belirlenmesi

Katı substrat kaynağı olarak pirinç kabuğu ile hazırlanan SSF besi yeri otoklavda steril edilip steril kabinde SSF besi yerine bakteri ekimi yapıldıktan 48 saat sonra 50mM NaCl, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween 40, 10 ml saf su, pH 7.0 sodyum fosfat tamponu ve 10 ml çeşme suyu ilave edilerek 30 dk sonra enzim aktivite tayinine bakıldı. Enzim için en iyi ekstraksiyon ortamı çeşme suyunda elde edildi. En düşük aktivite ise %1 TritonX100'de görüldü (Şekil 4.5). Enzim için aktivite sıralaması yapılacak olursa, çeşme suyu>NaCl>pH7.0 sodyum fosfat tamponu>saf su >Tween40>SDS> TritonX100 şekline sonuç elde edilir. Enzim için çeşme suyunda elde edilen maksimum aktivite değeri 1287.2 U/mg iken en düşük α -amilaz aktivitesi TritonX100'da 419.0 U/mg olarak tespit edilmiştir. En iyi aktivitenin çeşme suyunda olması çeşme suyunda tuz oranının az olmasından kaynaklanabilir. Sürfaktanlar fermentasyon ortamında hücre zarının geçirgenliğini (permiabilite) artırarak protein sekresyonunu artırır. Bunlar ekstrasellüler enzim üretiminde kullanılmaktadırlar. Sivaramakrishnan ve ark (2006) SDS, kolik asit, Tween gibi surfaktanların zarın geçirgenliğini artırarak enzim üretimini artırdığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.5. α -Amilaz üretimine ekstraksiyon ortamının etkisi

Haq ve ark. (2005) *Bacillus subtilis* GCBM-25'ten elde ettikleri α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine bazı surfaktanların etkisine bakmışlardır. Kullandıkları çamaşır sabunu, sıvı sabun, toz deterjan, Tween 80, Sodyum silikat, dettol (banyo) sabunu, akil benzen sulfonik asit, sodyum tripolyphosphate, sodyum lauryl sülfat (SLS) gibi surfaktanlardan sadece çamaşır sabununun α -amilaz aktivitesini artırdığı ve sodyum lauryl sülfat (SLS)'in aktiviteyi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Çamaşır sabununun aktiviteyi artırması, yüzey gerilimini azaltan silikatların yanında yağ alkollerin içermesinden dolayı fermentasyon ortamında hava miktarının arttırması yönüyle olabileceğini ifade etmişlerdir. Sodyum lauryl sülfat (SLS)'in aktiviteyi düşürmesi ise sodyum ve sülfat iyonlarının bakteriyel büyüme için toksik etki göstermesine bağlamışlardır.

Gupta ve ark. (2008) *Aspergillus niger*'den elde ettikleri α -amilaz aktivitesi üzerine; Tween 80, TritonX-100, sodyum dodesil sülfat (SDS) sırasıyla % 0.02, % 0.002 ve % 0.0002 konsantrasyonlardaki surfaktanların etkilerine bakmışlar ve bunların aktiviteyi artırdığını bildirmişlerdir.

Shafiei ve ark. (2010) *Nesterenkonia* sp. F suşundan ekstrasellüler halofilik α -amilaz üretimini, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'in aktiviteyi inhibe ettiğini;

ancak, fenil phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ve β -merkaptoetanol'ün aktiviteyi inhibe etmediğini belirtmişlerdir. Enzim, % 0.5 SDS, % 0.5 Sodium lauroyl sarcosinate diğer adı sarkosyl ve % 2 Triton X-100, % 2 Tween 80 ve Tween 20 gibi kimyasal deterjanlara karşı oldukça iyi bir şekilde stabilite gösterdiği belirtmişlerdir.

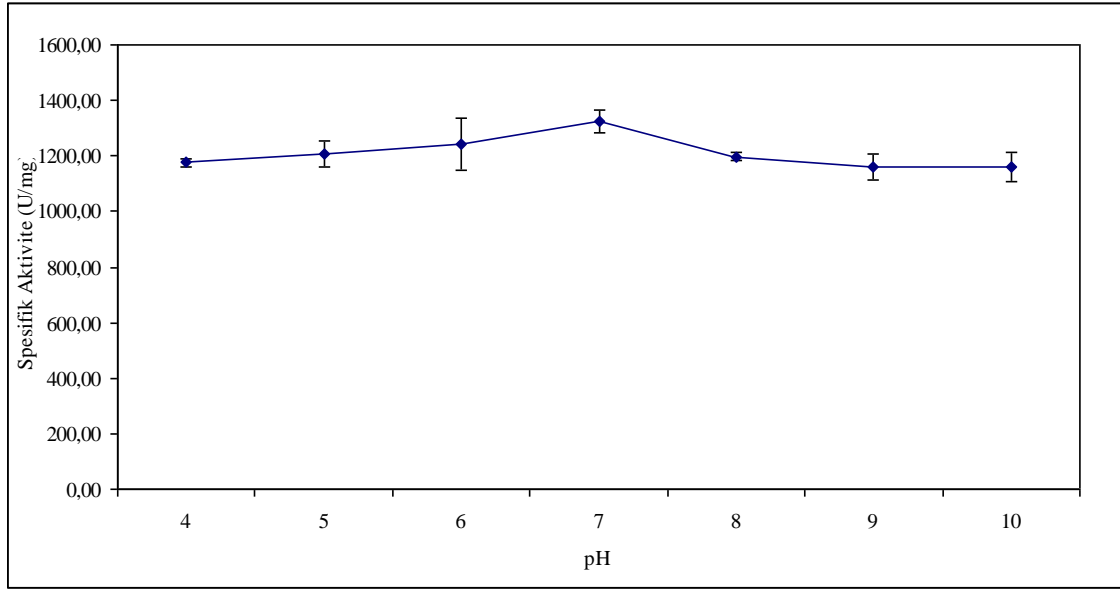
Hashemi ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Bacillus* sp. KR-8104'ten Ca^{2+} ye bağlı olmayan termostabil α -amilaz üretiminin aktivitesi üzerinde bazı iyonik ve non iyonik surfaktanların etkisini incelemiştir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda % 0.1 değerindeki non iyonik SDS, iyonik Tween 20 ve Tween 80'in enzim aktivitesini önemli olabilecek miktarlarda etkilemediğini belirtmişlerdir.

Hashemi ve ark. (2010) *Bacillus subtilis* ATCC2156'ten üretilen amilazın aktivitesini SDS, Tween 20 ve Tween 40'ın artırdığını bildirmişlerdir.

Gupta (2003) birçok metal katyonu, özellikle ağır metaller, sülfidril grubu reaktifleri, N-bromosüksinimid, polihidroksil merkuri benzoik asit, iodoasetat, BSA, EDTA ve EGTA gibi surfaktanların α -amilaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirmiştir.

4.6. Enzimin Optimum Başlangıç pH'sının Belirlenmesi

Enzimin optimum pH'sını belirlemek için pirinç kabuğu içeren SSF besi yerine çeşme suyunun pH'sı 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olmak üzere çeşitli pH'larda ayarlanarak 10 ml ilave edildi. Otoklav işleminden sonra bakteri ekimi yapılarak çalkalayıcıda 48 saat sonra enzim aktivite tayinine bakıldı. Şekil 4.6'te görüldüğü gibi enzim için maksimum aktivite pH 7'de 1372.7 U/mg olarak elde edildi. Bu yüzden çalışmalarda pH'sı 7.0 çeşme suyu kullanıldı. Mikrobiyal büyümeyi ve enzim aktivitesini etkileyen fiziksel parametrelerden birisi de başlangıç pH'dır. Fermantasyon ortamındaki hidrojen iyonlarının konsantrasyonlarından dolayı pH mikroorganizmaların büyümesi ve morfolojik özellikleri açısından oldukça önemlidir. α -Amilazların optimum pH aralığı 2-12 arasında değişiklik gösterir. Bakteri ve funguslardaki α -amilazlar asidik ve nötral pH'larda optimumdurlar. Bu enzimler genelde pH 4-11 aralığında stabildirler. Ancak aynı zamanda α -amilazların düşük bir pH aralığında da stabil olduğu rapor edilmiştir (Gupta 2003).



Şekil 4.6. α -Amilaz üretimine başlangıç pH'nın etkisi

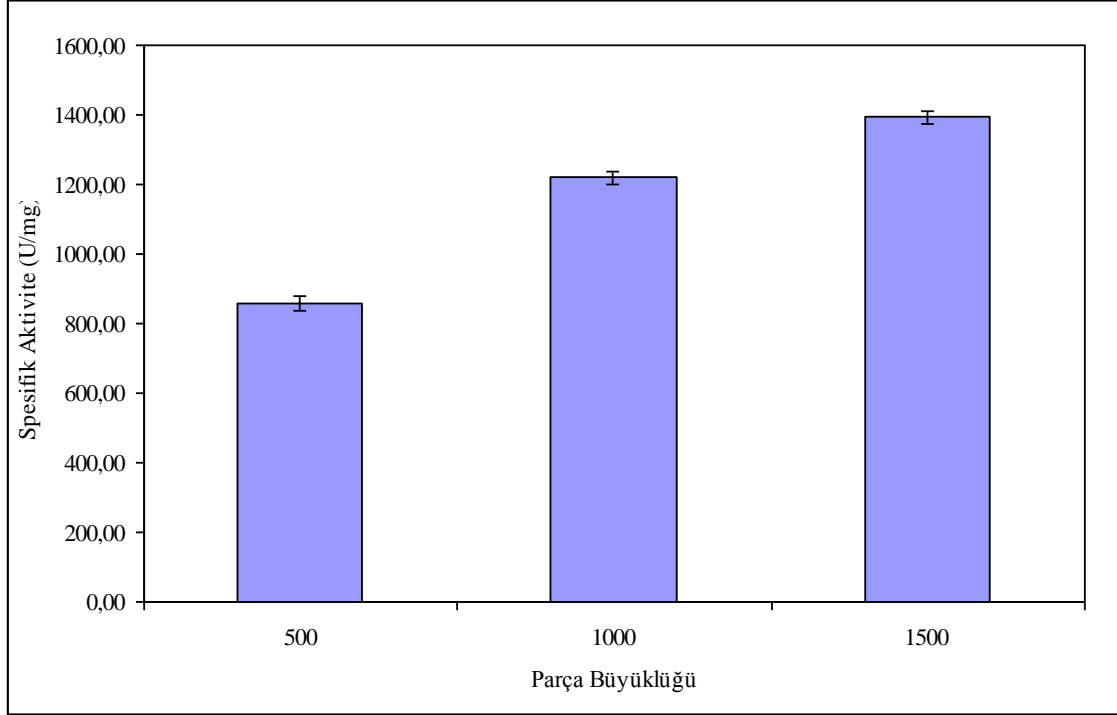
Genellikle mantarlar hafif asidik pH'larda iyi ürerken bakteriler ise daha çok nötr pH'larda iyi üreme göstermektedirler (Gupta 2003).

Riaz ve ark. (2003) *Bacillus subtilis* GCBUCM-25'ten elde ettikleri α -amilaz'ın optimum başlangıç pH'sını 7.5, Asgher ve ark. (2005) *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri α -amilaz'ın optimum başlangıç pH'sını 8, Sodhi ve ark. (2007) *Penicillium rugulosum*'dan elde ettikleri α -amilazın optimum başlangıç pH'sını 7.0, Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğini kullanarak *Bacillus* sp.'den elde ettikleri α -amilazın optimum başlangıç pH'sını 10, Perez ve ark. (2009) SSF tekniğiyle *Aspergillus niger* UO-01'den elde ettikleri α -amilazın optimum başlangıç pH'sını 6.0 ve Michelin ve ark. (2010) *Paecilomyces variotii*'den elde ettikleri α -amilazın optimum başlangıç pH'sını 4.0 olarak bulmuşlardır.

4.7. Enzim Üretimi İçin Partikül Büyüklüğünün Belirlenmesi

Çalışmamızda en iyi aktivite veren pirinç kabuğunun maksimum enzim üretimi için partikül büyüklüğünü belirlemek amacıyla 500, 1000, 1500 μ m, olmak üzere üç farklı parça büyüklüğünde substratlar elde edildi. Yapılan enzim aktivite tayini sonucunda substrat büyüklüğü olarak en iyi aktivite 1404.0 U/mg değerinde 1500 μ m büyüklüğündeki parçacıklarda elde edildi (Şekil 4.7). Bunun nedeni partikül büyüklüğü küçük olanlar porositlerin küçük olmasına, büyük olanlar ise partiküller arasındaki porositlerin büyük olmasına neden olarak hücrel fizyolojiyi olumsuz etkilediklerinden

dolayı SSF’te mikroorganizma büyümesinde partikül büyüklüğü önemli rol oynar. Balkan ve Ertan (2007) normal büyüklükteki partiküller arasında iyi bir havalandırma sağlandığından dolayı mikrobiyal büyümede oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.7. α -Amilaz üretimine parça büyüklüğünün etkisi

Shukla ve Kar (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis*’ten α -amilaz üretiminde sırasıyla *Bacillus licheniformis*’ten maksimum enzim üretimi için parça büyüklüğü 500 μm ve *Bacillus subtilis*’ten ise maksimum enzim üretimi için parça büyüklüğü 1000 μm olan substratları kullanmışlardır.

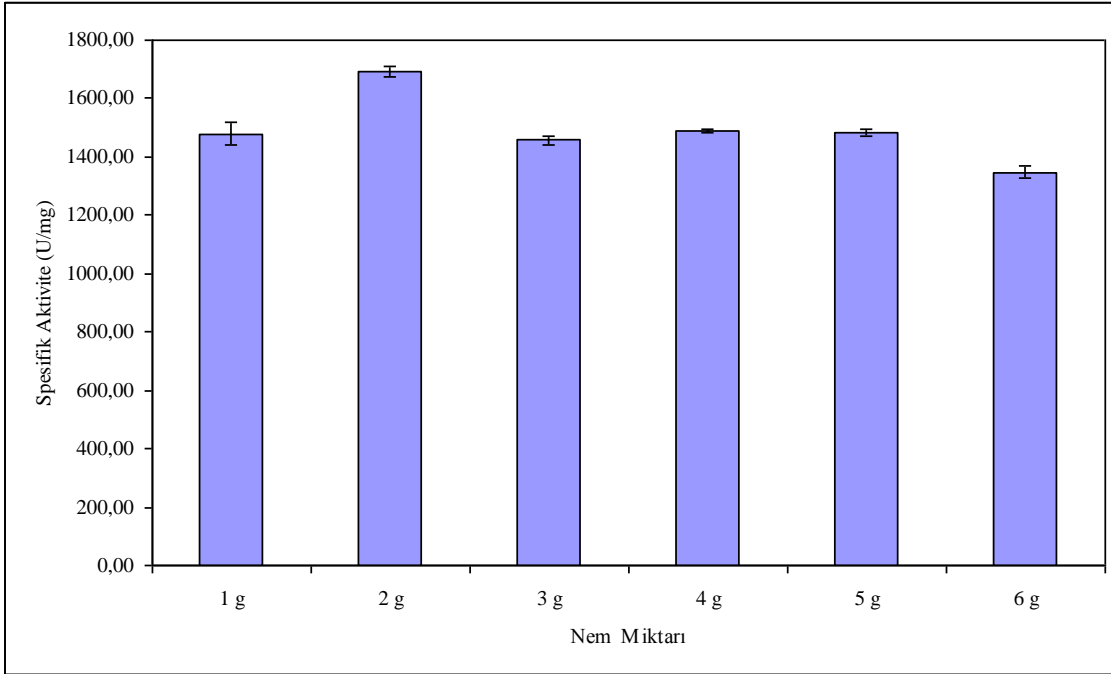
Perez ve ark. (2009) SSF tekniğiyle *Aspergillus niger*’den α -amilaz üretiminde partikül büyüklüğü 600-800 μm olan şeker kamışını, Hashemi ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Bacillus* sp. KR-8104’ten Ca^{+2} ye bağlı olmayan termostabil α -amilaz üretiminde partikül büyüklüğü 900 μm olan buğday kabuğunu, Erdal ve Taşkın (2010) SSF tekniğiyle *Penicillium expansum* MT-1’den partikül büyüklüğü 1 mm büyüklüğünde Loquat kernels dried (LKF) kullanmışlardır.

Shukla ve Kar (2006) daha küçük partiküller fermentasyonda büyümeyi daha fazla artırırken ancak partiküller arasındaki porositlerin küçülmesine neden olurlarken buna karşın büyük partiküller ise porositlerin büyümesine neden olduklarından dolayı

mikrobiyal büyümenin azalmasına ve dolayısıyla enzim aktivitesinde düşmelere neden olacağını bildirmişlerdir. Bu yüzden SSF’te iyi bir bakteri üretimi veya enzim üretimi için partikül büyüklüğünün oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

4.8. Enzim Üretimi Üzerine Substrat (Nem) Miktarının Belirlenmesi

SSF besiyerine, besi yeri hacminin %10, 20, 30, 40, 50 ve 60’ı olacak şekilde sırasıyla 1g, 2, 3, 4, 5 ve 6 pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra otoklav işlemine tabi tutuldu. Bu şekilde sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra yapılan aktivite tayini sonucunda enzim için en iyi aktivite 1488.7 U/mg değerinde % 20 nem miktarındaki pirinç kabuğunda elde edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. α -Amilaz üretimine substrat (nem) miktarının etkisi

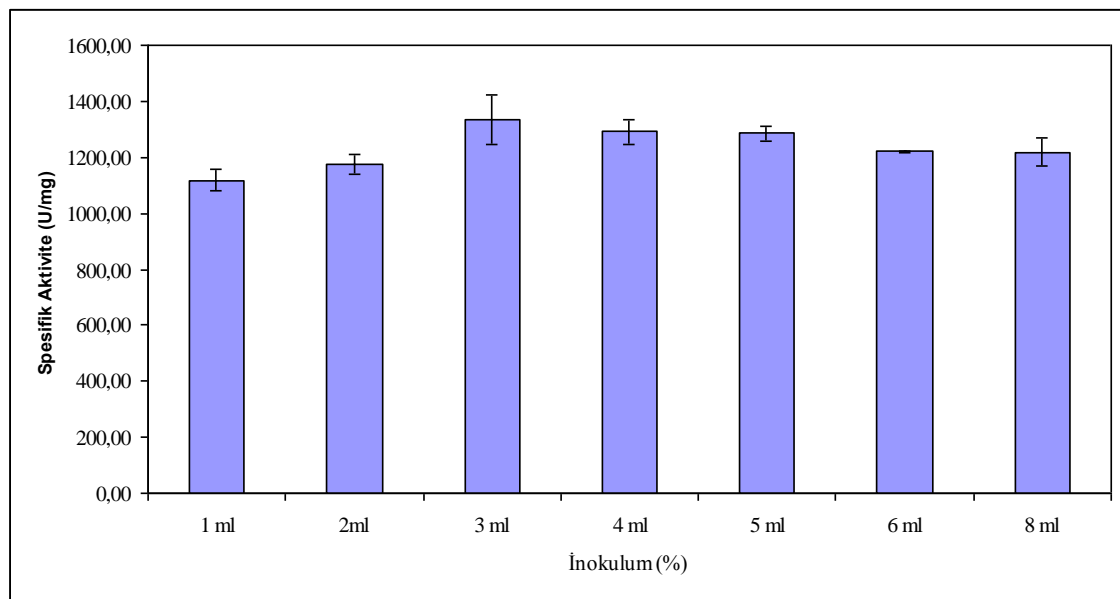
Baysal ve ark. (2008) SSF’te nem miktarının artması katı substratların porositlerini azalttığından dolayı oksijen transfer işlemi engeller. Nem miktarının az olması ise substratın çözünürlüğünü düşürmesinde ve dolayısıyla substratın istenilen düzeyde kabarmamasında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Shukla ve ark. (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis*’ten α -amilaz üretiminde % 80 ve *Bacillus licheniformis*’ten % 70, Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus* sp.’den alkalın α -amilaz üretiminde % 30 ve Kar ve ark. (2010) SSF tekniğiyle

Streptomyces erumpens MTCC 7317'den termostabil α -amilaz üretiminde % 60 (6 ml) nem miktarını kullanmışlardır..

4.9. Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm (Ekim) Miktarının Belirlenmesi

SSF besi yerlerine besi yeri hacminin %10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 80 olacak şekilde 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden 1000 μ l'den 8000 μ l'ye kadar değişen miktarlarda ekim yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 48. saate örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayini yapıldı. Enzim aktivitesi sonucunda maksimum aktivite 1333.7 miktarında % 30 tespit edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. α -Amilaz üretimine İnokülüm (ekim) miktarının etkisi

Rıaz ve ark. (2003) *Bacillus subtilis* GCBUCM-25'ten elde ettikleri α -amilaz enzimi için inokülüm miktarı % 4 olarak belirtmişlerdir. İnokülüm hacmi katı ortamdaki biyomas üretim miktarını belirler. Bakteri büyümesi ve α -amilaz aktivitesi açısından inokülüm miktarı oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Farklı miktarlardaki inokülüm değerlerine bakılmış en iyi inokülüm miktarını % 4 olarak tespit edip ancak inokülüm miktarının az ya da çok olması bakteri büyümesinin yavaşlamasına ve α -amilaz aktivitesinin azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Rıaz ve ark. (2003) Pandey ve ark. (2004) inokülüm miktarının fazla olması bakteriyel büyümeyi artırabilir, ancak ortamdaki substrat miktarının çok çabuk tükenmesinden ötürü bakterinin ölüm fazına girebileceğini ve ortamda oluşan

kontaminasyondan dolayı enzim aktivite değerinin de düşmesine neden olacağını belirtmişlerdir.

Gangadharan ve ark. (2006) *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842'den α -amilaz üretiminde 1 ml ekim ile 52.587 U/gr değerinde maksimum enzim üretmişlerdir. Ekim miktarının artması, fermentasyon ortamındaki sınırlayıcı besinlerden dolayı enzim üretimini negatif yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Anto ve ark. (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus cereus* MTCC 1305'ten maksimum α -amilaz üretiminde % 10, Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus* sp.'den alkalın α -amilaz üretiminde % 20, Kar ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Streptomyces erumpens* MTCC 7317'den α -amilaz üretiminde % 15 ekim ile maksimum aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.10. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımlarının Belirlenmesi

Enzim için en iyi aktivite pamuk küspesi ve pirinç kabuğunda elde edilmiştir. Bu nedenle bu iki substrat kaynağından;

4g Pirinç + 0 g Pamuk (Kontrol)

3.5g Pirinç + 0.5g Pamuk

3g Pirinç + 1g Pamuk

2.5g Pirinç + 1.5g Pamuk

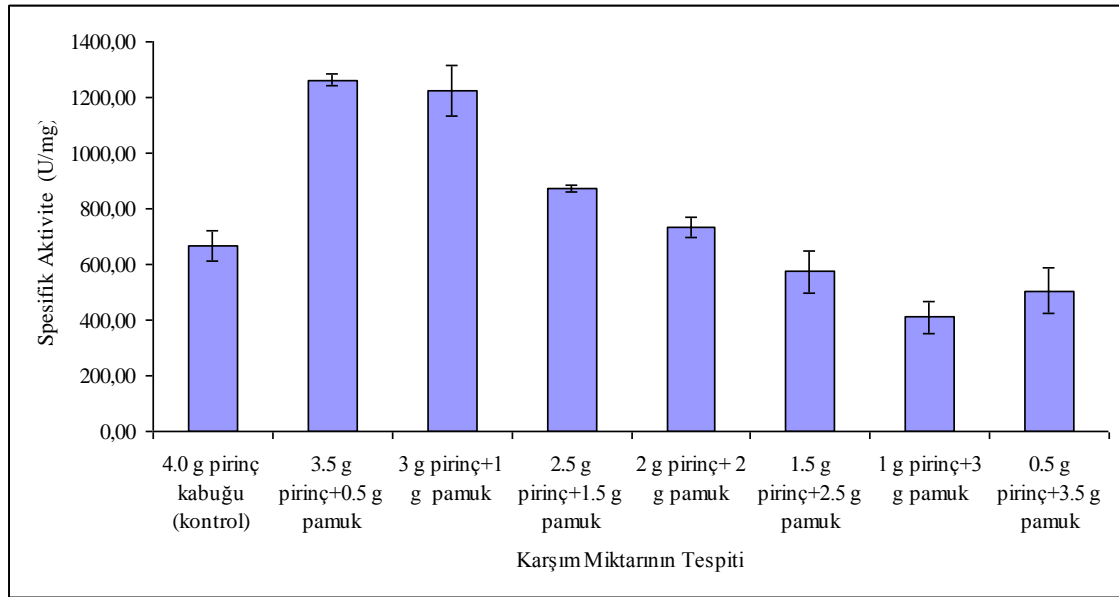
2g Pirinç + 2g Pamuk

1.5g Pirinç + 2.5g Pamuk

1g Pirinç + 3g Pamuk

0.5g Pirinç + 3.5g Pamuk

olmak üzere çeşitli oranlarda karıştırılarak enzim aktivite tayinine bakıldı. Enzim için en iyi aktivite 1261.6 U/mg değerinde 3.5g Pirinç+0.5g Pamukta elde edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. α -Amilaz üretimine en iyi aktivite veren substrat karışımlarının etkisi

Ertan ve ark. (2006) SSF’te katı besi kaynağı olarak buğday kepeği, ayçiçeği küspesi ve şeker kamışı küspesinden sırasıyla, 1:1:1 , 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:1:4, 2:1:1, 3:1:1, 4:1:1 olmak üzere çeşitli oranlarda hazırladıkları karışımlardan 1 g buğday kepeği, 3 g ayçiçeği küspesi ve 1 g şeker pancarı küspesinden oluşan karışımda *Penicillium chrysogenum*’dan 891 U/g değerinde maksimum α -amilaz elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (2010) RSM metodu yardımı ile SSF’te katı besi kaynağı olarak 2 g manyok nişastası ve 0.42 oranında buğday kepeği ve pirinç kabuğundan oluşan bir karışım kullanarak *Saccharomycopsis fibuligera* A11’den maksimum α -amilaz elde etmişlerdir.

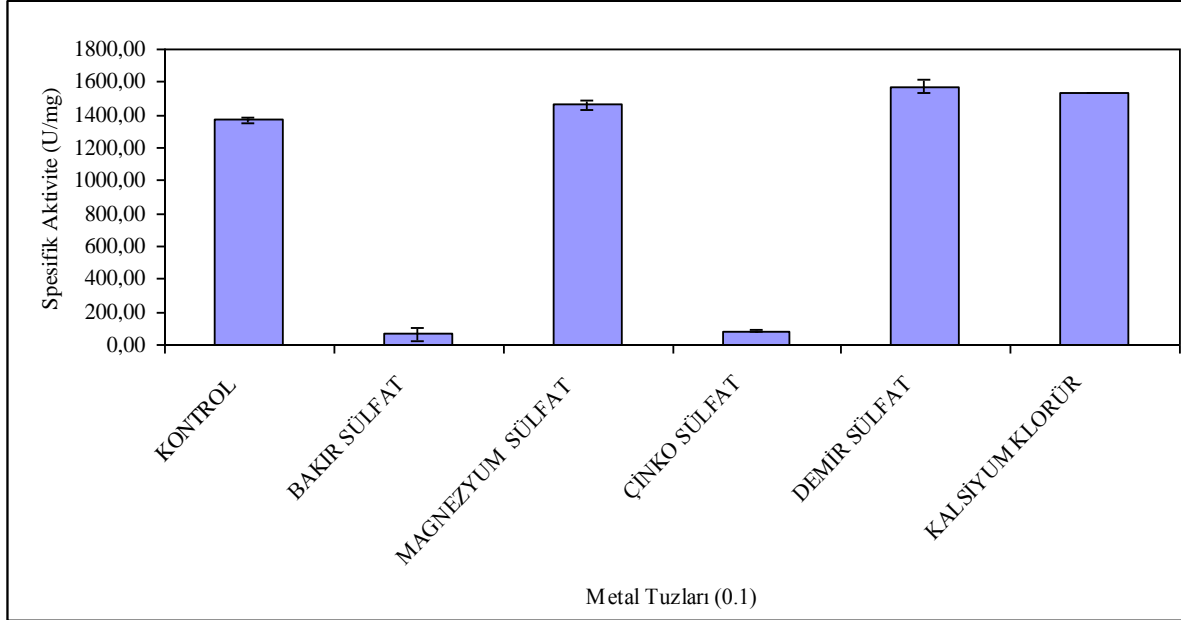
4.11. Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi

SSF besi yeri hazırlandıktan sonra besi yeri hacminin % 0.1’i olacak şekilde metal iyonlarından $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ metallerinin SSF’te homojen bir şekilde dağılması için öncelikle 10 ml saf su içinde çözünmesi sağlandıktan sonra besi yerine ilave edilerek otoklava alındı. Steril kabinde bakteri ekimi yapıp inkübasyona bırakılan örneklerden yapılan aktivite tayinlerinde

Şekil 4.11’te görüldüğü gibi $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ’nun 1574.5 U/mg miktarında enzim üretimini artırdığı, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CaCl_2$ ’sırasıyla 1461.3 ve 1534.4 miktarlarında az

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

da olsa üretimi artırdığı bununla birlikte $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 'nun da sırasıyla 85.7 ve 65.0 miktarlarında enzim üretimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. α -Amilaz üretimine metal tuzlarının etkisi

Demir tuzlarının aktiviteyi artırmasının sebebi çözülmüş demir minerallerinin hücre içerisine alınmasını sağlayan, *Bacillus subtilis* tarafından sentezlenen sideroforlardan kaynaklandığı söylenebilir (www.wikipedia.org/wiki/siderofor.com).

Hernandez ve ark. (2006) *Aspergillus niger* UO-1'den elde ettikleri α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini araştırmışlardır. RSM kullanarak yapılan çalışmalar sonucunda Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının aktiviteyi artırdığını, ancak Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin ise aktiviteyi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Xu ve ark. (2008), RSM'ye bağlı Plackett–Burman design (PBD) ve Box–Behnken design (BBD) ve SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'dan α -amilaz üretiminde % 0.22 $CaCl_2$ ve % 0.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda bu iki mineralin enzim aktivitesi yaklaşık olarak % 17.5 artırdığını bildirmişlerdir.

Asgher ve ark. (2006) atık patates nişastası içeren sıvı besiyeri ile *Bacillus subtilis* JS-2004'ten elde ettikleri α -amilaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının

etkisine bakıp Ca^{+2} iyonlarının aktiviteyi yaklaşık % 112 oranında artırdığını buna karşın Co^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} iyonlarının aktiviteyi tamamen inhibe ettiğini ve Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının da aktiviteyi kısmen inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Poli ve ark. (2009) *Anoxybacillus amylolyticus*'tan elde ettikleri α -amilaz aktivitesi üzerindeki ağır metallerin etkisine bakmışlardır. Ağır metallerden $25.0 \mu\text{M}$ konsantrasyondaki Hg^{2+} 'nin mikrobiyal büyümeyi tamamen durdurduğunu bu karşın $30.0 \mu\text{M}$ konsantrasyonundaki Zn^{2+} 'nin ise yaklaşık % 50 oranında mikrobiyal büyümeyi inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca 850 , 470 , $1150 \mu\text{M}$ farklı konsantrasyonlardaki Cr^{6+} , Ni^{2+} ve Cu^{2+} ağır metallerinin %70-80 oranında mikrobiyal büyümeyi inhibe ettiğini ve $1100 \mu\text{M}$ konsantrasyonundaki Mg^{2+} 'nin de % 10 oranında inhibe ettiğini çalışmaları sonucunda tespit etmişlerdir. Ayrıca yukarıdaki grafikte olduğu gibi çeşitli konsantrasyonlardaki Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ve Zn^{2+} ağır metallerin α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisine bakmışlardır. Enzim aktivitesi üzerinde Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ve Zn^{2+} ağır metallerinin aktiviteyi inhibe ettiğini vurgulamışlardır.

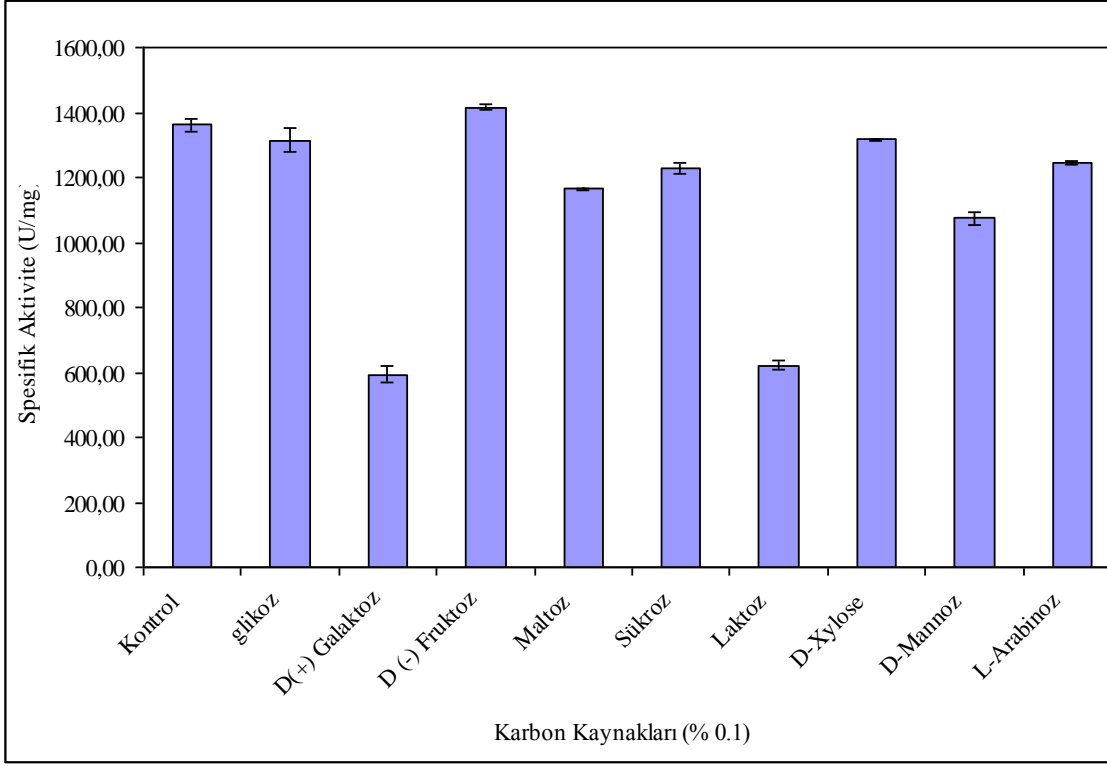
Hernandez ve ark. (2006) Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının enzimin yüksek sıcaklıklarda yapısının korunmasında yani denatürasyona karşı enzimin korunmasında aktivatör metaller olarak önemli olduklarını ifade etmişlerdir.

Haki ve Rakshit (2003) çeşitli *Bacillus* türlerinden elde edilen α -amilaz enziminin yüksek sıcaklıklardaki yapısının Ca^{+2} iyonları tarafından korunduğu belirtmişlerdir. Ajayi ve ark. (2007) Kliniksel ve endüstriyel amilaz uygulama alanlarında Ca^{+2} iyonlarının aktiviteyi artırması yönünden oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek sıcaklıktaki (70°C) Ca^{+2} iyonlarının α -amilaz enzim aktivitesi artırdığını bildirmişlerdir.

4.12.1. Enzim Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

SSF besiyeri hazırlandıktan sonra besi yeri hacminin % 1'i olacak şekilde karbon kaynaklarından glukoz, galaktoz, fruktoz, maltoz, sukroz, laktoz, ksiloz, mannoz ve arabinoz gibi karbon kaynaklarını enzim üretimi üzerindeki etkisine bakıldı. Ekimi yapıp inkübasyona bırakılan örneklerden yapılan aktivite tayini sonucunda fruktozun (1415.7 U/mg) enzim üretimini artırdığı, glukoz (1313.5 U/mg), arabinoz (1244.2 U/mg) ve ksilozun (1315.5 U/mg) üretimi çok az miktarda azalttığı bununla

birlikte galaktoz ve laktozun ise enzim üretimini 593.9 ve 621.2 miktarlarında %50'ye yakın düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.12.1).

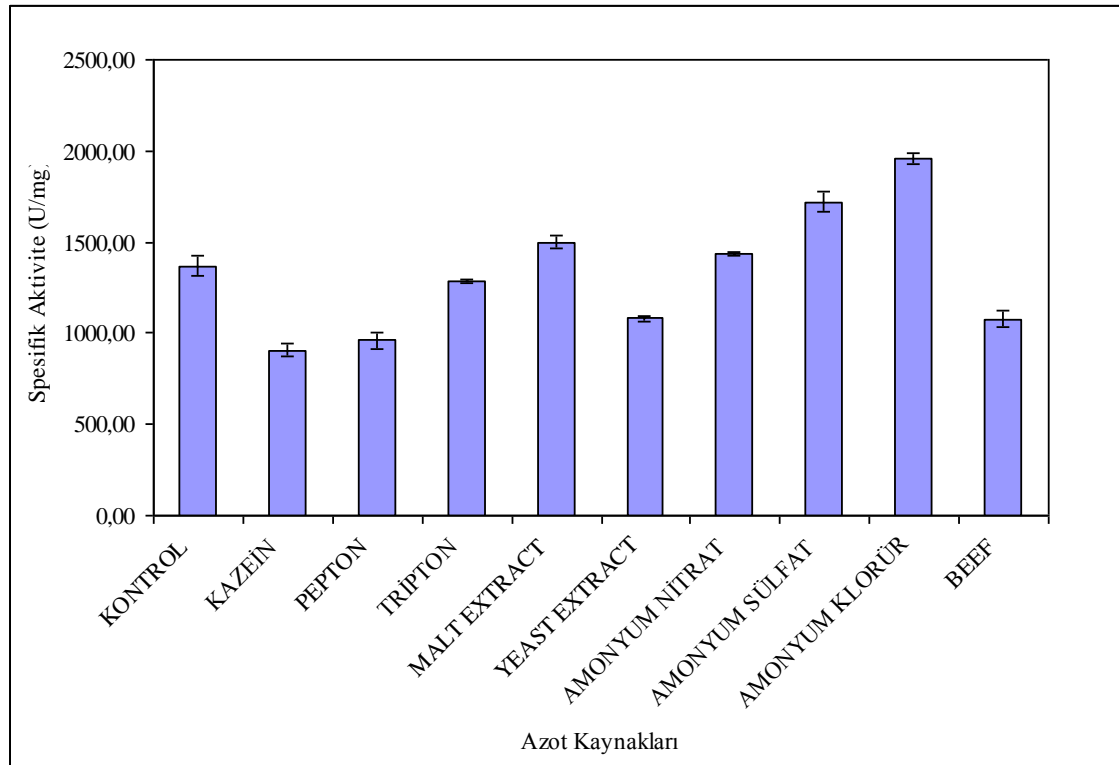


Şekil 4.12.1 α -Amilaz üretimine karbon kaynaklarının etkisi

Aynı şekilde pirinç kabuğu içeren SSF besi yerine, besi yeri hacminin %1'i olacak şekilde azot kaynaklarından sodyum nitrat, amonyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür, et özütü, tripton, pepton, maya özütü, malt ekstrakt ve kazein eklendikten sonra 10 ml çeşme suyu ilave edilerek hazırlanmış olan örnekler otoklava bırakıldı. Steril kabinde bakteri ekimi yapıldıktan sonra inkübasyona bırakılan örneklerden 48 saat sonra aktivite tayini yapıldı. Enzim aktivitesi sonucunda; amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve malt ekstraktın aktiviteyi sırasıyla 1956.9, 1718.8, 1435.3 ve 1499.8 U/mg enzim üretimini artırmakla birlikte triptonun üretimi çok fazla etkilemediği; ancak pepton ve kazeinin sırasıyla 959.0, 906.7 U/mg miktarlarında enzim üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.12.2).

Gupta (2003) glikoz ve maltoz gibi karbon kaynakları α -amilaz üretimini desteklediğini bununla birlikte ksiloz ve fruktoz gibi karbonların çok güçlü repressif grubunda olmasına rağmen *Aspergillus nidulans*'ta büyümeyi iyi bir şekilde desteklediğini ileri sürmüştür.

Crabb ve ark. (1997) Organik azot kaynaklarının kullanımı α -amilaz üretimini artırmak için tercih edilir. Tripton ve pepton *Bacillus sterothermophilus*'den α -amilaz enzim üretiminde önemli olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.12.2 α -Amilaz üretimine azot kaynaklarının etkisi

Gupta ve ark. (2003) *Aspergillus niger*'den elde ettikleri α -amilaz aktivitesi üzerine; glukoz, sukroz, ksiloz, nişasta, sorbitol, karboksimetil seluloz, galaktoz ve dekstrin gibi karbon kaynaklarının etkisine bakılmış; nişasta, dekstrin, galaktoz ve sukroz karbon kaynaklarının aktiviteyi pozitif yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

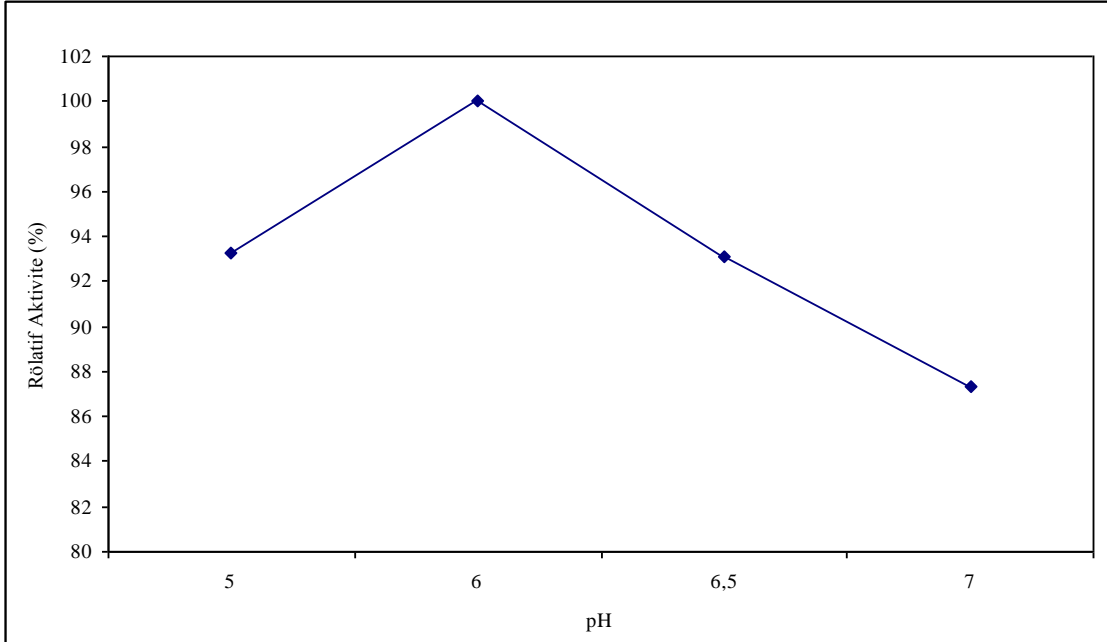
Aiyer (2005) *Bacillus licheniformis* SPT 27'den elde ettiği α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine; % 1 pepton'un enzim aktivitesini artırdığını bildirmiştir. Ayrıca; % 1 fruktoz ve maltoz'un da aktiviteyi artırdığını; ancak arabinoz, rafinoz, mesoinositol, sukroz ve galaktozun amilaz üretimini desteklemediğini bildirmiştir.

Tiwari ve ark. (2007) *Penicillium rugulosum*'dan termostabil α -amilaz üretiminde; galaktoz, arabinoz, laktoz, maltoz ve dekstroz olmak üzere farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. En yüksek aktiviteyi galaktozda elde etmişlerdir.

Hashemi ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Bacillus* sp. KR-8104'ten Ca^{2+} ye bağlı olmayan termostabil α -amilaz üretiminin aktivitesi bakteri üretimi üzerinde bazı azot ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Laktoz, Amonyum nitrat ve Sodyum nitrat'ın enzim üretimini artırdığını bildirmişlerdir.

4.13. Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi

Bacillus subtilis ATCC 6051'e ait α -amilazın optimum pH değerinin saptanması için sırasıyla 0.1 M sitrik asit (pH 5.5), 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0 ve 6.5) ve 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0-0.8) olmak üzere üç ayrı tampon sistemi kullanılmıştır. 30 dk sonraki aktivite tayini sonucunda enzimin maksimum çalıştığı aralık Şekil 4.13'te görüldüğü gibi pH 6.0'da tespit edilmiştir.



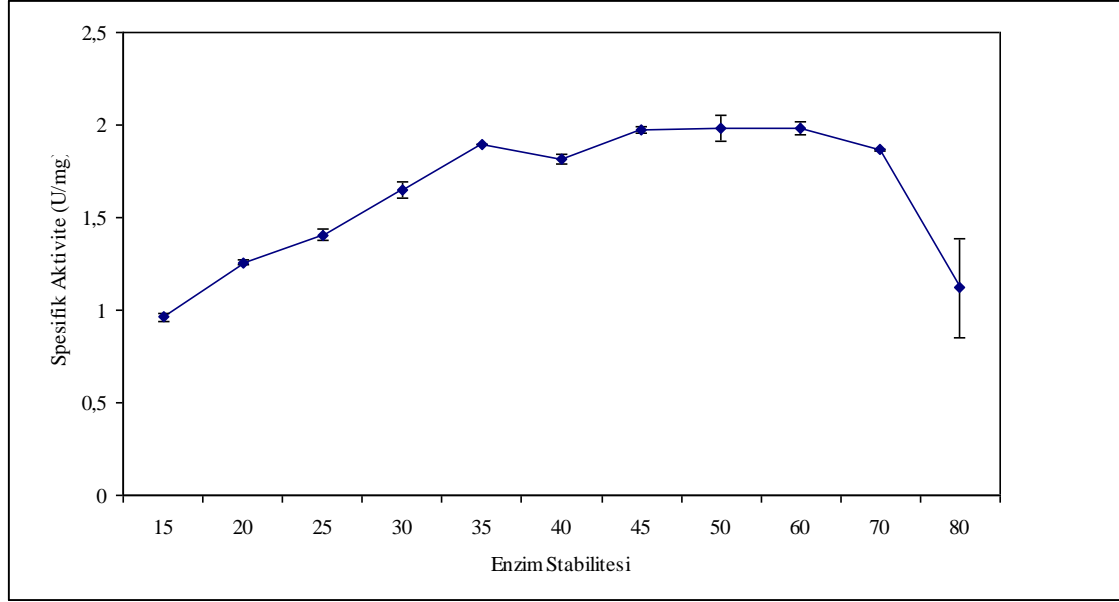
Şekil 4.13. α -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Najafi ve ark. (2005) *Bacillus subtilis* AX20 tarafından salgılanan α -amilazın optimum pH'sını 7.0 olarak bulmuşlardır.

4.14. Enzimin Optimum Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite sıcaklığını tespit etmek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklık aralıklarında inkübasyona bırakıldı. 30 dk inkübasyon süresi sonunda yapılan enzim aktivite tayin sonuçlarına göre α -amilaz için optimum aktivite 50°C'de olduğu tespit edildi (Şekil

4.14). Enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermemesinin nedeni yapısındaki proteinlerin denatüre olmuş olabileceğinden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 4.14. α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sodhi ve ark. (2003) SSF tekniğini kullanarak *Bacillus* PS-7'den elde ettikleri yüksek termostabil özelliğine sahip α -amilazın 60°C'de, Konsoula ve ark. (2005) *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri ekstrasellüler termostabil α -amilazın 135°C'de, Shukla ve Kar (2006) SSF tekniği ile *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri α -amilazın 90°C ve 70°C'de, Anto ve ark. (2006) SSF tekniğiyle *Bacillus cereus* MTCC1305'ten elde ettikleri α -amilazın 55°C'de, Tiwari ve ark. (2007) termofilik *Penicillium rugulosum*'dan elde ettikleri termostabil α -amilazın 57°C'de ve Michelin ve ark. (2010) *Paecilomyces variotii*'den üretmiş oldukları termostabil α -amilazın 60°C'de maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir..

Gelecekte Ca^{2+} 'ye bağlı olmayan ve nişasta sakkarifikasyonunun artırılması için 100°C'nin üzerinde asidik pH'da aktif olan hiper-termostabil α -amilazlara ihtiyaç duyulduğundan dolayı yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen termostabil bakterilere ilgi giderek artmaktadır. Ayrıca günümüzde özellikle deterjan sanayisinde tasarruf amacıyla daha düşük 15-20°C sıcaklıklarda aktif olabilen amilazlarla ilgili çalışmalar da hız kazanmaktadır

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışındaki diğer ülkeler bu konuda tamamen dışa bağımlı durumdadırlar. Modern biyoteknolojinin ışığında şu anda α -amilazlar biyofarmakolojik uygulamalardaki önemi artmaktadır. Bu çalışmada α -amilazların gıda, tekstil, kağıt, deterjan, şeker şuruplarının üretiminde, siklodekstrin üretiminde, farmakoloji gibi uygulama alanlarındaki üretimleri açısından önemli olan birçok parametrenin SSF kullanılarak optimizasyonları sağlanması amaçlanmıştır. Bu alanlarda kullanılan α -amilazlar dünya enzim piyasasının %30'unu oluşturur. Amilazlarla ilgili son çalışmalara bakıldığında, enzimin daha düşük sıcaklık değerlerinde aktif olma ve yüksek sıcaklıkta ve stabil pH'larda Ca^{2+} iyonlarından bağımsız aktif olabilen enzimlere yönelik çalışmalar hız kazanmaktadır. Enzimin düşük sıcaklıklarda aktif olması özellikle deterjan sanayisinde etkili olup lekelerin uzaklaştırılmasında yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmadan daha düşük sıcaklıklarda işlemin gerçekleşmesine olanak sağlar. Burada önemli olan daha az elektrik kullanımı ile yüksek oranda tasarrufa gidilmesidir. *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den elde edilen α -amilazın 15-20°C sıcaklıklarında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Endüstriyel alanlarda kullanılan α -amilazlar daha çok mikroorganizmalardan sağlanmaktadır. Bunun nedeni bunlardan üretilen enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Ayrıca seçilen mikroorganizmanın toksik özellik göstermemesi de gerekmektedir. Çalışmada kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6051'in bu özelliklere uygun olmasına dikkat edilmiştir. Amilazlardan glikoz ve maltoz formunda olanlar alkol fermentasyonu ve şeker şurubu formülasyonlarında, maltooligosakkarit formunda olan amilazlar ise gıda işleme süreçlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Endüstriyel üretimde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajları uzun zamandır savunulmaktadır.

1. Çalışmada maksimum enzim üretimi için en iyi aktivite pirinç kabuğunda elde edilmiştir. SSF’te katı substrat kaynağı olarak kullanılan endüstriyel atıkların hem maliyet açısından hem de bunların geri dönüşümü yoluyla çevresel zirai kirliliğin önlenmesi açısından oldukça önemli yararlar sağlamaktadır. Bu yüzden SSF çevresel ve gıda mikrobiyolojisi alanında oldukça önem kazanmıştır. Ayrıca bu substratların doğada çok fazla olması ve her zaman kolay bir şekilde karşılanabilmesi çalışmalara engel oluşturabilecek zaman ve para gibi önemli sorunlara çözüm oluşturabilmektedir.

2. Enzim için en iyi inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı 48. saat ve 37°C olarak tespit edilmiştir. Katı faz fermentasyonnundaki (KSF) inkübasyon süresinin kısa olması, enzim üretiminin çok fazla zaman almaması açısından önemlidir.

3. Enzim için en iyi ekstraksiyon ortamı çeşme suyunda elde edilmiştir. Bu da enzim üretiminde maliyet açısından önem arz etmektedir.

4. Bakteri için en iyi pH değeri 7.0 olarak bulunmuştur.

5. Enzim için başlangıç nem miktarı ve inokülüm miktarı % 20 ve % 30 olarak tespit edilmiştir.

6. Çalışmada yapılan enzim aktivite tayinlerinde en iyi enzim üretimi için çalkalama hızı 150 rpm’de elde edildi.

7. Enzim üretimi için substratın parça büyüklüğüne bakıldı. En iyi aktivite parça büyüklüğü 1500 µl’de tespit edilmiştir.

8. Enzimin termostabil aktivitesine bakıldı. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 50°C olarak tespit edilmiştir.

9. Enzim üretimi üzerine, en iyi aktiviteyi veren substrat karışımlarının etkisine bakıldı. Enzim için en iyi aktivite pirinç kabuğunun yoğunlukta olduğu katı faz fermentasyon ortamında elde edilmiştir.

10. Enzim için ekstraksiyon ortamı belirlenmeye çalışıldı. En iyi aktivite çeşme suyunda elde edildi. Deterjan sanayisinde kullanılan bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldı. Enzimin % 0.05 NaCl ve az da olsa Tween 40’a dirençli olduğu tespit edildi. Bu da enzimin deterjan sanayisinde kullanılabilirliğini göstermektedir.

11. Enzim aktivitesi üzerine bazı metal tuzlarının, karbon ve azot kaynaklarının etkisine bakıldı. Metal tuzlarından CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'nun enzim üretimini artırdığı buna karşın $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'nun aktiviteyi güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

12. Karbon kaynaklarından fruktozun enzim üretimini artırdığı, glukoz, ksiloz ve arabinoz şekerlerinin üretimi çok az miktarda azalttığı buna karşın galaktoz ve laktoz ise enzim üretimini % 50'ye yakın düşürdüğü tespit edildi.

13. Azot kaynaklarından amonyum klorür enzim üretimini iyi bir şekilde artırırken malt ekstrakt, amonyum nitrat ve amonyum sülfatın üretimi az miktarda artırdığı kazein ve pepton azot kaynaklarının da enzim üretimini desteklemediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada özellikle çevrede çok fazla kirliliğe neden olan tarımsal atıklarının kullanılması biyolojik açıdan çevre kirliliğine önemli oranlarda katkı sağlanabilmekte ayrıca biyoteknolojide bilimsel çalışmalarda önemli bir sorun olan maliyete de çözüm sunabilmektedir. Bu çalışmada SSF tekniği ile ticari olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den amilaz üretmek için özellikle Karacadağ yöresine ait pirinç kabuğu substrat kaynağı olarak kullanılması, bu atıkların yüksek oranda geri dönüşümü açısından ekolojik olarak çevre kirliliğinin önüne geçilebilecektir. Elde edilen enzimin sıcaklık ve pH özelliklerinden dolayı kağıt, deterjan, gıda ve tekstil gibi alanlarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Dünya genelinde artan tarımsal atıkların tekrar kullanılmaları ekolojik ve ekonomik olarak oldukça önemlidir. Birçok tarımsal atığın hayvan yemi vb. alanlarda kullanılabildiği bilinen bir gerçektir. Fakat SSF tekniği kullanılarak bu atıklardan, ticari önemi olan enzimler üretmede kullanılması daha ekonomik ve daha ekolojik yarar sağlanabileceği düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

- Aiyer, P.V. 2005. Amylases are widely distributed and are one of the most studied enzymes. These enzymes have wide scale application ranging from textile to effluent treatment. *African Journal of Biotechnology*, 13, 1525-1529.
- Ajayi, A., Fagade, O., Ezekiel, O. 2007. Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species *African Journal of Biotechnology* 6, 1181-1184.
- Anupama, P., Ravindrab, 2000. Value-added food: Single cell protein Research review paper Centre for Biotechnology,18,459-479.
- Anto, H., Trivedi, H., Patel, K. 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation, *Food Technol. Biotechnol* 44, 241–245
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. 2007 Athermostable α -amilaz from moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for strach processing, *Journal of Food Engineering*, 79, 950-955
- Ası T., 1996, Tablolarla Biyokimya, Tayf Ofset, 71-116.
- Aygan, A., Arikan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S., Çolak, Ö. 2008. Highly Thermostable and alkaline α -Amylase From a Halotolerant Alkalofilik *Bacillus* sp. AB68, 39:547-553
- Balkan, B., Ertan, F. 2007. Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation by using some agricultural by products, *Food Technol. Biotechnol*, 45, 439-442
- Baysal, Z., Uyar, F., Aytakin, Ç. 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot spring water, *Process Biochemistry*, 38, 1665-1668.
- Baysal, Z., Uyar, F., Doğru M., Alkan, H. 2008. Production of Extracellular Alkaline a-Amylase by Solid State Fermentation with a Newly Isolated *Bacillus* sp. *Biochemistry&Biotechnology*, 38, 184–190.
- Bernfeld, P. 1955. Enzymes carbohydrate metabolism, In *Methods In Enzymology* Academic Press, 17, 149-158

Bhat. M.S., Prabhakar, A., Koteswara, R.R., Madhu, G. M. 2010. Optimization of Process Variables for Amylase Production Using Agro Residual Wastes by Taguchi Methodology, 5, 1-32

Chen, L., Chi, Z. M., Chi, Z., Li, M. 2010. Amylase Production by *Saccharomycopsis fibuligera* A11 in Solid-State Fermentation for Hydrolysis of Cassava Starch *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 252–263

Crabb, W.D., Mitchinson, C. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends. Biotechnol.*, 15, 349-352.

Couto, S.R., Sanroman, M.A. 2006. Application of solid state fermentation to food industry, *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302

Ekşi, A. 1988. Meyve suyu durultma tekniği, *Gıda Teknolojisi Derneği Dergisi*, 127, 9, Ankara.

Elarbi, M.B., Khemiri,H., Jridi, T., Hamida, J.B. 2009. Purification and characterization of α -amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds *Laboratoire de biochimie des lipides et des protéines, Faculté des sciences de Tunis, Département de biologie, campus universitaire*, 332, 426–432, Tunisia.

Erdal, S., Taşkın, M. 2009. Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as Substrate *Department of Biology, Science Faculty, Ataturk University*, 25240, Turkey.

Ertan, F.,Balkan,B., Balkan, S., Aktac, T. 2006. Solid state fermentation for the production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* using mixed agricultural by-products as substrate *Biologia, Bratislava*, 61/6, 657-661,Turkey

Gangadharan, D. K., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., Soccol,C. R., Pandey, A. 2008. Amylases from Microbial Sources–An Overview on Recent Developments *Biotechnology Laboratory*, 99, 4597-4602. India

Graminha, E.B.N., Gonc, A.Z.L. Pirota R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Silva, R.D., Gomesa, E. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition *Animal Feed Science and Technology*,

Gupta, R., Gigras. P., Mohapatra, H., Goswami V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38, 1599-1616. India.

Gouda, M., Elbahloul., Y. 2008. Statistical Optimization and Partial Characterization of Amylases Produced by Halotolerant *Penicillium Sp.*, *World Journal of Agricultural Science*, 4, 359-368

Haki, G.D., Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technol.* 89, 17-34.

Hashemi, M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., Khajeh, K., Safari.M. 2010. Development of a solid-state fermentation process for production of an alphaamylase with potentially interesting properties *Journal of Bioscience and Bioengineering.*3, 333–337, Iran.

Hashemi, M., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A. 2011. Mathematical modeling of biomass and amylase production kinetics by *Bacillus sp.* in solid-state fermentation based on solid dry weight variation *Biochemical Engineering Journal*, 53, 159–164, Iran.

Haq, I. K., Shamim, N., Ashraf, H., Ali, S., Qadeer, M. A. 2005. Effect of Surfaktant on the Biosynthesis of Alpha Amylase by *Bacillus subtilis* GCBM-25 *Biotechnology Research Centre, Department of Botany*, 37,(2),373-379, Lahore.

Hernandez, M.S., Rodriguez, M.R.,Guerra, N.P., Roses, R.P. 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries *Journal of Food Engineering*,73, 93–100, Cuba.

Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnolgy. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 735-750

Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 175–186

[<http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/>] Erişim Tarihi: 25.04.2010

[<http://www.avatar.se/molscript/>] Erişim Tarihi: 26.04.2010

[(www.wikipedia.org/wiki/siderofor.com)] Erişim Tarihi: 14.05.2010

[<http://www.enzim-teknolojisi.com>] Erişim Tarihi: 20.05.2010

[<http://www.acilforum.com>] Erişim Tarihi: 14.06.2010

Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Arıkan, B. 2005. Effects of Carbon Sources and Various Chemicals on the Production of a Novel Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. K-12, 29, 99-103, Turkey.

Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu,U., Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9, 1.

Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamioğlu M., Başpınar N., Tiftik A. M., 2000. Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, 163-165, 246-247.

Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S. 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product) Bioresource Technology, 99, 5602–5609, Tunisia

Kandra, L. 2003. α -Amylases of medical and industrial importance; Journal of Molecular Structure (Teochem) 666-667 p. 487-498

Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 100, 168-171 South Afrika.

Kar, S., Data,T.K., Ray, R.C. 2010. Optimization of Thermostable α - Amylase Production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in Solid-state Fermentation Using Cassava Fibrous Residue, Brazilian Archives of Biology and Technology an International journal 53, 301-309, India.

Lonsane, B.K., 1994 “Resurgence of interest in solid-state frementation” Solid State Fermentation, Pandey, A.(Ed.). Wiles Eastern Pvt. Ltd., New Delhi, 11-20

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193, 265-275

Michelin, M., Silva, T. M., Benassi, V. M., Peixoto-Nogueira, S. M., Moraes, L.A., Leão, J. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. 2010. Purification and

characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*, Carbohydrate Research ,345 ,2348–2353, Brazily.

Mukherjee, A.K., Borah, M., Rai, S.K. 2009. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations, Biochemical Engineering Journal, 43, 149-156, India.

Muralikrishna, G., Nirmala, M. 2005. Cereal α -amylases—an overview, Department of Biochemistry and Nutrition, CFTRI, Cheluvamba Mansion, 60,163-173. India.

Najafi, M.F., Deobagkar, D. 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20, Protein Expression and Purification, 41, 349-354, India

Nielsen, J.E., Torben, V. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases Borchert Biochimica et Biophysica Acta 1543 253- 274

Öner, M. 1987. Mikrobiyal Ekoloji. Ege Üniversitesi Basım Evi Bornova İzmir.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, Current Science,77,149-162 The application of enzymes in industry, .274-373.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I –Bioprocesses and products. Process Biochem 35, 1153–1169

Pandey A, C.R., Soccol, J.A.R., Leon, Nigam, P. 2004. Solid-state fermentation in biotechnology. New Delhi: Asiatech Publishers Inc.

Pandey, A.,S.Ramachandran,S., Webb, C. 2005. Enzyme Technology, New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 15, 349-352.

Pandey, A. Ricardo, C. Larroche, C. 2008. Current Developments in Solid-state Fermentation Springer Science Business Media, 144, 1–22

Poli, A., Salerno, A., Laezza, G., Donato, P., Dumontet, S., Nicolaus, B. 2009. Heavy metal resistance of some thermophiles: potential use of α -amylase from

Anoxybacillus amylolyticus as a microbial enzymatic bioassay Research in Microbiology, 160, 99-106, İtalia

Poonam, N., Dalel, S. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme Microb. Technol. 17, 770-778.

Rajagopalan, G., Krishnan, C. 2008. Optimization of medium and process parameters for a constitutive α -amylase production from a catabolite derepressed Bacillus subtilis KCC103, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83, 654-661

Reddy, N. S., Nimmagadda, R. D., A., Rao, K.R.S.S. 2003. An overview of the microbial α -amylase family Centre for Biotechnology, 510-522, India.

Riaz, N., Haq , H.K., Qadder, M.A. 2003. Characterization of α -Amylase by Bacillus subtilis International Journal of Agriculture & Biology, 3–249–252, Lahore, Pakistan.

Roses, R.P., Guerra, N.P. 2009. Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material World J Microbiol Biotechnol 25, 1929–1939

Saha, B.C., Jordan, D.B. 2009 Applied Microbiology: Industrial | Enzymes, Industrial (overview), Encyclopedia of Microbiolog 280-294, USA

Sarıkaya, E., Gürğün, V. 2000. Increase of the a-amylase yield by Some *Bacillus*

Sasi, A., Kani, M., Panneerselvam, A., Jegadeesh, G., Muthu, K., Kumar, M.R. 2010. Optimizing the conditions of amylase by an Esturian strain of *Aspergillus* spp, 4, (8), 581-586, İndia.

Satyanarayana, T., Mohaswer, J.L.,Ezhilwanan, M. 2006. Enzyme technology, 189-193.

Serin, B. 2009. Katı faz tekniğiyle (solid state fermentation; SSF) tekniğiyle Bacillus circulans'tan α -amilaz ve β -galaktosidaz üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, 47s, Türkiye.

Shaifei, M., Ziaee, A. A., Amoozegar, M. A. 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and

halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia sp.* strain F. *Process Biochemistry*, 45, 694–699, India

Shukla, J., Kar, R. 2006. Potato peel as a solid state substrate for thermostable α -amylase production by thermophilic *Bacillus* isolates *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 417–422, India.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18

Sindhu, G. S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J. K. (1997). Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 584-589.

Si, J.Q. 1999, Enzymes, baking, bread making. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, 2, 947- 58.

Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., Soni, S. K. 2005. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, *Process Biochemistry*, 40, 525-534

Steinbüchel, A., Rhee, S. K. 2005 *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, Properties, Production*, 462-465

Strains Ankara University, Faculty of Agriculture, Food Engineering Department, 24, 299-308, Turkey

Taniguchi, H., Honda, Y. 2009. Ishikawa Prefectural University, Nonoichi, Elsevier Inc. All rights reserved. *Defining Statement*, 159-179, Ishikawa, Japan.

Tanyıldızı, M.S., Özer, D., Elibol, M. 2007. Production of bacterial α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 37, 294-297

Tarakçıoğlu, Y., 1979. An Amylase Producing Maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 49 (4), 1901-1907.

Tiwari, K.L., Joadhav, S.K., Fatima, A. 2007. Culture Condition for the Production of Thermostable Amylase By *Penicillium rugulosum* Global Journal of Biotechnology/Biochemistry, 2, 21-24, India

Uyar, F. 1997. *Bacillus subtilis*'te Üreme, Plazmid ve alfa-Amilaz Sekresyonu Üzerine Kalsiyum Kanal Blokörlerinin ve Ağır Metallerin Etkisi Doktora Tezi Dicle Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, S4, Türkiye.

Vazquez, M., Agustín, R.D., Castro, J.2009. Modelling of the Enzymatic Hydrolysis of Potato (*Solanum tuberosum*) Using Response Surface Methodology, 61, 601–609, Mexico.

Wiesman, A. 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, 274-373.

Wijbenga, D.J., Beldman, G., Veen, A., Binnema, D.J. 1991. Production of native-starch degrading enzymes by a *Bacillus firmus/lentus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 180-184.

Vishnu, C., Navenna, B. J., Altaf, MD., Venkateshwear, M., Reddy, G., 2006. Amylopullulanase A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid, Enzyme Microb Technol, 38, .545–550.

Xu, H., Sun, L., Zhao, D., Zhang, B., Shi, Y., Wu, Y., 2008. Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* AS-3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as Substrate, Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 529–535, China

Xu, Y. A., Liu, X.D. 2008 novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization, Bioresource Technology, 99, 4315-4320

Yoshizaki, Y., Susuki, T., Takamine, K., Tamaki, H., Ito, H., Sameshima, Y. 2010. Characterization of glucoamylase and α -amilaz from *Monascus anka*: Enhanced production of α -amilaz in red koji Original Research Article Journal of Bioscience and Bioengineering, 110, 670-674.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yusuf ÖNEN
Doğum Yeri : Diyarbakır
Doğum Tarihi : 01.01.1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ziya Gökalp Lisesi/ Diyarbakır – 2003

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/- 2008

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D.- 2011