

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KATI FAZ FERMANTASYON
(SOLID STATE FERMENTATION; SSF)
YÖNTEMİYLE *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den
PROTEAZ ÜRETİMİ**

Muhamet AFŞİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
TEMMUZ- 2010**

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KATI FAZ FERMANTASYON
(SOLID STATE FERMENTATION; SSF)
YÖNTEMİYLE *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den
PROTEAZ ÜRETİMİ**

Muhamet AFŞİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Fikret UYAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
TEMMUZ-2010**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Muhamet AFŞİN tarafından yapılan “Katı Faz Fermantasyon(Solid State Fermentation; SSF) Yöntemiyle *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den Proteaz Üretimi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR(Danışman)

Üye : Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../.....

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

Öz

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, kültür ortamında kolay çoğalmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır.

Proteazlar önemli paya sahip bir endüstriyel enzim grubudur. Deterjan endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, deri endüstrisinde, et, süt, bira gibi gıda endüstrilerinde, boynuz, tüy, saç gibi proteinlerin hidrolizinde, x ray filmlerindeki gümüşün geri kazanılmasında, tekstilde protein bağlı zincirlerin kaldırılmasında ve daha birçok endüstri alanında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda SSF yöntemiyle *Bacillus licheniformis* 'ten proteaz üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi incelendi. SSF besiyeri için pirinç kabuğu, buğday kabuğu, pirinç sapı, buğday sapı ve arpa kabuğu katı substrat olarak kullanıldı. En iyi aktivite pirinç sapında elde edildiğinden dolayı sonraki çalışmalarımızda katı substrat olarak pirinç sapı kullanıldı. Proteaz için en iyi inkübasyon süresinin 72.saatte olduğu belirlendi. Substratın partikül büyüklüğünün proteaz üretimi üzerine etkisini incelemek için yapılan çalışmada, 1500 µm partikül büyüklüğündeki substratta en iyi proteaz üretimi tespit edildi.

Proteaz aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi incelendi. Maximum proteaz aktivitesi sırasıyla pH 9.5'ta ve 50 °C'de tespit edildi. Deterjanların proteaz üretimi üzerine etkisini incelemek için %1-5 SDS ve Tween 40 kullanıldı. Elde edilen bütün sonuçların kontrolden daha düşük olduğu tespit edildi.

Ekim miktarının (inokulum hacmi) ve nem oranının(moisture level) enzim üretimine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada, proteaz için uygun ekim miktarının %25, uygun nem miktarının ise %50 olduğu belirlenmiştir.

Enzim üretimi üzerine %1 oranında farklı azot ve karbon kaynaklarının etkisi araştırıldı. Proteaz için en iyi azot kaynağının sırasıyla casamino asit, üre ve amonyum nitrat iken, en iyi karbon kaynağı ise sukroz, maltoz ve glikozda tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Bacillus licheniformis*, proteaz, SSF

ABSTRACT

Enzymes that are being used in almost all areas in industry is usually obtained from microorganisms. Because, enzymes are produced by microorganisms have some advantages when compared with enzymes produced by plants or animals, they have considerably higher catalytic activity, they don't form undesirable by-products, they are more stable and relatively cheap, and they can be obtained much quantity.

Proteases that are a group of industrial enzymes have an important role. Proteases were used detergent, pharmaceutical, leather, meat, milk, beer industries, hydrolysis of proteins such as horn, feather and hair, recovery of silver from x-ray films. Hydrolysis of the protein bound of the chain in the textile and used many more industries field.

In our study, the effect of various parameters on the protease from the *Bacillus licheniformis* with the SSF method was examined. SSF medium; rice husk, wheat bran, rice stalk, wheat stalk and barley husk were used as solid substrate. The best result was gained with rice stalk, therefore, rice stalk was used as solid substrate in the following studies. The suitable incubation time for the obtaining, for the protease has been determined as 72 th hour. The effect of substrat particle size on the protease production was tested. Maximum protease production was detected at 1500 µm substrat particle size.

The effect of pH and temperature on the protease activity was tested. Maximum protease activity was detected at pH 9.5 and 50 °C respectively. To examine the effect of detergents on the protease activity, 1-5% SDS and Tween 40 were used. All results obtained were found to be lower than the control.

In studies done for the effect of planting amount and moisture level on the enzyme production, for protease has been determine suitable planting amount as %25 and suitable moisture level as %50.

The effect of different nitrogen and carbon sources in %1 ratio on the production of enzyme was examined. While the best nitrogen sources for protease was detected as casaminoacid, urea and amonyum nitrate; the best carbon sources for protease was detected as sucrose, maltose and glucose.

Key words: *Bacillus licheniformis*, protease, SSF

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve birikimiyle beni yönlendiren, yol gösteren ve her konuda desteğini esirgemeyen danışman hocam **Doç. Dr. Fikret UYAR**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında gerekli imkanları sağlayarak desteğini esirgemeyen hocalarım **Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ** ve **Doç. Dr. Zübeyde Baysal** 'a teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yardımlarını ve desteklerini gördüğüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerinden **Ömer ACER**, **Süleyman ÖZAKIN**, **İlknur PORSUK** ve **Besi SERİN**'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazımı aşamasında her türlü desteğini gördüğüm doktora öğrencisi **Veysi KIZMAZ**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşim **Zeynep AFŞİN**'e sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın yürütülmesinde SSF (Solid State Fermentation) yöntemiyle Bacillerden proteaz eldesi 08-FF-22 nolu proje ile maddi destek sağlayan DÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Proteaz	2
KAYNAKLAR	5
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	
2.1. Mikrobiyal Enzimler	7
2.2. Alkalen Proteazlar	8
2.3. Proteazların Sınıflandırılması	8

2.3.1. Kaynağına Göre Proteazlar	8
2.3.2. Aktif Bölgedeki Fonksiyonel Gruplarına Göre Proteazlar	9
2.3.3. Katalitik Bölgedeki İşlevlerine Göre Proteazlar	9
2.3.4. pH Stabilitesine Göre Proteazlar	10
2.4. Proteaz Üreten Mikroorganizmalar	12
2.5. Katı Faz Fermantasyonu(SSF, Solid-State Fermentasyonu)	13
2.6. Proteazların Endüstride Kullanım Alanları	15
2.6.1. Deterjan Endüstrisinde Proteazların Kullanımı	16
2.6.2. Tekstil Sanayinde Proteazların Kullanımı	17
2.6.3. Unlu Mamullerde Proteazların Kullanım	17
2.6.4. Et ve Balık Sanayinde proteazların Kullanımı	18
2.6.5. Alkol ve Bira Üretiminde Proteazların Kullanımı	19
2.6.6. Süt Teknolojisinde Proteazların Kullanımı	19
2.6.7. Atık Arıtımı ve Dönüşümünde Proteazların Kullanımı	20
2.6.8. Deri Endüstrisinde Proteazların Kullanımı	21
2.7. Önceki Çalışmalar	24
KAYNAKLAR	35

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Biyolojik Materyal	40
3.2. Substrat Seçimi	40
3.3. Substratın Partikül Büyüklüğü	40
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
3.4.1. Karbon Kaynakları	40
3.4.2. Azot Kaynakları	41
3.5. Besiyerleri	41
3.5.1. Katı Besiyeri	41
3.5.2. Sıvı Besiyeri	41
3.5.2.1. Luria Broth(L B) Besiyeri	41
3.6. SSF Besiyeri	41
3.7. Kullanılan Aletler	42
3.8. Mikroorganizmanın Seçimi ve Üretilmesi	43
3.9. SSF Besiyerinde Proteaz Üretimi	43
3.10. Proteaz Aktivite Tayini	44
3.11. Protein Miktar Tayini	44

3.12. Alkalin Çözeltilisinin Hazırlanması	45
3.13. Enzim Üretimi Üzerine Değişik Parametrelerin Etkisi	45
3.13.1. Uygun Substrat Seçimi	45
3.13.2. Uygun Partikül Büyüklüğündeki Substrat Seçimi	45
3.13.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	46
3.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH 'nın Etkisi	46
3.13.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	46
3.13.6 Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	47
3.13.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi	47
3.13.8.Enzim Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Etkisi (İnokülüm Hacmi)	47
3.13.9.Enzim Üretimi Üzerine Uygun Nem Miktarının Belirlenmesi (Moisture Level)	48
3.13.10.Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	48
3.13.11. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	49
KAYNAKLAR	50

4. BULGULAR veTARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Substratların Etkisi	51
4.1.2. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Partikül Büyüklüğündeki Substratın Etkisi	51
4.1.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	52
4.1.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH 'nın Etkisi	52
4.1.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	52
4.1.6. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	53
4.1.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi	53
4.1.8. Enzim Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Etkisi	54
4.1.9. Enzim Üretimi Üzerine Nem Oranın Etkisi	54
4.1.10. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	55
4.1.11. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	55

4.2. TARTIŞMA	57
4.3.ŞEKİLLER	68
KAYNAKLAR	74
SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	80

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Mikrobiyal Enzimlerin Yıllık Kullanım Değerleri

Tablo 2.2. Alkalen Proteazın Ticari Üreticileri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteazların Hidroliz Reaksiyonunun Mekanizması

Şekil 2.1. Tripsinin Üç Boyutlu Konformasyonel Yapısı

Şekil 2.2. Kimotripsinin Aktif Bölge Rezidüleri

Şekil 2.3. Endüstriyel Enzimlerin Dünya Pazarındaki Sektörlere Göre Yüzdelerle Dağılımı

Şekil 4.1. Proteaz Üretimi Üzerine Farklı Substratların Etkisi

Şekil 4.2. Proteaz Üretimi Üzerine Substratın Partikül Büyüklüğünün Etkisi

Şekil 4.3. Proteaz Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Süresinin Etkisi

Şekil 4.4. Proteaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Şekil 4.5. Proteaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.6. Proteaz Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.7. Proteaz Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi

Şekil 4.8. Proteaz Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Etkisi

Şekil 4.9. Proteaz Üretimi Üzerine Nem Oranının Etkisi

Şekil 4.10. Proteaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Şekil 4. 11. Proteaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

SİMGELER ve KISALTMALAR

SSF ; Solid State Fermentation

SmF ; Submerged Fermentation

YE ; Yeast Extract

SDS ; Sodyum Dodesil Sülfat

LB ; Lauria Broth

NB ; Nütrient Broth

FCR ; Folin Ciocalteu Reagent

sp. ; Tür

ark. ; Arkadaşları

TCA ; Tricloroasetikasit

DNA ; Deoksiribonükleik asit

rpm ; Santrifüj rotorunun dakikadaki devir hızı

U ; Ünite

ml ; Mililitre

pH ; Asitlik derecesi

g ; Gram

mg ; Miligram

μl ; mikrolitre

μm ; mikrometre

M ; molarite

A ; Absorbans

1.GİRİŞ

Biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran, genel olarak protein yapısında olan ve organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik makromoleküllere enzim denir. Enzimler biyolojik katalizörler olmaları nedeni ile dünyamızdaki canlıların yaşamını olası kılan etmenlerin başında gelir¹.

Enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen enzimolojinin başlangıcı 19.yy' dan daha önceki tarihlere dayanır. Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan peynir, bira, şarap, yoğurt, ekmek, sirke, boza vb. maddelerin yapımında enzimlerden yararlanmışlardır². Son yıllarda endüstriyel katalizörler olarak enzimlerin kullanımında büyük bir artış gözlenmiştir. Biyoteknolojinin son 50 yıldaki gelişimi ile biyolojik katalizörlerin, proseslerin endüstride kullanımı hız kazanmıştır. Özellikle son çeyrek yüzyılda çevre ve insan sağlığının ön plana çıkması ile enzimlerden teknolojiye daha iyi yararlanma yolları aranmış ve önemli başarılar elde edilmiştir. Dünyadaki enzim marketlerinin 2005 yılında yaklaşık değeri 2 milyar \$'a ulaştığı tahmin edilmiştir³. Enzimler; fizyolojik, analitik ve endüstriyel uygulamalarından dolayı dünyadaki araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bugün 3000' den fazla enzim tanımlanmış ve bunların çoğu biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar yoluyla bulunmuştur. Bu kadar çeşitte enzime rağmen endüstriyel talepleri karşılamada enzimlerin yetersiz olduğu görülmüştür. Bu yetersizliklerden dolayı araştırmacılar ekstremofillerden enzimlerin karakterizasyonunu ve izolasyonunu yapmaya başlamışlar⁴.

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 son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır⁹. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59' unu proteazlar, %28' ini karbohidrazlar, %3' ünü lipazlar ve %10' unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Proteazlar; çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira fotoğraf vb. endüstriyel alanlarda, organik sentezlerde ve atık arıtımında kullanılmaktadır^{4,5}.

1.1 Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir. Endüstride kullanılan enzimlerin %75' i hidrolitik enzimlerdir. Proteazlarda bu %75' lik kısımda yer alan üç büyük gruptan birini oluştururlar. Proteazlar, diğer bir adı ile proteolitik enzimler hedeflerindeki proteinlerin peptid bağlarını hidrolizleyen hidrolitik enzimlerdir². Proteazlar, enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteazlar, enzim sınıfları içerisinde hem fizyolojik hem de ticari alanda büyük bir uygulama alanına sahiptirler⁶.

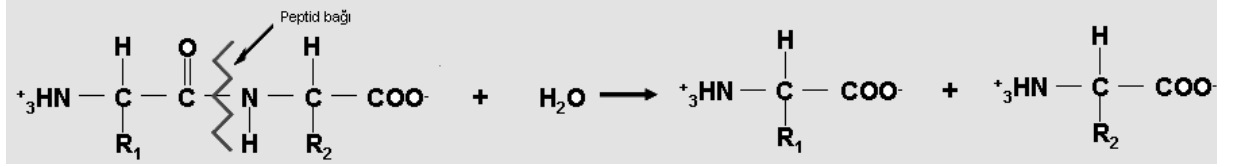
Proteazlar pH 'ya göre asidik, nötral ve alkalın olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Bunlar arasında alkalın proteazlar biyoteknolojide ve endüstriyel uygulamalarda en çok tercih edilenidir. Alkalın proteazlar çamaşır deterjanlarında, tekstil, gıda işlemlerinde, ilaç kimyasında, deri, kağıt, kağıt hamuru endüstrisi, süt

endüstrisi, organik sentez işlemleri ve atık su işlemlerinde geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Alkalin proteazlar öncelikle deterjan katkı maddesi olarak kullanılırlar ve toplam proteaz satışının %89' unu ve dünya genelindeki toplam satılan endüstriyel enzimlerin %60' ını karşılamaktadır. Bu nedenle ticari ilgiden dolayı endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroorganizmalar çok çeşitli habitatlardan araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Proteazların endüstriyel alanda kullanımından itibaren özellikle alkalin proteazların gelecek yıllarda büyük gelişme göstermeleri beklenmektedir⁷.

Enzimlerin büyük çoğunluğu düşük sıcaklıkta ve dar bir pH aralığında çalışmaktadır. Bu durum da endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek yeni mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir. Son yıllarda alkalofilik mikroorganizmalar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Alkalofilik mikroorganizmalar doğada; sodalı göllerde, alkalin memba sularında, çöl topraklarında ve çözünmüş proteinleri içeren topraklarda mevcuttur. Alkalofil mikroorganizmalar bu alanlardan izole edildikten sonra alkalin proteaz üretiminde kullanılabilirler⁸.

Alkalin proteazlar; bakteri, küf ve mayalardan izole edilse de *alkalofilik Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır. Nedeni ise çeşitli ortamlardan izolasyonu kolaydır⁸. Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrisinde en fazla kullanılan enzimlerdir. Son 30 yılda deterjanlardaki proteazların önemi küçük katkı maddesinden anahtar bileşenlere değişmiştir. İyi bir deterjan enziminin özelliği oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini de koruyabilmesidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma–oksitleme ajanlarının varlığında stabilitesini

koruyamamaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha iyi stabiliteye sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır⁹.



Şekil 1. 1.Proteazların hidroliz reaksiyonunun mekanizması²

KAYNAKLAR

1. Öztürk, S. *Ülkemizde izole edilen Bacillus licheniformis BA17 'den alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi –Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2007**
2. Çelik, N. *Bacillus clausii GMBAE 42'den saflaştırılan alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu⁺² iyonları ile termostabilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, **2006**, 1-5
3. Chauhan, B.; Gupta, R. *Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from Bacillus sp. R6R-14*, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 2115-2122
4. Patel, R.; Dodia, M.; Singh, S. P. *Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkalophilic Bacillus sp.: Production and optimization*, *Process Biochemistry*, **2005**, 40, 3569-3575
5. Alpan, L. G. *Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**
6. Mukherjee, A. K.; Adhikari, H.; Rai, S. K. *Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid state fermentation (SSF) condition using imperate Cylindrica gres and potato peel as low-cost medium :Characterization and application of enzyme in detergent formulation*, *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 39, 353-361

7. Rai, S. K.; Mukherjee, A. K. *Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprose) from Bacillus subtilis DM-04*, *Biochemical Engineering Journal* , **2010** , 48, 173-180
8. Kanekar, P. P; Nilegaonkar, S. S.; Sarnaik, S. S; Kelkar, A. S. *Optimization of protease activity of alkalophilic bacteria isolated from an alkaline lake in India*, *Bioresource Technology*, **2002**, 85, 87-93
9. Prakasham, R. S.; Rao, C. S.; Sarma, P. N. *Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease by Bacillus sp. in solid state fermentation*, *Bioresource Technology*, **2006**, 97, 1449-1453

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mikrobiyal Enzimler

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle bakteri ve mantarlardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, kültür ortamında kolay üretilmeleri, enzim oluşumunun kolay kontrol edilebilmesi, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır¹. Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur ve yüksek molekül ağırlığa sahip substratlara etki ederler. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimlerdir².

Ekstremofilik mikroorganizmalar; çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklarda, çok yüksek ve çok düşük pH değerlerinde (pH 10-12, pH 1-4) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır. Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, alkalofilik, asidofilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır. Buralarda yaşayan termoasidofilik ve alkalifolik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır¹.

2.2. Alkalen Proteazlar

Günümüzde endüstriyel enzimlerin %60' ını proteazlar oluşturmaktadır ve bu enzimlerin arasında en çok pazar payına sahip olanlar da alkalen proteazlardır. Alkalen proteazlar yüksek pH değerlerinde aktivite gösterebilen enzimlerdir. Bu nedenle deterjan sanayisinde önemli bir pazar payı bulunmaktadır³.

Enzimlerin büyük çoğunluğu düşük sıcaklıkta ve dar bir pH aralığında çalışmaktadır. Bu durum da endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek yeni mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir. Son yıllarda alkalofilik mikroorganizmalar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Alkalofilik mikroorganizmalar doğada; sodalı göllerde, alkalın memba sularında, çöl topraklarında ve çözünmüş proteinleri içeren topraklarda mevcuttur. Alkalofilik mikroorganizmalar bu alanlardan izole edildikten sonra alkalın proteaz enzimi üretiminde kullanılabilirler. Alkalın proteazlar; bakteri, küf ve mayalardan izole edilse de alkalifilik bacillus biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır. Nedeni ise çeşitli ortamlardan izolasyonu kolaydır⁴.

2.3. Proteazların sınıflandırılması

2.3.1. Kaynağına göre proteazlar

2.3.1.1. Bitkisel proteazlar: Papain, bromelain ve fisin' dir.

2.3.1.2. Hayvansal proteazlar: Tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin' dir

2.3.1.3. Mikrobiyal proteazlar: Bakteriyel ve fungal kökenli proteazlardır.

2.3.2. Aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar

2.3.2.1. Serin proteazlar: Aktif merkezlerinde aspartik asit, serin, histidin amino asitlerinden oluşan üçlü katalitik yapılar ile karakterize edilirler. Bu yapı içinde serin, substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir amino asittir.

2.3.2.2. Sistein proteazlar: Aktif merkezlerinde sistein, histidin ve aspartik asit bulunmaktadır. Sistein substrat ile kompleks oluşturulmasında etkili olmaktadır.

2.3.2.3. Aspartat proteazlar: Katalitik bölgelerinde iki aspartik asit artığı bulunmaktadır.

2.3.2.4. Metalo proteazlar: Metalo proteazlar aktiviteleri için divalent katyonlara gerek duyan enzimlerdir. Metalo proteazların yapısında katyon olarak genellikle Zn^{+2} (çinko +2 iyonu) bulunmaktadır ve EDTA gibi şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilen enzimlerdir.

2.3.3. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar

2.3.3.1. Ekzopeptidazlar: Substratın amino ya da karboksi ucuna yakın peptid bağınyı ayırırlar.

Ekzopeptidazlar 2 ye ayrılırlar.

2.3.3.1.1. Aminopeptidazlar: Polipeptid zincirinin serbest bir N ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit ya da dipeptidi ayırırlar.

2.3.3.1.2. Karboksipeptidaz: Polipeptid zincirinin C ucunda işlevseldir ve tek bir aminoasit ya da bir dipeptidi ayırırlar.

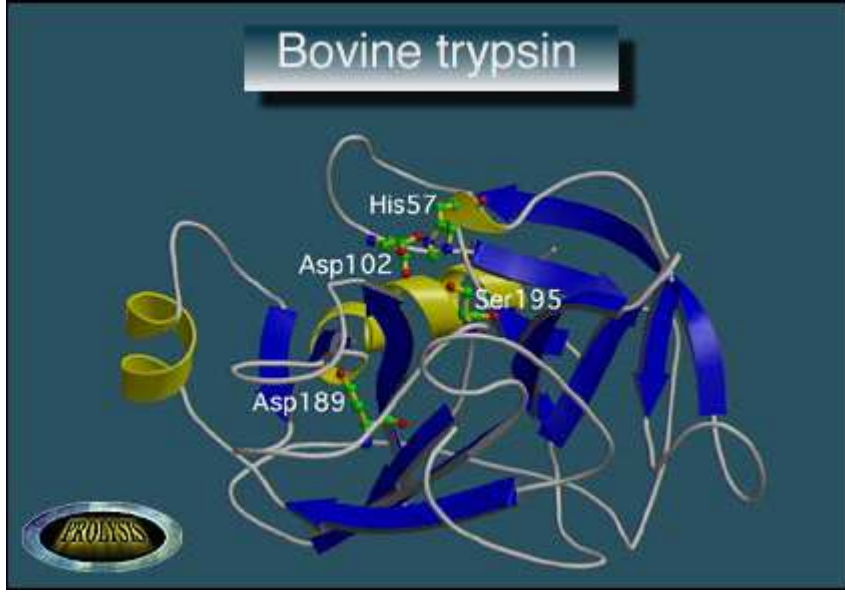
2.3.3.2. Endopeptidazlar: Ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler^{5,6}.

2.3.4. pH stabilitesine göre proteazlar

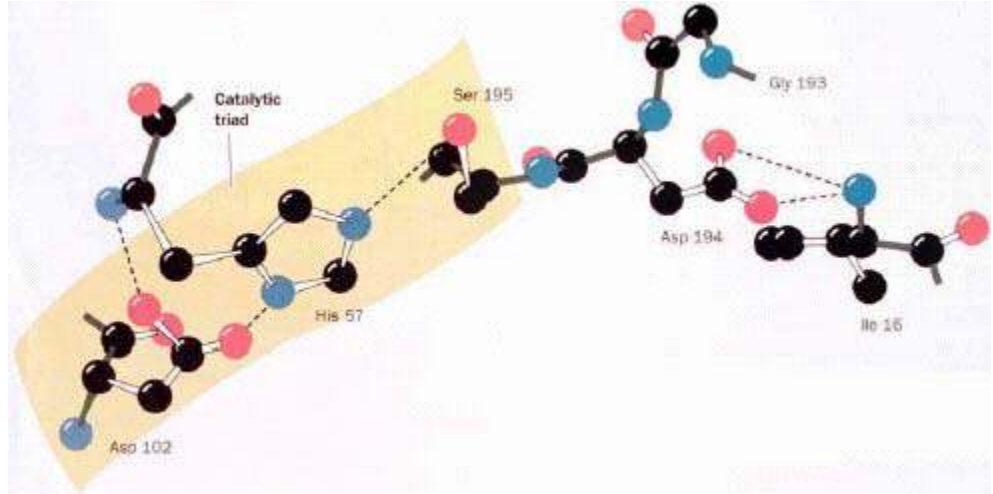
2.3.4.1. Asidik proteazlar

2.3.4.2. Nötral proteazlar

2.3.4.3. Alkalın proteazlar²⁶.



Şekil 2.1. Tripsinin üç boyutlu konformasyonel yapısı⁶



Şekil 2.2. Kimotripsinin aktif bölge rezidüleri⁶

2.4. Proteaz Üreten Mikroorganizmalar

2.4.1. Proteaz üreten mayalar ve küfler

Aspergillus flavus

Aspergillus melleu

Aspergillus niger

Chrysosporium keratinophylum

Fusarium graminearum

Penisillium griseofulvin

Scedosporium apiosermum

2.4.2. Proteaz üreten bakteriler

Bacillus licheniformis

Bacillus firmus

Bacillus alcalophilus

Bacillus amyloliquefaciens

Bacillus proteolyticus

Bacillus subtilis

Bacillus thuringiensis

Bu mikroorganizmalardan elde edilen alkalın proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok biyoteknoloji ve endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Ayrıca *Bacillus* türleri post eksponansiyel ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir⁷.

Tablo 2.1. Mikrobiyal Enzimlerin Yıllık Kullanım Değerleri¹

Enzim	Pazar Payı (%)
Alkalın Proteazlar	25
Diğer Proteazlar	21
Amilaz	18
Reninler	10
Analitik Enzimler	10
Karbohidrazlar	10
Lipaz	3
Tripsin	3

2.5.Katı Faz Fermantasyonu (SSF, Solid-State Fermentation)

SSF, suyun olmadığı veya az olduğu, çözünmeyen katı substratların bulunduğu ortamda mikroorganizmaların doğal ortamlarına benzer büyüme göstermelerini sağlar. Araştırmacılar; endüstriyel uygulamalarda enzimlerin kullanımını giderek artışı için enzim üretiminde yeni yöntemlerin arayışına

girmişlerdir. SSF işlemlerinde genelde katı atıklar, zirai-endüstriyel substratlar kullanılmaktadır. Bu amaçla; portakal kabuğu, mısır koçanı, şeker kamışı kabuğu, pirinç kabuğu, pirinç sapı, buğday kepeği, buğday unu, mercimek kabuğu, muz kabuğu, soya unu gibi katı substratlar kullanılmaktadır. Bu katı substratlar kullanılarak SSF yöntemiyle amilaz ve proteaz üretimi SmF'e (Submerged Fermentation) göre daha fazla ürün elde etmek mümkündür^{8,9}.

SSF tekniğiyle; yiyecekler, enzimler, organik asit ve tatlandırıcı içeren diğer ekstrasellüler metabolitler elde edilmektedir. SSF ile antibiyotik üretimi üzerine yapılan çalışmalarda Rifamycin B üretimi için en uygun katı substratın buğday kepeği olduğu görülmüştür^{8,9}.

Mikrobiyal ekzoenzimlerin üretiminde SSF SmF'e göre birçok avantaja sahiptir. Bunların bazıları; tarımsal atıkların değerlendirilmesi, minimum oranda suya ihtiyaç duyma, yapılışının daha kolay olması, daha yüksek oranda verim, düşük maliyetli olma, mikroorganizmalar için doğal ortamlarına benzemesi ve daha az enerji kullanımı gibi avantajları sayabiliriz. SSF ayrıca tarımsal ve yiyecek endüstrisinde kullanılan kolay elde edilebilir substratlara sahip olması, maliyetinin düşük olmasına ve substrata ulaşmayı kolaylaştırmaktadır. Bu ucuz tarımsal ve endüstriyel kaynaklar kullanılarak mikrobiyal enzimler ve çeşitli kimyasal ürünler elde edilmektedir¹⁰.

SSF'in amacı suda çözünmeyen substratların bulunduğu ortamda fermentasyonu başarmaktır. SmF'e oranla daha fazla avantaja sahip olmasına rağmen bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar SSF' in daha yavaş işleyen bir süreç olması, suyun az olmasından dolayı optimum koşulların seçiminin zorluğu yani pH,

sıcaklık, nem, besin miktarı gibi parametrelerin kontrol güçlüğü ve saf olmayan maddelerin üretimi sayılabilir⁹.

Son yıllarda bu yöntemle yapılan araştırmalarda çeşitli yiyecekler, tıpta tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler, çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel alanda kullanılan enzimler, çeşitli tatlandırıcılar ve biyolojik aktiviteye sahip sekonder metabolitler elde edilmiştir. Biyoteknolojide alkalın proteaz daha çok SmF ile üretilir. SSF ile alkalın proteaz üretimi daha az su isteği ve substrat olarak zirai-endüstriyel katı atıkların kullanımından dolayı maliyeti azalttığı için SmF' e kıyasla daha ekonomik ve çevre dostudur^{9, 11, 12}.

2.6. Proteazların Endüstride Kullanım Alanları

Proteazlar, protein molekülündeki peptid bağlarını hidrolizleyen, endüstriyel enzim gruplarından en geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir. Özellikle endüstriyel, biyoteknolojik, tıbbi ve temel araştırma alanlarında bu enzimlerin kullanımı giderek artmaktadır^{5, 6}. Alkali proteazlar endüstride özellikle deterjanların bileşiminde, deri işlemlerinde, fotoğraf filmleri üzerindeki gümüşün yeniden eldesinde, ilaç sektöründe, gıda işlemlerinde, organik atıklar ve geri dönüşüm gibi alanlarda kullanılmaktadır. Gıda sanayinde genellikle bitkisel ve fungal kaynaklı proteazlar kullanılmakta iken bakteriyel kaynaklı proteazlar geniş çapta gıda içermeyen proseslerde, mesela tekstil sanayinde haşillamada, fotoğraf filmleri üzerindeki gümüşün geri kazanılmasında kullanılmaktadır. Papain ve diğer bitkisel kaynaklı proteazların etin yumuşatılması, biranın soğukta bulanmasının önlenmesi ve protein hidrolizatlarının üretilmesi gibi uygulama alanları vardır. Fungal kaynaklı

proteazlar özellikle unlu mamullerin sanayinde buğday proteini olan gluteni modifiye etmek için kullanılırken nadiren etin yumuşatılmasında ve protein hidrolizatlarının eldesinde kullanılmaktadır. Tripsin, genellikle protein hidrolizatlarının eldesinde kullanılırken, renin ise peynir yapımında kazeinin çöktürülmesinde kullanılır. Bakteriyel kaynaklı proteazlar gıda proseslerinde yaygın bir kullanım alanına sahip olmamakla birlikte sucuk, sosis ve peynir gibi ürünlerin olgunlaştırılmasında, nadiren birada protein hidrolizatlarının oluşumunda ve yem üretiminde kullanılmaktadır¹⁵.

2.6.1. Deterjan Endüstrisinde Proteazların Kullanımı

İlk olarak 1914 yılında bu enzimler deterjanda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bugün bu enzimlerin toplam satışının %89'u deterjanların bileşiminde kullanılmaktadır. Alkalın proteazların deterjan sanayisinde oldukça fazla kullanmalarının sebebi yüksek sıcaklık, alkalın pH, surfaktanlar veya oksitleyici ajanlar varlığında yüksek stabilite ve aktivite göstermelerinden dolayıdır. İdeal deterjan enzimi yüksek pH' da ve 65 °C sıcaklıklarda çalışmalı ve deterjanın daha kısa sürede bozulmasına neden olan oksitlenmeye karşı dayanıklı olmalıdır. Bu bağlamda deterjan sanayinde kullanılan proteazlar her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmakta; işlevleri kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin azaltılmasını sağlamaktır. Bu enzimlerin deterjanlara ilavesiyle daha iyi temizleme performansı göstermeleri ve düşük maliyete yol açmaları, proteazların deterjan endüstrisinde kullanımını yaygınlaştırmıştır. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan proteazlar çoğunlukla Bacillus proteazlarıdır^{1, 6}.

2.6.2. Tekstil Sanayinde Proteazların Kullanımı

Ham ipek, sericin adı verilen mumsu ve mat bir protein kılıfı ile sarıdır. Tipik ipek parlaklığının ve yumuşaklığının ortaya çıkabilmesi için sericinin ağartma adı verilen işlemle çözülmesi gerekmektedir. Bu operasyon geleneksel olarak ipek çilelerini sabunlu ve sodalı suda kaynatarak yapılmaktadır ve kayıplara neden olmaktadır. Alkalın proteaz enzimi non-iyonik bir ısıtıcıyla pH 8.0 civarında 50-55 °C’de kullanılarak 1-2 saat ekonomik bir şekilde ağartma işlemi yapılabilir. Bu şekilde ipek kalitesi yükseldiği gibi kayıplar da en aza indirilebilir¹³.

2.6.3. Unlu Mamullerde Proteazların Kullanımı

Enzimlerin unlu mamullerin sanayiinde geniş bir uygulama alanı vardır. Ekmek yapım aşamasında, hamurun ekmek yapımına uygunluğunun artırılmasında, fermantasyon ve yoğurma sürelerinin kısaltılmasında ve ekmeğe bazı lezzet maddelerinin kazandırılmasında proteazla birlikte alfa amilazdan da yararlanılmaktadır¹².

Proteazlar, buğday unundaki gluteni hidrolize etmekte ve böylece de hamurun vizkozitesindeki düşüşle birlikte, hamur vizikoelastik bir özellik kazanmaktadır. Bu durum, hamurun yoğrulma karakteristiklerini (yoğurma ve şekil verme kolaylığı ve yoğurma süresinin azalması) iyileştirir, enerji tasarrufunu sağlar ve ekmek kalitesini artırır. Ancak unda çok miktarda proteaz bulunması, hamurun aşırı derecede yumuşamasına ve işlem yapılamayacak derecede yapışkan bir hal almasına neden olabilir. Bu nedenle süne zararlısına maruz kalmış buğdaylardan elde edilen una

ayrıca katkı şeklinde proteaz eklenmesi doğru değildir. Bisküvi ve kraker yapımında düşük gluten içeren unlar tercih edilmekte, bunun yeterli olmadığı durumlarda proteaz tipi enzimlerle bu ihtiyaç giderilmektedir^{12,13}.

2.6.4. Et ve Balık Sanayinde Kullanılan Proteazlar

Et endüstrisinde papain, fisin ve bromelain gibi bitkisel proteazlar ile fungal proteazlardan et yumuşatma (tenderizasyon) amacıyla yararlanılmaktadır. Bu proteolitik enzimler etteki elastin ve kollajeni kısmi hidrolize uğratarak etin yumuşamasına neden olurlar. Bu etki özellikle kas fibrillerini tutan sarkolemma ve benzeri kas doku bölgelerinde olmaktadır. Kas fibrillerindeki aşırı proteolitik parçalanma, etin lapalaşma şeklinde istenmeyen bir değişikliğe uğramasına neden olur. Etin rigor mortis (ölüm sertliği) fazındaki sertliğinden uzaklaşarak daha fazla yumuşaması ise, ette doğal olarak bulunan ve Ca^{+2} tarafından aktive edilen proteazlar ile katepsinler tarafından gerçekleşir¹⁴.

Et ve balık ürünleri elde edilirken bazı enzimlerden özellikle bitkisel kökenli proteazlardan yararlanılmaktadır. Et kalitesini artırmak için çeşitli proteaz preparatları kullanılabildiği gibi bazen et bileşiminde bulunan enzimleri aktive edici maddelerle de aynı amaca ulaşılabilmektedir. Et ve balık işleme sanayinde bunlardan başka balık protein hidrolizatlarının elde edilmesinde, bazı kabuklu deniz hayvanlarının etlerinden ayrılmasında ve kabukların açılmasında proteolitik enzimler kullanılmaktadır. Proteince zengin bazı sebze ve meyvelerden örneğin soyadan yapay et elde edilmesinde de proteazlardan yararlanılmaktadır¹².

2.6.5. Alkol ve Bira Üretiminde Proteazların Kullanımı

Bira teknolojisinde üretim sürecini kısaltmak, yatırım ve işçilik giderlerini en az düzeye indirmek için bu dalda enzim kullanımının esas amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla en çok alfa amilaz ve proteazlardan yararlanılmaktadır.¹² Proteazlardan biracılıkta biyolojik olmayan bulanıklığı engellemek amacıyla da yararlanılmaktadır. Birada biyolojik ve biyolojik olmayan iki tip bulanıklığa rastlanmaktadır. Biyolojik bulanıklığın nedeni mikroorganizmalardır. Biyolojik olmayan bulanıklık ise, biradaki protein ve taninin gözle görülebilir partiküller halinde kompleksler oluşturmasından kaynaklanmaktadır¹⁴.

2.6.6. Süt Teknolojisinde Alkali Proteazlar

Süt ve mamülleri sanayii en fazla enzim kullanılan gıda sanayi dallarından birisidir. Sütten peynir ve benzeri bazı ürünlerin enzimler yoluyla elde edilebildiği M.Ö. 5000 yıllarından beri bilinmektedir. Peynir eldesinde süt proteinlerinin çöktürülmesi için renin veya kimozen olarak adlandırılan proteaz kullanılmaktadır. Bu enzim süt danalarının midesinin 4. bölümünde bulunmaktadır. Renin süt danalarından tuzlu su ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Özellikle süt danalarından elde edilen renin, miktar yetersizliği ve ekstraksiyon zorlukları nedeniyle pek kullanılamamaktadır. Bu konuda yapılan araştırmalar sonucu bakteriyel kökenli renin elde edilmiş ve 1985 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Laktik asit bakterileri, süt teknolojisinde peynir ve süt ürünlerinin yapımında çok önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur. Bu bakteriler sütte bulunan kazeinin peptit bağlarını kırarak kazeinin pıhtılaşmasını ve buna bağlı olarak peynirin oluşumunu

sağlarlar. Laktik asit bakterileri, peynir üretiminde sütün asetlenmesi ile peynirin olgunlaşmasında işlevseldir ve özgün lezzetin oluşumuna da katkıda bulunurlar. Bakterilerin bu iki işlevi için proteolitik aktivite temeldir. Peynir endüstrisindeki önemleri nedeni ile son yıllarda fermentasyon bakterileri üzerine yapılan çalışmalar giderek artmıştır. Laktik asit bakterileri başka besinlerin fermentasyonu ve fermentasyon için uygun ortamın oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Proteazlar ayrıca gıda sektöründe bebek maması, diyet ürünleri, meyve suyu v.b. ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır^{1, 12, 13}.

2.6.7. Atık Arıtımı ve Dönüşümünde Proteazların Kullanımı

Boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi lifsel proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarla kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilirler. Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kümes atıklarının düzenlenmesi proteazların kullanım alanları arasındadır ve bu yolla atıklar ve tüy birikintileri giderilebilmektedir.

Alkalen proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde önemli miktarda gümüş bulunmaktadır. Filmlerin yakılması ile yüzeyindeki gümüş geri kazanılmakta ancak bu yöntemle çevre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Bu işlemde proteazların kullanılması, gümüşün geri dönüşümü için çevre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmler üzerindeki jelatinin enzim tarafından parçalanması ile üzerinde bulunan gümüş kolayca geri kazanılmakta,

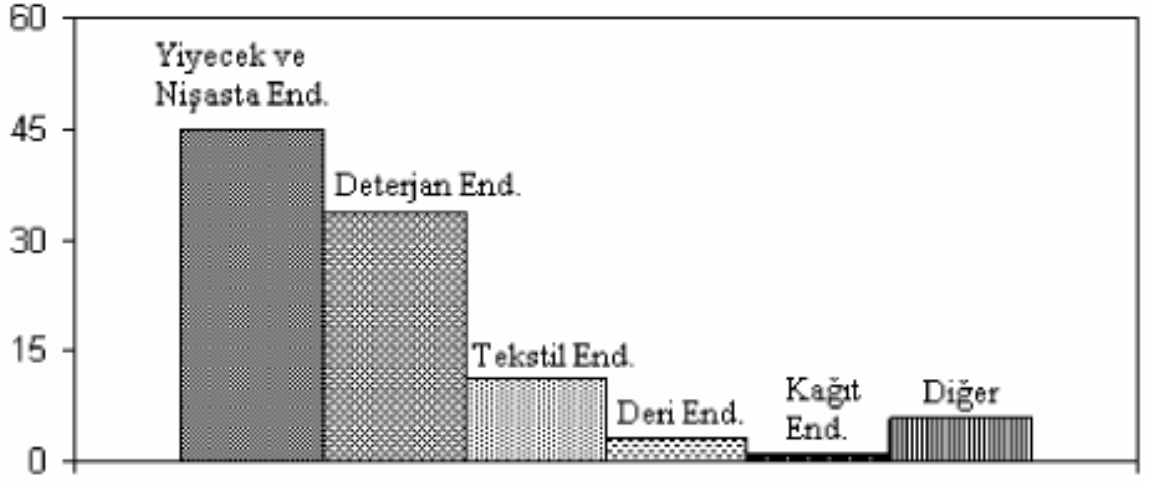
proteazlar film sektöründe de giderek önemli bir yer edinmektedir^{1,9}.

2.6.8. Deri Endüstrisinde Kullanılan Proteazlar

Eskiden dericilikte proteaz olarak pankreatik tripsin kullanılmaktaydı. Günümüzde ise bakteriyel kökenli proteazlar tripsinin yerine kullanılmaktadır. Bu enzimlerle tabakalama işlemleri sırasında ıslatma, kıl dökme ve sama işlemi gibi uygulamalar yapılmaktadır. Deri endüstrisinde enzim kullanımı ile hayvan derilerinin daha düzgün bir yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır. Bu süreç, geleneksel olarak kullanılan, derilerin kireç ve sodyum sülfid ile işlenmesinin yerini almaktadır. Ayrıca kimyasalların kullanıldığı klasik yöntem pahalı ve çevreye zararlı olduğundan, günümüzde deri sanayinde enzimlerin kullanılması tercih edilmektedir. Deri işlenmesinin çeşitli basamaklarında kullanılan alkali proteazlar daha kaliteli deri üretimine olanak sağlamaktadır. Bu uygulamada, deride istenilmeyen pigmentlerin yok edilmesi, deri yüzeyinden kılların ve tüylerin uzaklaştırılması ve daha düzgün, kullanışlı bir deri yüzeyinin elde edilmesi sağlanmaktadır^{1,13}.

Tablo 2.2. Alkalen Proteazların Ticari Üreticileri⁵

Mikroorganizma	Ticari isimler	Üreticileri
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase	Novo Nordisk, Danimarka
<i>Alcalofilic Bacillus sp.</i>	Savinase, Esperase	Novo Nordisk, Danimarka
<i>Alcalofilic Bacillus sp.</i>	Maxacal, Maxatas	Gist-Brocades, Hollanda
<i>Alcalofilic Bacillus sp.</i>	Opticleas, Optimase	Solvey Enzymes, GmbH, Almanya
<i>Alcalofilik Bacillus sp.</i>	Proleather	Amano Pharmaceuticals ltd, Japonya
Protein Engineered Variant	Durazym	Novo Nordisk of Sevinase, Danimarka
<i>Aspergillus sp.</i>	Protease P	Amano Pharmaceuticals ltd, Japonya
Protein Engineered Variant Of <i>Alkalofilic Bacillus sp.</i>	Maxapem	Solvey Enzymes, GmbH, Almanya
Genetic Engineered Donor- <i>B.lentus</i> Expressed in <i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	Purafect	Genenencor International, ABD



Şekil 2.3. Endüstriyel Enzimlerin Dünya Pazarındaki Sektörlere Göre Yüzde Dağılımı³³

2.7. Önceki Çalışmalar

Pandey ve ark.¹⁶ (1998) Tuzlu ve alkali topraklardan izole edilen 52 alkalofilik bakteriyel suşu alkalın proteaz üretmeleri için süt-agar besisi yerinde ürettir. Toprakta izole edilen 52 suştan sadece 15 suşun alkalın proteaz üretimini gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Burada %1 karbon kaynağı olarak sukroz, fruktoz, mannitol, glukoz, maltoz, nişasta ve laktöz kullanılmış, %1 azot kaynağı olarak, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4Cl , pepton, kazein ve maya ekstraktı kullanılmıştır. Maksimum enzim aktivitesi, %1 glikoz, %1 amonyum klorür kullanılmıştır. Maksimum enzim aktivitesi pH 10.5, sıcaklık 40 °C ve 20 saatlik inkübasyonda elde edilmiştir.

Park ve ark.¹⁷ (2003) *Alkalofilik Bacillus sp.* 103 bakterisinden ekstrasellüler alkalın proteaz üretiminde maksimum enzim aktivitesi elde etmek için mikroorganizmayı %2 soya, %1 kazein, %1 buğday unu, %0.5 K_2HPO_4 , %0.5 sodyum sitrat, %0.01 MgSO_4 ve %0.4 sodyum karbonat; 37 °C, 250 rpm 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim pH 5.5-12 arasında aktivite gösterirken optimum aktivite pH 10'da elde edilmiştir. Optimum sıcaklık ise 50 °C'de gözlenmiştir.

Banerjee ve ark.¹⁸ (2004) Toprakta izole edilen *Beauveria feline*' da soya proteinini hidrolizleyen alkalın proteaz aktivitesini, alkalın proteaz üreticisi olarak bilinen *Aspergillus oryzae* NCIM 649 ile karşılaştırmışlardır. SSF ortamında alkalın proteaza etki eden parametreleri incelemişler ve *Beauveria feline*' da buğday unu

kullanarak 7 gün boyunca inkübasyona bırakılan ortamda maksimum enzim aktivitesi 20.000 U/g olarak tespit edilmiştir. Başlangıç nem oranı %120 ve optimum pH 7.0 tespit edilmiştir. *Aspergillus oryzae* NCIM 649'un, *Beauveria feline*' ya oranla iki kat daha fazla alkalın proteaz ürettiği tespit etmişlerdir.

Basheer ve ark.⁹ (2006) *Engyodontium album* BTMFS, deniz tortularından izole edilmiş ve maksimum ekstrasellüler proteaz üretimini pH 11'de tespit etmişlerdir. Partikül büyüklüğü 425 µm 'den küçük, başlangıç nem içeriği %60 ile SSF yöntemiyle buğday kepeği katı substrat olarak kullanılmış ve proteaz üretimi için 25 °C 120 saat inkübasyona bırakılmıştır. Karbon kaynağı olarak sukroz, inorganik azot kaynağı amonyum hidrojen karbonat ilavesi ve aminoasitlerden lösün kullanıldığında enzim üretimini artırmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 60 °C dir. Enzimin yüksek pH ve sıcaklıkta maksimum aktivite göstermesi deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Uyar ve ark.¹⁰ (2003) *Bacillus sp.* kullanarak SSF tekniği ile mercimek kabuğu ve buğday kepeğinin bulunduğu ortamda alkalın proteaz aktivitesi incelemişlerdir. Buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF besiyerinde en yüksek enzim aktivitesini belirlemişlerdir. Maksimum aktivite 429.041 U/g ve 168.640 U/g olarak buğday kepeğinin ve mercimek kabuğunun substrat olarak kullanıldığı ortamda %40' lık başlangıç nem içeriği ve pH 10 'da inkübasyonun 24.saatinde elde edilmiştir. İnokülüm hacmi olarak %20 rapor edilmiştir.

Prakasham ve ark.⁴ (2005) *Alkalofilik Bacillus sp.* yi kullanarak SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler. Kullandıkları katı atıklar arasında en iyi aktiviteyi yeşil gram kabuğunda elde etmişlerdir. %1.5 maltoz ve %2 maya ekstraktı kullandıklarında optimum enzim üretimi kontrole göre %371 daha fazla verim elde edilmiştir. Glukoz enzim üretimini baskılamamış fakat kullanılan inorganik azot kaynakları ise enzim üretimi üzerine negatif etki bırakmışlardır. Maksimum enzim üretiminde optimum pH 9.0, nem içeriği %140, inokülüm oranı %3 ve inkübasyon süresi 60.saat olarak belirlenmiştir.

Singh ve ark.¹⁹ (2005) SSF yöntemiyle *alkalofilik aktinomisetes* üzerinde yaptıkları çalışmada glukoz, pepton, maya ekstraktı, KH_2PO_4 ve amino asitlerden tirozin, triptofan, lizin ve arginin farklı konsantrasyonlarda kullanarak alkalın proteaz üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada katı substrat olarak molas, buğday unu ve buğday kepeğine %0-2 oranında bu kaynaklar ilave edilerek 37 °C' de 32 saatlik inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyondan sonra glukozun %0.5 ile %1' de enzim aktivitesini olumlu etkilediği, %2 ve daha yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi olumsuz etkilediği görülmüştür. KH_2PO_4 'te ise %1.5 konsantrasyonunda enzim aktivitesini artırdığı %2 ve daha yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi baskıladığı gözlemlenmiştir. Pepton ve maya ekstraktında ise sırasıyla %0.5 ve %1 konsantrasyonlarında aktiviteyi olumlu etkilerken bunun dışındaki konsantrasyonlarda enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür. Kullanılan amino asitlerden, tirozin enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkide bulunmamıştır. Lizin

ise %1' lik konsantrasyonda aktiviteyi artırırken bunun dışındaki konsantrasyonlarda aktiviteyi olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir. Arginin ve triptofan %1'lik konsantrasyonlarda maksimum enzim üretimine yol açarlarken %2' den daha yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi baskıladığını ileri sürmüşlerdir.

Sarnaik ve ark.³ (2002) Hindistan'daki alkalın Lonar Gölü' nün tortularından izole edilen *Arthrobacter ramosus* ve *Bacillus alcalophilus* bakterilerinden alkalın proteaz üretmeye çalışmışlardır. Karbon ve azot kaynağı olarak yalnızca soya küspesi kullanılmıştır. Her iki organizmada da maksimum proteaz aktivitesi %1' lik başlangıç substrat konsantrasyonunda ve 30 °C çalkalamalı inkübatörde elde edilmiştir. Enzim ticari deterjanların varlığında 65 °C ve pH 12' de maksimum aktivite göstermiştir. Bu enzim aynı zamanda pamuk bezlerdeki kan lekelerini temizlediğinden dolayı ticari deterjan bileşimi için de uygun olduğu rapor edilmiştir.

Bahçeci.²⁰ (2004) Tuz Gölü' nden izole edilen bakterilerin endüstriyel öneme sahip ksilanaz, selülaz, alfa amilaz ve proteaz üreten üretenlerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Elde edilen izolatlardan birinin *Bacillus pumilis*, iki izolatın *Bacillus subtilis* ve geriye kalanların *Bacillus licheniformis* olduğunu tespit etmişlerdir. Bu izolatların önemli ölçüde amilaz ve proteaz ürettiği belirlenmiştir. Enzimlerin optimum aktivite sıcaklıkları 60-80 °C ve optimum pH 7.0-8.0 olarak belirlenmiştir. Amilazın 80 °C ve pH 9.0' a kadar stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. Proteazın optimum aktivite sıcaklıkları 50-60 °C ve optimum pH

7.0-7.4 olarak belirlenmiştir. Proteazın 80 °C pH 9.0' a kadar stabilite gösterdiği belirlenmiştir.

Mahanta ve ark.²¹ (2008) yaptıkları çalışmada yağı alınmış *Jatropha* tohum küspesinin SSF'te enzim üretimi için substrat olarak kullanılabilceğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar daha önce kendileri tarafından rapor edilen çözücü tolerant *Pseudomonas aeruginosa PseA* soyunu fermantasyon için kullanmışlardır. Bu tohum küspesinin bakteriyel gelişimi ve enzim üretimini iyi bir şekilde desteklediğini görmüşlerdir (Proteaz 1818 U/g ve lipaz 625 U/g). Araştırmacılar maksimum proteaz ve lipaz aktivitesini %50 substrat nemliliğinde ve 72-120. saat geliş periyotlarında pH 6.0-7.0' da tespit etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak maltoz ile zenginleştirmenin proteaz ve lipaz üretimini sırasıyla, 6.3 ve 1.6 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Proteaz üretimi için azot kaynağı olarak pepton eklenmesinin, lipaz üretimi için NaNO₃ eklenmesinin enzim üretimini *Jatropha* tohum küspesinin gramı başına lipaz aktivitesi 1084 U ve proteaz aktivitesi ise 11.376 U artırdığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar elde edilen sonuçların endüstriyel enzimlerin üretimi için SSF şartlarında bu yol, biyokütlenin değerlendirilmesi için değişik yaklaşımların olabileceğini göstermişlerdir.

Öztürk.⁵ (2007) Yaptığı çalışmada Van Gölü' nden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den alkalın proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu araştırmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 19.7 kDa, Ca⁺² iyonu varlığında ve yokluğunda optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur.

Rao ve ark.²² (2009) *Amycolatopsis sp.* RSP 3' ten zirai–endüstriyel atık materyallerini kullanarak SSF yöntemiyle Rifamycin B üretmişlerdir. Kullanılan katı substratlardan mısır kabuğu, buğday kepeği ve mısır koçanına göre 4 kat daha fazla üretim gerçekleştirmiştir. İncelenen parametreler, pH, sıcaklık, oksijenli ortam, karbon ve azot kaynakları, inokülüm oranı ve inkübasyon süresidir. Çalışmada antibiyotik üretiminde pH 7.0-9.0 aralığında verim elde edildiği, maksimum aktivitenin pH 8.0' da elde edildiği gözlenmiştir. Rifamycin B üretmek için uygun sıcaklık aralığı 24-32 °C arasında ve en iyi aktivite 28 °C 'de elde edilmiştir. Üretim düşük seviyedeki nem oranlarında (1:1,1:1.5 ve1:2) çok az olduğu, nem oranı 1:4.5'a kadar artırıldığında antibiyotik üretimini de artırdığını gözlenmiştir. Nem oranı 1:4.5'tan daha fazla artırılırsa Rifamycin B üretiminin olumsuz etkilendiğini dile getirmişlerdir. İnkübasyon süresince antibiyotik üretimi 3. günde başlamış 9. günde maksimuma ulaşmıştır, 9.günden sonra ise üretimin azalmaya başladığını raporlamışlardır. İnokülüm oranı %2.4' ten %7.2' ye artırıldığı zaman antibiyotik üretiminde %250 oranında bir artış gözlenmiştir. İnokulum oranı %12 kadar artırıldığında ise antibiyotik üretiminde %50' lik bir azalmaya yol açtığı görülmüştür. İlave edilen karbon kaynakları arasında üretimi artıran glikoz, ksiloz ve maltoz iken, üretimi azaltan ise riboz ve nişasta olmuştur. Azot kaynakları arasında soya ununun üretimi etkilemediği diğer organik azot kaynaklarının üretimi olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. İnorganik azot kaynakları arasında ise KNO₃' ün %25 oranında Rifamycin B üretimini artırdığı gözlenmiştir.

Gupta ve Chauhan.²³ (2003) *Bacillus sp.* RGR-14' ü kullanarak alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Ekstraselluler alkalın proteaz üretimi için kompleks azot ve karbon kaynakları olarak; nişasta, casaminoasit, soya unu kullanmışlar. Bu kompleks kaynaklar; glukoz, mannoz, fruktoz, sukroz veya inorganik azot kaynaklarından potasyum nitrat ve amonyum sülfat ile karşılaştırıldığında proteaz üretimini çok dah fazla artırdığı görülmüştür. Casamino asitin yüksek konsatrasyonlarda proteaz üretimini baskıladığı görülmüştür.

Dodia ve ark.²⁴ (2005) *Haloalkalifilik Bacillus sp.*'den ekstrasellüler alkaline proteaz üretmişlerdir. Proteaz üretimi gelatin broth' ta maksimuma ulaşmıştır. Üretim pH 8.0 ve 9.0'da en yüksek verime ulaşıldığını bildirmişlerdir. Organik azot kaynaklarından pepton ve maya ekstraktı bakterinin çoğalması için en uygun kaynakken, proteaz üretimi üzerinde ise casamino asit en yüksek aktiviteye sebebiyet vermiştir. Enzim üretiminde azalmaya en fazla soya daki pepton ve tripton neden olmuştur. İnorganik azot kaynakları daha az tercih edilmiştir. Proteaz üretiminin glukoz ve amonyum klorür tarafından da baskılandığını raporlamışlardır.

Sathish ve ark.²⁵ (2008) *Bacillus circulanstan* alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Enzim geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösterip optimum aktivitesi 70 °C' de, alkalın pH ortamında, sürfaktanlar ve oksitleyici ajanların bulunduğu ortamda göstermiştir. Enzim için Optimum pH 11 olarak tespit edilmiştir. Ca⁺², Mg⁺² ve Mn⁺² gibi metal iyonlar enzim aktivitesini olumlu etkilerken Cu⁺²' in olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Enzim bu ortamlarda aktivite gösterdiği için

hayvan derilerindeki kıl, tüy gibi maddeleri temizlemekte ve pamuk ipliklerindeki kan lekelerini yok ettiği rapor edilmiştir.

Mukerjee ve ark.²⁶ (2009) *Bacillus subtilis* DM-04 ‘ten SmF yöntemini kullanarak serin proteaz elde etmişler. Enzim optimum aktivitesini 45 °C ve pH 10’ da göstermiştir. Çalışma sırasında çeşitli metal iyonlarının enzim üretimine etkisi araştırılmış ve hiç bir metal iyonunun aktiviteyi olumlu etkilemediği görülmüş, maksimum inhibisyonun ortamda Mg⁺² ve Cu⁺² olduğunda gözlenmiştir. Bu enzim 0.1 mg/ml konsantrasyonunda deterjana ilave edildiğinde pamuk ipliklerinden kan lekelerini %28 oranında yok ettiği gözlemlenmiştir. Serin proteazların ticari deterjanlara ilave edilmesiyle biyoteknolojide oldukça başarılı sonuçlar elde edileceği umulmaktadır.

Makri ve ark.¹¹ (2009) Yarı katı faz fermentasyon yöntemiyle bir mantar olan *Mortierella isabellina*’ yı kullanarak tatlı sorgum’ dan biodizel üretimini gerçekleştirmişler. Biodizel üretmek için bu çalışmada etanol un yerine tatlı sorgum kullanılmıştır. *M isabellina* mantarı kullanılarak yarı katı faz fermentasyonu yöntemiyle şekerler lipitlere dnştrlmştir.

Adhikari ve ark.²⁷ (2007) Bu çalışmada termofilik *Bacillus subtilis* DM -04 bakterisi SSF metodunu kullanarak farklı tarımsal-endüstriyel atıklar ve mutfak atıklarını; buğday kepeği, pirinç kepeği, *Imperata cylindrica* imeni, muz yaprağı,

patates kabuğu ve çay yapraklarını substrat olarak kullanarak alkalın proteaz üretiminin hangisinde maksimum aktivite gösterdiğini incelemişler. Proteaz aktivitesi en yüksek patates kabuğu ve *Imperata cylindrica* çimeninde gözlemişler. Hatta patates kabuğu ve *Imperata cylindrica* çimeni 1:1 oranında karıştırıldığında aktivitenin daha da yükseldiği görülmüştür. *I. cylindrica* çimenine azot kaynağı olarak sığır eti ekstraktı ve maya ekstraktı ayrı ayrı ilave edildiğinde proteaz üretimini olumlu etkilediği görülmüştür. Karbon kaynağı olarak en iyi aktivite maltoz da gözlenmiştir. Ham proteazın optimum aktivitesini 37-45 °C’ de ve pH 8.0 ve 9.0’ da vermiştir. *Bacillus subtilis* DM -04’ten elde edilen enzim 60 °C’ de 15 dk bekletildikten sonra %67 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Bu özelliğinden dolayı enzim ticari deterjanlara ilave edilip olumlu sonuçlar alınacağı umulmaktadır.

Haddar ve ark.²⁸ (2009) *Alkalofilik Bacillus licheniformis* NH1 suşundan ekstraselluler alkalın proteaz üretmişlerdir. Alkalın proteaz için optimal aktivite pH ve sıcaklık için sırasıyla 10.0 ve 70 °C’ de elde etmişlerdir. Ham alkalın proteazın çeşitli katı ve sıvı deterjanlarda kullanımı denenmiştir ve yıkama performansı test edilmiş; kan, çikolata ve salça gibi lekeleri temizlemede başarılı bulunmuştur. Bu özelliğinden dolayı alkalın proteazlar gelecekte deterjan endüstrisinde potansiyel aday olduğu tahmin edilmiştir. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde özellikle Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Cu^{+2} ‘ın aktiviteyi olumlu etkilediği gözlenmiştir. Kullanılan inhibitörler arasında PMSF ‘nin proteaz üretimi üzerinde güçlü bir inhibisyona neden olduğu görülmüştür.

Chi ve ark.²⁹ (2006) Deniz mayası *Aureobasidium pullulans* ‘tan alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler. Bu maya suşunu Çin’in Qingdao bölgesindeki tortulardan izole etmişler. Maksimum enzim üretimi ortamda 2.5 gr nişasta, 2.0 gr NaNO₃, 100 ml deniz suyu ve başlangıç pH 6.0’ da 24.5 °C 30 saatlik inkübasyondan sonra elde edilmiştir. Proteaz üretimi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 9.0 ve 45 °C elde edilmiştir.

Mankai ve ark.³⁰ (2009) *Stretomyces sp.* CN902 ile SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini ve optimizasyonunu gerçekleştirmişler. Burada çeşitli zirai-endüstriyel atıklar katı substrat olarak kullanılmış ve en iyi aktivite buğday kepeği ve ezilmiş hurma çekirdeği karışımında elde edilmiştir. Bu iki substratı beraber kullanmaları durumunda enzim aktivitesi 90.50 U/g iken ayrı ayrı kullanıldıklarında buğday kepeğinde 74.50 U/g , ezilmiş hurma çekirdeğinin ise 69.50 U/g olarak tespit edilmiştir. %60’ lık başlangıç nem içeren ortamda ve 45 °C 5 günlük inkübasyondan sonra enzim üretimi 220.50 U/g olarak bulunmuştur. Optimal pH ise 9.0 ‘da gözlenmiştir. Bu karışıma azot kaynağı olarak maya özütü eklendiğinde SSF tekniğiyle enzim üretimi 245.50U/g yükselmiştir. Kullanılan karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine olumsuz etkide bulunduğunu raporlamışlardır.

Limam ve ark.³¹ (2008) *Botrytis cinerea* mantarını kullanarak özellikle ticari deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılmak üzere alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler. Alkalın proteaz üretimi için optimal fermantasyon koşulları

başlangıç pH 6.5, 28 °C ve 9 günlük inkübasyon ortamında maksimum verim elde etmişlerdir. Azot kaynaklarından pepton ve maya ekstraktı enzim üretimini artırmışlar, kullanılan karbon kaynaklarından nişasta ve molas proteaz üretimi üzerinde pozitif etkide bulunmuşlar. Proteaz aktivitesini en fazla uyaranlar ise bir alg olan *Spirulina algae*, KCl ve oligo elementlerdir. Son proteaz aktivitesinin başlangıçtaki şartlarda elde edilen aktiviteye göre 6.2 kat artığını tespit etmişler.

Shivanand ve Jayaraman.³² (2009) Kumta kıyılarından izole edilen halofilik *Bacillus aquimaris* VITP4 suşundan ekstrasellüler alkalın proteaz elde etmişler. Proteaz üretimi 0-4 M arasında değişen tuz konsantrasyonlarda araştırılmıştır. Proteaz aktivitesinde maksimum üretim 0.5 M tuzun olduğu ortamda 728U/ml, 48.saat ve 1 M tuzun olduğu ortamda 796 U/ml, 78.saat elde edilmiştir. Tuz konsantrasyonu 2.5 M ve daha fazla konsantrasyonlarda bakteriyel çoğalma ve enzim üretimini olumsuz etkilemiştir. Üretimde optimal pH ve sıcaklık sırasıyla 7.5 ve 37 °C' de tespit edilmiştir. Organik azot kaynaklarından pepton ve maya özütü üretimi artırırken inorganik azot kaynaklarının verimi olumlu etkilemediği gözlenmiştir. Karbon kaynakları ise proteaz üretimini baskılamışlardır.

KAYNAKLAR

1. Alpan, L. G. *Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**
2. Kıran, Ö. E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal ürünler ve endüstri de kullanım alanları*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, **2006**
3. Kanekar, P. P.; Nilegaonkar, S. S.; Sarnaik, S. S.; Kelkar, A. S. *Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India*, *Bioresource Technology*, **2002**, 85, 87-93
4. Prakasham, R. S.; Rao, C. S.; Sarma, P. N. *Green gram husk -an inexpensive substrate for alkaline protease production by Bacillus sp.in solid-state fermentation*, *Bioresource Technology*, **2006**, 97, 1449-1454
5. Öztürk, S. *Ülkemizde izole edilen Bacillus licheniformis BA17 'den alkalin proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi –Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2007**
6. Çelik, N. *Bacillus clausii GMBAE 42'den saflaştırılan alkalin proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu⁺² iyonları ile termostabilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, **2006**, 1-5

7. Mahalaxmi, Y.; Satshish, T.; Rao, C. S.; Rrakasham, R. S. *Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated Amycolatopsis sp.RSP3 under SS* , *Process Biochemistry*, **2010**, 45, 47-53
8. Karataş, H. *Bazı Bitki atıklarından Katı Faz Fermantasyon (SSF) Tekniği İle Ekstraselüler Enzim Üretimi*, Doktora Tez, Dicle Üniversitesi –Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, **2008**
9. Chellappan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S. M.; Elyas, K. K.; Bhat, G. S.; Chandrasekaran, M. *Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine Engyodontium album BTMFS10 under solid state fermentation* , *Process Biochemistry*, **2006** , 41, 956-961
10. Uyar, F.; Baysal, Z. *Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated Bacillus sp. under solid state fermentation*, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1893-1898
11. Economou, C. N.; Makri, A.; Aggelis, G.; Pavlou, S.; Vayena , D. V. *Semi –solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil* , *Bioresource Technology* , **2010**, 101, 1385-1388
12. Dönmez, S. *Gıda sanayinde kullanılan enzimler ve ülkemizdeki durumu*
A.Ü.Z.F. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara
13. Dağışan, L. *Marmara Araştırma Lisans Üstü Yaz Okulu Enzimlerin Gıda ve Hayvan Yemi Üretimindeki Uygulamaları-Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Araştırmalar, Bölüm 14-15*
14. <http://www>. Standartmerkezi. Com. *Gıdalarda kullanılan katkı maddeleri*

15. Fadiloğlu, S ve Erkmen, O. *Importance of enzymes in food industry, Gaziantep Üniversitesi Mühendislik fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, **2004**, 29, 393-400
16. Mehrotra, S.; Pandey, P. K.; Gaur, R. Darmwal, N. S. *The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate* , *Bioresource Technology* , **1999** , 67 ,201-203
17. Joo, H. S.; Kumar, C. G.; Park, G. C.; Raik, S. R.; Chang , C. S. *Bleach-resistant alkaline protease produced by a Bacillus sp.isolated from the Korean polychaete,Periserrula leucophryna* , *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1441-1447
18. Agrawal, D.; Patidar, P.; Banerjee, T.; Patil, S. *Alkaline protease production by a soil isoleta of Beauveria felina undes SSF condition : Parameter optimization and application-to soy protein hidrolysis* ,*Process Biochemistry*, **2005**, 40, 1131-1136
19. Mehta, V. J.; Thumar, J. T.; Singh, S. P. *Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete* , *Bioresource Technology* , **2006**, 97, 1650-1654
20. Bahçeci, H. *Tuz Gölü Bakteri İzolatlarının Yağ Asidi Metil Ester Analizi ve Hücre Dışı Enzimlerin Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi –Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2004**
21. Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. K. *Production of protease and lipase by solvent tolerant Psoudomonas aeruginosa Pse A in solid state fermentation using Jetropha curcas seed cake as substrate*, *Bioresource Technology* , **1999**, 1729-1735

22. Mahalaxmi, Y.; Satshish, T.; Rao, C. S.; Rrakasham, R. S. *Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated Amycolatopsis sp.RSP3 under SSF, Process Biochemistry*, **2010**, 45, 47-53
23. Chauhan, B.; Gupta, R. *Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from Bacillus sp. R6R-14, Process Biochemistry*, **2004**, 39, 2115-2122
24. Patel, R.; Dodia, M.; Singh, S. P. *Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkalophilic Bacillus SP.: Production and optimization*, *Process Biochemistry*, **2005**, 40, 3569-3575
25. Rao, C. S.; Sathish, T.; Ravichanda, P.; Rrakasham, R. S. *Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated Bacillus circulans and evaluation of eco friendly applications*, *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 262-268
26. Rai, S. K.; Mukherjee, A. K. *Statistical optimization of production of a purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent – stable subtilisin-like serine protease(Alzwiprase)from Bacillus subtilis DM-04, Biochemical Engineering Journal*, **2010**, 48, 173-180
27. Mukherjee, A. K.; Adhikari, H.; Rai, S. K. *Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation*, *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 39, 353-361.

28. Hmidet, N.; Ali, N. E. H.; Hadda, A.; Kanoun, S.; Alya, S. K.; Nasri, M. *Alkaline proteases and thermostable alpha amylase co-produced by Bacillus licheniformis NHI: Characterization and potential application as detergent additive* , *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 47, 71-79
29. Chi, Z.; Ma, C.; Wang, P. Li, H. F. *Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast Aureobasidium pullulans* , *Bioresource Technology* , **2007**, 98, 534-538
30. Lazim, H.; Mankai, H.; Slama, N.; Barkallah, I.; Limam, F. *Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid state fermentation by Streptomyces sp. CN902*, *Ind Microbiol Biotechnology*, **2009**, 36, 531-537
31. Abidi, F.; Limam, F.; Nejib, M. M. *Production of alkaline proteases by Botrytis cinerea using economic raw materials: Assay as biodetergent*, *Process Biochemistry*, **2008** , 43, 1202-1208
32. Shivanand, P.; Jayaraman, G. *Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, Bacillus aquimaris strain VITP4 isolated from Kumta coast*, *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 1088-1094
33. Selen, V. *Bacillus amyloliquefaciens alfa amilaz üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, **2006**

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Biyolojik Materyal

Çalışmalarımızda biyolojik materyal olarak ticari olarak temin ettiğimiz *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 kullanıldı.

3.2. Substrat Seçimi

Çalışmalarımızda substrat olarak yöremizde kullanılan zirai atıklardan buğday kabuğu, buğday sapı, pirinç kabuğu, pirinç sapı ve arpa kabuğu kullanılmıştır.

3.3. Substrat Partikül Büyüklüğü

Çalışmalarımızda kullandığımız bitkisel atıklar olan; buğday kabuğu, buğday sapı, pirinç kabuğu, pirinç sapı ve arpa kabuğu blendırda 15-20 saniye öğütüldükten sonra 3 farklı elek (1000 µm, 1500 µm ve 2000 µm çaplı) yardımıyla elendi. Elde edilen farklı substratların hepsi kullanılarak enzim üretimi sağlandı.

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.4.1. Karbon Kaynakları

Glukoz, Merck'ten; nişasta, galaktoz, fruktoz, laktöz Sigma'dan; maltoz ve sakkaroz Difco'dan temin edilmiştir.

3.4.2. Azot Kaynakları

Amonyum sulfat ve amonyum nitrat Riedel De Haen'den; sodyum sitrat, üre, maya özütü Merck'ten; Bakteriyolojik pepton Oxoid'den; casamino asit Difco'dan temin edilmiştir.

3.5. Besiyerleri

3.5.1. Katı Besiyeri

3,5 gram Nütrient Broth (Oxoid) ve 7 gram agar (Merck), 300 ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

3.5.2. Sıvı Besiyeri

3.5.2.1. Luria Broth(L B) Besiyeri

10 gr maya özütü, 5 gr NaCl (Merck), 5 gr tryptone (Difco) 1 lt saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

3.6. SSF Besiyeri

Kurutulmuş bitkisel atıklar blendırde öğütüldükten sonra farklı gözenek büyüklüğündeki eleklerden geçirilerek 1000 µm, 1500 µm ve 2000 µm çaplı olmak üzere 3 farklı partikül büyüklüğündeki katı substratlar elde edilmiştir. Çalışmamızda bu 3 farklı partikül büyüklüğündeki substratların hepsi kullanılarak enzim üretiminin hangisinde daha iyi sonuç verdiği araştırıldı. Bu farklı büyüklükteki katı substratlar

100 ml'lik erlenmayer içerisinde %30 olacak şekilde 3'er gr tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edildikten sonra steril etmek için otoklavlandı. Otoklavdan sonra SSF besiyerine daha önce inkübasyona alınan bakterilerden OD'si 0.6'ya gelen bakterilerden 3 ml yani %30 inokülüm besiyerinden erlenmayer içerisindeki SSF besiyerine katılarak 37 °C ve 150 rpm' de üretildi.

3.7.Kullanılan Aletler

<i>İnkübatör</i>	(EN 400)
Steril Kabin	(Telstar AV-100)
Spektrofotometre	(Pharmacia LKB-Novaspec 2)
Çalkalayıcı	(Selecta P)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K15)
Vorteks	(VWR International)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Deep-Freeze	(Haris, -70 °C)
Etüv	(Heraus)
Dijital Göstergeli Hassas Terazi	(GEG,AVEY)
Otoklav	(HMC, HIRAYAMA)
Su Banyosu	(Grant 6G, -20, +100 °C)

pH metre	(METTLER TOLEDO MP220)
Sterilizatör	(Heraus)
Blender	(Waring Commercial Laboratory)
Mikropipet	(Physio Care 1000)

3.8. Mikroorganizmanın Seçimi ve Üretilmesi

Çalışmamızın başında 3 ayrı *Bacillus* türünün ayrı katı besiyerine ekimi yapıldı. Daha sonra petri kutuları 37 °C 24 saat inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen bakteriler LB besiyerine aktarıldı. LB besiyeri 37 °C 24 saat boyunca 150 rpm' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra örneklerin enzim aktivitesine bakılarak çalışmamızda kullanacağımız bakteriyi yani *Bacillus licheniformis* ATCC 14580' i seçtik.

3.9. SSF Besiyerinde Proteaz Üretimi

Çalışmamızda buğday kabuğu, buğday sapı, pirinç kabuğu, pirinç sapı ve arpa kabuğu kullanarak SSF besiyeri hazırlamak için bu substratlar 3 'er gr tartılarak 100' lük erlenlere koyuldu. Üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edildikten sonra 121 °C ' de 15 dk otoklavlandı. LB besiyerinde üretilen bakteriyi steril ortamda her bir erlene 3 ml ilave edildikten sonra örnekler 37°C ve 150 rpm' de 24, 48, 72, 96 ve 120. saatte kadar her 24 saatte bir örneklere 10 ml çeşme suyu daha ilave edilip 15 dk çalkalandıktan sonra SSF besiyerindeki sıvı kısım süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne

alınarak soğutmalı santrifüjde 10000 rpm' de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde ettiğimiz üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanıldı.

3.10. Proteaz Aktivite Tayini

SSF besiyerinden ekstrakte ettiğimiz üst sıvıdan (süpernatant) 150 µl enzim, 250 µl 0.1 M Tris HCl tamponunda (pH 7.2, 8.0, 9.0, 9.5, 10) çözünen %1' lik azokazeinin olduğu tüplere aktarıldı. Tüpler 37 °C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alındıktan sonra örneklere 1 ml %10' luk TCA (Tricloro asetik asit) ilave edildi. 15 dk +4 °C bekletilen örnekler bu süre sonunda 2 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvıdan 1 ml alınarak 0.8 ml 1.8 M NaOH' in üzerine ilave edildikten sonra spektrofotometrede 420 nm' de okundu¹.

Bir enzim ünitesi, deney koşullarında 1 µmol azokazeini 30 dk'da parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.11. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için Lowry yöntemi tercih edildi. Tüplere 5 ml alkalın çözeltisi konulduktan sonra 450 µl saf su ve 50 µl enzim ilave edildi. Tüpler 15 dk 37 °C' de bekletildikten sonra 1:1 oranında seyreltilmiş Folin Cialcateu Reagent (FCR) ilave edilerek 30 dk karanlıkta bekletildi. 30 dk tamamlandıktan sonra spektrofotometrede 660 nm' de okundu².

3.12. Alkalin Çözeltisinin Hazırlanması

Alkalin çözeltisi %4 Na₂CO₃, %4 Na- K tartarat ve %2 CuSO₄·5H₂O karışımından oluşmaktadır. Bir baherde 100 ml % 4 oranında Na₂CO₃ hazırlandıktan sonra ayrı kaplarda hazırlanan %4' lük Na -K tartarat ve CuSO₄' tan 1'er ml alınarak Na₂CO₃' ün olduğu behere ilave edildi. Karıştırıcı yardımıyla karışımları sağlandı.

3.13. Enzimi Üretimi Üzerine Değişik Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi

3.13.1. Uygun Substratın Seçimi

Buğday kabuğu, buğday sapı, pirinç kabuğu, pirinç sapı ve arpa kabuğundan her biri ayrı ayrı 3' er gram tartılarak 100 ml' lik erlenlere aktarıldıktan sonra üzerine çeşme suyu eklenip 121 °C' de 15 dk otoklavlandı. Daha sonra 600 nm' de 0.6 OD' ye gelen bakterilerden her bir erlene 3'er ml ekimi yapılarak 37 °C ve 150 rpm' de inkübasyona bırakıldı ve en iyi aktivite pirinç sapında tespit edildi.

3.13.2. Uygun Partikül Büyüklüğündeki Substrat Seçimi

Çalışmamızda kullandığımız kurutulmuş bitkisel atıkları blendırde öğütüldükten sonra 3 farklı elek yardımıyla (1000 µm, 1500 µm, 2000 µm çaplı) elendi. Elde edilen bu substratlardan SSF besiyeri hazırlanarak sterilizasyon ve ekim işlemleri yapıldıktan sonra inkübasyona bırakıldı. Daha sonra enzim

aktivitesine bakılarak uygun büyüklükteki substrat tespit edildi. Çalışmanın bundan sonraki safhalarında bu büyüklükteki substratı kullandık.

3.13.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Farklı partikül büyüklüğündeki substratlar alınarak 3'er gr tartılıp erlenlere konuldu, üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edilip steril etmek için otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her bir erlene 3' er ml bakteri ekimi yapıldıktan sonra 37 °C 150 rpm 'de inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir 5 gün süreyle (24, 48, 72, 96, 120. saat) örnekler alınıp enzim aktivite tayini yapılarak en uygun inkübasyon süresi belirlendi.

3.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

Enzimin aktivitesi üzerine pH 'nın etkisini incelemek için; 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH: 7.2; 8.0; 9.0; 9.5; 10.0) kullanılarak %1 oranında azokazein hazırlandı. Hazırlanan azokazein ile enzim üst sıvısı kullanılarak proteaz aktivitesine bakıldı. Optimum pH 9.5' ta elde edildi.

3.13.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler; 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C' deki sıcaklıklarda

30 dk bekletildikten sonra aktivite tayini yapılarak optimum sıcaklık belirlenmeye çalışıldı.

3.13.6. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın enzim stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemek için enzim içeren üst sıvılar; 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C' de 1'er saat bekletildikten sonra enzim aktivite tayini yapılarak enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığı tespit edildi.

3.13.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için %1-5 SDS ve %1-5 Tween 40 kullanıldı. Bu deterjanlar enzim içeren üst sıvıyla 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 30 dk +4 °C ön inkübasyonda tutulduktan sonra enzim aktivite tayinine bakılarak deterjanların proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi.

3.13.8. Enzim Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Seçimi (İnokülüm Hacmi)

Uygun inokülüm hacminin belirlenmesi için sıvı besiyerinden SSF'li ortama 1.5 ml'den başlayıp 4 ml'ye kadar artırılarak SSF besiyerlerindeki besiyeri hacminin %15, %20, %25, %30, %35, %40' ı olacak şekilde bakteri ekimi yapıldı. Daha sonra örnekler 37 °C 150 rpm 'de proteaz üretimi için daha önce

belirlenen en uygun inkübasyon süresi olan 72. saate kadar inkübasyona alındı. Sonra örneklerin üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edilip çalkalayıcıda 15 dk çalkalandı. Örneklerin sıvı kısmı katı kısımdan alınıp 10000 rpm' de 5 dk soğutmalı santrifüjde santrifüjlendikten sonra üst sıvıları elde edilerek enzim aktivite tayini yapıldı.

3.13.9. Enzim Üretimi Üzerine Uygun Nem Miktarının Belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine uygun nem miktarının belirlenmesi için 1500 µm büyüklüğündeki pirinç sapı alındı. SSF besiyeri hacminin %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50 ve %55 'i olacak şekilde sırasıyla 100 ml'lik erlenlere 2 gr, 2.5 gr, 3 gr, 3.5 gr, 4 gr, 4.5 gr, 5 gr, 5.5 gr pirinç sapı bırakılarak üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edilerek otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) erlenlere daha önce belirlediğimiz en uygun inokülüm hacmi olan 2.5 ml bakteri ekimi yapılarak inkübatörde 37 °C 150 rpm' de 72.saate kadar inkübasyona alındı. Daha sonra örneklerin üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edilip 15 dk daha çalkalandıktan sonra örneklerden sıvı kısım alınarak 10000 rpm' de 5 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen üst sıvıdan enzim aktivite tayinine bakıldı.

3.13.10. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besiyeri hazırlandıktan sonra kullanılan katı substratın ağırlığının %1' i olacak şekilde hazırlanan azot kaynaklarından amonyum sülfat, amonyum nitrat,

sodyum sitrat, üre, bakteriyolojik pepton, maya ekstraktı ve casaminoasit SSF besiyerlerine eklendi. Her bir erlene 2.5 ml bakteri ekimi yapıldıktan sonra 37 °C 150 rpm' de inkübasyona alındı. 72 saat sonra örneklere 10 ml çeşme suyu ilave edilip 15 dk çalkalandıktan sonra örneklerin sıvı kısımları alındı. Santrifüjde 5 dk 10 000 rpm' de santrifüjlendikten sonra üst sıvı alınarak enzim aktivitesine bakıldı.

3.13.11. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besiyeri hazırlandıktan sonra kullanılan katı substratın ağırlığını %1' i olacak şekilde hazırlanan karbon kaynaklarından glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, sukroz, maltoz ve nişasta UV altında belirli bir süre tutulduktan sonra SSF besiyerlerine eklendi. Daha sonra her bir erlene 2.5 ml bakteri ekimi yapıldıktan sonra 37 °C 150 rpm' de inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonra örneklere 10 ml çeşme suyu ilave edildikten sonra 15 dk çalkalandı. Örneklerin sıvıları alınıp 10000 rpm' de 5 dk santrifüjlenip üst sıvıları alınarak enzimin aktivite tayinine bakıldı.

KAYNAKLAR

1. Leighton, T. J.; Dor, R. H.; Warren, R. A.; Kelln, R. A.; *J. Mol Biol.* **1973**, May 5, 76 103-122.
2. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. *Protein measurement with the folin phenol reagent* ,*J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Substratların Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız katı sustratlar buğday kabuğu, buğday sapı, pirinç kabuğu, pirinç sapı va arpa kabuğu SSF besiyerinde kullanıldı. Bu substratlardan elde edilen proteaz aktivite sonuçları şekil 4. 1' de gösterilmiştir.

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi kullanılan katı substratlardan hepsinin proteaz aktivitesi birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Kullanılan bu substratlardan pirinç kabuğunun 48, 72, 96. saatlerdeki enzim üretiminin diğer substratlara nazaran düşük olduğu gözlenmiştir. Pirinç sapında 72.saatte 1.740 A(420 nm) ile en iyi proteaz üretiminin gerçekleştiği görülmüştür. Dolayısıyla çalışmanın bundan sonraki aşamalarında katı substrat olarak pirinç sapı kullanıldı.

4.1.2. Enzim Üretimi Üzerine Uygun Partikül Büyüklüğündeki Substratın etkisi

Çalışmamızda kullandığımız katı substratları blendırda öğüttükten sonra 3 farklı elekten geçirilerek farklı partikül büyüklüğündeki substratları SSF besiyerinde kullandık.

Şekil 4.2' de görüldüğü gibi en düşük enzim aktivitesinin en küçük partikül büyüklüğündeki substratta (1000 µm) elde edildiği, enzimin maksimum aktivitesinin orta büyüklükteki (1500 µm) substratta elde edildiği görülmektedir.

4.1.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Pirinç sapı en uygun katı substrat olarak seçildikten sonra en uygun inkübasyon süresini belirlemek için 24, 48, 72, 96 ve 120. saate kadar her 24 saatte bir enzim aktivite tayini yapılarak optimum inkübasyon süresinin 72.saat olduğu tespit edildi.

Şekil 4.3' te görüldüğü gibi enzim üretimi 24.saatten 72.saate kadar artış gösterdiği 72.saatte maksimum olduğu görülmektedir 1.740 A(420 nm). 72. saatten sonra ise aktivitede düşüşün olduğu görülmektedir.

4.1.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

Enzimin aktivitesi üzerine pH' nın etkisini incelemek için; 0.1 M Tris -HCl tamponu (pH: 7.2; 8.0; 9.0; 9.5; 10.0) kullanılarak %1 oranında azokazein hazırlandı.

Şekil 4.4' te görüldüğü gibi pH' nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi pH'yı 7.2' den pH 9.5 'e kadar artırdığımızda enzim aktivitesinin de arttığı, pH 9.5 proteaz için optimum pH olduğu görülmektedir. pH 9.5' tan sonra pH' yı artırdığımızda ise enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu görülmektedir.

4.1.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Bacillus licheniformis, pirinç saplarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamında, proteaz aktivitesi için elde edilen enzim içeren üst sıvıların 30 dakika

boyunca 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C bekletildikten sonra enzim aktivitesine bakıldı.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi sıcaklık 40 °C' den 50 °C ' ye kadar artırıldığında enzim aktivitesinin de artışı ve enzimin 50 °C' de maksimum aktiviteye ulaştığı görülmektedir. 50 °C' den sonra sıcaklık artırıldığında enzim aktivitesinin azaldığı görülmektedir.

4.1.6. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

SSF ortamından proteaz aktivitesi için alınan ve enzim içeren üst sıvı 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C 'de 1 saat bekletildikten sonra enzim aktivite tayinine bakıldı.

Şekil 4.6' da görüldüğü gibi sıcaklık 40 °C'den 60 °C' ye artırıldığında enzimin stabilitesinin değişmediği, 60 °C' den sonra ise enzimin stabilitesinde hızlı bir düşüşün olduğu gözlenmektedir.

4.1.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi

Bacillus licheniformis, bakterisinin pirinç saplarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamında, proteaz aktivitesi için enzim içeren üst sıvılar alındıktan sonra 1:1 oranında % 1-5 SDS ve %1-5 Tween 40 ile karıştırılıp 30 dk +4 °C de ön inkübasyona tutuldu ve enzim aktivite tayinine bakıldı.

Şekil 4.7' de görüldüğü gibi kontrol ile karşılaştırıldığında deterjanların enzim aktivitesini olumlu etkilemediği gözlenmektedir.

4.1.8. Enzim Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Etkisi

Pirinç sapı bulunan SSF' li besiyeri otoklavlandıktan sonra besiyeri hacminin %15, %20, %25, %30, %35 ve %40 olacak şekilde daha önce sıvı besiyerine ekimi yapılan bakterilerden 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml, 3.5 ml ve 4 ml bakteri SSF besiyerine ekimi yapıldıktan sonra 37 °C 150 rpm' de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra enzimin aktivite tayinine bakıldığında şekil 4.8' de görüldüğü gibi en iyi aktivitenin 2.5 ml' lik inokülüm hacminde olduğu tespit edilmiştir. Ekim miktarı 1.5 ml' den 2.5 ml' ye artırıldığında enzim aktivitesinin de arttığı, ekim miktarı 2.5 ml' den 4 ml' ye artırıldığında ise aktivite de azalmanın olduğu görülmektedir.

4.1.9. Enzim Üretimi Üzerine Nem Miktarının Etkisi

SSF besiyerine besiyeri hacminin %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55 olacak şekilde 2 g, 2.5 g, 3 g, 3.5 g, 4 g, 4.5 g, 5 g ve 5.5 g pirinç sapsarı eklendi. Üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edilip 121 °C' de 15 dk otoklavlandı. Steril edildikten sonra üzerine 2.5 ml bakteri ilave edilip inkübasyona alındı.

Şekil 4.9 'da görüldüğü gibi *Bacillus licheniformis* bakterisinin pirinç sapsarını substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamda en uygun nem oranının %50 (5 g) olduğu ve proteaz aktivitesinin 1.730 A(420 nm) elde edildiği görülmektedir. Nem oranının %20' den %35 'e artırıldığında enzim aktivitesinde de artışın olduğu görülmektedir.

Nem oranı %40 ile %55 arasında ise proteaz aktivite değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

4.1.10. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Pirinç saplari bulunan SSF besiyerine kullanılan katı substratın hacminin %1 'i olacak şekilde azot kaynaklarından amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum sitrat, üre, pepton, maya ekstraktı ve casaminoasit steril edilmiş hazır halde bulunan SSF besiyerine ilave edildi. Daha sonra üzerine 2.5 ml bakteri ilave edildikten sonra inkübasyona alındı. 72 saat sonra proteaz aktivitesi ölçüldü.

Şekil 4.10 'da görüldüğü gibi proteaz üretimini en fazla artıran azot kaynakları sırasıyla; casaminoasit, üre, amonyum nitrat, sodyum sitrat ve peptonun olduğu görülmektedir. Enzim üretimine amonyum sülfat ve maya ekstraktının katkısının olmadığı tespit edildi.

4.1.11. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

SSF ortamına kullandığımız katı substratın hacminin %1' i olacak şekilde karbon kaynaklarından glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, sukroz ve nişasta ilave edildi. Sıvı besiyerinden 2.5 ml bakteri ekimi yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 72 saatlik inkübasyondan sonra proteaz aktivite tayinine bakıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11' de görülmektedir.

Şekil 4.11' de görüldüğü gibi proteaz aktivitesinin en fazla artıran karbon kaynağının sukroz 1.808 A(420 nm) olduğu görülmektedir. Daha sonra sırasıyla aktiviteyi maltoz, glukoz ve laktozun artırdığı tespit edilmiştir. Galaktozun enzim

aktivitesini etkilemediği gör÷lmektedir. Fruktoz ve nişastanın ise kontrol ile karşılaştırıldığında enzim üretimini artırmadığı ve enzim aktiviteleri kontrole göre daha düşük olduğu gör÷lmektedir.

4.2. TARTIŞMA

Alkali proteazlar deterjan ve gıda endüstrisinde, süt ürünleri ve bazı besinlerde yenebilir tat oluşturulmasında, dericilikte kılların uzaklaştırılması ve daha pürüzsüz deri yüzeyinin elde edilmesinde ve fotoğrafçılıkta filmlerin yüzeyinde bulunan gümüşün geri kazandırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç sanayi, fırıncılık, yakıt, hayvan yemlerinde, meşrubat, tekstil, kağıt ve kimya endüstrilerinde de kullanım alanına sahiptir ^{1,2}.

Adhikari ve ark.³ termofilik *Bacillus subtilis* bakterisini kullanarak SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretmek için katı substrat olarak; buğday kepeği, pirinç kepeği, *Impereta cylindrica* çimeni, muz yaprağı, patates kabuğu ve çay yapraklarını kullanmıştır. Yaptığı bu çalışmada en iyi proteaz aktivitesini patates kabuğu ve *Impereta cylindrica* çimeninde elde etmişlerdir.

Prakasham ve ark.⁴ *Amcolatopsis sp.*RSP suşunu kullanarak SSF yöntemiyle bir antibiotik olan Rifamycin B 'yi üretmek için çeşitli tarımsal ve zirai atık kullanmışlardır. Bu atıklar; üzüm tohumu, portakal kabuğu, mısır koçanı, şeker kamışı, buğday kepeği ve mısır yaprağı kullanılmıştır. En iyi üretimi mısır kabuğundan elde etmiş ve mısır kabuğunun verimi buğday kepeği ve mısır koçanın 4 katı olduğunu rapor etmişlerdir.

Singh ve ark.⁵ *Alkalofilik actinomycete* ' den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler. Katı substrat olarak buğday unu, buğday kepeği ve molases kullanmışlar. En yüksek proteaz aktivitesini molases te elde etmişlerdir.

Sarma ve ark.⁶ *Bacillus sp* ' den alkalın proteaz üretimini SSF tekniğiyle gerçekleştirmek için mercimek kabuğu, buğday kepeği, soya unu ve yeşil gram

kabuğunu katı substrat olarak kullanmışlar ve en iyi proteaz aktivitesini yeşil garm kabuğunda 9658 U/g elde etmişlerdir.

Park ve ark.⁷ *Bacillus sp.*'den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmek için patates nişastası, mısır nişastası, buğday kepeği ve buğday ununu katı substrat olarak kullanmışlar. En iyi enzim aktivitesini buğday unundan 3856.0 U/ml elde etmişlerdir.

Uyar ve Baysal.⁸ *Bacillus sp.*' den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmek için kullandıkları katı substratlar arasında en yüksek enzim üretimini buğday kepeği ve mercimek kabuğundan elde etmişlerdir.

Elyas ve ark.⁹ *Engyodontium album*' dan SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler. En yüksek proteaz üretimini buğday kepeğinden elde etmişlerdir.

Çalışmamızda SSF tekniğiyle katı substrat olarak buğday kabuğu, buğday sapı, pirinç kabuğu, pirinç sapı ve arpa kabuğu gibi tarımsal ve zirai atıklar kullanıldı. Kullandığımız bu katı atıkların hepsinde proteaz aktivitesine rastlanmıştır ve en yüksek pirinç sapında elde edilmiştir. Pirinç sapında inkübasyonun 72.saatinde en yüksek proteaz aktivitesi 1.740 A(420 nm) olarak elde edilmiştir. Bundan dolayı çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında 1500 µm büyüklüğündeki pirinç sapı kullanılmıştır.

Elyas ve ark.⁹ *Engyodontium album* ' dan SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler ve en uygun inkübasyon süresinin 120.saatte elde etmişlerdir.

Baysal ve Uyar.⁸ *Bacillus sp.* 'den SSF tekniğiyle buğday kepeği ve mercimek kabuğunu katı substrat olarak kullandıklarında her ikisi için de en uygun inkübasyon süresinin 24.saat olduğunu tespit etmişlerdir.

Sarma ve ark.⁶ *Bacillus sp.* 'den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmek için yeşil gram kabuğu için en uygun inkübasyon süresini 60.Saat olarak belirlemişlerdir.

Singh ve ark.⁵ *Alkalofilik actinomycete* ' den alkalın proteaz üretiminde SSF yöntemiyle kullandıkları katı substratlardan en yüksek aktiviteyi 32.saatte elde etmişlerdir.

Pandey ve ark.¹⁰ *Bacillus sp.* ' den alkalın proteaz üretimi sırasında enzimdeki maksimum aktivitenin 20. saatte olduğunu raporlamışlardır.

Patel ve ark.¹¹ Haloalkalofilik *Bacillus sp.* 'den ekstraselluler alkalın proteaz üretimi için uygun inkübasyon süresinin 60.saat olduğunu tespit etmişlerdir.

Mankai ve ark.¹² *Streptomyces sp.* CN902 ile SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimi için buğday kepeği ve ezilmiş hurma çekirdeğini karıştırılarak substrat olarak kullanmışlar ve uygun inkübasyon süresini 120.saatte elde ettiklerini raporlamışlar.

Chi ve ark.¹³ Deniz mayası *Aureobasidium pullulans* ' tan SSF tekniğiyle en uygun inkübasyon süresinin 30.saat olduğunu dile getirmişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız katı substratlar arasında en yüksek aktiviteyi pirinç sapı vermiştir. Uygun inkübasyon süresini belirlemek için hazırlanan SSF besiyeri 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde örneklerin proteaz aktivite tayinine bakılarak maksimum enzim üretiminin 72.saatte olduğu görülmüştür. Uygun inkübasyon süresindeki farklılığın nedeni, besiyerlerinde kullanılan bakterilerin özelliklerinin farklı olması ve substratların içerdikleri besin maddelerinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Park ve ark.⁷ *Bacillus sp.* 'den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimi için optimum pH 'nın 10.0 olduğunu tespit etmişler ve enzimin pH 5.0 ile 12.0 arasında aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Sarita ve ark.¹⁰ *Engyodontium album* 'dan SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler ve en uygun pH' nın 11.0 olduğunu raporlamışlardır.

Singh ve ark.⁵ izole ettikleri haloalkalofilik *Bbacillus sp.* 'den ekstrasellüler alkalın proteaz üretimi için pH 7.0, 8.0 ve 9.0' da proteaz aktivitesini incelemişler ve pH 8.0 ve 9.0' da maksimum üretimin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Pandey ve ark.¹⁰ *Bacillus sp.* 'den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretiminin en yüksek pH 10.5' ta olduğunu dile getirmişlerdir.

Çalışmamızda pH 'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelediğimizde pH' yı 7.2 'den 9.5 'a kadar artırdığımızda enzim aktivitesinin de arttığı ve maksimum proteaz aktivitesinin pH 9.5' ta olduğu gözlenmiştir. pH 9.5'ta maksimum aktivite gözlememiz enzimin orta derecede alkalın oluşunu desteklemektedir. Alkalın

proteazlar yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olmalarından dolayı başta deterjan endüstrisi olmak üzere deri, gıda, ipek ve kağıt endüstrilerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Rao ve ark.² izole ettikleri *Bacillus circulans*' tan serin proteaz üretiminde optimum sıcaklığın 70 °C olduğunu dile getirmişlerdir.

Mukherejee ve ark.³ *Bacillus subtilis* DM-04 'ten serin proteaz üretmek için örnekler farklı sıcaklıklarda belli bir süre tutulduktan sonra maksimum enzim üretiminin 45 °C elde edildiğini raporlamışlardır.

Basheer ve ark.⁹ *Engyodontium album*' dan SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler ve enzim aktivitesi için en uygun sıcaklığın 60 °C olduğunu tespit etmişlerdir.

Chang ve ark.⁷ *Bacillus sp.*' dan SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretiminde optimum sıcaklığın 45-50 °C arası olduğunu gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızda sıcaklığın proteaz aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak için enzim içeren üst sıvı su banyosunda 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C sıcaklıklarda 30 dk bekletildikten sonra enzim aktivitesine bakıldı. Proteaz için optimum aktivite sıcaklığının 50 °C olduğu tespit edildi. Çalıştığımız enzimin 70 °C hala aktivite gösteriyor olması enzimin yapısında yer alan aminoasitler arasındaki hidrofobik etkileşimler ile açıklayabiliriz. Enzimin bu özelliğinden dolayı özellikle deterjan endüstrisi ve deri işleme sanayii gibi alanlar sıcaklığa bağlı süreçler olduğundan geniş bir uygulama alanı bulabileceğini düşünmekteyiz.

Sathish ve ark.² İzole ettikleri *Bacillus circulans*' tan serin proteaz üretiminde %1 oranında Tween-20, Triton X-100 ve SDS 'yi enzime ilave ettikten sonra aktivite tayini yapmışlardır. Kontrol ile karşılaştırıldığında Triton X-100 ve Tween 20' nin enzim aktivitesinde artışa neden olduklarını tespit etmişlerdir. Fakat SDS'nin enzim aktivitesini olumsuz etkilediğini gözlemlemişlerdir.

Kumar ve ark.⁷ *Bacillus sp.* ' dan SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretiminde %1 oranında SDS, Tween 20 ve Triton X-100 kullanmışlardır. Yaptıkları aktivite tayini sonucunda proteaz aktivitesini en fazla Tween 20'de artığını, SDS 'nin proteaz aktivitesinde azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Nasri ve ark.¹⁵ *Bacillus licheniformis NHI*'den alkalın proteaz üretmek için %1 oranında Tween 20 ve Triton X-100 kullandıklarında proteaz aktivitesinin etkilenmediği tespit edilmiştir. %5 oranında Triton X-100 kullanıldığında proteaz aktivitesinin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. SDS %0.1, %1 , %5 oranında kullandıklarında ise her üç oranda da enzim aktivitesini olumsuz etkilediğini raporlamışlardır.

Çalışmamızda deterjanların proteaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için %1-5 SDS ile %1-5 Tween 40 kullanıldı. Proteaz aktivite tayininde deterjanların kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden düşük olduğu görülmüştür.

Adhikari ve ark.³ *Bacillus subtilis* bakterisinden SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretmek için kullandıkları patates kabuğu ve *Imperata cylindrica* çimenini katı substrat olarak kullanmışlar. En uygun inokülüm hacmini 4 ml' lik bakteri ekiminde elde etmişlerdir.

Prakasham ve ark.⁴ *Amycolatopsis sp.*RSP3' ten SSF yoluyla Rifmycin B üretmek için %2.4 ten %12.0 kadar değişen oranlarda ekim yapılmış ve en uygun inokülüm hacminin %7.2' de elde etmişlerdir.

Baysal ve Uyar;⁸ yeni izole ettikleri *Bacillus sp.*' den SSF yoluyla alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmişler. Buğday kepeği ve mercimek kabuğu üzerinde yaptıkları çalışmada enzim üretimi için en uygun inokülüm hacminin %20 olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisini belirlemek için yaptığımız çalışmada en yüksek proteaz aktivitesi 1.521 U/mg ile 2.5 ml' lik SSF ortamına ilave edilen bakteri miktarında elde edilmiştir. Proteaz üretiminde ekim miktarı 2.5 ml' nin üstüne çıktığında enzim aktivitesinde azalmanın olduğu görülmüştür. İnokülüm hacmi artırıldığında ortamdaki bakteri yoğunluğunu artırdığından dolayı bu bakterilerin sentezlediği ikincil metabolitlerde artacaktır. Bu metabolitlerin artışı proteaz üretimini indükleyebildiği düşünülmektedir. Literatürlerde yapılan incelemelerde enzim aktivitesi üzerindeki inokülüm hacminin farklı olması kullanılan bakterilerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Baysal ve Uyar;⁸ *Bacillus sp.*'den SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretmek için buğday kepeği ve mercimek kabuğunu kullandıklarında buğday kabuğunda nem oranını %30; mercimek kabuğunda ise %40 nem oranında maksimum alkalın proteaz üretimini gerçekleştirdiklerini raporlamışlar.

Mankai va ark.¹² *Streptomyces sp.*CN902 ile SSF tekniğini kullanarak alkalın proteaz üretmek için ezilmiş hurma çekirdeği ve buğday kepeğini karıştırdıklarında

nem oranı %60 olduğu durumda enzim üretiminde maksimum verim elde ettiklerini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda nem oranının enzim üretimi üzerindeki etkisini incelemek için SSF' li ortama 2 gr dan 5.5 gr 'a kadar değişen miktarlarda pirinç sapı ilave edilmiştir. 2 gr' dan 3.5 gr 'a katı substratı artırdığımızda proteaz üretiminde de artış olduğu gözlenmiş, 3.5 gr ile 5.5 gr arasında enzim üretiminde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Maksimum enzim üretimi 1.730 A(420 nm) ile 5 gr 'da yani %50' lik nem oranında tespit edilmiştir. Substrat miktarı az iken aktivitenin düşük olmasının sebebi ortamda katı substratın yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Rao ve ark.⁶ *Bacillus sp.*'den alkalın proteaz üretmek için SSF besiyerine ilave edilen azot kaynakları arasında en yüksek proteaz aktivitesinin maya ekstraktında elde edildiği görülmüştür.

Gaur ve ark.¹⁰ izole ettikleri *Bacillus sp.*'den alkalın proteaz üretmek için kullandıkları %1 oranındaki azot kaynakları arasında maksimum enzim aktivitesinin NH₄Cl' da tespit ettiklerini raporlamışlardır.

Rai ve ark.³ *Bacillus subtilis*' ten SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretmek için %1 oranında kullandıkları azot kaynakları arasında proteaz aktivitesini en yüksek et ekstraktında tespit ettiklerini raporlamışlardır.

Slama ve ark.¹² *Streptomyces sp.* CN902 bakterisinden alkalın proteaz üretmek için kullandıkları %1 oranındaki azot kaynaklarından sadece amonyum sülfatın kontrolden daha fazla proteaz üretimini gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda enzim aktivitesi üzerinde %1 oranındaki azot kaynaklarının etkisini incelemek için amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum sitrat, üre, bakteriyolojik peptone, maya ekstraktı ve casamino asit kullanılmıştır. Bu kaynaklar SSF ortamına ilave edilip proteaz aktiviteleri incelendiğinde maksimum enzim aktivitesinin 1.805 A(420 nm) ile casamino asit olduğu görülmüştür. Casamino asitten sonra üre ve amonyum nitratında kontrolden daha fazla enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Pepton ve sodyum sitratın kontrol ile karşılaştırıldıklarında enzim üretimi üzerindeki etkilerinin aynı olduğu görülmüştür. Kontrolden daha az enzim üretimine amonyum sülfat ve maya ekstraktında rastlanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız azot kaynaklarından enzim üretimini en fazla artıran casamino asittir. Bu sonuç Dodia ve ark. yaptığı çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir. Dodia ve ark. karbon kaynakları üzerinde yaptıkları çalışmada ise glikozun proteaz üretimini baskıladığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise fruktoz baskılayıcı olmuştur. Bu tür farklılıkların görülmesinin nedenin kullanılan besiyerinin farklı olmasından kaynaklandığını düşünebiliriz.

Azot kaynaklarının seçimi enzim üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bakteriler büyüme ve enzim üretimi için farklı organik ve inorganik azot kaynaklarını tercih ederler. Genelde kompleks azot kaynakları proteaz üretimi için daha fazla tercih edilmektedir.

Mankai ve ark.¹² *Streptomyces sp.*CN902 ile SSF yöntemini kullanarak alkalın proteaz üretmek için yaptıkları çalışmada kullandıkları %1 oranındaki karbon kaynaklarının tümü kontrolden daha düşük değer elde ettiklerini tespit etmişlerdir.

Adhikari ve ark.³ *Bacillus subtilis* ile SSF yöntemi yardımıyla alkalın proteaz üretmek için kullandıkları karbon kaynakları arasında sadece maltozun kontrolden daha fazla proteaz üretimine neden olduğunu dile getirmişlerdir.

Sathish ve ark.² *Amycolatopsis sp.*RSP 3 ile yaptıkları çalışmada Rifamycin B üretmek için SSF besiyerine ilave ettikleri karbon kaynakları arasında en iyi aktiviteyi glukoz ve ksiloz da tespit etmişlerdir.

Darmwal ve ark.¹⁰ izole ettikleri *Bacillus sp.* ' den alkalın proteaz üretmek için kullandıkları %1 oranındaki karbon kaynakları arasında proteaz aktivitesi en yüksek glukozda tespit etmişlerdir.

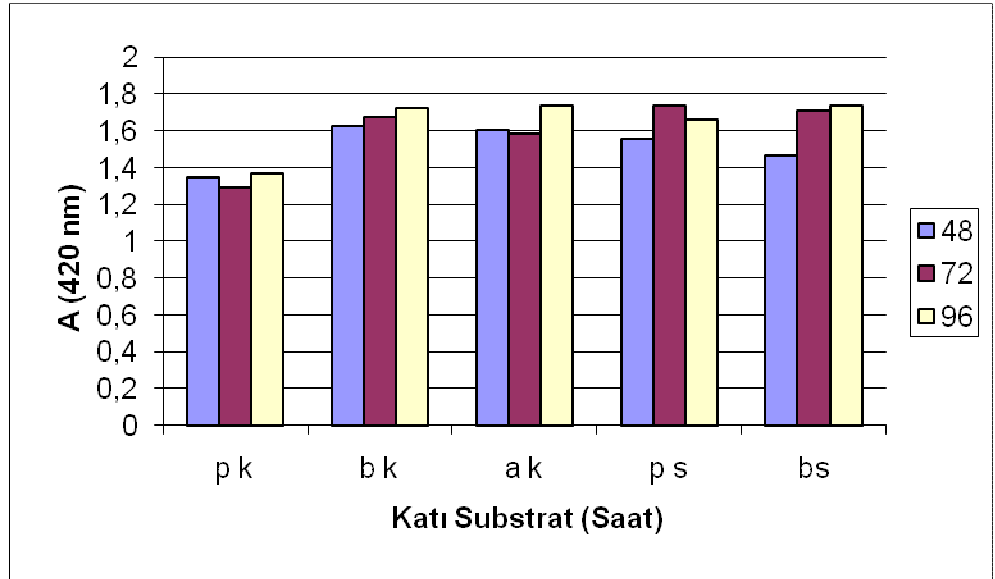
Rao ve ark.⁶ *Bacillus sp.*'den alkalın proteaz üretmek için %0.5 -2 oranında kullandıkları karbon kaynakları arasında maksimum aktivitenin ksiloz ve maltoz da tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda enzimlerin üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi araştırıldı. %1 oranında kullandığımız karbon kaynakları arasında enzim üretiminde en yüksek aktiviteyi 1.808 A(420 nm) ile sukroz da elde edilmiştir. Sukrozdan sonra maltoz ve glikoz da proteaz üretimini olumlu etkiledikleri tespit edilmiştir. Enzim üretiminde en düşük aktivite ise fruktozda elde edilmiştir.

Pirinç sapı substrat olarak kullanıldığında ortama eklenen karbon kaynaklarının (glikoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, sukroz, maltoz ve nişasta) ve azot

kaynaklarının (amonyum sülfat, amonyum nitrat, üre, pepton, maya özütü, casamino asit ve sodyum sitrat) proteaz sentezini artırmaları bu maddelerin *Bacillus licheniformis*'e besin oluşturması ve enzim üretimini olumlu yönde etkilediğini dile getirebiliriz.

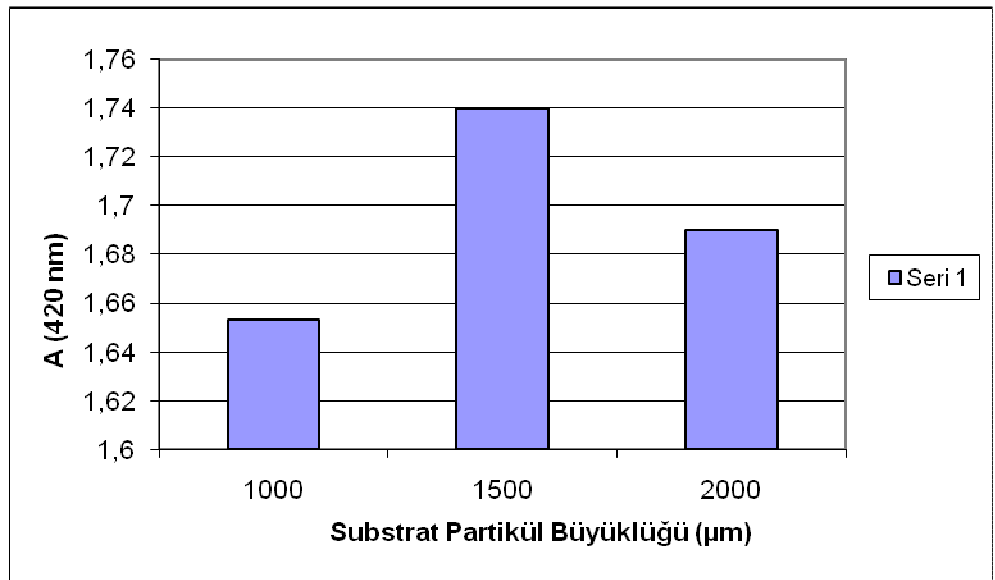
4.3.ŞEKİLLER



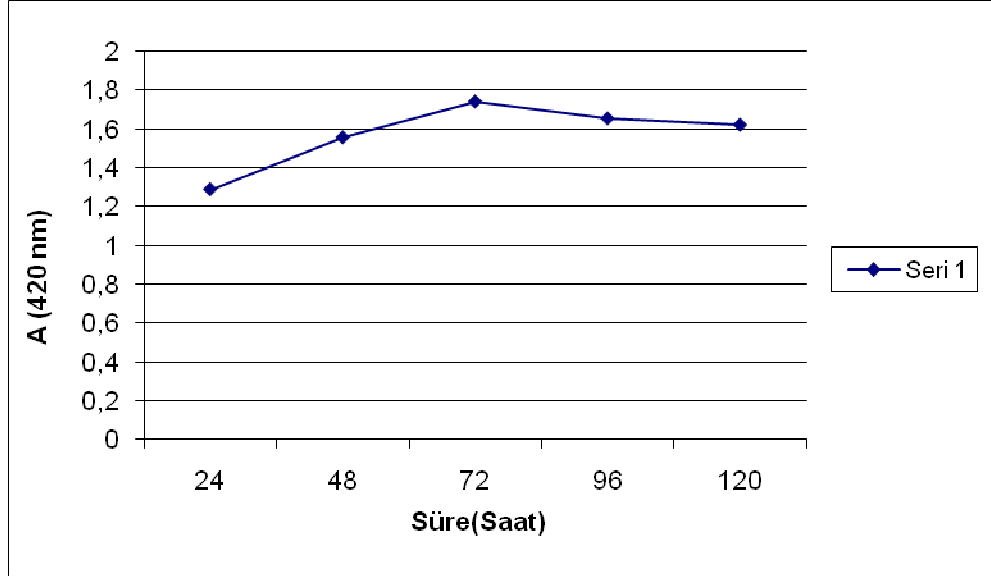
Şekil 4.1. Proteaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi

Pk: pirinç kabuğu, Bk: buğday kabuğu, Ak: arpa kabuğu,

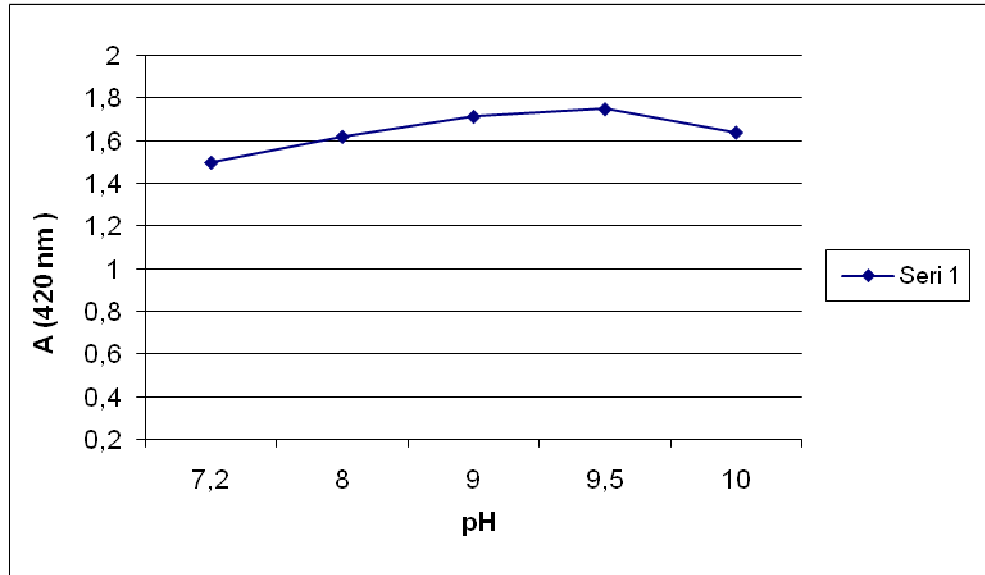
Ps: pirinç sapı, Bs: buğday sapı



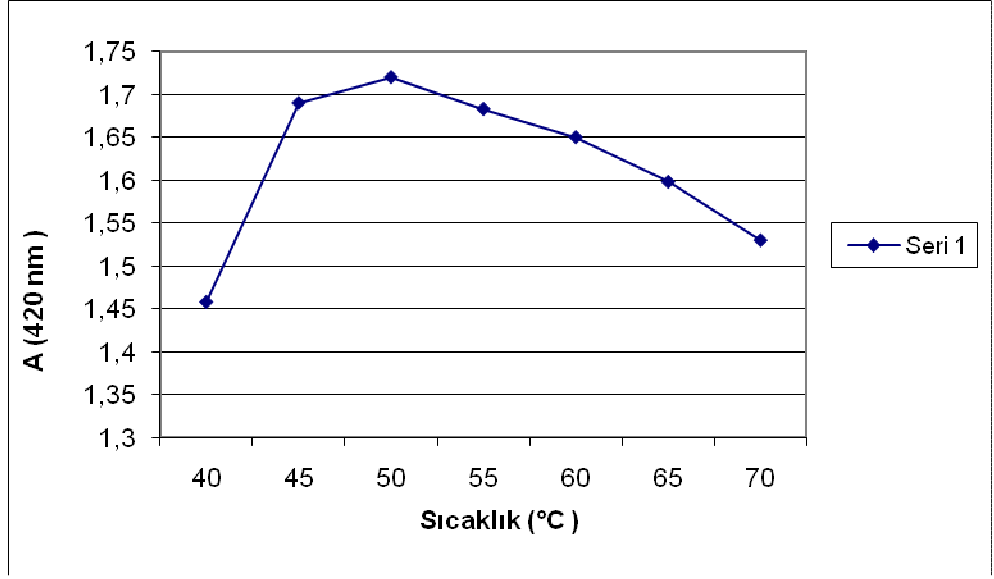
Şekil 4.2. Proteaz üretimi üzerine substratın partikül büyüklüğünün etkisi



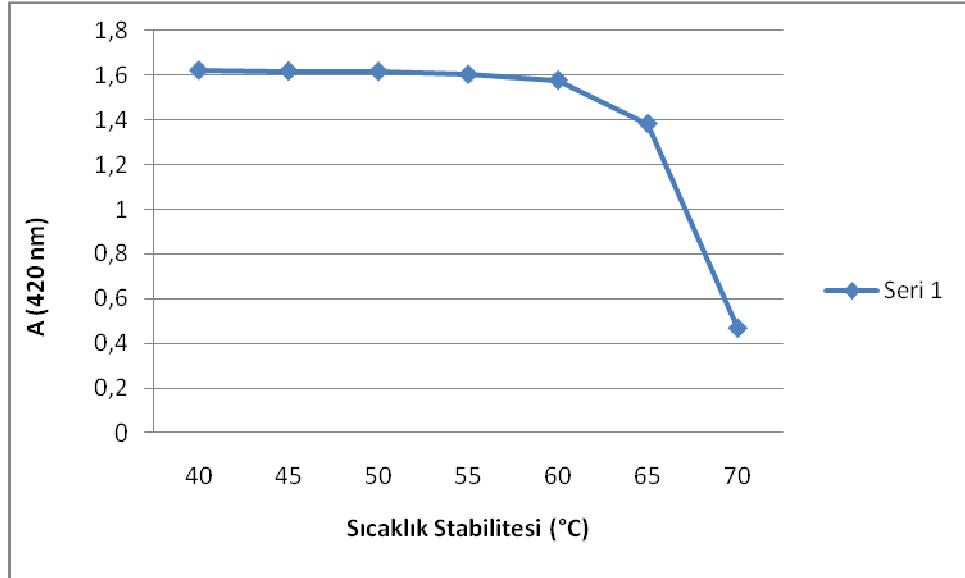
Şekil 4.3. Proteaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi



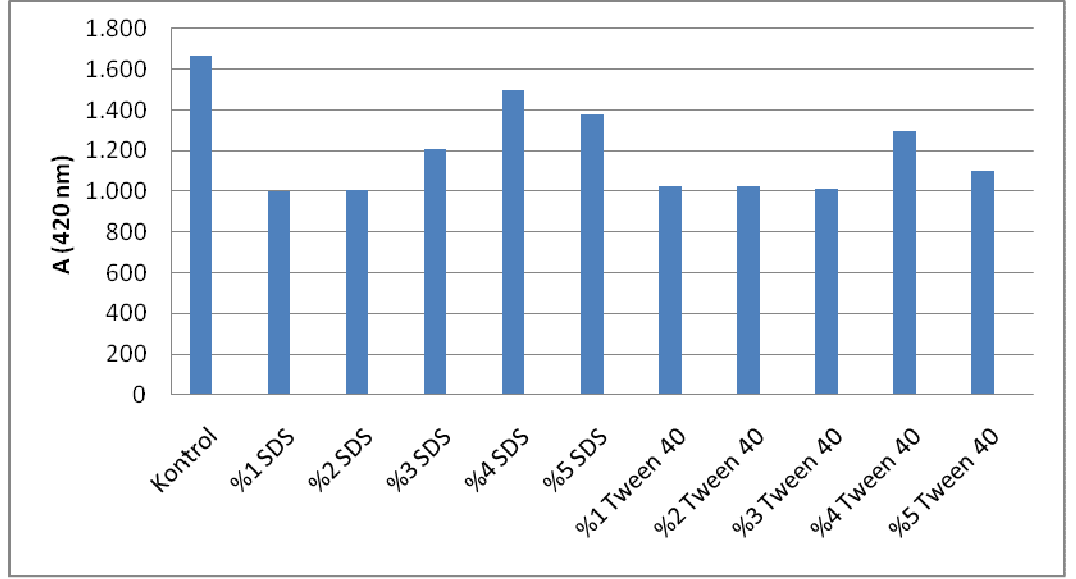
Şekil 4.4. Proteaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



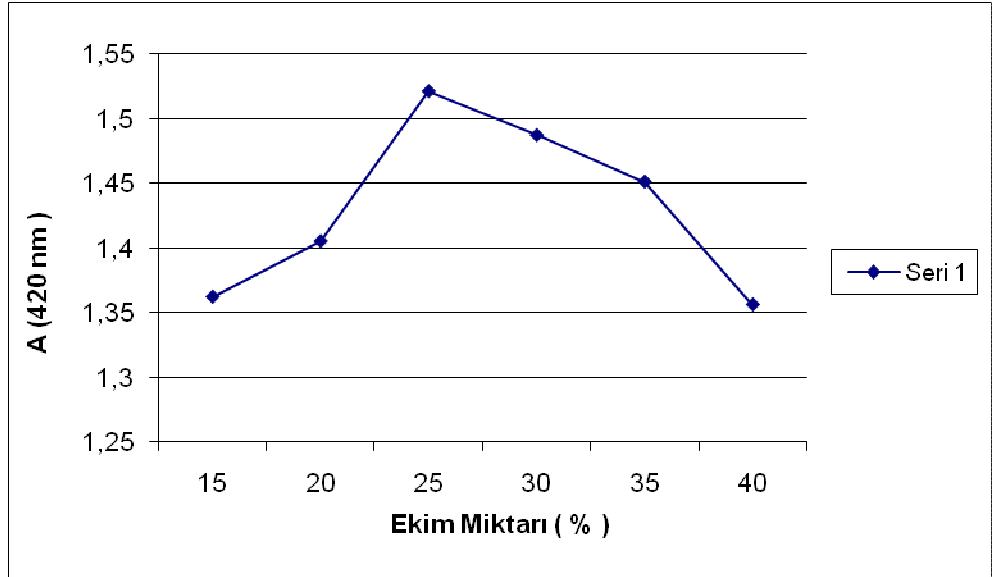
Şekil4.5. Proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



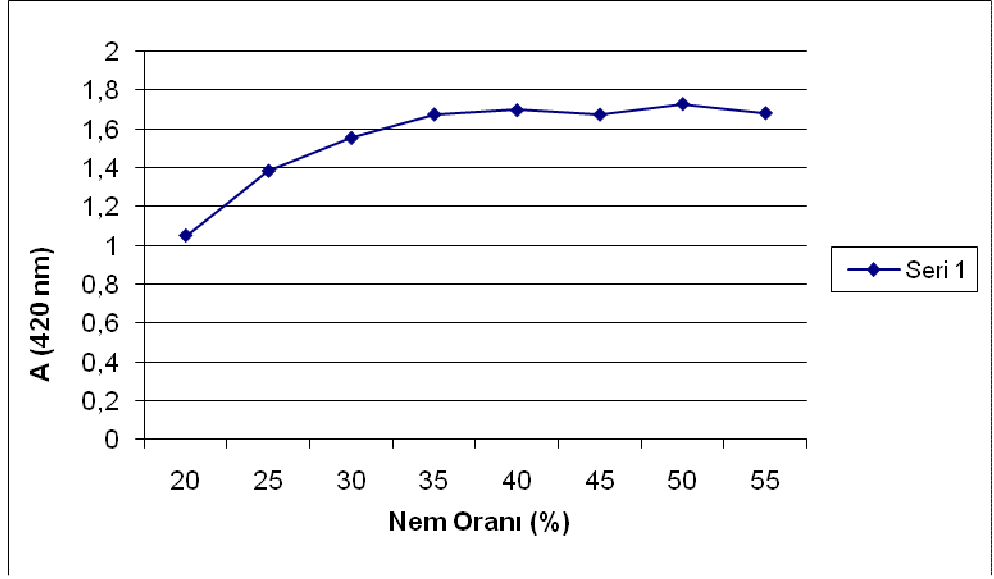
Şekil 4.6. Proteaz stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi



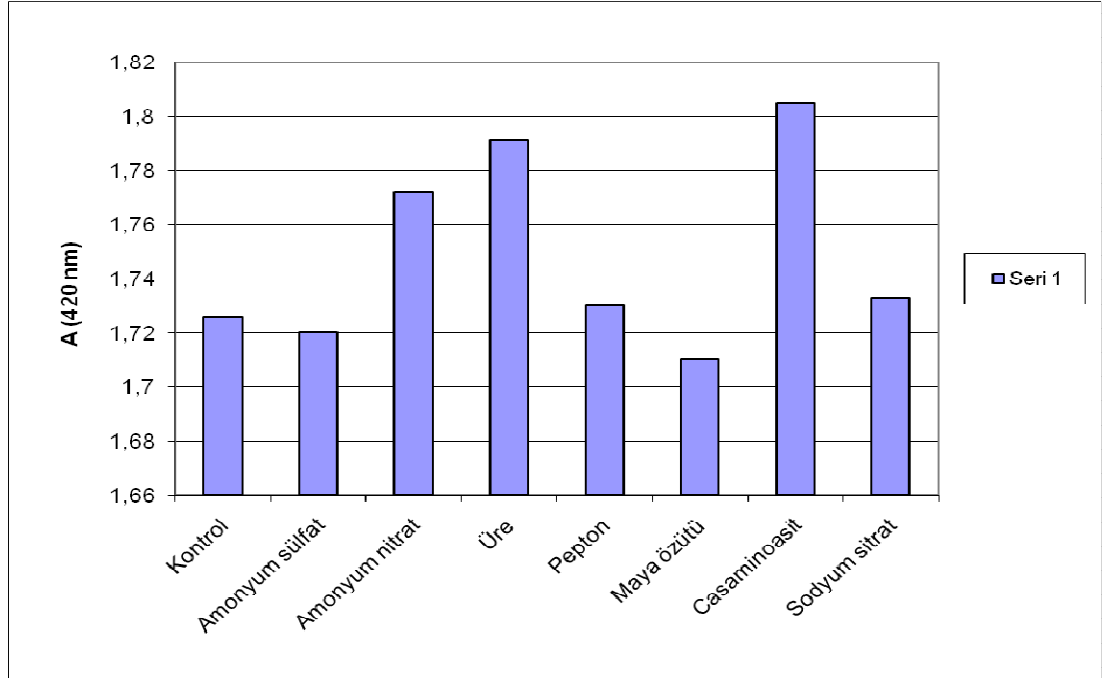
Şekil 4.7. Proteaz aktivitesi üzerine deterjanların etkisi



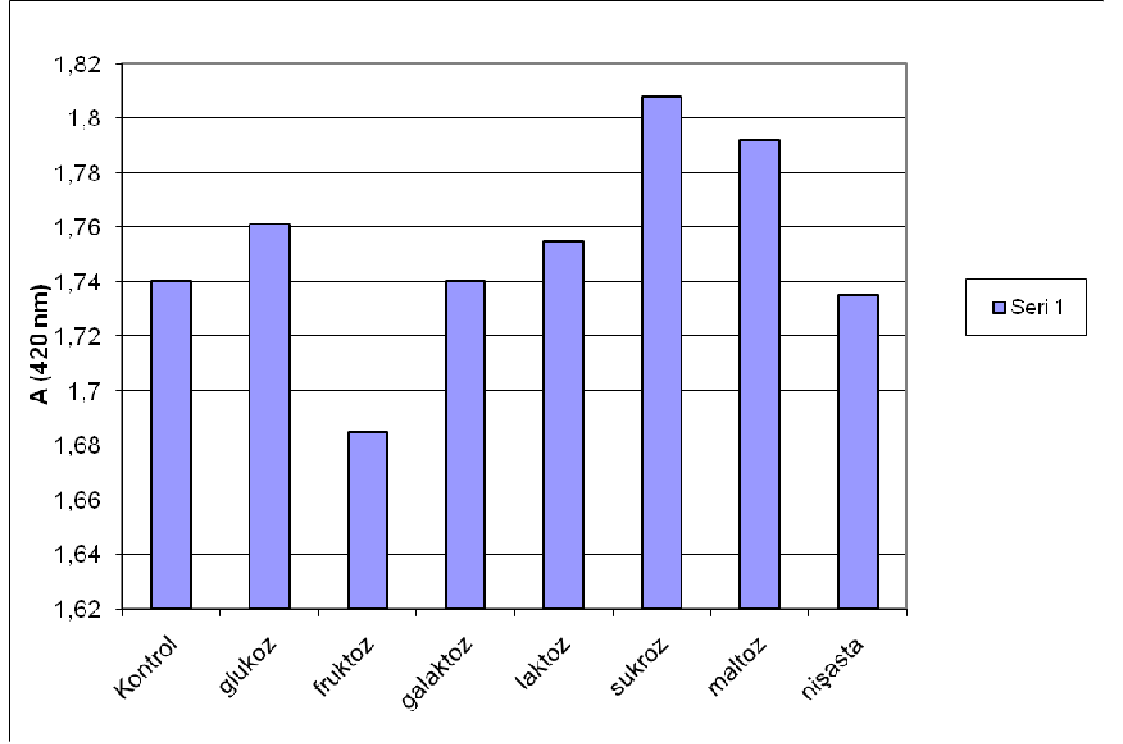
Şekil 4.8. Proteaz üretimi üzerine ekim miktarının etkisi



Şekil 4.9. Proteaz üretimi üzerine nem oranının etkisi



Şekil 4.10. Proteaz üretimi üzerine % 1 azot kaynaklarının etkisi



Şekil 4.11. Proteaz üretimi üzerine % 1 karbon kaynaklarının etkisi

KAYNAKLAR

1. Agrawal, D.; Patidar, P.; Banerjee, T.; Patil, S. *Alkaline protease production by a soil isoleta of Beauveria felina under SSF condition : Parameter optimization and application-to soy protein hidrolysis* , *Process Biochemistry* **2005**, 40, 1131-1136
2. Rao, C. S.; Sathish, T.; Ravichanda, P.; Rrakasham, R. S. *Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated Bacillus circulans and evaluation of eco -friendly application* , *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 262-268
3. Mukherjee, A. K.; ,Adhikari, H.; Rai, S. K. *Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation*,*Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 39, 353-361
4. Mahalaxmi, Y.; Satshish, T.; Rao, C. S.; Rrakasham, R. S. *Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated Amycolatopsis sp.RSP3 under SSF*, *Process Biochemistry*, **2010**, 45, 47-53
5. Mehta, V. J.; Thumar, J. T.; Singh, S. P. *Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete*,*Bioresource Technology* , **2006**, 97, 1650-1654
6. Prakasham, R. S.; Rao, C. S.; Sarma, P. N. *Green gram husk -an inexpensive substrate for alkaline protease production by Bacillus sp.in solid-state fermentation* , *Bioresource Technology* , **2006**, 97, 1449-1454

7. Joo, H. S.; Kumar, C. G. Park, G. C.; Raik, S. R.; Chang, C. S. *Bleach-resistant alkaline protease produced by a Bacillus sp. isolated from the Korean polychaete, Periserrula leucophryna*, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1441-1447
8. Economou, C. N.; Makri, A.; Aggelis, G.; Pavlou, S.; Vayena, D. V. *Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil*, *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 1385-1388
9. Uyar, F.; Baysal, Z. *Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated Bacillus sp. under solid state fermentation*, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1893-1898
10. Chellappan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S. M.; Elyas; Bhat, G. S. Chandrasekaran M. *Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine Engyodontium album BTMFS10 under solid state fermentation*, *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 956-961
11. Mehrotra, S.; Pandey, P. K.; Gaur, R.; Darmwal, N. S. *The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate*, *Bioresource Technology*, **1999**, 67, 201-203
12. Patel, R.; Dodia, M.; Singh, S. P. *Extracellular alkaline protease from a newly isolated halo alkaliphilic Bacillus sp.: Production and optimization*, *Process Biochemistry*, **2004**, 40, 3569-3575
13. Lazim, H.; Mankai, H.; Slama, N.; Barkallah, I.; Limam, F. *Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid state fermentation by Streptomyces sp. CN902*, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2009**, 36, 531-537

14. Chi, Z.; Ma, C.; Wang, P. Li, H. F. *Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans** , *Bioresource Technology* , **2007**, 98, 534-538

15. Himdet, N.; Hadj Ali, N. E.; Haddar, A.; Kanoun, S.; Kamoun.; Alya, S.; Nasri, M. *Alkaline proteases and thermostable alfa-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive*, *Biochemical Engineering Journal* ,**2009**, 47, 71-79

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerde yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde transformasyon geçiren, yeni ve geleceğe damgasının vuracak bir alandır. Ticari alanda kullanılan ürünlerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların giderek hız kazanması sonucu, önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalar genellikle çevreye zarar vermeyen, enerji ihtiyacı az olan teknikleri kullanırlar. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır¹.

Son yıllarda endüstride klasik yöntemler yerine enzimlere dayalı süreçlerin kullanımı giderek ağırlık kazanmaktadır. Çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin, yıllık toplam satış tutarı 2 milyar \$ ' ın üzerindedir. Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel işlemler daha ucuz ve kaliteli ürün elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır ve bu nedenle enzim pazarında oldukça büyük bir paya sahiptir. Mikroorganizmalardan üretilen alkalik proteazlar yüksek pH ve yüksek sıcaklığa dayanıklı olmalarından dolayı deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama olanağı vermektedir. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalofilik mikroorganizmaların ürettiği proteaz üreticilerinin taranması, izolasyonu ve nitelendirmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır².

Mikroorganizmalar kullanılarak SSF ‘ li ortamda enzim üretme çalışmaları son yıllarda giderek artmaya ve SmF ‘ e alternatif bir teknik haline gelmeye başlamıştır. Dünya genelinde artan tarımsal atıkların tekrar kullanılmalari ekolojik ve ekonomik olarak oldukça büyük önem taşımaktadır. Birçok tarımsal atığın hayvan yemi vb. alanlarda kullanıldığı bilinmektedir. Fakat SSF tekniği kullanılarak bu atıklardan ekonomik yarar sağlamak mümkün hale gelmektedir. SSF tekniğiyle endüstriyel enzimler haricinde tıpta tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler üretmek de mümkün hale gelmiştir³.

Çalışmamızda *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 ‘den SSF yöntemiyle katı substrat olarak pirinç sapı kullanılarak biyoteknoloji alanında büyük bir öneme sahip olan proteaz üretimini gerçekleştirdik. Böylece SSF tekniğiyle tarımsal ve zirai atıkların mikrobiyolojik süreçte tekrar kullanımı mümkün hale gelmekte ve bu atıklardan elde edilen mikrobiyal enzimler endüstriyel alanda geniş bir kullanım alanına sahip olmaktadırlar.

Çalışmamızda kullandığımız pirinç sapı ülkemizde bol bulunmasından dolayı *Bacillus licheniformis* ATCC 14580’den enzim üretilmesinde kullanımının hem ülke ekonomisi için yararlı olmakta hem de pirinç sapının çevreye verdiği kirliliğinin giderilmesi bakımından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kiran, Ö. E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal ürünler ve endüstri de kullanım alanları,Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi,Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**
2. Chauhan, B.; Gupta, R., *Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease protuction from Bacillus sp.P R6R-14 ,Process Biochemistry* , **2004**, 39, 2115-2122
3. Mahalaxmi, Y.; Satshish, T.; Rao, C. S.; Rrakasham, R. S. *Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated Amycolatopsis sp.RSP3 under SSF, Process Biochemistry*, **2010**, 45, 47-53

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : MUHAMET AFŞİN

Doğum Yeri : KULP

Doğum Tarihi : 20.12.1978

Medeni Hali : EVLİ

Yabancı Dili : İNGİLİZCE

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : ATATÜRK SAĞLIK MESLEK LİSESİ KONYA-1999

Lisans : DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT
FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ-2004

Yüksek Lisans : DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT
FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ-2010

Çalıştığı Kurum /Kurumlar ve Yıl: DİYARBAKIR ÇOCUK HASTALIKLARI
HASTANESİ-2001-2008 DİYARBAKIR KADIN DOĞUM VE ÇOCUK
HASTALIKLARI HASTANESİ-2008