

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

**BAZI *Bacillus* TÜRLERİNİN EKSTRASELLÜLER
ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurullah AKCAN

DOKTORA TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Fikret UYAR

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

KASIM-2009

ÖZET

Bacillus türlerinin birçoğu yüksek miktarda enzim sentezleme yeteneğine sahip olmaları ile endüstriyel enzimlerin önemli kaynağıdır. Bu özellikleri biyoteknolojideki önemlerini daha da arttırmaktadır.

Bu araştırmada yöremizde doğal olarak bulunan mevcut bazı tarım atıkları katı faz fermantasyonu (KSF) tekniğinde substrat olarak kullanılarak *Bacillus licheniformis* ATCC12759 ve *Bacillus licheniformis*'in yabani suşundan β -galaktosidaz üretimi, *Bacillus subtilis* RSK96'dan katı faz fermantasyonu (KSF) ve submerged (SmF) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak α -amilaz ve proteaz üretimleri üzerine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Bacillus licheniformis ATCC12759 ve *Bacillus licheniformis*'in yabani suşu β -galaktosidaz üretimi için pirinç kabuğu, *Bacillus subtilis* RSK96'dan α -amilaz üretimi için pamuk sapı ve proteaz üretimi için mercimek kabuğu katı faz fermantasyon (KSF) ortamında en iyi indükleyici bitkisel atıklar olarak kullanılmıştır. Katı faz fermantasyon (KSF) koşullarında pirinç kabuğu katı substrat olarak kullanıldığında yabani suş *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus licheniformis* ATCC12759'dan elde edilen en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi sırasıyla 48. saatte 3509 U/mg ve 120. saatte 5064 U/mg olarak elde ölçülmüştür. Pamuk sapının katı substrat olarak kullanıldığı katı faz fermantasyon koşullarında (KSF) *Bacillus subtilis* RSK96'dan en yüksek α -amilaz aktivitesi 72. saatte 2029 U/mg, mercimek kabuğunun katı substrat olarak kullanılması ile en yüksek proteaz aktivitesi 120. saatte 9566 U/mg olarak elde edilmiştir. SmF ortamlarında *Bacillus subtilis* RSK96 kültür edildiğinde en yüksek α -amilaz ve proteaz aktiviteleri 72. saatte sırasıyla 669 U/mg ve 1903 U/mg olarak elde edilmiştir.

Yapılan çalışmada pamuk sapı, mercimek kabuğu ve pirinç kabuğunun enzim aktivitelerini indüklediği belirlenmiştir. Kullandığımız *Bacillus* türleri ile bu bitkisel atıkların biyoteknolojik uygulamalarda değerlendirilmesi durumunda faydalı olacağını söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, β -Galaktosidaz, α -Amilaz, Proteaz, Pamuk Sapı, Mercimek Kabuğu, Pirinç kabuğu, Biyoteknoloji

ABSTRACT

Having the ability to synthesize large quantities of enzymes, many of *Bacillus* species are an important source of industrial enzymes. This feature increases their importance in biotechnology.

In this investigation the effect of various parameters were studied on the production of β -galactosidase enzyme from *Bacillus licheniformis* ATCC12759 and wild type *Bacillus licheniformis*. In the study some agricultural wastes present in our region were used as substrate in solid state fermentation (SSF) technique. Production of α -amylase and protease from was also studied, *Bacillus subtilis* RSK96 with solid state fermentation (SSF) and submerged (SMF) methods were compared.

Rice husk was the best inducing vegetable waste in solid state fermentation (SSF) environment for producing β -galactosidase enzyme from wild strains of *Bacillus licheniformis* ATCC12759 and wild type *Bacillus licheniformis* and cotton stalk was the best for production of an α -amylase in *Bacillus subtilis* RSK96, while lentil husk was the best for production of protease. When rice husk was used as solid subtrat in solid state fermentation (SSF) the highest obtained activity of β -galaktosidaz from wild strain of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus licheniformis* ATCC12759, respectively, was measured 3509 U/mg in 48th hour and 5064 U/mg in 120th hour. In the solid state fermentation conditions (SSF) in which cotton stalk was used as solid subtrat the highest α -amylase level from *Bacillus subtilis* RSK96 was 2029 U/mg in the 72nd hour, and by the usage of lentil husk as solid subtrat the highest protease activity was obtained as 9566 U/mg in the 120th hour. In SmF conditions when *Bacillus subtilis* RSK96 was cultured, the highest α -amylase and protease level activities, respectively, were obtained 669 U/mg and 1903 U/mg in the 72nd hour.

Our findings relieved that cotton stalk, lentils and rice shell induce enzyme activities. These vegetable wastes may be evaluated in biotechnological applications of *Bacillus* species used in the study.

Keywords: *Bacillus*, β -Galactosidase, α -Amylase, Protease, Cotton Stalk, the Lentil husk, Rice husk, Biotechnology

ÖNSÖZ

Mikrobiyal çeşitliliğin derinliklerini inceleyerek keşfedilen mikroorganizmaların her zaman ticari olarak kullanılmaları ve daha iyi özelliklere sahip doğal enzimleri üretmeleri çevresel faktörlerin etkisindedir. Habitatların farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları mikrobiyal alem içindeki sayısız moleküler adaptasyonların gelişimine eşit oranda meydan okumaktadır. Mikrobiyal çeşitliliğin biyoteknolojik ürünler ve uygulamalar için önemli bir kaynak olduğunu düşünmekteyiz. Bu doğrultuda doktora öğrenimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle yol gösterip bana örnek olan, daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukların aşılmasında sonsuz yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fikret UYAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşaması sırasında desteğini esirgemeyen Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden hocam Sayın Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Arif BAYSAL, Sayın Doç. Dr. Süleyman GÜL ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysel Güven'e teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Hüseyin ALKAN, Arş.Gör. Cem Öziç ve Ömer AYGÜN'e teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yardımlarını gördüğüm Yüksek Lisans ve Doktora yapan arkadaşlara teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olup beni yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim.

Nurullah AKCAN

Kasım, 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. ENZİMLER.....	5
2.2. <i>Bacillus</i> CİNSİ	6
2.2.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	6
2.2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.3. Katı Substrat (Faz) Fermantasyon Tekniği (KSF)	7
2.3.1. KSF'nin avantajları ve dezavantajları.....	11
2.3.2. KSF'yi etkileyen faktörler.....	13
2.3.2.1. Biyolojik Faktörler:	13
2.3.2.1.1 İnokülüm Hacmi.....	13
2.3.2.2.1. Karbon Kaynağı ve Karbon/Azot İlişkisi	15
2.3.2.2.2. Sıcaklık	15
2.3.2.2.3. Nem ve Su Aktivitesi.....	16
2.3.2.2.4. pH.....	16
2.3.2.2.5. Havalandırma ve Çalkalama	17
2.3.2.2. 6. Substrat Parça Büyüklüğü.....	17
2.3.3. KSF'de Enzim Üretimi	17

2.4. AMİLAZLAR	20
2.4.1. α -Amilaz Familyası	20
2.4.2. α -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları	25
2.4.2.1. α -Amilazların Ekmek Pişirme Endüstrisi ve Raf ömrünü Uzatma Sürecinde Kullanımı	25
2.4.2.2. α -Amilazların Nişastayı Sıvılaştırmada ve Şekerlemede Kullanımı	25
2.4.2.3. α -Amilazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı	26
2.4.2.4. α -Amilazların Kâğıt Endüstrisinde Kullanımı	26
2.4.2.5. α -Amilazların Deterjan Uygulamalarında Kullanımı	26
2.4.2.6. α -Amilazların Tıp ve Klinik Kimyada Kullanımı	26
2.6. β -GALAKTOSİDAZ	27
2.5. PROTEAZLAR	30
2.5.1. Proteazların Genel Özellikleri	31
2.5.2. Mikrobiyal Proteaz Sistem Çeşitleri	32
2.5.3. Proteaz Kaynakları	35
2.5.4. Proteaz Üretimi	35
2.5.5. Proteazların Uygulama Alanları	36
2.5.5.1. Fırında Pişirme Uygulamaları	37
2.5.5.2. Deterjan Endüstrisi	37
2.6. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	38
4. MATERYAL ve METOT	44
4.1. MATERYAL	44
4.1.1. Mikroorganizma seçimi	44
4.1.2. Substrat seçimi	44
4.1.3. Substrat parça büyüklüğü	44

4.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler	44
4.1.4.1. Azot kaynakları	45
4.1.4.2. Karbon kaynakları	45
4.1.4.3. Aminoasitler	45
4.1.4.4. Deterjanlar.....	45
4.1.4.5. Metal Tuzları.....	45
4.1.4.6. Besi Yeri Maddeleri:	46
4.1.5. Kullanılan Besiyerleri	46
4.1.5.1. Sıvı Besiyeri:.....	46
4.1.5.4. KSF Besiyeri:.....	47
4.1.6. Kullanılan Aletler:	48
4.2. METOT.....	49
4.2.1. Mikroorganizmaların Üretilmesi	49
4.2.2. Çözeltiler	49
4.2.3. Enzim Ekstraksiyonu	49
4.2.3.1. SmF Besiyeri.....	49
4.2.3.2. KSF Besiyerinde	50
4.2.4 Enzim Aktivite Tayini.....	50
4.2.4.1. α -Amilaz Aktivite Tayini.....	50
4.2.4.2. Proteaz Aktivite Tayini	50
4.2.4.3. β -Galaktosidaz Aktivite Tayini.....	51
4.2.4.4. Protein Miktar Tayini	51
4.2.5. SmF.....	51
4.2.5.1. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi	51

4.2.5.2. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi	52
4.2.5.3. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi	52
4.2.5.4. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Azot kaynakları Etkisi	52
4.2.5.5. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Aminoasitlerin Etkisi	53
4.2.5.6. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi	53
4.2.5.7. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Derişimlerdeki Kalsiyum (CaCl ₂) Tuzlarının Etkisi.....	53
4.2.5.8. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Derişimlerdeki Pamuk Saplarının (küçük) Etkisi	54
4.2.6. KSF	54
4.2.6.1. KSF Ortamında Uygun Substrat Seçimi.....	54
4.2.6.2. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi	54
4.2.6.3. KSF'de Enzim Üretimi Üzerine Üreme Sıcaklığının Etkisi.....	55
4.2.6.4. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi	55
4.2.6.5. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Kaynağının Etkisi	55
4.2.6.6. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi	56
4.2.6.7. KSF Ortamında Uygun Substrat Miktarının Belirlenmesi	56
4.2.6.8. KSF Ortamında Başlangıç pH'nın Belirlenmesi.....	57
4.2.6.9. KSF Ortamında En İyi Aktivite Elde Edilen Substrat Karışım Miktarlarının Belirlenmesi	57
4.2.6.10. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi	58

4.2.6.11. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynakları Etkisi	58
4.2.6.12. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi	59
4.2.6.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	59
4.2.6.14. Farklı Hacimlerdeki KSF Ortamlarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	60
4.2.6.15. Verilerin İstatistik Analizi.....	60
5. BULGULAR	61
5.1. Sub-merged Fermantasyonu (SmF).....	61
5.1.1. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkisi..	61
5.1.2. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı İnkübasyon Sürelerinin Etkisi.....	62
5.1.3. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	64
5.1.4. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi.....	66
5.1.5. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Aminoasitlerin Etkisi 68	
5.1.6. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal Tuzlarının Etkisi	70
5.1.7. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Konsantrasyonlardaki Kalsiyum (CaCl ₂) Tuzlarının Etkisi	72
5.1.8. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Konsantrasyonlardaki Pamuk Saplarının (küçük) Etkisi.....	73
5.2 Katı Faz Fermantasyonu (KSF).....	74
5.2.1. KSF Ortamında Uygun substratın Seçimi.....	74
5.2.2. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi.....	79

5.2.3. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Üreme Sıcaklığının Etkisi	82
5.2.4. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi	85
5.2.5. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik Ekstraksiyon Ortamının Etkisi	87
5.2.6. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi...	90
5.2.7. KSF Ortamında Farklı Substrat Miktarlarının Belirlenmesi	94
5.2.8. KSF Ortamında Başlangıç pH'nın Belirlenmesi	97
5.2.9. KSF Ortamında En İyi Aktivite Elde Edilen Substrat Karışım Miktarlarının Belirlenmesi.....	100
5.2.10. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi	104
5.2.11. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynakları Etkisi	108
5.2.12. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi	112
5.2.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	114
5.2.14. Farklı Hacimlerdeki KSF Ortamlarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	116
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	119
7. KAYNAKLAR	146
8.ÖZGEÇMİŞ.....	162

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. 1. Biyoteknolojik Uygulamalardaki Başlıca Alanlar	2
Tablo 2. 1. KSF'nin Tarihsel Gelişimi.....	8
Tablo 2. 2. <i>Bacillus</i> spp.'lerin KSF Yöntemi ile Ürettikleri Bazı Enzimler	18
Tablo 2. 3. Bazı Proteaz Kaynakları ve Endüstriyel Uygulamaları.....	30
Tablo 2. 4. Proteazların Bazı Endüstriyel Alanlardaki Uygulamaları	36
Tablo 5. 1. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi.....	65
Tablo 5. 2. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi.....	66
Tablo 5. 3. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi	67
Tablo 5. 4. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi.....	68
Tablo 5. 5. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı aminoasitlerin etkisi	69
Tablo 5. 6. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı aminoasitlerin etkisi	70
Tablo 5. 7. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı metal tuzlarının etkisi	71
Tablo 5. 8. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı metal tuzlarının etkisi	71
Tablo 5. 9. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi.....	88
Tablo 5. 10. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi.....	89
Tablo 5. 11. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi	89
Tablo 5. 12. KSF ortamında yabani suş <i>B. licheniformis</i> 'in β -galaktosidaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi	90

Tablo 5. 13. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi.....	101
Tablo 5. 14. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi.....	102
Tablo 5. 15. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC12759'un β -galaktosidaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi	103
Tablo 5. 16.KSF ortamında yabani suş <i>B. licheniformis</i> β -galaktosidaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi	104
Tablo 5. 17. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi.....	105
Tablo 5. 18. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi.....	106
Tablo 5. 19. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi.....	107
Tablo 5. 20. KSF ortamında yabani suş <i>B. licheniformis</i> 'in β -galaktosidaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi.....	108
Tablo 5. 21. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi.....	109
Tablo 5. 22. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi.....	110
Tablo 5. 23. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759'un ürettiği β -galaktosidaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi	111
Tablo 5. 24. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> yabani suşunun ürettiği β -galaktosidaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi	112
Tablo 5. 25. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine metal tuzlarının etkisi	113
Tablo 5. 26. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine metal tuzlarının etkisi	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Biyoteknoloji Ağacı	3
Şekil 2.1. KSF ortamında henüz fermente olmamış buğday kepeğinin elektron mikroskopundaki görünümü.....	14
Şekil 2.2. KSF ortamında bakteri hücreleri ile fermente olmuş buğday kepeğinin elektron mikroskopundaki görünümü	14
Şekil 2. 3. SSF ve SmF yöntemleri ile Enzim Elde Edilme Basamakları.....	19
Şekil 2. 4. Glikosil hidrolazların etki mekanizması.....	20
Şekil 2. 5. α -Amilazların aktif bölgesi ve alt birimlerinin sistematik şeması	22
Şekil 2. 6. α -Amilazların yapı organizasyonları.....	23
Şekil 2. 7. α -Amilazın olası katalitik mekanizmaları	24
Şekil 2. 8. Laktozun β -galaktosidaz tarafından hidrolizi.	28
Şekil 2. 9. Proteazların sınıflandırılması	33
Şekil 2. 10. Serin proteazın etki mekanizması.	34
Şekil 5. 1. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı besiyerlerinin etkisi	61
Şekil 5. 2. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı besiyerlerinin etkisi	62
Şekil 5. 3. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi	63
Şekil 5. 4. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi	63
Şekil 5. 5. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı konsantrasyonlardaki kalsiyum klorür (CaCl_2) tuzlarının etkisi.....	72
Şekil 5. 6. SmF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı konsantrasyonlardaki pamuk saplarının (küçük) etkisi	73
Şekil 5. 7. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi.....	75
Şekil 5. 8. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi.....	76
Şekil 5. 9. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759'da β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi	77

Şekil 5. 10. KSF ortamında kültür edilen <i>B. licheniformis</i> 'in yabancı suşunun β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi	78
Şekil 5. 11. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi.....	79
Şekil 5. 12. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi.....	80
Şekil 5. 13. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi	81
Şekil 5. 14. KSF ortamında yabancı suş <i>B. licheniformis</i> 'in β galaktosidaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi	82
Şekil 5. 15. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi	83
Şekil 5. 16. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi	84
Şekil 5. 17. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi	84
Şekil 5. 18. KSF ortamında yabancı suş <i>B. licheniformis</i> ' in β -galaktosidaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi	85
Şekil 5. 19. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi.....	86
Şekil 5. 20. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi	87
Şekil 5. 21. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisi.....	91
Şekil 5. 22. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine inokülüm etkisi.....	92
Şekil 5. 23. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759' da β -galaktosidaz üretimi üzerine inokülüm etkisi.....	93
Şekil 5. 24. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> yabancı suşunun β -galaktosidaz üretimi üzerine inokülüm etkisi.....	93
Şekil 5. 25. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi	94

Şekil 5. 26. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi	95
Şekil 5. 27. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC 12759'da β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi.....	96
Şekil 5. 28. KSF ortamında Yabani suş <i>B. licheniformis</i> 'in β -galaktosidaz enzim üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi.....	96
Şekil 5. 29. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi.....	97
Şekil 5. 30. KSF ortamında <i>B. subtilis</i> RSK96'nın proteaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi	98
Şekil 5. 31. KSF ortamında <i>B. licheniformis</i> ATCC12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi	99
Şekil 5. 32. KSF ortamında yabani suş <i>B. licheniformis</i> ' in β -galaktosidaz üretimi üzerine başlangıç pH'nın etkisi	99
Şekil 5. 33. KSF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'dan elde edilen α -amilaz üzerine aktivite sıcaklığının etkisi	115
Şekil 5. 34. KSF ortamında kültür edilen <i>B. subtilis</i> RSK96'dan elde edilen proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	116
Şekil 5. 35. Farklı hacimlerdeki KSF ortamlarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi	117
Şekil 5. 36. Farklı hacimlerdeki KSF ortamlarının proteaz üretimi üzerine etkisi	118

SİMGELER VE KISALTMALAR

KSF: Katı faz fermantasyonu

SmF: Submerged fermentasyonu

°C: Santigrat celcius

aw: Su aktivitesi faktörü

C/N: Karbon azot oranı

GC: Guanin Sitozin

GOS: Galaktooligosakkarit

Glu: Glutamik asit

Aps: Asparajin

His: Histidin

H₂O₂: Hidrojen peroksit

NH₄NO₃: Amonyum nitrat

NH₄Cl: Amonyum klorid

NaNO₃: Sodyum nitrat

U/mg: Ünite/miligram

1.GİRİŞ

Günümüzde biyoteknoloji bilim dalı biyolojinin bir alt disiplini olmaktan çıkarak disiplinlerarası bir yere gelmiş olsa da, temelde yaklaşık 10.000 yıl önce yapılmaya başlanan tarım ve yaklaşık 6.000 yıl önce üretilmeye başlanan fermantasyon ürünlerinin ilk biyoteknolojik uygulamalar olduğu bilinmektedir^{1,2}.

Biyoteknoloji en genel anlamı ile “herhangi bir teknolojik uygulamanın; biyolojik sistemleri, organizmayı veya organizma kaynaklı yapıları; bir ürünün üretiminde, değiştirilmesinde veya özel bir süreçte kullanması” olarak tanımlanır³. Fakat 1970’lerden sonra gelişen “rekombinant DNA” teknolojisi ile Biyoteknoloji bilim dalı yeni bir boyut kazanmıştır. 2000 yılında Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Konvansiyonu Cartagena Protokolünde yeni nesil Biyoteknoloji kavramını “Modern Biyoteknoloji” olarak şu şekilde tanımlar;

Modern Biyoteknoloji;

•Rekombinant DNA’yı içeren in-vitro nükleik asit tekniklerinin ve nükleik asitlerin organel veya hücrelere direk aktarımının veya

• Taksonomik ailelerin ötesinde oluşturulan hücre birleştirmelerinin canlılığın doğal fizyolojik gelişimini ya da rekombinant engellerini aşan ve geleneksel beslenme ve eleme ile üretilmeyen uygulamalarıdır⁴.

Bir Biyoteknoloji uygulamasının başarılı bir şekilde gerçekleştirilme sürecinde bir veya daha fazla disiplinlerden yararlanılmalıdır. Biyoteknolojinin temel uygulama alanları Tablo 1.1’de gösterilmiştir. Şekil 1.1 ise yapılan denemelerde biyoteknolojik uygulamaların uygulanabilir farklı teknolojiler ile disiplinler arasındaki uyumun nasıl gerçekleştiğini göstermektedir⁵.

Tablo 1. 1. Biyoteknolojik Uygulamalardaki Başlıca Alanlar⁵

Biyouygulama teknolojisi

Tarihsel olarak biyoteknolojinin en önemli alanı (bira yapımı, antibiyotikler, memeli hücre kültürleri, vb.) yaygın şekilde yeni ürünlerin geliştirilmesi (polisakkaritler, tıbbi olarak önemli ilaçlar, solventler, protein değeri arttırılmış gıdalar) ile gerçekleştirilmiştir. Üretimi optimize etmek için yeni fermenterler tasarlanmaktadır.

Enzim teknolojisi

Aşırı derecede spesifik kimyasal reaksiyonların katalizi için kullanılmaktadırlar; spesifik moleküler dönüştürücüler (biyoreaktörler) meydana getirmek için enzim immobilizasyonları. L-aminoasitler, yüksek fruktoz şurubu, semi-sentetik penisilinler, nişasta ve selüloz hidrolizi vb. içeren ürünlerin oluşumu. Biyotahliller için enzim problemleri.

Atık teknolojisi

Uzun tarihsel önemi daha fazla vurgu ile şu anda gıdalar, gübreler ve biyolojik yakıt kaynaklarının geri dönüşümü ve muhafazası ile birleştirilmektedir.

Çevresel biyoteknoloji

Varolan engin ufuklar ile birçok çevresel problemin çözümünde (kirlilik kontrolü, toksik atıkların uzaklaştırılması) biyoteknolojik konseptlerin uygulanması, madencilik atıkları ve düşük derecedeki cevherlerden metallerin geri dönüşümü.

Yenilenebilir kaynakların teknolojisi

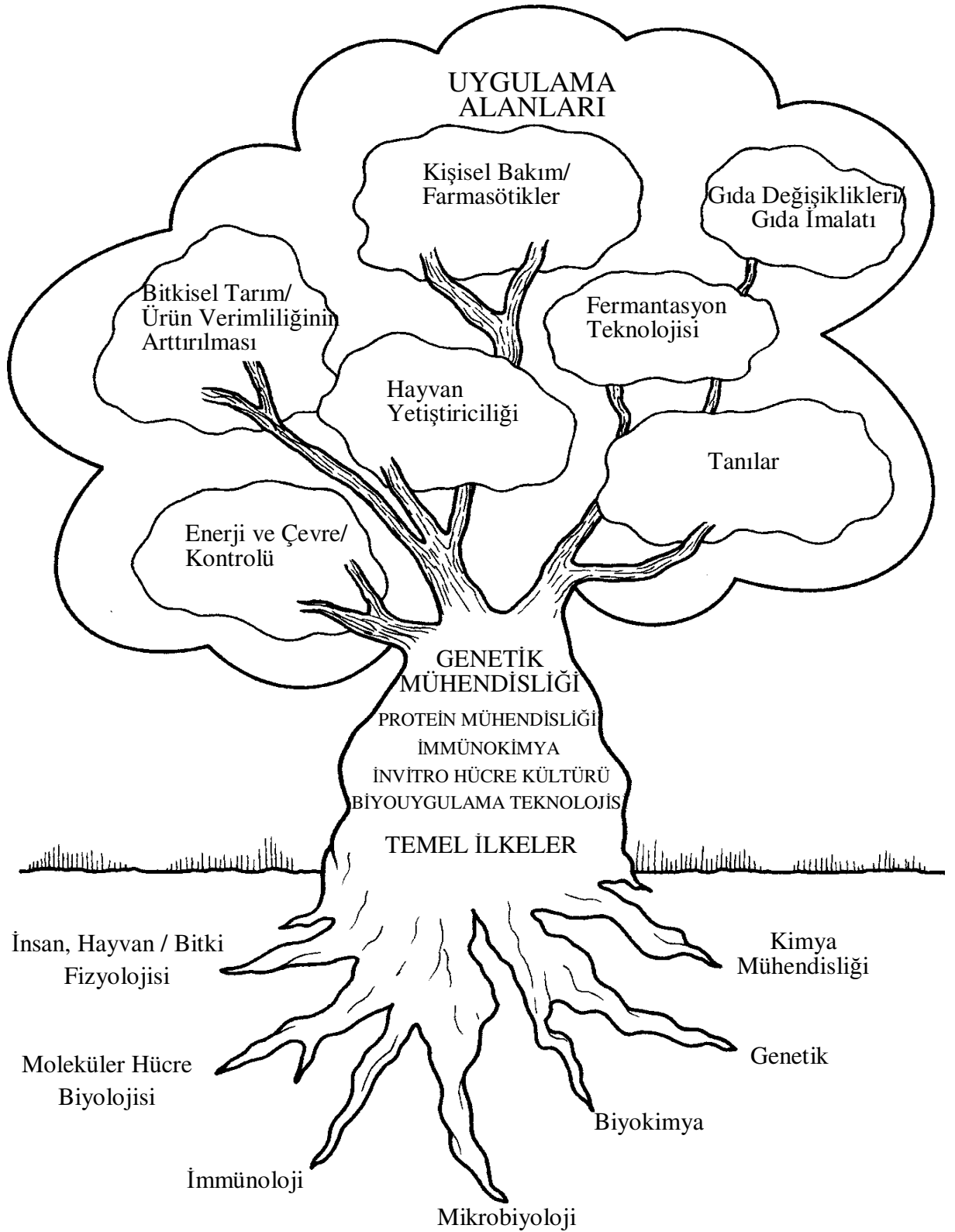
Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı, özellikle lignosellülozdan kimyasal ham materyallerin enerji-etanol, metan ve hidrojen gibi yeni kaynakların meydana getirilmesi. Bitkisel ve hayvansal materyalin toplam kullanımı. Temizlik teknolojisi, destekleme teknolojisi

Tarım uygulamaları

Genetik mühendisliği ile bitkilerin besinsel değeri, hastalığa olan direncin kalitesini geliştirme gibi özelliklerinin ve ürün verimi arttırılması ve stres toleransı ticari olarak giderek artacaktır. Hayvan çiftçiliği için üretimin arttırılması. Gıda kalitesi, tat, koku ve mikrobiyal güvenin sağlanması.

Kişisel bakım

Hastalıkların tedavisi için daha iyi özelliklere sahip ilaçlar sağlamak. İnsan genom-genomiksleri ve proteomiklerinin anlaşılması ve informatik teknolojisi ile geliştirilmiş hastalık tanı yöntemleri.



Şekil 1. 1. Biyoteknoloji Ağacı⁵

Biyoteknoloji kişisel bakım ve sağlık, tarım ve ormancılık, yararlı ve saf kimyasallar, gıda teknolojisi, yakıt ve enerji üretimi, kirlilik kontrolü ve yeni kaynakların elde edilmesi gibi endüstriyel sektörlerin geniş bir kısmında faydalar sağlamaya ve ticari gelişimleri için heyecan verici yeni fırsatlar yaratmaya devam edecektir. Günümüzde Biyoteknoloji, dünyanın karşı karşıya olduğu sorunların çözümü için çok büyük umutlar sunmaktadır⁵.

Fermantasyon uygulamaları kimyasallar, enzimler, antibiyotikler, ilaçlar ve gıdaların üretim uygulamalarında kullanılmaktadır. Gelişmiş genetik ve metabolik metotların yeni ürünlerin geliştirilmesinde kullanımı artmakta ve daha önce kullanılmayan ham materyallerin kullanımında bir avantaj sağlamaktadır⁶. Fermantasyon uygulamaları ile gerçekleştirilen en önemli üretim işlemlerinden biri de kuşkusuz enzimlerin üretilmesine yönelik uygulamalardır.

Son yıllarda diğer tekniklere oranla daha fazla ürün elde edilmesinden ötürü Katı Faz Fermantasyon (KSF) tekniği, biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda gittikçe artan bir önem kazanmıştır. Bu teknikte, ticari önemi olmayan veya az olan ve çevre kirliliğine yol açan bazı bitkisel atıkların substrat olarak kullanılmasıyla, ekonomik ve ekolojik açıdan değerlendirilebilirliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada enzim üretim kaynağı olarak uygun mikroorganizmalar kullanılacak olup bunların uygun substrat ve enzim üretim şartları belirlenecektir. Ayrıca katı faz fermantasyon (KSF) tekniği kullanılarak ekonomik değeri olmayan bitkisel atıklar ile yapılan çalışmalardan elde edilecek enzimlerin yüksek seviyede üretilmesi ve bu tekniğin bir takım özellikleri incelenmeye çalışılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. ENZİMLER

Enzimler biyolojik hızlandırıcılar (katalizör) olup kendileri herhangi bir değişime uğramadan canlı sistemlerde oluşan kimyasal tepkimelerin hızını artırır⁶. Enzimler çoğu kez sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli olağanüstü katalitik güce sahiptirler. Substratları için yüksek spesifiklik gösterirler ve kimyasal tepkimeleri müthiş derecede hızlandırır. Optimum pH ve sıcaklık koşullarında işlev görürler. Biyolojik olmayan katalizörlerin çok azı bu özelliklerin hepsine sahiptir. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır⁷.

Genelde tonlar düzeyinde kullanılan endüstriyel enzimlerin saflık düzeyleri düşük olduğu için fiyatları da düşük olmaktadır. Bunun yanı sıra gram ve miligram düzeyinde kullanılan bilimsel ve analitik ile tıbbi enzimler çoğu zaman yüksek saflık düzeylerinde oldukları için yüksek fiyatlarda pazarlanmaktadır⁸.

2005 yılında dünya enzim pazarı 1.7-2 milyar dolarlık bir boyuta ulaşmıştır. Enzimler mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kökenli olabilirler. Mikrobiyal enzimler endüstriyel enzim pazarının %90'ını kapsar. Bunlar bakteriyel ve fungus (küf, mantar ve mayalardan oluşan mikroorganizmalar) kökenlidir. Kontrollü ortamda kolaylıkla ve hızlı olarak üretilebilmeleri, çok zengin enzim çeşitliliğine sahip olmaları, mikroorganizmaların enzim üretiminde en çok kullanılan kaynak olmalarına neden olmuştur. Doğadan taranmış enzim üreticisi mikroorganizmalara, son zamanlarda genetik mühendisliği teknikleriyle geliştirilmiş olan rekombinant (yenidenbileşenli) mikroorganizmalar da katılmış durumdadır.

Bazı mikrobiyal enzimler, hücreler tarafından sentezlendikten sonra hücre dışına salgılanırlarken bazıları ise hücre içinde kalırlar. Endüstriyel enzimlerin çoğu, hücre dışına salgılanan enzimlerdir. Hücre içi enzimlerden yararlanmak için hücrelerin parçalanarak enzim moleküllerinin hücrelerden özütlenmesi gerekir.

2.2. *Bacillus* CİNSİ

Bacillus cinsinin üyeleri mezofiller ve ekstremofilleri içeren endospor formundaki gram-pozitif bakterilerdir. *Bacillus* türleri toprak ve bununla ilişkili nehirler, nehir ağızları ve kıyı suları gibi su kaynakları ve bitkileri de içeren ortamlarda en fazla yayılış gösteren mikroorganizmalardır^{9,10}. Birçok türü hayvan ve insanlara karşı zararsız olup sadece birkaç patojen tür belirlenmiştir. Bu cinsin üyeleri olağandışı metabolik farklılık ve yaşam şekilleri gösterirler ve termofilleri, alkalofiller ve asidofilleri içerirler^{11,12}. Bu bakteriler metabolik olarak karbon ve enerji kaynağı gibi organik bileşiklere bağlı olarak kemoorganotrofturlar. En yaygın olarak karakterize edilmiş türler olan *Bacillus subtilis*, glukoz ve diğer basit karbon kaynakları ile tuzlu ortamlarda mesofilik sıcaklıklarda üreme yeteneğinde olan bir protootroftur. Buna karşın bazı insektisid patojen türleri besinsel olarak oldukça seçici ve bilhassa son derece özel büyüme ortamına ihtiyaç duyarlar¹³.

Metabolik farklılıkları, önemli genetiksel farklılıklarından kaynaklanmaktadır. DNA'sının GC içeriği %33-67 arasında değişmektedir.

2.2.1. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis doğada yaygın olarak bulunan ve üyelerinin çeşitli enzimleri üretmesinden dolayı besin döngüsüne önemli katkı sağladığı düşünülen saprofit bir bakteridir. *B. licheniformis* her yerde bulunan ve çubuk şeklinde gram-pozitif bir bakteridir¹⁴.

Çok farklı enzimler, antibiyotikler ve küçük metabolitleri üreterek endüstriyel amaçlarda kullanılmak üzere arzu edilen ürünleri oluştururlar. Enzim salgılamak için optimum 37°C'ye ihtiyaç duyarlar^{15,16}. Proteaz ve amilaz enzimlerini üretebilmeleri ile besin döngüsüne katkıda bulunan organizmalar gibi düşünülmektedirler. Bu türlerin doğadaki sayıları tespit edilememesine rağmen, toprağın her gramındaki bakteri sayısı yaklaşık olarak 10^6 - 10^7 (cfu mikroorganizma/gr kuru toprak) arasında değişmektedir^{17,18}.

2.2.2. *Bacillus subtilis*

Genelde toprakta yaşarlar. Optimum sıcaklık dereceleri 25-35 °C'dir. Patojen olmayıp ticari öneme sahip önemli ürünleri üretirler, bunlar arasında en dikkate değer olanları proteazlar ve amilazlardır. Kısmen ticari önemde olmaları ve genetik manipülasyonlarının kolay olması nedeni ile *B. subtilis* yoğun şekilde çalışılmıştır¹⁹.

Enzimler mikrobiyal kaynaklar aracılığıyla insan gereksinimleri için elde edilen en önemli ürünler arasında yer almaktadır. Endüstriyel, çevresel ve gıda biyoteknolojisi alanlarındaki endüstriyel uygulamaların geniş bir kısmında ve diğer aşamalarda enzimler kullanılır.

2.3. Katı Substrat (Faz) Fermantasyon Tekniği (KSF)

Katı substrat (faz) fermantasyonu (KSF) genel olarak suyun olmadığı veya az olduğu ortamda katı (nemli) materyaller üzerinde mikroorganizmaların gelişimi olarak tanımlanır²⁰. KSF son yıllarda bazı biyolojik uygulamalar ve ürünlerin gelişiminde umut vermektedir.

KSF, katı faz fermantasyonu ve katı substrat fermantasyonu olmak üzere iki şekilde tanımlanır. Katı substrat fermantasyonu sadece susuz veya az su içeren ortamda karbon/enerji kaynağı gibi iş gören substrat üzerinde; katı faz fermantasyonu ise katı destekleyici gibi iş gören doğal bir substrat veya kullanılan katı substrat üzerinde susuz veya az su içeren ortamda meydana gelen herhangi bir fermantasyon olarak tanımlanmıştır²¹⁻²⁴.

Katı substrat (faz) fermantasyonunun (KSF) ayrıntılı bilimsel ve gelişimsel tarihi zaman zaman bazı araştırmacılar tarafından yeniden incelenmiştir. Gıda fermantasyonu ve enzimlerin üretimi katı substrat fermantasyonunun (KSF) ilk icat edildiği yerlerde gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.1)²¹.

Son on yılda katı substrat (faz) fermantasyonu KSF sistemleriyle antibiyotikler, alkaloidler, bitki büyüme faktörleri vb. içeren biyolojik olarak aktif sekonder metabolitler, enzimler, organik asitler, mikopestisitler ve biyoherbisitleri içeren biyopestisitler, biyosurfaktanlar, biyoyakıt, aroma bileşikleri gibi değerli katkı

maddelerinin KSF ile üretimindeki metotların gelişimi için eşi görülmemiş olağanüstü bir çabaya şahit olunmuştur²¹.

Submerged fermantasyonu (SmF) genelde sentetik olarak hazırlanmış ortamlarda meydana gelen fermantasyon işlemidir. SmF ortamında katı destekleyici yerine sıvı ortam bulunmaktadır. Araştırmacılar katı substrat (faz) fermantasyonunun (KSF) submerged fermantasyonuna (SmF) göre üstün olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak katı substrat (faz) fermantasyonunda (KSF) verimi arttırmak için yapılacak uygulamalarda sıcaklık, pH, substrat ve nem içeriğindeki artış gibi parametrelerin değişkenliği endüstriyel ölçekteki üretim sırasında olumsuzluklara yol açtığı için bu parametrelerin kontrol edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir²¹. Çalışmalar KSF'nin önemli avantajlarından birinin de esas substrat gibi kullanılan ham materyallerin son derece ucuz olması olduğunu göstermiştir. Hem gıda hem de tarım atıkları bol miktarda üretilmekte ve bu atıklar karbonhidratça ve diğer besinlerce zengin olduklarından KSF tekniğinin kullanımıyla enzimler ve önemli kimyasalların üretiminde bir substrat gibi hizmet ederler²⁵.

Günümüzde KSF daha çok laboratuvar ölçeğinde uygulanmasına rağmen, KSF'nin daha yüksek fermentasyon verimliliği, daha yüksek son ürün konsantrasyonu daha az katabolik represyon, değişik mikroorganizmaların karışık kültürlerinde veya çözünmeyen substratlar için özelleştirilmiş mikroorganizma kültürlerinin kullanılması gibi çeşitli biyoteknolojik avantajlara sahip olduğu bilinmektedir²⁶. Daha fazla biyokütle, yüksek enzim üretimi ve daha düşük protein bozulması, KSF'de daha iyi özellikte üretime katkıda bulunur²⁶⁻²⁸.

Tablo 2. 1. KSF'nin Tarihsel Gelişimi²¹

M.Ö. 2000	Mısırlılar tarafından ekme yapımı
Hz. İsa'nın doğumundan önce Asya'da	Peynir yapımı için <i>Penicillium roquefortii</i> 'den yararlanılmıştır.
M.Ö 1500	Balık fermantasyonu/şeker, nişasta ve tuzlar ile koruma
M.Ö 1500	<i>Koji</i> işlemi

7. yüzyıl	<i>Koji</i> uygulamasının Çin'den Japonya ya geçmesi
18. yüzyıl	Meyve ezmesinden sirke yapımı
18. yüzyıl	Tabaklama ve baskı uygulamalarında gallik asit kullanımı
1860-1900	Kanalizasyon ıslah işlemleri
1900-1920	Fungal enzimlerin üretilmesi, kojik asit
1920-1940	Fıçı tipi fermentörün geliştirilmesi sayesinde fungal enzimler, gallik asit ve sitrik asit üretimlerinin gerçekleştirilmesi
1940-1950	Fermantasyon endüstrisinde penisilin üretimi ile görülen olağanüstü gelişme
1950-1960	Steroid transformasyonu
1960-1980	Mikotoksinler ve protein değeri artırılmış hayvan yemlerinin üretimi
1980-1990	Çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin üretimi, column tipi fermentörün geliştirilmesi, KSF kinetikleri ve modellerine yönelik çalışmalar
1990-günümüze kadar	KSF'ye yönelik temel yaklaşımlardaki gelişmeler, biyolojik uygulamalar/elde edilen ürünlerdeki ilerlemeler: Tehlikeli bileşiklerin ıslahı, biyolojik dönüşümü, tarım endüstrisi atıklarının detoksifikasyonu, biyotransformasyonlar

A.Biyolojik uygulamalar

B. Ürünler

Biyoaktif bileşikler: Alfatoksin, osiratoksin, bakteriyel endotoksinler, giberillik asit, zearalenon, çavdar alkaloidleri, penicilin, cephalosporin, cephalomycin C, tetrasiklin, klorotetrasiklin, oksitetrasiklin, iturin, aktinorhodin, metilenomisin, surfaktin, monordan, siklosporin A, ustiloksinler, antifungal uçucu bileşikler, destrüksin A ve B, klavulanik asit, mikofenolik asit

Enzimler: Sellulaz, β -glukosidaz, CMCaz, lakkaz, ksilanaz, poligalakturonaz, ligninaz, β -ksilosidaz, α -arabinofuranosidaz, lakkaz, Li-peroksidaz, Mn-peroksidaz, proteazlar (asidik, nötral ve alkalın), lipazlar, α -amilaz, β -amilaz, glukoamilaz, glutaminaz, inulinaz, fitaz, tannaz, feruloil para-kaumaroil esteraz

Organik asitler: Sitrik asit, fumarik asit, laktik asit, oksalik asit, gallik asit

Diğer bileşikler: L-glutamik asit, pigmentler, karotenoidler, xanthan gum, süksinoglikan, etanol, aramo bileşikleri, vitamin B-12, B-6, riboflavin, tiamin, biyosurfaktanlar, biyopestisitler/biyoherbisitler

KSF, SmF ile karşılaştırıldığında genelde SmF'e göre daha az kompleks karbon kaynakları kullanılır, katı maddeler mikrobiyal metabolizmada indüksiyon, inhibisyon ve represyona neden olabilen yüksek moleküler ağırlığa sahip karbon bileşiklerinin substratlarla karışmasını engeller. KSF'nin bu eşsiz özelliği mikroorganizmaya düşük oranda nem içeren ortamda seçici bir büyüme ortamı sağlar ve böylece organizma değişik ekstrasellüler enzimleri bağlı ya da serbest halde üretir aynı zamanda katı subtrat yüzeylerine yakın yüksek besin konsantrasyonlarında gelişebilir²⁹.

KSF'de uygun substrat seçimi üzerine yapılan araştırmalarda başlıca mantarların miselyum ucunda meydana gelen turgor basıncı yardımıyla katı substratların içine nüfuz edebilecek filamentli funguslar için sağlanan potansiyel avantajlardan dolayı tarım endüstrisi atıkları üzerinde odaklanılmıştır³⁰. Ayrıca bu tarım endüstrisi atıklarının kullanımı bir taraftan alternatif substratlar sağlarken diğer taraftan çevresel kirlenme problemlerini de ortadan kaldırır³¹.

KSF uygulamalarında substrat seçimindeki en temel faktörlerden biri substratın maliyeti ve bulunabilir olmasıdır. İdeal bir substrat mikroorganizmanın üremesi ve gelişimi için gerekli olan tüm besinleri sağlamalıdır. Genelde substratların ön muamelesi mikroorganizmanın besine ulaşabilmesi ve konaklama yeri için gereklidir²⁹. Bununla birlikte bazı besinler sub-optimal konsantrasyonlarda veya substrat yapısında hiç olmayabilir. Bu gibi durumlarda besinler ortama dışarıdan eklenirler. KSF işleminden önce mikrobiyal büyüme için daha kolay erişilebilir ve bazı substratlar (örneğin; lignosellulozik) kimyasal veya mekaniksel ön muameleye tabi tutulabilir. Uygun substratların seçimine yönelik yapılan çalışmalarda başlıca tropikal tarım endüstrisi ürünleri ve atıkları üzerine odaklanılmıştır. Bu ürünler ve atıklar potansiyel avantajlar sağlarlar. KSF yönteminde katı substrat sadece mikrobiyal büyüme için besin sağlamaz aynı zamanda hücreler için bir konaklama yeri gibi iş görür²¹. Bu amaçla şimdiye kadar kullanılan katı substratlar, manyok, soya, şeker kamışı, tatlı patates ve süpürge darısı gibi ürünler, buğday ve pirinç kepeği ve samanları gibi tarım atıkları, şeker kamışı posası, kahve posası ve kabuğu gibi kahve işleme endüstrisinde meydana gelen atıklar, üzüm ve elma püresi gibi meyve işleme endüstrisinde meydana gelen atıklar, ananas ve muz atıkları, hindistan cevizi, soya, yer fıstığı, kanola ve hurma ağacı yağlarının çıkarılmasından sonra arta kalan parçalar gibi substratlardır. KSF aynı zamanda bu gibi atıkların detoksifikasyonu ve indirgenmesinde belirgin bir avantaj sağlar²⁹.

2.3.1. KSF'nin avantajları ve dezavantajları

KSF verimlilik, ürün konsantrasyonu ve atık oluşumu gibi hallerde SmF'e göre belirgin avantajlara sahiptir. KSF'nin çeşitli avantajları aşağıda sıralanmıştır²¹.

- ✓ Daha yüksek miktarlarda ürün elde edilmesi
- ✓ Düşük maliyet ve tekrarlanabilir harcamalar
- ✓ Düşük enerji ihtiyacı
- ✓ Köpüklenmenin olmaması
- ✓ Basit ve daha kolay üretilebilirlik

- ✓ Daha basit fermantasyon ortamı
- ✓ Daha az fermantasyon alanı
- ✓ Fermantasyon parametrelerinin dikkatlice kontrolüne gerek duyulmayışı
- ✓ Daha kolay havalandırma
- ✓ Küçük ölçeklerde bile ekonomik kullanım
- ✓ Kontaminantların basit kontrolü
- ✓ Fermantasyonda kullanılan katıların doğrudan uygulanabilirliği
- ✓ Kurutulmuş fermantasyon materyallerinin muhafazası
- ✓ Ürün elde edilme sürecindeki daha düşük maliyet
- ✓ Mikroorganizmaların doğal habitatlarına benzer ortamlarda gelişimine izin veren yabani-tip mikroorganizmaların kullanılmasına olanak sağlaması

KSF'de çoğunlukla yabani suşmikroorganizmalar genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalara nazaran daha iyi uygulama imkânı sağlar ve daha güvenilirdir.

Yukarıda adı geçen avantajlara rağmen KSF tekniği SmF tekniği ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajları vardır²¹:

- ✓ Isı artışı
- ✓ Nadiren meydana gelen bakteriyel ve fungal kontaminasyon
- ✓ Kullanılabilen mikrobiyal türlerin sınırlı olması
- ✓ Biyokütle değerlendirmesi için dolaylı metotlara ihtiyaç duyulması
- ✓ Ortamın nem içeriğinin kontrolündeki zorluklar
- ✓ Yapılan ön işlemlerin pahalı olabilmesi
- ✓ Büyük miktarda spor inokülümüne ihtiyaç duyulması
- ✓ Fermantasyon süresince pH kontrolünün mümkün olmaması
- ✓ Devamlı çalkalama için yüksek enerji gereksinimi
- ✓ Uzmanlaşma ve ilerlemeler için gerekli bilgilerin azlığı
- ✓ İyi şekilde kanıtlanmış scale-up kriterlerinin mevcut olmaması

2.3.2. KSF'yi etkileyen faktörler

Genel olarak KSF'yi etkileyen 2 tip faktör vardır²⁹.

- Biyolojik faktörler
- Fiziko-kimyasal Faktörler

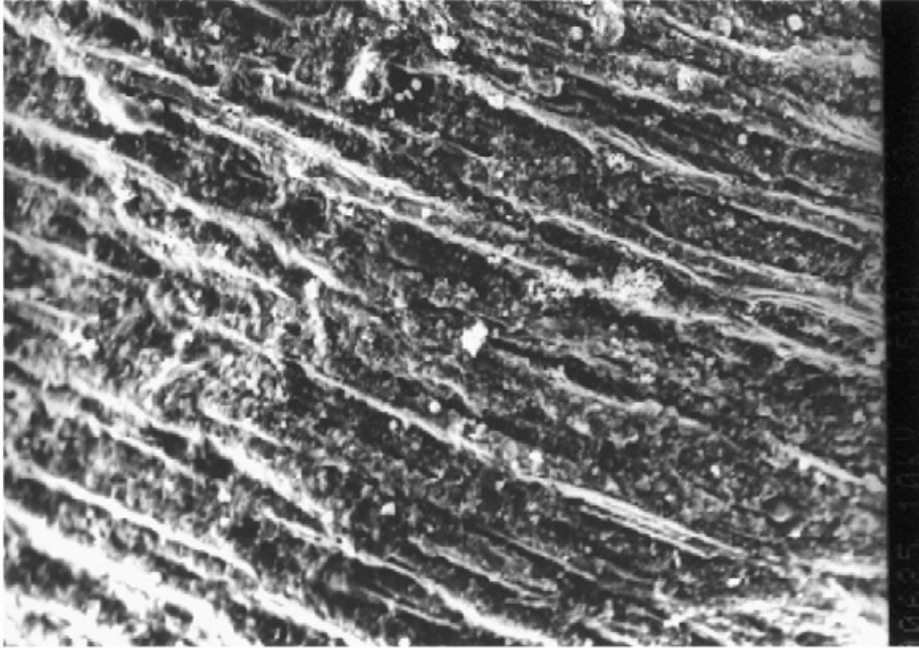
2.3.2.1. Biyolojik Faktörler:

Bu faktörler yaşayan türler veya organizmanın biyolojisi, metabolik işleyişi ve üremesiyle ilişkili faktörlerdir. Bu faktörlerin spesifik bir yol ile incelenmesi belirli türlerin davranışlarının saptanmasını sağlar³⁰. Uygun bir tür seçimi KSF'nin en önemli kriterlerinden biridir. Mikroorganizmalar, hedeflenmiş ürünlerin ticari olarak uygun verimlerde olması, yan ürün miktarı ve substrat üzerindeki üreme ve gelişim şekillerine göre ayırt edilirler²⁹.

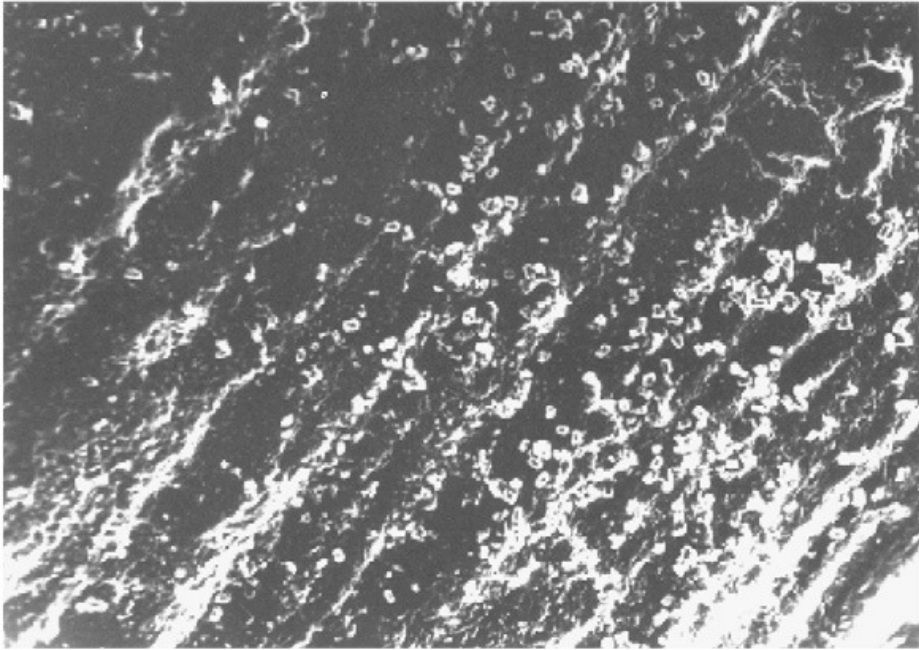
KSF yönteminde substrat seçimi, maliyet ve bulunabilir olması gibi faktörlere bağlıdır. Katı substrat hücreler için destek ve bir besin kaynağı gibi iş görmesi şeklinde KSF'de iki role sahiptir. Tropikal tarım endüstrisi atıkları bu açıdan sayısız avantajlar sağlarlar²⁹.

2.3.2.1.1 İnokülüm Hacmi

İnokülüm hacmi katı ortamdaki biyokütle üretim miktarını belirler. Biyokütlenin çok fazla ve çok az yoğunluğu çoğunlukla enzim üretiminde istenmeyen bir durumdur ve genelde ürün için optimum bir seviye belirlenmelidir. Şekil 2.1 ve Şekil 2.2 substrat olarak buğday kepeğinin kullanıldığı bir KSF işleminde inokülüm işleminden önce ve sonra fermantasyon ortamının elektron mikroskopundaki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2.1. KSF ortamında henüz fermente olmamış buğday kepeğinin elektron mikroskopundaki görünümü (kompakt nişasta-sellüloz fibrilleri ile)³¹⁻³³.



Şekil 2.2. KSF ortamında bakteri hücreleri ile fermente olmuş buğday kepeğinin elektron mikroskopundaki görünümü (fibriller içindeki hidrolize olan nişastaya bakınız)³¹⁻³³.

2.3.2.2. Fiziko-kimyasal faktörler

2.3.2.2.1. Karbon Kaynağı ve Karbon/Azot İlişkisi

Karbon ve azotun yapı ve kaynağı her fermantasyon işleminde en önemli faktörlerdendir. Karbon kaynağı mikroorganizmanın gelişimini sağlayacak enerjiyi sağlar. Ortamda glukoz gibi monosakkaritlerin olması sellüloz veya nişasta gibi kompleks polimer moleküllerin olmasından daha uygundur. Bu nedenle herhangi bir fermantasyon işleminde uygun bir enerji veya karbon kaynağı seçiminde iki önemli nokta göz önüne alınmalıdır³⁴.

- a) Seçilen karbon kaynağı mikroorganizmanın kullanımı için iyi fonksiyon görmeli ve ürün sağlamalıdır. Bu özellik uygun bir ortam hazırlanırken bu faktörün göz önüne alınması anlamına gelir.
- b) Uygun mikroorganizmanın seçilmesi belirli bir substratın kullanımı için gereklidir. Bu bakış açısı doğada bulunan ham materyaller ve çevre kirlenmelerine neden olan endüstriyel atıkların kaynak olarak kullanımıyla ilgilidir.

Azot, büyüme ve nükleik asit-aminoasit bileşeni gibi protein sentezini belirler. Karbon ve azot miktarı arasındaki ilişki, spesifik bir ürünü elde etme işleminde çok önemlidir. KSF'de ortama organik ve inorganik azot bileşiklerin eklenmesiyle genelde enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir²⁹.

Ortam formülasyonları ile ilgili biyokütle içeriğinin hesaba katılması gereklidir. Hücresel biyokütle ortalama %40-50 karbon, %30-50 oksijen, %6-8 hidrojen ve %3-12 nitrojen içerir³⁴.

2.3.2.2.2. Sıcaklık

Biyolojik işlemler genelde belirli sıcaklık derecelerinde gerçekleştirilmektedirler. Biyolojik bir işlemin geliştirilmesinde sıcaklığın önemi protein denatürasyonu, enzimatik inhibisyon, belirli bir metabolit üretiminin indüklenme ve baskılanması veya hücre yaşam/ölümü gibi etkilerin belirlenmesi şeklindedir. Mikroorganizmaların psikrofiller, mezofiller ve termofiller şeklinde

sınıflandırılması sıcaklığı belirlenmiş bir işlem için spesifik bir tür mikroorganizmanın kullanılmasındaki engeli ortadan kaldırır²⁹.

2.3.2.2.3. Nem ve Su Aktivitesi

Yaşayan hücreler ortamın %70-80 nem içeriği ile karakterize edilir ve bu nedenle su içeriği yeni hücrelerin sentezini belirleyen bir faktördür. Bir faktör olarak nem, KSF'nin tanımlanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu parametrenin kontrolü mikroorganizmanın metabolik aktivitesindeki değişimi kontrol etmek için kullanılabilir. Bakteriler için katı matriks nem oranının %70'ten fazla olması gerektiği belirlenmiştir²⁹.

Substrat nemi ve su aktivitesi KSF'de rol oynayan çok önemli faktörlerdir. Ortamın su içeriği suyun kütle transferi ve hücre membranı içinde eriyen maddeler için temel bir parametredir. Bu parametrenin kontrolü mikroorganizmanın metabolik aktivitesini hafifletmek ve kontrol edebilmek için kullanılır. Genelde KSF sisteminde gelişen mikroorganizma türleri su aktivitesi faktörü (a_w) ile belirlenir. Su aktivitesi substrat ile kararsız atmosfer gazlarının bağıl nemi olarak tanımlanır. Fungi ve mayalar düşük su aktivitesi seviyesinde gelişiyor iken bakteriler yüksek su aktivitesi seviyelerinde gelişirler. Uygun bir substratın seçiminde başlıca tropikal tarım endüstrisi ürün ve kalıntıları tercih edilir²¹.

2.3.2.2.4. pH

Herhangi bir KSF işlemi için en önemli faktörler arasında pH bulunmaktadır. Her mikroorganizma gelişimi için belirli bir pH değerine sahiptir ve belirli pH aralıklarında aktiftir. KSF işlemi sırasında farklı pH değerlerini dengede tutmak için zayıf çözeltilerden biri biyolojik aktivite üzerinde ters etki yapmayacak tamponların kullanılması ile sağlanabilir³⁷. İlginç biçimde bazı tarım endüstrisi atıkları diğer katı matriksler tarafından sağlanamayan bir tampon kapasitesine sahiptirler²⁹.

2.3.2.2.5. Havalandırma ve Çalkalama

KSF'deki bu özellik bu yönüyle SmF'e göre bir üstünlük sağlar. Metabolizma için kullanılmadan önce, sıvı faz içinde oksijenin çözünmesi için bir mekanizmaya gerek yoktur. SmF ile karşılaştırıldığında daha az havalandırma seviyeleri KSF için yeterlidir²⁹.

2.3.2.2. 6. Substrat Parça Büyüklüğü

Mikrobiyal büyüme için substrat parça büyüklüğü oldukça önemlidir. Genel olarak küçük substrat parçacıkları mikrobiyal büyüme için geniş bir yüzey alanı sağlar ve bu nedenle arzu edilen bir faktör gibi düşünülür. Bununla birlikte çok küçük substrat parçacıkları substrat yığını oluşturabilir bu gibi hallerde en çok mikrobiyal solunum/havalanmayı engelleyen ve bu nedenle zayıf hücresel büyüme meydana getiren olay görülür^{35,36}. Buna karşın daha büyük partiküller kullanıldığında iç kısımdaki parçalar arasındaki alan arttığından büyük parçacıklar daha etkili solunum/havalanmayı sağlayabilir, ancak mikrobiyal büyüme için sınırlı bir alan oluşmasına neden olur. Bu nedenle belirli bir KSF işleminde parça büyüklüğünü belirlemek oldukça önemlidir³⁷.

2.3.3. KSF'de Enzim Üretimi

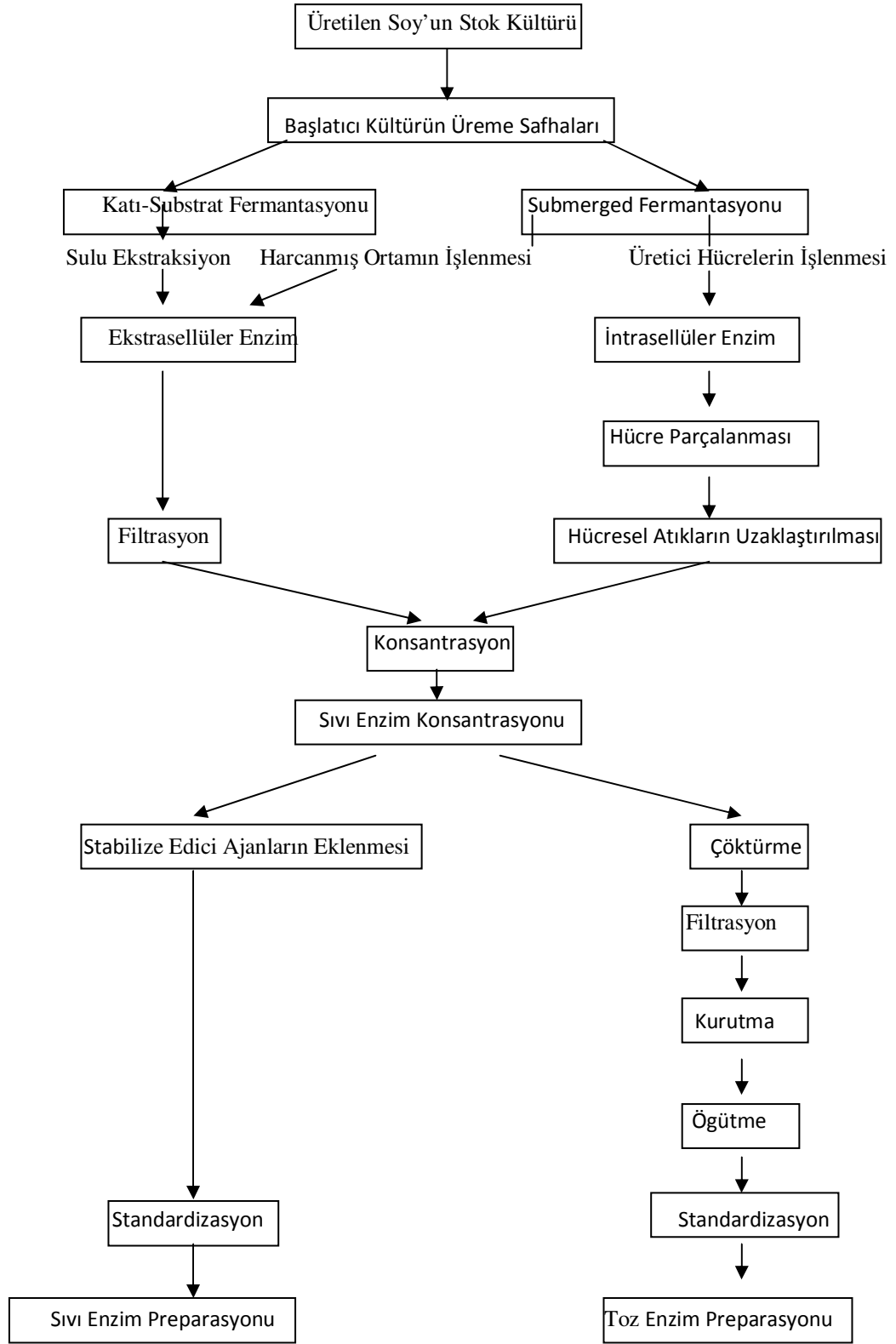
KSF enzimlerin üretimi için çok büyük potansiyel sağlar. Bu potansiyel doğrudan enzim kaynakları gibi kullanılabilen ham fermente ürünlerin uygulamalarında özel bir ilgi alanı olabilir³⁷.

İdeal olarak, bilinen mikrobiyal enzimlerin hemen hemen hepsi KSF sistemlerinde üretilebilmektedir. KSF yöntemi kullanılarak birçok çalışmada sellülazlar, hemisellülazlar, pektinaz, amilazlar, α ve β -galaktosidazlar, kafeinaz, tannaz, proteazlar, ligninazlar, ksilanazlar, glukoamilazlar, vb. gibi endüstriyel öneme sahip enzimlerin üretimi yapılmıştır. Aynı zamanda inülinazlar, fitazlar, tanazlar, fenolik asit esterazlar, mikrobiyal rennetler, aril-alkol oksidazlar, oligosakkarid oksidazlar, tanin açıl hidrolazlar, L-arabinofuranosidaz gibi enzimlerin üretimi için KSF sistemleri kullanılmıştır³⁸.

Enzim üretimi için KSF uygulamalarında kullanılan en önemli organizmalar fungi ve bakterilerdir. Tablo 2.5'te *Bacillus* spp.'nin KSF yöntemi ile ürettiği bazı enzimler ve Şekil 2.3'te KSF ve SmF yöntemleri ile enzim üretimi ve saflaştırma basamakları gösterilmiştir.

Tablo 2. 2. *Bacillus* spp.'lerin KSF Yöntemi ile Ürettikleri Bazı Enzimler³⁹⁻⁴⁵

Organizma	Substrat	Enzim
<i>Bacillus</i> sp. JB-99	Pirinç kepeği	Ksilanaz
<i>Bacillus</i> sp.	Nohut kabuğu	Alkalin proteaz
<i>Bacillus</i> sp.P-2	Buğday kepeği	Alkalin proteaz
<i>Bacillus</i> sp.	Buğday kepeği+poligalakturonik asit	Pektinaz
<i>Bacillus</i> sp. PS-7	Buğday kepeği+soya unu+gliserol	α -amilaz
<i>Bacillus subtilis</i>	Buğday kepeği	α -amilaz
<i>Bacillus</i> sp AS-1	Buğday kepeği	α -amilaz



Şekil 2. 3. SSF ve SmF yöntemleri ile Enzim Elde Edilme Basamakları

2.4. AMİLAZLAR

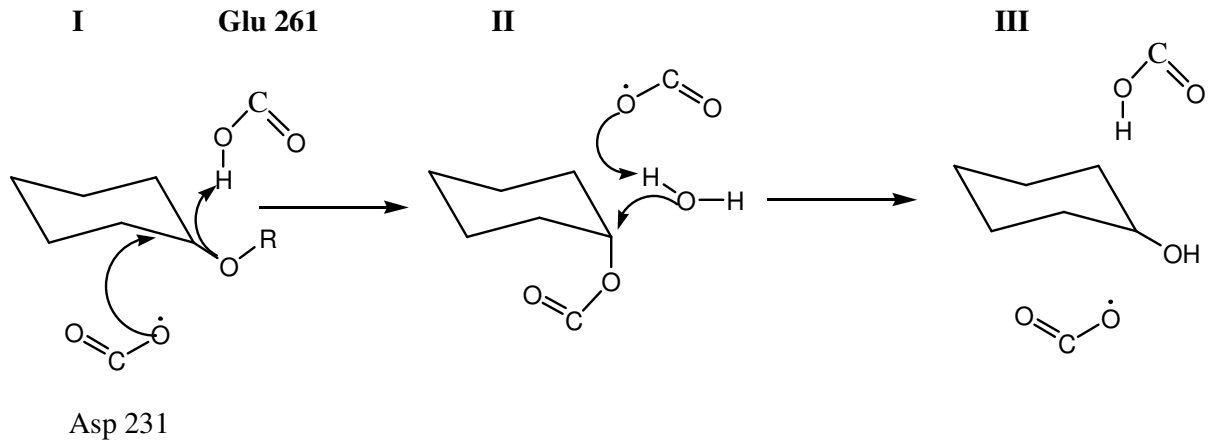
Mikroorganizmalar nişastayı parçalayan değişik enzimler üretirler:

Amilolitik enzimler endo-amilazlar [α -1,4 glukon-glukanohidrolaz; EC. 3.2.1.1]; ekso-amilazlar [β -amilaz (EC. 3.2.1.2), glukoamilaz (α -1,4-D-glukanhidrolaz), α -galaktosidaz (EC. 3.2.1.20), siklodekstrin glikosil-transferaz (2.4.1.19), maltogenik α -amilaz (EC. 3.2.1.133), maltooligosakkarit amilaz ve maltoheksoz amilaz (EC. 3.2.1.98)], α -1,6 bağlarını hidroliz ederek son ürünü dallanma göstermeyen yapılar oluşturan enzimler, İzamilaz (EC. 3.2.1.168), pullulanaz (EC. 3.2.1.41) ve amilopullulanaz amilopektin dallarındaki α -1,6 glikozidik bağlarını kırarlar⁴⁶.

2.4.1. α -Amilaz Familyası

α -Amilaz familyası glikosid hidrolazların (GH) en büyük familyasıdır⁴⁷. Bu enzimlerin tümü bir çeşit substrat özgülüğü ile glukoz üniteleri arasındaki α -1-1, α -1-4, α -1-6 bağlarını hidroliz ederler.

Bu gruba ait tüm enzimler GH-13 familyası içinde sınıflandırılmışlardır. Yapılarında (α/β)₈ yarığı ile katalitik bölgelerinde bir proton görevi gören Glutamik asit aminoasidi ve nükleofil rolü üstlenen Asparajin aminoasidi içermektedirler. Şekil 2.4'te glikosil hidrolazların etki mekanizması gösterilmiştir⁴⁸.



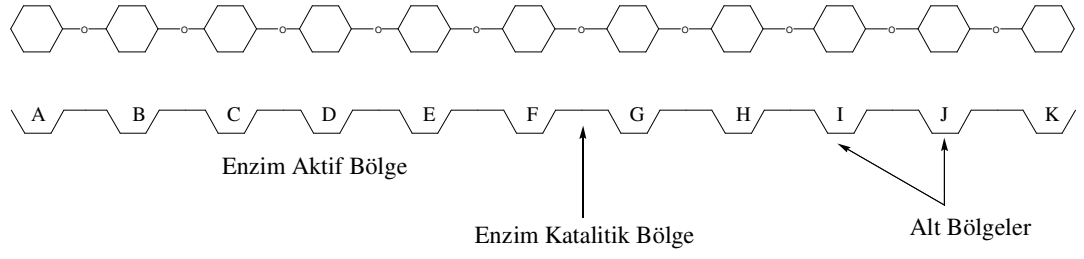
Şekil 2.4. Glikosil hidrolazların etki mekanizması. (I) Glikosil oksijenin protonlanması ve D231 tarafından glukoz C1'e atağı. Substratın indirgen ucunun

ayrılması. (II) Bir su molekülünün aktivasyonu ile C1-D231 kovalent bağının kırılması. (III) Başlangıçta protonlanmış bölgelerin rejenerasyonu⁴⁹

2.4.1.2. α -Amilaz

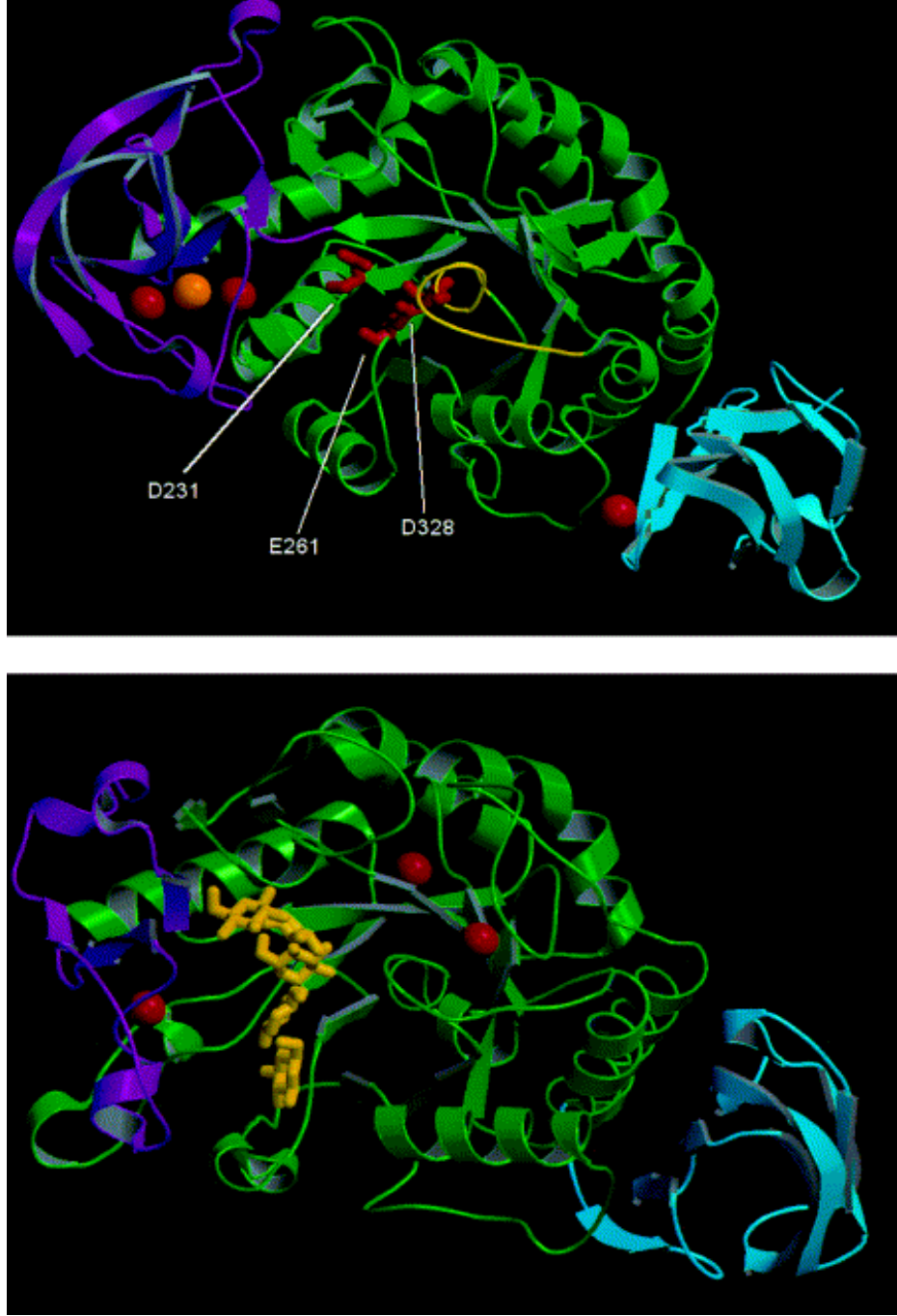
α -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1.) ürünler içinde α -anomerik konfigürasyonunu kaybetmeden polisakkaritlerin iç kısmında bulunan α -1,4-*O*-glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen nişasta parçalayıcı enzimlerdir⁵¹. α -Amilazların birçoğu metalloenzimlerdir. Bu enzimler aktiviteleri, yapı sağlamlığı ve stabiliteleri için kalsiyum iyonlarına (Ca^{2+}) gereksinim duyarlar. Metalloenzimler enzimlerin glikosid hidrolaz grubundan 13 (GH-13) familyasına aittirler⁵². α -Amilazlar endüstriyel amilazların en popüler ve en önemli olanlarıdır. α -Amilazların substrat özgülüğü mikroorganizmadan mikroorganizmaya farklılık gösterir. Genelde başta nişasta olmak üzere amiloz, amilopektin, siklodekstrin ve maltotriosa yüksek spesifite gösterirler⁵². α -Amilazların optimum pH'sı pH 2-12 arasında değişiklik gösterir⁵³. Bakteri ve funguslarda bulunan α -amilazlar asidik ve nötral pH'ta optimumdurlar⁵⁴. Bu enzimler genelde pH 4-11 aralığında stabildirler, aynı zamanda düşük bir pH aralığında da stabil oldukları rapor edilmiştir⁵⁵⁻⁶². α -Amilazların molekül ağırlıkları 10 kDa'dan 210 kDa kadar çeşitlilik gösterir. Doğrudan α -amilazların gen klonlama analizi ve aminoasit dizi sırasının belirlenmesi ile genel olarak mikrobiyal α -amilazların molekül ağırlıklarının 50-60 kDa aralığında olduğu belirlenmiştir⁵³.

α -Amilazın aktif merkezi yaklaşık 3nm büyüklüğündeki bir yarık içerisinde bulunur, A ve B etki alanlarının karboksil ucu arasında yer almaktadır. Aktif bölge ve alt birimlerin organizasyonu için bir model olarak her birimin glukozu bağlama yeteneğinde olduğu öne sürülmüştür^{61,62} (Şekil 2.5). Dolayısıyla farklı α -amilazların aktif bölgeleri 5-11 arasında alt birim oluşturur (A-K). Katalitik bölge F ve G alt birimleri arasında bulunmaktadır. α -Glukoz zincirinin indirgen ucu K alt birimine doğru yerleşmiştir. α -Amilaz spesifitesindeki fark, örneğin detaylı şekilde amilazların bir polisakkariti hidroliz etmesi aktif bölgedeki alt birimler açısından açıklanmıştır. Her alt birim substratın bir glukoz unitesi ile etkileşir. Enzimin aktif merkezi F ve G alt birimleri arasında bulunur. F ve G alt birimleri Asp- 206 ve Glu-230 veya Asp-297'i içerir. C-6 da modifiye olmamış bir glukoz halkasının primer hidroksili ile enzimin etkileşimi bu alt birimin bağlanması için en önemli şarttır⁶¹.



Şekil 2. 5. α -Amilazların aktif bölgesi ve alt birimlerinin sistematik şeması⁶³

α -Amilazın katalitik mekanizması Taka amilazına oranla iyi şekilde karakterize edilmiştir. Aktif bölgede bulunan His 122 ve His 296 substratın glikozil üniteleri ile bağlanıyorken, aktif bölgede (β/α)₈ yarığı içine yerleşmiş olan Asp 206, Glu 230, Asp 297 katalitik aktivitede önemli rol oynarlar⁵⁰.



Şekil 2. 6. α -Amilazların yapı organizasyonları. A bölgesi yeşil, B bölgesi morumsu ve C bölgesi turkuaz renkte görülmektedir. Sırasıyla kalsiyum iyonları ve sodyum iyonları kırmızı küre ve turuncu küre olarak gösterilmektedir. (A) *B. licheniformis* α -amilazıdır (PDB:1BLI). Aktif merkezde bulunan Asp231, Glu261 ve Asp328 aminoasitleri kırmızı renkte görülmektedirler. Sarı renkle gösterilerin bölge lobun $\beta 7$ 'den $\alpha 7$ 'e olan bağlanmasını ifade eder. (B) *B. subtilis* α -amilazını göstermektedir. Aktif merkezine maltopentoz (sarı renkte) bağlıdır (Bu şekiller Molscrip ve Raster3D programları ile hazırlanmıştır.)^{59,60,62}

yolu ile (b) S_N2 reaksiyonu ile bir kovalent bağ sayesinde glikosil enzim kompleksinin oluşumu⁶³

2.4.2. α -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Bugün amilazlar toplam enzim piyasasının en büyük grubunu oluştururlar⁶⁶. Dünya genelindeki enzim piyasasının 2005 yılında yaklaşık olarak 2 milyar Amerikan doları değerinde olduğu hesaplanmıştır⁶⁷.

Amilazlardan tekstil, gıda, bira yapımı, saflaştırma endüstrileri, kliniksel, tıbbi ve analitik kimya alanlarında yararlanılmaktadır⁶⁸.

2.4.2.1. α -Amilazların Ekmek Pişirme Endüstrisi ve Raf ömrünü Uzatma Sürecinde Kullanımı

Bu enzimler ekmek yapımında yüksek hacimde, daha yumuşak ve daha iyi renk elde etmek amacıyla kullanılmaktadırlar.

α -Amilazların unlara katılmasıyla sadece fermantasyon sürecinin hızlanması, hamur vizkositenin azaltılması ve daha geniş hacimli ekmek üretimi sağlanmaz (ürünlerin yapı ve yoğunluğunun artmasıyla sonuçlanır), aynı zamanda tat, renk ve daha kaliteli kızarmış ekmek (hamur içinde fazladan şeker oluşumu) üretimi de sağlanmış olur^{52,69-74}.

Endüstride α -amilazın son kullanım alanlarından biri de ekmek ürünlerinin bayatlamasını geciktirme ve bu şekilde ürünlerin raf ömrünün uzatılmasıdır⁷⁴.

2.4.2.2. α -Amilazların Nişastayı Sıvılaştırmada ve Şekerlemede Kullanımı

α -Amilaz termostabil özelliktedir. Bu enzim nişastayı hidroliz ederek dekstrinleri meydana getirir daha sonra glukoamilazların etkisiyle dekstrinler glukozlara dönüşür. Bu işlem alkol, şeker ve biracılık endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁶⁴.

2.4.2.3. α -Amilazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Tekstil ürünlerinin işleme sürecinde dokumanın sertleştirilmesi ve gerilmesi önemli bir etkidir. Tekstilde nişasta molekül boyunun iyi bir şekilde ayarlanması α -amilazların uygulanması ile başarılabilir. α -Amilazlar sıklıkla çözümlü nişasta içindeki dekstrin moleküllerini temizleyerek, nişastanın fazlasının uzaklaştırılması işlemini sağlayabilir^{48,75}. α -Amilazların kullanılmasıyla tekstil ürünlerindeki dokuma eğriliği düzeltilebilir.

2.4.2.4. α -Amilazların Kâğıt Endüstrisinde Kullanımı

Yüksek molekül ağırlığına sahip nişastanın kâğıt endüstrisinde kullanımı, düşük viskozite sağlamasından dolayı α -amilazlar sayesinde başarılmıştır. Kâğıdın sertleştirilmesi ve toplanması için nişastanın bulamaç haline getirilmesi ve transfer edilmesi gibi iki etkiyle olur⁴⁸.

2.4.2.5. α -Amilazların Deterjan Uygulamalarında Kullanımı

Enzimler şu anda modern şekilde üretilen deterjanların en önemli bileşenlerinden biridir. Deterjanlardaki enzim uygulamalarının en önemli avantajı daha ılımlı koşullarda iş görmeleridir. α -Amilazlar 1975 yılından beri toz çamaşır deterjanları içinde kullanılmaktadırlar. Bugünlerde tüm sıvı deterjanların %90'unda α -amilaz bulunur ve otomatik bulaşık makinelerinde kullanılmak üzere deterjan geliştirmeye yönelik talep her geçen gün artmaktadır⁵².

2.4.2.6. α -Amilazların Tıp ve Klinik Kimyada Kullanımı

Biyoteknolojide yeni ilerlemelerin sağlanması ile klinik, tıp ve analitik kimya gibi diğer alanların birçoğunda amilaz uygulamalarının kullanımı artmıştır. Tıp ve klinik alanlarında amilazların kullanıldığı bazı uygulamalar bulunmaktadır. Nişasta uygulanması sonucu meydana gelen spesifik maltooligosakkaritler doğada benzersiz olmaları ve özgün özelliklerinden dolayı gıda, eczacılık ve yararlı kimyasalların elde edildiği endüstrilerde potansiyel olarak geniş kullanım alanına sahiptirler.

Maltopentoz böbrek yetersizliği bulunan hastalarda ve kaloriden yoksun olma durumunda besleyici gıda olarak kullanılmaktadır⁵⁴.

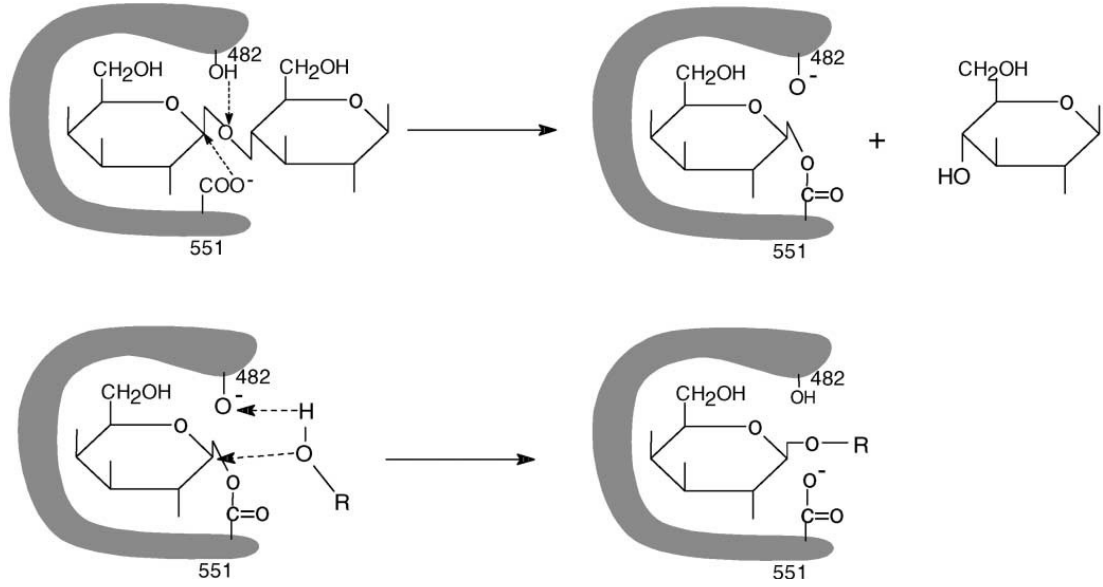
2.6. β -GALAKTOSİDAZ

β -galaktosidaz (laktaz, EC 3.2.1.23) enzimi laktozun hidrolizini kataliz ederek laktozu glukoz ve galaktoza parçalamaktadır. β -galaktosidaz insanlar, hayvanlar gibi gelişmiş organizmalar ve mayalar, küfler, bakteriler, aktinomisetler ve archealar gibi mikroorganizmaların geniş bir kısmı tarafından üretilmektedir⁷⁶. β -Galaktosidaz suyun kanalizasyon ile kirlenmesinde indikatör rol oynayan koliform bakteriler için bir enzim markırı olarak bilinmektedir⁷⁷.

Mikrobiyal β -galaktosidazların moleküler özellikleri ve özgülükleri enzim kaynağına göre önemli farklılıklar göstermektedir. β -Galaktosidazların moleküler ağırlıkları ve subinite yapıları 19-630 kDa arasında olabilmektedir ve monomer yapıdan oktamer yapıya kadar değişiklik göstermektedirler⁷⁶⁻⁷⁸. Bakteriye β -galaktosidazlar genelde nötral pH'larda aktiftirler. Ancak bazıları pH 2.0 gibi asidik ortamlarda bile aktif olabilmektedir⁷⁹. Bazı β -galaktosidazlar aktiviteleri için monovalent ve divalent iyonlara ihtiyaç duyarlar⁸⁰. Bu gibi özellikler mikrobiyal β -galaktosidazların yapısal çeşitliliği hakkında fikir vermektedir⁷⁷.

Henrissat hidrofobik dizi analizini kullanarak glikosil hidrolazların mevcut dizilişlerini karşılaştırmış ve bu enzimleri familyalara sınıflandırmıştır⁴⁷.

Laktozun glikosidik bağının enzimatik hidrolizi genelde bir nükleofil/baz ve bir proton vericisi gibi iki önemli aminoaside ihtiyaç duyan asit katalizi yolu ile gerçekleşmektedir. Laktozun hidroliz mekanizması ilk defa *E. coli* laktazını kullanan Wallenfels tarafından tanımlanmıştır. Öne sürülen reaksiyon mekanizmasına göre enzimatik hidroliz boyunca proton verici olarak sistein ve proton alıcısı olarak da histidin aminoasitleri aktif bölgede iş görmektedir. Son zamanlarda mikrobiyal orijinli birçok β -galaktosidaz ile yapılan çalışmalar sonucunda enzimin proton vericisi ve nükleofil/baz gibi iş gören iki glutamik asit aminoasidine (Glu482 ve Glu551) sahip olduğu bulunmuştur. Laktozun reaksiyon mekanizması Şekil 2.13'de görülmektedir⁸¹.



Şekil 2. 8. Laktozun β -galaktosidaz tarafından hidrolizi. İlk aşamada enzim-galaktosil kompleksi meydana gelir ve aynı zamanda glukoz serbest kalır, ikinci aşamada ise enzim-galaktozil-kompleksinin bir hidroksil grubu içeren akseptöre transferi görülmektedir.

Biyo-uygulama teknolojisinde β -galaktosidaz uygulamaları sütün sindirilebilir özelliğini ve süt ürünlerinin fonksiyonel özelliklerinin artırılmasında mikrobiyal enzimlerin kullanılması ile uzun zamandan beri yaygın şekilde gerçekleştirilmektedir⁷⁷.

Mikroorganizmalardan β -galaktosidaz üretim araştırmaları yeni değildir⁸²⁻⁸⁴. Laktozu glukoz ve galaktoza çeviren β -galaktosidaz veya β -D-galaktosid galaktohidrolaz (EC 3.2.1.23) özel bir ilgiye sahiptir⁸⁵. β -Galaktosidaz düşük maliyet gerektiren fermantasyon ortamlarında *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus* ve *B. subtilis* gibi *Bacillus* türlerinden elde edilmektedir⁷⁷. *B. circulans* β -galaktosidazı üzerine birçok sentetik çalışma yapılmıştır⁸⁶⁻⁹⁰. β -Galaktosidazların aktivite ve stabiliteleri tür tipine, kültür şartlarına (sıcaklık, pH, havalandırma, çalkalama, inkübasyon zamanı) ve büyüme ortamı içeriğine (özellikle karbon ve azot kaynakları) bağlı olarak değişmektedir⁹¹⁻⁹³. *B. circulans*'tan elde edilen ticari β -galaktosidaz preparasyonları yağı alınmış sütte laktozun enzimatik hidrolizini katalizler⁷⁷.

Genelde inek sütü daha az sindirilebilir, düşük oranda çözünür ve düşük oranda tatlı özellikte olup %4.5-5(w/v) oranında laktoz içermektedir. Bu durum süt ve süt ürünleri endüstrisinde çeşitli problemlere neden olmaktadır⁷⁷. β -Galaktosidaz süt ve süt ürünlerinin laktoz içeriğini azaltmada kullanılmaktadır.

Laktoz genellikle düşük tatlılığı, sınırlı çözünürlüğü ve bazı kişilerde intoleransı nedenleriyle tercih edilmemektedir^{77,93}. Süt veya peynir altı suyunda laktoz miktarının azaltılması ile bu ürünlerin tadında artış meydana gelmektedir. β -Galaktosidaz enzimi dondurma veya dondurulmuş süt konsantrelerinde laktozun kristallenmesiyle ilişkili olan kumsu yapının ortadan kalkmasını sağlar. Laktoz intoleransı olan insanlar ise laktoz miktarı %90 düzeyinde azaltılmış ürünleri kullanabilirler. Amerika’da laktaz toz halinde satılmakta ve tüketimden bir gün önce süte eklenerek kullanılmaktadır. Yakın zamanda daha stabil ve kullanım için daha uygun olan sıvı formu üretilmiştir. Steril laktaz enzimi sterilize edilmiş süte ilave edilmekte ve bu süt pazara sunulmadan önce 10 gün oda sıcaklığında depolanarak enzimin hidrolizi tamamlaması sağlanmaktadır. Diğer yöntemde ise laktaz, işlemin son basamağında süte ilave edilmekte ve buzdolabı koşullarında 24 saat bekletilerek hidrolizin gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Laktaz aynı zamanda çeşitli peynirlerde ve düşük laktoz içerikli yoğurt elde etmede kullanılmaktadır. Laktaz enzimiyle muamele edilmiş peynir suyu proteini gıda endüstrisinde şekerleme, fırın ürünleri ve urup üretiminde kayda değer uygulama alanı bulmaktadır.

Sindirilemeyen oligosakkaritlerden olan galakto-oligosakkaritler (GOS) 2-20 galaktoz ve bir glukoz molekülünden meydana gelirler. Sağlığa yararları, serumdaki kolesterol seviyesini azaltma, kolon kanserini nleme ve kalsiyum absorpsiyonunu arttırma eklindedir⁹⁵⁻⁹⁷. GOS’un onaylanmış sağlık yararları nedeniyle özellikle Japonya ve Avrupa’da GOS içeren gıdalara yönelik tüketici talepleri gün geçtikçe artmaktadır⁹⁸. GOS oluşumu insan sağlığına katkıları olan fonksiyonel prebiotik gıda içerikleri gibi kullanılabilir⁹⁹. Bu bileşikler bağırsakta bulunan yararlı bakterilerin gelişimini sağlayarak sindirime yardımcı olur¹⁰⁰. Son zamanlarda daha ucuz ve etkili bir yöntem olan GOS üretimine olan talep gittikçe artmaktadır¹⁰¹.

Diğer taraftan β -galaktosidaz ters hidroliz reaksiyonları veya transglukosilasyonla galaktooligosakkaritlerin (GOS) sentez edilme işlemlerinde de etkilidir. GOS probiotik oligosakkaritler içerisinde en umut verici olanlarıdır¹⁰¹.

2.5. PROTEAZLAR

İnsanoğlu uzun yıllardan beri peynir, şarap ve bira üretimi gibi birçok uygulamada enzimlerin katalitik aktivitelerinden faydalanmaktadır¹⁰². Mikrobiyal proteazlar hidrolitik enzimler arasında en önemli olanlarıdır ve enzimoloji bilimi ortaya çıktığından beri yaygın olarak incelenmişlerdir¹⁰³.

Proteazlar fizikokimyasal ve katalitik özelliklerinde muazzam farklılıklar göstermektedirler ve bu enzimlerle ilgili yapılan çalışmaların birçoğu biyokimyasal ve biyoteknolojik yaklaşımları içermektedir^{104,105}. Proteazlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalardan elde edilirler. Proteolitik enzimler proteinlerde bulunan peptid bağlarını hidroliz ederler ve peptidleri aminoasit birimlerine dönüştürürler, hem ekstrasellüler ve hem de intrasellüler olarak sentezlenirler¹⁰⁶.

Proteazlar fırınlama, bira yapımı, deterjanlar, deri uygulamaları, farmasötikler, etlerin yumuşatılması, kozmetik ürünleri, peptit sentezleri ve tıbbi teşhisler olmak üzere endüstriyel uygulamaların geniş bir kısmında önemli bir rol oynarlar^{103,106-109}. Bazı proteaz kaynakları ve endüstriyel uygulamaları Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Tablo 2. 3. Bazı Proteaz Kaynakları ve Endüstriyel Uygulamaları¹⁰²

Mikroorganizma	Proteaz Çeşidi	Endüstri
Bakteriler		
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Bacillus firmus</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Bacillus megaterium</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Bacillus pumulis</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Streptomyces fradiae</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Streptomyces griseus</i>	Alkalin, Nötral	Deterjan
<i>Streptomyces rectus</i>	Nötral	Deterjan, Deri, Gıda
<i>Bacillus subtilis</i>	Nötral	Deri, Gıda
<i>Bacillus cereus</i>	Nötral	Deri, Gıda
<i>Bacillus megaterium</i>	Nötral	Deri, Gıda
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nötral	Deri, Gıda
Fungi		
<i>Aspergillus niger</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Aspergillus sofae</i>	Alkalin, Nötral	Deterjan, Deri, Gıda
<i>Aspergillus oryzae</i>	Alkalin, Nötral	Deterjan, Deri, Gıda
<i>Aspergillus flavus</i>	Alkalin	Deterjan
<i>Pericularia oryzae</i>	Nötral	Deri, Gıda
<i>Endothia parasitica</i>	Asidik	Eczacılık, Gıda
<i>Mucor michei</i>	Asidik	Eczacılık, Gıda
<i>Mucor pusillus</i>	Asidik	Eczacılık, Gıda

2.5.1. Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar en önemli endüstriyel enzimler arasındadır. Proteolitik (protein sindirim) aktivite göstermeleriyle yüzyıllardır mandıra endüstrisinde peynir yapımı için süt-pıhtılaştırma ajanları (rennet) gibi kullanılmışlardır. Proteazlar çeşitli özelliklere sahiptirler:

- ❖ Proteazlar tüm yaşayan sistemlerde bulunur ve çeşitli metabolik reaksiyonları katalizleyerek normal ve anormal çevre şartlarında önemli rol oynarlar¹¹⁰.
- ❖ Proteazlar saprofitlerde proteinlerin parçalanması, gelişmiş organizmalarda peptidazlar ile proteinlerin belirli sinyal dizilerindeki bağların koparılması gibi çok yönlü bir role sahip olmaları ile biyosferdeki etkilerini açıkça göstermektedirler¹⁰².
- ❖ Proteazlar protein moleküllerindeki peptit bağlarını yıkarak molekülleri aminoasitlere ayrıştıran hidrolitik reaksiyonları katalizlerler¹¹⁰.
- ❖ Bu enzimler substrat özgünlüğü, aktif merkez ve katalitik mekanizma, optimum pH-sıcaklıklarda stabil olmaları gibi çeşitli özelliklere sahip farklı yapıdaki kompleks enzimlerin geniş bir kısmını oluştururlar¹¹⁰.
- ❖ Proteolitik enzimlerin spesifikliğı aminoasitlerin yapısı ve diğer fonksiyonel gruplar (aromatik, alifatik ve sülfür içerenler) tarafından kontrol edilmektedir¹¹⁰.
- ❖ Bu enzimler sadece proteolitik reaksiyonları gerçekleştirmezler aynı zamanda karbonhidratlar ve yağların yıkımını içeren tüm metabolik reaksiyonları etkileyerek değişik metabolik reaksiyonları da düzenlerler¹¹⁰.

Mikroorganizmalardaki proteolitik enzimler hücre içinde (intraseküler), hücre duvarı ile ilişkide (periplazmik) bulunurlar ve ortama salgılanırlar (ekstraseküler). Ekstraseküler enzimler genelde sellüloz, protein, nişasta gibi çözünmeyen besinlerin sindirimini gerçekleştirirler ve sindirim sonucu meydana gelen ürünler büyüme için gerekli besinler şeklinde kullanılmak üzere hücre içine alınırlar^{103,111,112}.

İntraseküler proteazlar sporlanma, farklılaşma, protein yıkımı, enzim ve hormonların üretimi, hücresel protein rezervlerinin onarımı gibi çeşitli metabolik olaylarda rol oynamaları ile hücreler için önemlidirler¹⁰³.

2.5.2. Mikrobiyal Proteaz Sistem Çeşitleri

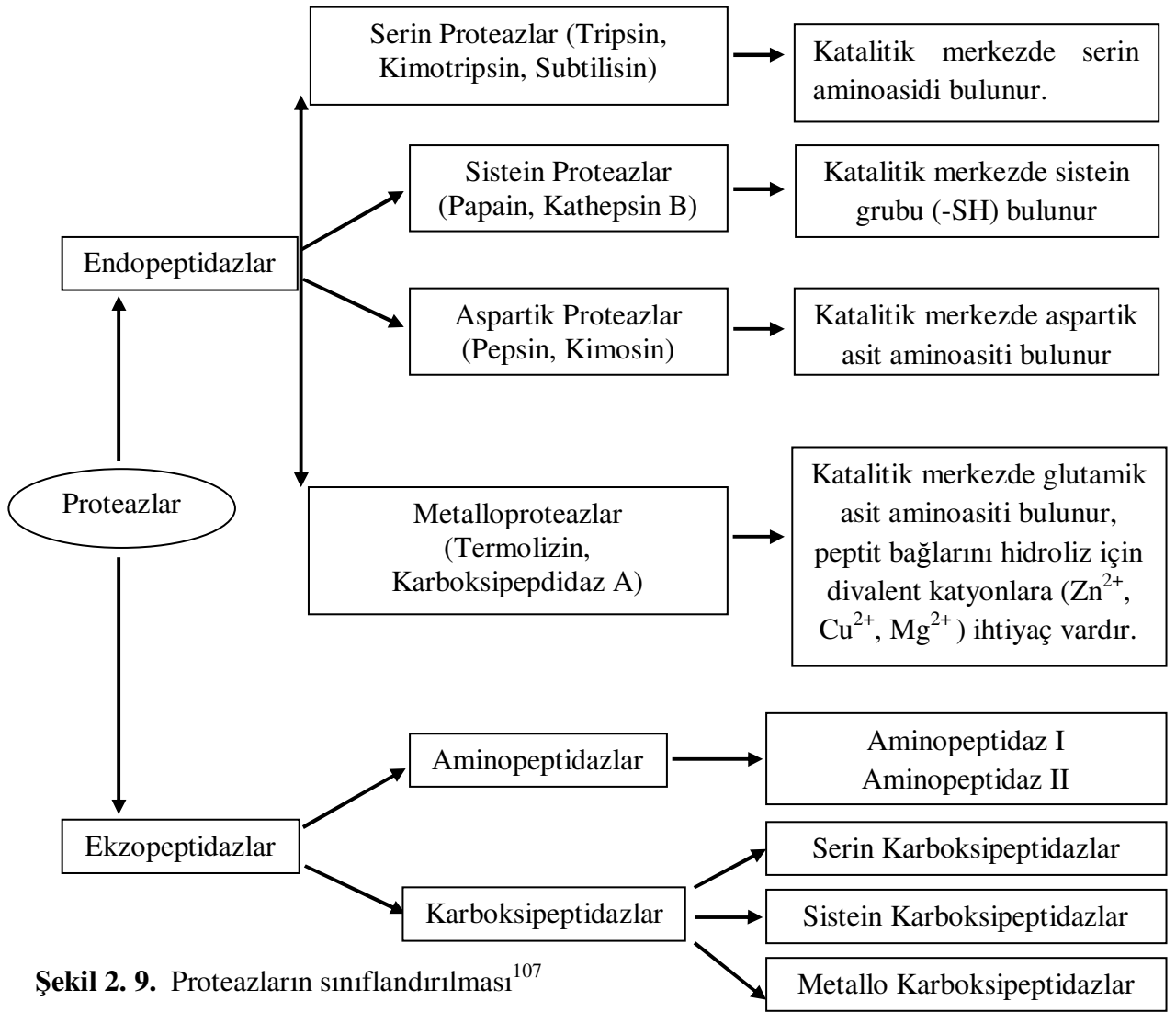
Etki özelliklerine bağlı olarak Uluslararası Biyokimya Birliği proteazları başlıca peptidazlar ve proteinazlar olmak üzere iki büyük gruba ayırmışlardır. Peptidazlar daha sonra aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılmıştır¹¹⁴:

- 1- Reaksiyon katalizi
- 2- Katalitik bölgenin kimyasal yapısı
- 3- Yapı ile bağlantılı evrimsel ilişkiler

Proteinlerin iç kısmında bulunan peptit bağlarını kıran mikrobiyal proteazlar spesifiteleri ve aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruplarına göre bir kez daha 4 gruba ayrılmışlardır^{104,107}.

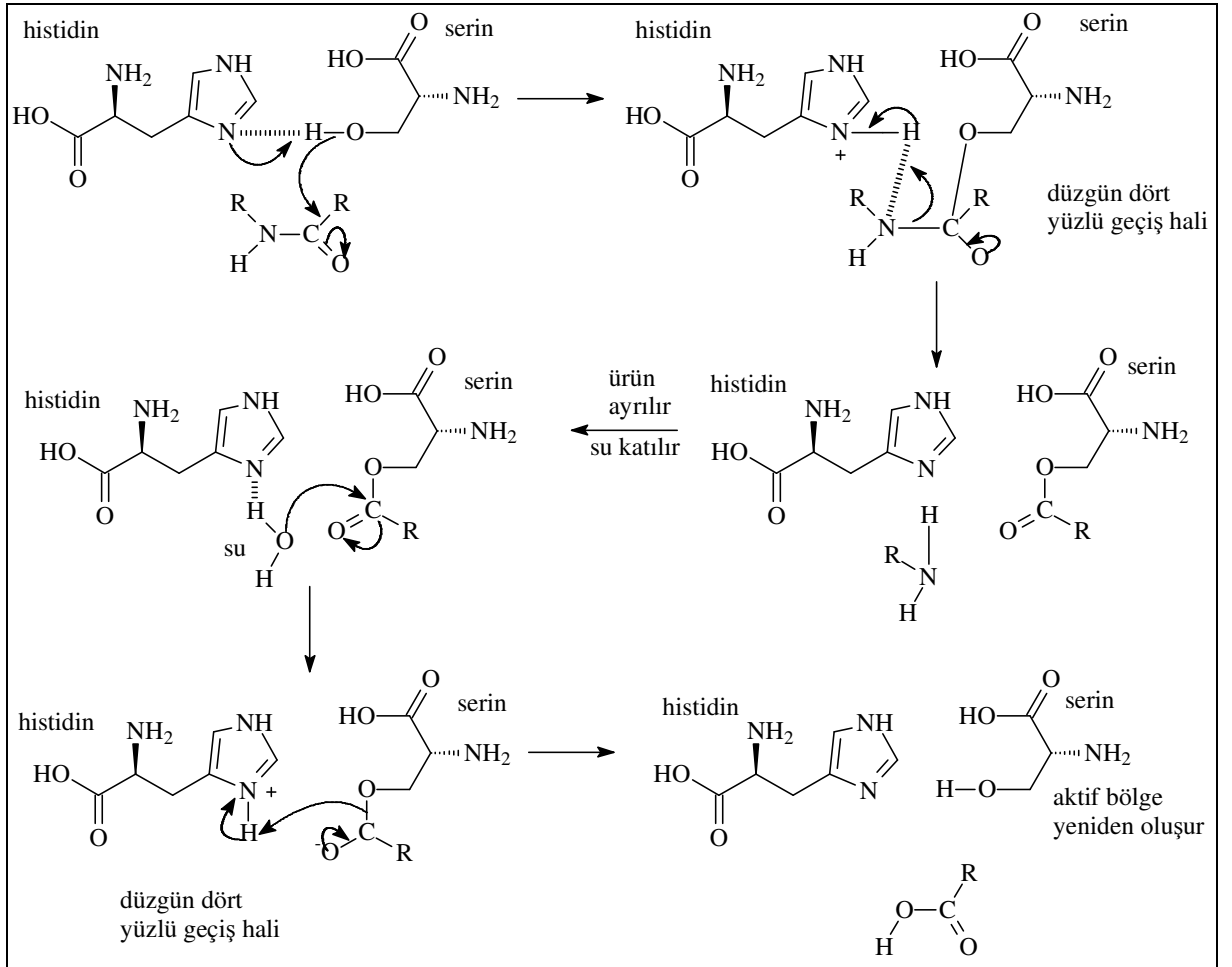
- Serin proteazlar (EC. 3.4.21)
- Sistein proteazlar (EC. 3.4.22)
- Aspartik proteazlar (EC. 3.4.23)
- Metalloproteazlar(EC. 3.4.24)

Proteazların sistematik dağılımı Şekil 2.11’de verilmiştir.



Şekil 2. 9. Proteazların sınıflandırılması¹⁰⁷

Genelde proteazlar aktif merkezlerinde katalitik bir üçlüye sahiptirler. Bu üçlü katalizin meydana geldiği aktif merkezde bulunmaktadır. Örneğin tüm serin proteazlarda bu bölge korunmaktadır. Katalitik üçlüyü histidin (His 57), serin (serin 195) ve aspartik asit oluşturmaktadır. Bu aminoasitler birbirlerine yakın olarak bulunmaktadır ve proteazların hidroliz yeteneğinde önemli rol oynamaktadırlar¹¹⁵. Şekil 2.10.'da serin proteazın etki mekanizması verilmiştir.



Şekil 2. 10. Serin proteazın etki mekanizması. Substrat olan polipeptit serin proteaz enziminin yüzeyine bağlanır, bu olay şu şekilde gerçekleşir açılan peptit bağı aktif merkezin içine yerleşir bu bağı karbonil karbonu ile nükleofil serin yakın şekilde konumlanır. Serin aminoasidindeki –OH grubu karbonil karbonuna atak yapar ve histidin azotu serin –OH grubundan hidrojen alır, karbonil oksijenin çift bağından bir elektron çifti oksijene geçer. Sonuç olarak bir tetrahedral yapı meydana gelir. Peptit bağındaki azot ve karbon bağı katılmadan bozulur. Bu bağda meydana gelen kovalent elektronlar histidin hidrojenine atak yaparak birleşmeyi engeller. Daha önce karbonil oksijen çift bağından ayrılan elektronlar yeniden bağa gelir ve bir açıl-enzim ara ürünü oluşur. Reaksiyona su katılır. Su kırılan peptit bağına N-terminaline geçer ve karbonil karbonuna atak yapar. Birkez daha çift bağdaki elektronlar oksijene geçer ve negatifleşir, su molekülündeki oksijen ile karbon arasında bağ oluşur. Bu

sudan gelen bir protonu alan histidindeki azot tarafından koordine edilmektedir. Genel olarak, bu olayla bir başka tetrahedral ara ürün oluşur. Son basamakta, serin ve karbonil karbonu arasında meydana gelen bağ histidine hidrojenine atak eder. Elektronu eksik karbonil karbonu yeniden oksijen ile çift bağ oluşturur. Sonuç olarak peptidin C-terminali ortaya çıkar¹¹⁵.

2.5.3. Proteaz Kaynakları

Proteolitik enzimler bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklarda bulunmaktadır. Bununla birlikte, mikroorganizmalar geniş biyokimyasal çeşitlilik göstermeleri ve genetik manipülasyonlara uygun olmalarından dolayı proteaz kaynakları olarak tercih edilmektedirler (Tablo 2.7). Mikroorganizmalar proteinleri parçalayarak meydana gelen ürünleri besin olarak büyümeleri için kullanılmaktadırlar. Bunlar arasında fungusların enzim üretiminde kullanımları birçok avantaj sağlamaktadır. Enzimlerin doğal olarak ekstrasellüler olmaları fermentasyon ortamından geri kazanımlarını kolaylaştırmaktadır¹⁰².

2.5.4. Proteaz Üretimi

Ekstrasellüler proteazlar ticari olarak değerlidirler ve çeşitli endüstrilerde birçok uygulama alanına sahiptirler. Proteazların üretimi için birçok mikrobiyal kaynak mevcut olmasına rağmen ticari olarak sadece birkaç güvenilir tür bilinmektedir¹¹⁶.

Geleneksel olarak proteazların ticari üretimleri submerged fermentasyonunun (SmF) kullanılmasıyla başarılmıştır. Ancak KSF enzim üretimlerinde büyük bir potansiyele sahip olduğu kabul edilmektedir.

Proteolitik enzimler dünya endüstriyel enzim pazarının % 60'ını meydana getirirler. Bu enzimler biyoteknolojik faaliyetlerin büyük bir bölümünde uygulama alanı bulurlar ve birçok endüstriyel alanlarda kullanılırlar¹¹⁴. Proteaz çeşitlerinden olan alkalik proteazlar gıda, deri, eczacılık ve deterjan endüstrileri gibi çeşitli endüstrilerde yaygın kullanımlarından dolayı en fazla çalışılmış enzim gruplarından biridir^{117,118}. Aynı zamanda protein ultrafiltrasyonunda membran temizliği için kullanılmışlardır¹¹⁹. Değişik uygulamalardan biri de alkalik proteazların başlıca

deterjan endüstrisinde kullanımına yöneliktir. Alkalin proteazlar çeşitli deterjanlarda ve otomatik çamaşır makinesi deterjanlarında kullanılırlar. Proteinli lekeleri parçalama aktivitesi gösterirler¹⁰⁵. Mikrobiyal proteazlar bakteri, fungi ve mayaların kullanılması ile katı- faz fermentasyonu ve submerged fermentasyonu gibi çeşitli yöntemlerle üretilirler¹²¹⁻¹²³.

Genel olarak mikroorganizmaların meydana getirdiği proteazlar doğada temel ve kısmen birçok kültür şartlarında indüklenirler. *Bacillus* türleri logaritmik artış öncesi ve durağan fazlarda ekstraselüler proteazları üretirler¹⁰². Mikroorganizmaların ürettiği ekstraselüler proteazlar aynı zamanda C/N oranındaki farklardan, glukoz gibi kolay metabolize edilen şekerler ve metal iyonları gibi ortam bileşenlerinden yoğun şekilde etkilenirler^{118,119,123,124}. Proteaz sentezi ortamdaki aminoasitler gibi hızlı metabolize edilebilen azot kaynaklarından da etkilenir¹⁰³. Ayrıca havalandırma, inokülüm konsantrasyonu, pH ve inkübasyon sıcaklığı gibi bazı diğer fiziksel faktörlerde proteaz sentezini etkilerler^{124,125}.

2.5.5. Proteazların Uygulama Alanları

Proteazların bazı endüstriyel alanlardaki uygulamaları Tablo 2.4'de verilmiştir.

Tablo 2. 4. Proteazların Bazı Endüstriyel Alanlardaki Uygulamaları^{103,107,113}

Endüstri	Proteaz	Uygulama
Ekmek yapımı	Nötral proteaz	Hamur kalitesini arttırma
İçecek	Papain	Soğuktan etkilenmeme, içeceklerde bulanıklığın giderilmesi
Mandıra	Fungal proteazlar, simozin, diğer proteazlar	Sığır renneti yerine kesilmiş süt suyunun işlenmesi, modifiye peynir enzim üretimi
Deterjan	Alkali proteaz, subtilisin	Giysilerdeki protein lekelerinin uzaklaştırılması
Gıda üretimi	Bazı proteazlar	Soya protein veya buğday gluteni gibi zengin protein metaryallerinin modifikasyonu

Deri	Tripsin, diğer proteazlar	Derinin asitlenmesi, derilerden tüylerin uzaklaştırılması
Et ve balık	Papain, diğer proteazlar	Et yumuşatılması, kemik ve balık atıklarından protein eldesi
Tıp	Tripsin	Ölü dokunun uzaklaştırılması, kan pıhtısını çözme, doku iltihaplarının azaltılması, tıbbi ürünlerin geliştirilmesi, kontakt lensler ve takma dişlerin temizlenmesi
Fotoğraf	Bazı proteazlar	Kullanılan X-ışını ve fotoğraf filmlerinden gümüş eldesi
Tatlandırma	Termolizin	Aspartam sentezinde revers hidroliz
Endüstriyel ve Evsel Atıkların İşlenmesi	Bazı proteazlar	Gıda endüstrilerinde ve evsel faaliyetler sonucu meydana gelen atıkların işlenmesi

2.5.5.1. Fırında Pişirme Uygulamaları

Proteazlar hamur karıştırılması ve fermantasyon aşamalarında ortama ilave edilerek hamur vizkozitesi, yoğurmaya karşı direnç ve yoğurma zamanının azalması sağlanır ve böylece vizkoelastik özellikler iyileşir⁶⁶. Proteazın etkisiyle hem hamurun makine ile işlenebilirliği artar hem de ekmek içi yapısı gelişir^{72,125}.

2.5.5.2. Deterjan Endüstrisi

Proteazlar süt ve protein kaynaklı lekelerdeki proteinli maddelerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için 50 yıldan fazladır çamaşır deterjanları içine katılmaktadırlar ve geleneksel deterjan teknolojileriyle sağlanamayan eşsiz yararlar sağlamaktadırlar¹⁰⁷.

Proteazlar sadece belirgin şekilde meydana gelen kan lekeleri gibi lekeleri uzaklaştırmaz, aynı zamanda süt, yumurta, et ve balık gibi gıdalar ve vücut salgılarından kaynaklanan proteinli lekeleri de uzaklaştırılmasını sağlamaktadırlar⁸⁶. Protezlar aynı zamanda kuru temizlemede kullanılırlar. Proteinli maddeler proteazlar

tarafından daha küçük moleküllere dönüştürülerek daha sonra diğer solventler tarafından uzaklaştırılırlar^{103,113,126-130}.

2.6. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Krishna ve arkadaşları, KSF yöntemiyle pirinç kabuklarını substrat olarak kullanarak *B. subtilis* CBTK 106'dan α -amilaz üretimini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada substrat parça büyüklüğü, ortam pH'ı, başlangıç nem oranı, inkübasyon sıcaklığı, ortama eklenen karbon ve azot kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Uygun parçacık büyüklüğünü 400 μ m, uygun başlangıç nem seviyesini %70, uygun inkübasyon sıcaklığını 35 °C, uygun pH'ı 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Azot kaynağı olarak %1'lik amonyum nitrat, amonyum sülfat ve %0.5'lik et özütü veya peptonun enzim sentezini artırdığını belirlemişlerdir. Karbon kaynaklarından %0.1'lik nişasta, maltoz, glukoz ve sükrozun enzim sentezini arttırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca %1'lik NaCl ve KCl'nin enzim sentezini arttırdığını belirlemişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 24. saatte elde etmişlerdir¹³¹.

Baysal ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada KSF koşullarında buğday kepeği ve pirinç kabuğunu substrat olarak kullanarak termotolerant *B. subtilis*'ten α -amilaz üretimini inceleyerek üretim koşullarını optimize etmişlerdir. α -Amilaz üretimi üzerine uygun inkübasyon periyodu, nem içeriği, parçacık büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyon etkileri belirlenmiştir. Substrat olarak buğday kepeği ve pirinç kabuğu 0.1 M fosfat tamponu (pH:7.0) ile %30'luk nem içeriği kullanılarak maksimum ürün miktarı 24. saatte 159.520 U g⁻¹ ve 48. saatte 21.760 U g⁻¹ olarak elde edilmiştir. Buğday kepeği için parçacık büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonu 1000 μ m ve %20, pirinç kabuğu için parçacık büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonu 500 μ m ve %15 olarak belirlenmiştir. Buğday kepeği ile pirinç kabuklarının kullanılması ile meydana gelen enzim miktarları karşılaştırıldığında buğday kepeğinden elde edilen

enzim miktarının pirinç kabuğuna göre 7.3 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir⁴⁴.

Kıran ve arkadaşları, *Bacillus* sp. K-12'den α -amilaz üretimi üzerine çeşitli kimyasallar ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Toprakta izole edilen *Bacillus* sp. K-12 suşu kullanılarak 20–55 °C sıcaklıklar arasında araştırmalar yapmışlar ve optimum sıcaklığı 42 °C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelediklerinde pH 4.5-10.5 arasında değişen enzim aktiviteleri bulmuşlardır. Karbon kaynağı olarak %1 nişasta içeren ortamda maksimum α -amilaz üretimini elde edilmiştir. EDTA, MgSO₄ ve ZnSO₄ kullanımında α -amilaz üretiminin inhibe olduğunu saptamışlardır¹³².

Jyoti Shukla ve Rita Kar, patates kabuğu ve buğday kepeğini KSF koşullarında substrat olarak kullanıp termofilik *B. licheniformis* ve *Bacillus subtilis* izolatlarında α -amilaz üretimini karşılaştırdıklarında en iyi substratın patates kabuğu olduğunu saptamışlardır. Optimum koşullar altında *B. licheniformis* patates kabuğu üzerinde 270 ünite/mL ve buğday kepeği üzerinde 175 ünite/mL α -amilaz üretimi gerçekleştirmiştir. *B. subtilis* ise patates kabuğu üzerinde 600 ünite/mL, buğday kabuğu üzerinde ise 265 ünite/mL α -amilaz üretimi gerçekleştirmiştir. *B. licheniformis*'in ürettiği enzim optimum olarak 90 °C'de pH 9.0 aktif iken, *B. subtilis*'in ürettiği enzimin optimum olarak 60°C'de, pH 7.0'da aktif olduğu belirlenmiştir¹³³.

Xu Dong Liu ve Yan Xu, yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. YX-1 izolatından doğal olarak nişastayı hidroliz eden α -amilazı saflaştırılıp karakterize etmişlerdir. Maksimum α -amilaz aktivitesini (53 U mL⁻¹) 45°C'de 44 saat inkübasyondan sonra elde edilmiştir¹³⁴.

Singh ve Verma, *B. subtilis* ATCC 6633'ten α -amilaz üretimini incelemişlerdir. (g/l): 20 nişasta, 5.6 (NH₄)₂NO, 0.5 MgSO₄; 0.1 CaCl₂, 5 trisodyum asetat, 10 pepton ve pH 7.0 içeren 50 mL besiyeri ortamında *B. subtilis* inoküle edilmiş ve 250

rpm'de orbital shaker içerisinde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri tarafından üretilen amilazın spesifik aktivitesi 29.341 IU/mg, optimum pH'sı 7.0 ve optimum sıcaklığının 60°C olduğu belirlenmiştir¹³⁵.

Ashis ve arkadaşları, KSF ile termofilik bir tür olan *B. subtilis* DM-03 tarafından salgılanan α -amilaz üretimini incelemek için çeşitli tarım endüstrisi atıkları üzerine araştırma yapmışlardır. α -Amilaz üretimi için en iyi substratın patates kabuğu olduğunu bulmuşlardır. KSF koşulları altında kuru substratın her gram başına 72. saatte optimize edilmiş *B. subtilis* DM-03'in 532 U/mg α -amilaz ürettiği belirlenmiştir. Yapılan denemelerde *Bacillus subtilis* DM-03 türünden elde edilen saf α -amilazın ticari çamaşır deterjan formülasyonlarını kapsayan çamaşır deterjanları ile mükemmel bir stabilite ve uygunluk gösterdiği belirlenmiştir¹³⁶.

Chakraborti ve arkadaşları, ekstrasellüler β -galaktosidaz üreten *Bacillus* sp. MTCC 3088'i incelemişlerdir. Enzim aktivitesi laktoz hidrolizinin son ürünü olan galaktoz tarafından (%68) kuvvetli şekilde inhibe olmuştur. Enzim aktivitesi 1-2.5 mM konsantrasyonundaki Mg^{+2} iyonlarının enzim aktivasyonu için iyi bir aktivatör olduğu belirlenmiştir. Ancak enzim Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Ag^{+} gibi metal iyonları tarafından inhibe olmuştur. Metal bağlayıcı ajan olan EDTA katalitik aktiviteyi etkilememiştir¹³⁷.

Batra ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada *B. coagulans* RCS3'ün yüksek oranda β -galaktosidaz ürettiğini tespit etmişlerdir. 50 °C'de enzim maksimum aktivite göstermiştir. β -galaktosidaz pH 5.0-8.0 aralığında stabil özellik göstermiştir. Galaktoz hidrolizi sonucu enzim kuvvetli şekilde inhibe olmuştur. 0.5-2.0 mM konsantrasyonundaki bivalent katyonlar (Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Hg^{+2}) varlığında enzim aktivitesinde inhibisyon gözlenmiştir¹³⁸.

Todorova-Balvay ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada bir mutant tür olan *Aspergillus oryzae* H26-10-7'nin ürettiği ekstrasellüler β -galaktosidazı incelemişlerdir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 113 kDa olarak saptanmıştır. Mutant türün meydana getirdiği enzim yabancı fungal tipin meydana getirdiği enzimle

karşılaştırıldığında sentetik substrat olan o-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid'i (ONPG) beş kat daha fazla parçaladığı belirlenmiştir. Aynı zamanda mutant enzim yabani tiple karşılaştırıldığında sıcaklığa karşı daha stabil olduğu saptanmıştır¹³⁹.

Konsoula ve Kyriakides, yaptıkları çalışmada karbon, organik azot ve kompleks organik kaynaklar şeklinde üç kategoriye ait besinleri taze koyun sütünden izole ettikleri *Bacillus subtilis*'in ekstrasellüler termostabil α -amilaz ve β -galaktosidaz üretimleri üzerindeki etkilerini araştırmak için kullanmışlardır. Test edilen organik azot kaynakları arasında tripton ve mısır meserasyon sıvısı enzim üretimini arttırmıştır. Mısır unu gibi çeşitli nişastalı substratlar, çözünür nişastanın yerine kullanıldığında her iki enzim ürünlerine pozitif etki göstermiştir. Ayrıca her iki enzimin iki kat daha yüksek üretimi, mısır meserasyon sıvısı, tripton ve değişik unların birlikte kullanımı ile başarılmıştır. İncelenen divalent katyonlar arasında kalsiyum iyonlarının α -amilaz üretimi için yaşamsal önemde olduğu görülmüştür. *B. subtilis* tarafından üretilen saf α -amilaz ve β -galaktosidaz maksimal aktivitelerini sırasıyla 135°C ve 65°C'lerde göstermişlerdir ve yüksek sıcaklıklarda önemli derecede stabil oldukları bulunmuştur¹⁴⁰.

Alazzeh ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada *Lactobacillus reuteri*'nin (*L. reuteri*) altı türünde β -galaktosidaz üretimini altı farklı karbon kaynağı ve dört farklı azot kaynağını kullanarak incelemişlerdir. *L. reuteri* laktoz bulunan ortamda üretildiğinde diğer karbon kaynaklarına göre en yüksek β -galaktosidaz üretimi (43.82 Gal U/mL) gerçekleşmiştir. *L. reuteri* CF2-7F türü laktozlu ortamda üretildiğinde en yüksek β -galaktosidaz üretimi (82.01 Gal U/L) meydana gelmiştir. *L. reuteri* MM2-3 ve *L. reuteri* CF2-7F türleri yeast ekstrakt bulunan ortamda üretildiklerinde en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi (sırasıyla 18.1 ve 17.59 Gal U/ml) gerçekleşmiştir. Raffinoz ve laktoz β -galaktosidaz üretimi için en iyi karbon kaynakları olarak belirlenmiştir. Yeast ekstrakt β -galaktosidaz için en iyi azot kaynağı olduğu ve *L. reuteri* CF2-7F türünün incelenen tüm şartlarda en iyi enzim üreticisi olduğu belirlenmiştir¹⁴¹.

Kumar, B. pumilus MK6-5'i %1 süt tozu, %0.25 mısır meserasyon sıvısı, %1 glukoz, %0.5 tripton, %1 sodyum sitrat, %0.02 MgSO₄.7H₂O ve % 0.65 Na₂CO₃ içeren bir ortamda 35 °C'de, pH 9.6' da, 250 rpm'de ve 60 saat inkübasyona bıraktığında serin alkalın proteaz üretmeyi başarmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 28 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimal olarak pH 11.5 ve 55-60°C'de aktif olduğu tespit edilmiştir. PMSF enzimi inhibe etmiştir. Bu yönüyle enzimin serin alkalın proteaz olduğu düşünülmektedir¹⁴².

Uyar ve Baysal, Bacillus sp.'yi kullanarak KSF tekniği ile mercimek kabuğu ve buğday kepeği bulunan ortamda alkalın proteaz aktivitesini incelemişlerdir. Buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı KSF'li besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi belirlenmiştir¹⁴³.

Joo ve Chang, SmF yöntemini kullanılarak üretilecek enzimin deterjan katkı maddesi gibi kullanımına yönelik SDS-stabil alkalın proteaz üreten *B. clausii* I-52 ile oksidant enzim üretimi üzerine inceleme yapmışlardır¹⁴⁴.

Wei-Hua Chu, ekstrasellüler alkalın proteaz üretme yeteneğinde olan 34 türü topraktan ve değişik çevrelerden izole etmiştir. *Bacillus* sp. APP1 türü ile en yüksek alkalın proteaz aktivitesi elde edilmiştir. Maksimum enzim üretimi için kültür şartları optimize edilmiştir. Ortam başlangıç pH'sı 9.0 olduğunda, maksimum proteolitik aktivite (2,560 U mL⁻¹) değeri 48. saatten sonra (g⁻¹): 15 soya unu, 30 buğday unu, 4 K₂HPO₄, 1 Na₂HPO₄, 0.1 MgSO₄.7H₂O ve 6 Na₂CO₃ içeren ortamdan elde edilmiştir. Alkalın proteaz 72. saatte %5 SDS ve %5 H₂O₂ gibi SDS ve oksitleyici ajanlar varlığında stabilite göstermiştir¹⁴⁵.

Nadeem ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada alkalofilik *B. licheniformis* N-2 tarafından meydana getirilen proteaz üretimini g/L'de 10 glukoz, 10 soya unu, 3 K₂HPO₄, 0.5 MgSO₄.7H₂O ve 0.5 CaCl₂ içeren 50mLkültür ortamında gerçekleştirmişlerdir. Farklı karbon ve azot kaynakları organik ve inorganik formda ve yağı çıkarılmış unlar uygun substratı belirlemek için kullanılmıştır. En yüksek

alkalin proteaz aktivitesi (677.64 U/mL) buğday kepeği, çözümlü nişasta ve glukoz içeren ortamda elde edilmiştir. Değişik azot kaynakları arasında soya unu alkalin proteaz üretimini en iyi şekilde indüklemiştir. İnorganik azot kaynaklarından amonyum tuzları %96 oranında enzim üretimini baskılamıştır. Termostabilite çalışmalarında enzim 10 mM Ca²⁺ iyonları varlığında 12 saat 40°C'de kaldıktan sonra %80 oranında aktifliğini korumuştur. Enzim pH:8.0-11.0 gibi geniş bir aralıkta aktif olarak kalmış ve pH:12.0'da aktivitesini %52 oranında korumuştur. Enzim, Tween 20, Tween 45, Tween 65, Triton X-45, H₂O₂ ve sodyum perborat gibi kimyasallarla %1 konsantrasyonunda muamele edildikten sonra enzim aktivitesini sırasıyla %105, %82, %116, %109, %135 ve %126 oranlarında koruyabilmiştir¹⁴⁶.

Hmidet ve arkadaşları, alkalofilik özellik gösteren *B. licheniformis* NH1 türünün beş önemli ekstrasellüler proteaz ve bir α -amilaz ürettiğini belirlemişlerdir. Proteolitik aktivite için optimum pH 10.0 ve optimum sıcaklık olarak da 70°C'ye, α -amilazın ise optimum pH 6.5 ve optimum sıcaklık olarak da 90°C'ye ihtiyaç duyduğunu saptamışlardır. Alkalin proteazlar ve termostabil α -amilaz 40°C'de 1 saat bekletildikten sonra noniyonik ve anyonik oksitleyici surfaktantlar varlığında ve ilişkili olarak oksitleyici ajanlara karşı ekstrem derecede stabilite göstermişlerdir. Ayrıca saf enzim çeşitli katı ve sıvı deterjanlar ile kusursuz bir uyum ve stabilite göstermiştir¹⁴⁷.

4. MATERYAL ve METOT

4.1. MATERYAL

4.1.1. Mikroorganizma seçimi

Çalışmalarımızda, Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Kültür Suşları Bölümünden *Bacillus subtilis* RSK 96, Doç.Dr. Zübeyde BAYSAL tarafından Van Gölü kıyısından izole edilen ve ODTÜ Ref-Gen Teknokent'te teşhis edilen yabancı suş *Bacillus licheniformis* ve MicroBioLogics Inc.'ten temin edilen *Bacillus licheniformis* ATCC12759 kullanılmıştır.

4.1.2. Substrat seçimi

Çalışmamızda substrat olarak, çevremizdeki tarımsal ürün atıklarından buğday kepeği, pirinç kabuğu, muz kabuğu, mercimek kabuğu, portakal kabuğu, elma kabuğu, pamuk sapı, öğütülmüş darı ve mısır kaba unları kullanılmıştır.

4.1.3. Substrat parça büyüklüğü

Çalışmamızda kullanılan bitkisel atıklardan; buğday kepeği, pirinç kabuğu, muz kabuğu, mercimek kabuğu, portakal kabuğu, elma kabuğu, pamuk sapı öğütüldükten sonra ve öğütülmüş darı ve mısır unları 4 farklı elek (500 µm, 1000 µm, 1500 µm, 2000 µm çaplı) yardımıyla elendi ve 100°C'de 2 saat kurutuldu. Elde edilen farklı substratlardan 1500 µm çapındaki parçalar kullanılıp enzim üretimi sağlandı.

4.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Folin-Ciocalteu's ayıracı (FCR), tris-hidroksimetilaminometan, sodyum di hidrojen fosfat (NaH₂PO₄), di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), sodyum hidroksit (NaOH), trikloroasetik asit (TCA), Tris-base [Tris (hydroxymetyl), triton X-100, sodyum sitrat, sodyum-potasyum tartarat MERCK'ten, hidroklorik asit (HCl) ve NaCl Riedel-de Hean' dan, azocasein, sodyum karbonat (Na₂CO₃), 3,5-

Dinitrosalicylic acid (DNS), 2- Nitrophenly β -D-galaktoprynoside SIGMA' dan temin edilmiştir.

4.1.4.1. Azot kaynakları

Pepton, beef extract, kazein, OXOID'den, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl) Riedel-de Haen'dan, sodyum nitrat (NaNO_3), üre, amonyum sülfat (NH_4)₂SO₄, yeast extract MERCK'ten, tryptone DIFCO'dan ve soya unu BUNSA Hayat Gıda San. A.Ş.'den temin edilmiştir.

4.1.4.2. Karbon kaynakları

Mannoz, ksiloz, laktoz, sukroz, fruktoz ve galaktoz SIGMA'dan, çözünür nişasta, glukoz ve gliserol MERCK'den, arabinoz DIFCO'dan, patates nişastası, mısır nişastası, buğday unu ve pirinç unu BAŞAK Tüketim Gıda A.Ş.'den, mısır unu BUNSA Hayat Gıda San. A.Ş.'den, buğday nişastası SÖKE Tekstil San. Tic. A.Ş'den temin edilmiştir.

4.1.4.3. Aminoasitler

L- fenilalanin, L-tirozin, L-lizin, L-sistein ve L-metyonin MERCK'ten, glisin, glutamik asit, L-alanin, L-triptofan, L-izolözin, L-valin SIGMA'dan temin edilmiştir.

4.1.4.4. Deterjanlar

Sodyum dodesil sülfat (SDS), CHAPS (3-[(3-Cholamido-propyl)-dimethylammonio]-propane- sulfonate), tween-40 MERCK'ten, triton-X 100 Sigma'dan temin edilmiştir.

4.1.4.5. Metal Tuzları

FeSO₄.7H₂O, CaCl₂ ve MgSO₄.7H₂O MERCK'ten CuSO₄.5H₂O Riedel-de Haen'dan ZnSO₄.7H₂O AnalaR'dan temin edilmiştir.

4.1.4.6. Besi Yeri Maddeleri:

Nutrient Broth (NB) OXOID'den, yeast extract, sodyum klorür (NaCl), tryptone ve agar MERCK'ten temin edilmiştir.

4.1.5. Kullanılan Besiyerleri

4.1.5.1. Sıvı Besiyeri:

Luria Broth (LB): 10 g yeast extract, 5 g NaCl, 5 g tryptone 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

Nutrient Broth (NB): 8 g nutrient broth 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

Spizizen (SP):

14 g $K_2 HPO_4$

6 g KH_2PO_4

2 g Amonyum Sülfat

1 g Sodyum Sitrat

0,2 g $MgSO_4$ 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra % 1 glikoz eklendi.

A besiyeri:

5 g pepton

5 g yeast ekstrakt

5 g Na_2CO_3

1 g KH_2PO_4

0,2 g $MgSO_4$ 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra % 1 glikoz eklendi.

B besiyeri:

5 g pepton

5 g yeast ekstrakt

1 g KH₂PO₄

0,2 g MgSO₄ 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra % 1 glikoz eklendi.

4.1.5.2. Katı Besiyeri:

10 g yeast extract, 5 g NaCl, 5 g tryptone ve 15 g agar, 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

4.1.5.3. SmF Besiyeri

0.2 g yeast extract, 0.1 g NaCl, 0.1 g tryptone (LB) 100 mL'lik erlenmayerler içinde 20mLsaf suya tamamlanıp otoklavlandı.

0.16 g NB. 100 mL'lik erlenmayerler içinde 20 mL saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

4.1.5.4. KSF Besiyeri:

Kurutulmuş bitkisel atıklar, besiyeri ortamında %30 (w/v) olacak şekilde 3 g 1500 µm parça büyüklüğündeki substratlardan kullanılarak 100 mL'lik erlenmayerlere bırakıldı. Üzerlerine çeşme suyu eklenerek 10 mL'ye tamamlanarak otoklavlandı.

4.1.6. Kullanılan Aletler:

İnkübatör (Sanyo)

Steril Kabin (Telstar AV-100)

Spektrofotometre (Varian Carry U.V. Visible)

Spektrofotometre (U.V-VIS SHIMADZU 1240)

Çalkalayıcı (Julobo)

Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K15)

Vorteks (Stuart)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Deep-Freeze (Harris, -70°C)

Etüv (Heraus)

Dijital Göstergeli Hassas Terazi (GEG, AVEY, 0,0001)

Otoklav (HIRAYAMA)

Su Banyosu (Grant 6G, -20, +100°C)

pH metre (Jenvay 3010, PCP J01 elektrod)

Sterilizatör (Heraus)

Blender (Waring)

Mikropipet (Gilson)

Magnetik Karıştırıcı (Heidolph)

Mikropipet (Eppendorf)

4.2. METOT

4.2.1. Mikroorganizmaların Üretilmesi

Van Gölü kıyısından izole edilen ODTÜ Ref-Gen Teknokent'te teşhis edilen yabani suş *B. licheniformis*, MicroBioLogics, Inc.'ten temin edilen *B. licheniformis* ATCC12759 ve Refik saydam Hıfızlıha Enstitüsü Kültür Suşları Bölümünden temin edilen *B. subtilis* RSK96 saklanma koşullarından (-20°C) çıkarılıp 37°C'de 24 saat boyunca LB besiyerinde üretildi. α -Amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz üretimleri için LB sıvı besiyeri kullanıldı. Bu besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

100 mL'lik erlenmayerlerde 20mL farklı sıvı besiyeri içeren ortamlara 100 μ L örnek eklenerek, mikroorganizmalar 0.6 absorbansa gelecek şekilde 37°C'de 24 saat süreyle üretildi. Buradan alınan 100 μ L örneğin, %0.5 olacak şekilde taze LB besiyerine ekimi yapıldı. Ardından 37°C'de 150 rpm'de 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürelerin sonunda örnekler +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre sporlardan arındırıldı. Enzim aktivitesi ve optimizasyon çalışmaları için üst sıvı kullanıldı.

4.2.2. Çözeltiler

Çözeltilerin hazırlanması **Ekler (Ek1-9)** kısmında verilmiştir.

4.2.3. Enzim Ekstraksiyonu

4.2.3.1. SmF Besiyeri

Bakteriyel kültür ortamında bulunan enzimi ekstrakte etmek için SmF besiyeri ortamından deney tüplerine örnekler alınarak +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücrelerden arındırıldı. Süpernatant üzerinden α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.3.2. KSF Besiyeri

Bakteriyel kültür ortamında bulunan enzimi ekstrakte etmek için KSF besiyeri ortamına 10 mL çeşme suyu eklenerek 30 dakika çalkalanması sağlandı. Bu süre sonunda örnekler steril sargı beziyle süzildükten sonra +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre sporlardan ve katı atıklardan arındırıldı. Süpernatant üzerinden α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.4 Enzim Aktivite Tayini

4.2.4.1. α -Amilaz Aktivite Tayini

α -Amilaz aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı¹⁴⁸. 150 μ L enzim çözeltisi ve 200 μ L % 0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M Sodyum-Fosfat tamponu pH:7.0) 37°C'de 30 dak. inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400 μ L DNS (3.5 dinitro salisilik asit) çözeltisi ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına geldiğinde 8 mL saf su ilave edilerek seyreltme yapıldı ve örneklerin absorbans değerleri 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi

Bir enzim ünitesi deney koşullarında 1 μ mol nişastayı 30 dakikada maltoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

4.2.4.2. Proteaz Aktivite Tayini

Proteaz aktivite tayini için 150 μ L enzim çözeltisine 250 μ L % 0.5 azokazein (0.1 M Tris-HCl tamponu; pH: 9.0) ilave edilerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda ortama 1 mL TCA katılarak reaksiyon durduruldu. 15 dakika +4°C'de bekletildikten sonra +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 1 mL üst sıvı üzerine 500 μ L NaOH ilave edilerek 420 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi¹⁴⁹.

Bir enzim ünitesi deney koşullarında 1 μ mol azokazeini 30 dakikada parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

4.2.4.3. β -Galaktosidaz Aktivite Tayini

β -galaktosidaz aktivite tayini için 200 μ L enzim çözeltisine 500 μ L 6 mM 2-Nitrophenly β -D-galaktopyrynoside (0.1 M Fosfat tamponu pH: 6.8) ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 1 M 500 μ L sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi ilave edilerek örneklerin absorbans değerleri 420 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi.

Bir enzim ünitesi 30 dakikada ONPG'den 1 μ mol O-NP'nin oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı¹⁴¹.

4.2.4.4. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini standart olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (5 mg.mL⁻¹) Bovin serum albumin'den bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı. Tüplere 2.5 mL alkalın çözeltisi konulduktan sonra üzerine 25 μ L enzim ve 225 μ L saf su ilave edildi. Örnekler 15 dakika 40 °C'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 250 μ L Folin Reaktifi (FCR) ilave edilerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı¹⁵⁰.

4.2.5. SmF

4.2.5.1. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi

SmF yöntemiyle enzim üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisini incelemek için NB, LB, SP, A ve B besiyerleri kullanıldı. Hazırlanan besiyerlerine %0.5 bakteri ekimleri yapılarak 37°C'de 150 rpm'de 12, 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda alınan örnekler +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

4.2.5.2. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

Bakteriler için belirlenen uygun besiyerlerine %0.5 bakteri ekimleri yapılarak 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerin sonunda alınan örnekler +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılarda α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

4.2.5.3. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi

Çözünür nişasta, patates nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, buğday unu, pirinç unu, soya unu ve mısır unundan %1 olacak şekilde 0.2 g ve gliserolden 200 μ l alınarak 100 mL'lik erlenmayerlere konuldu ve 20 mL'ye tamamlanarak otoklavlandı. Arabinoz, mannoz, ksiloz, laktoz, sukroz, fruktoz, galaktoz ve glukoz % 1 olacak şekilde 0.2 g tartıldı ve steril edildi. Otoklav edilmiş besiyeri içeren 100 mL'lik erlenmayerler içerisine konuldu.

Otoklav işlemi sonrasında her bir besiyerine %0.5 oranında ekim yapılarak 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. α -Amilaz ve proteaz aktiviteleri için 72. saat sonunda örnekler alınarak +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteazi aktivite tayinleri yapıldı.

4.2.5.4. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Azot kaynakları Etkisi

0.2'şer g pepton, beef extract, kazein, tryptone, üre, yeast extract, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl), sodyum nitrat (NaNO_3) ve amonyum sülfat (NH_4)₂SO₄ tartılıp (%1) 100 mL'lik erlenmayerlere konularak 20 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı. Otoklav işlemi sonrasında her bir besiyerine %0.5 oranında ekim yapıldı. 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. α -Amilaz ve proteaz aktiviteleri için 72. saat sonunda örnekler alınarak +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı

4.2.5.5. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Aminoasitlerin Etkisi

L-fenilalanin, L-tirozin, L-lizin, L-sistein ve L-metyonin, glisin, glutamik asit, L-alanin, L-triptofan, L-izolözin, L-valin 0.002 g tartıldı ve steril edildi. Otoklavlanmış besiyerlerine aminoasitler eklendi. Daha sonra her besiyerine %0.5 oranında ekim yapılarak 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. α -Amilaz ve proteaz aktiviteleri için 72. saat sonunda örnekler alınarak +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

4.2.5.6. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi

FeSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, ZnSO₄.7H₂O, MgSO₄.7H₂O ve CaCl₂ 0.02 g miktarlarında tartıldı. 100 mL'lik erlenmayerlere konuldu ve daha önce belirlenip hazırlanan uygun besiyerleri metal tuzlarının bulunduğu erlenmayerlerin içinde 20 mL'ye tamamlanarak otoklavlandı. Otoklav işlemi sonrasında her bir besiyerine %0.5 oranında ekim yapılarak 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. α -Amilaz ve proteaz aktiviteleri için 72. saat sonunda örnekler alınarak +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

4.2.5.7. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Derişimlerdeki Kalsiyum (CaCl₂) Tuzlarının Etkisi

CaCl₂ tuzlarından 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 ve 0.3 g tartıldı. 100 mL'lik erlenmayerlere konuldu ve daha önce belirlenip hazırlanan uygun besiyerleri kalsiyum iyonlarının bulunduğu erlenmayerlerin içinde 20 mL'ye tamamlanarak otoklavlandı. Otoklav işlemi sonrasında kontrol dahil her bir besiyerine %0.5 oranında ekim yapıldı. 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. α -amilaz aktivitesi için 72. saat sonunda örnekler alınarak +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılardan α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.5.8. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Derişimlerdeki Pamuk Saplarının (küçük) Etkisi

Pamuk saplarından 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 g tartıldı. 100 mL'lik erlenmayerlere konuldu ve daha önce belirlenip hazırlanan uygun besiyerleri pamuk saplarının (küçük) bulunduğu erlenmayerlerin içinde 20 mL'ye tamamlanarak otoklavlandı. Otoklav işleminin sonrasında kontrol dahil her bir besiyerine %0.5 oranında ekim yapıldı. 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. α -amilaz aktivitesi için 72. saat sonunda örnekler alınarak +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılardan α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6. KSF

4.2.6.1. KSF Ortamında Uygun Substrat Seçimi

1500 μ m çapında olan buğday kepeği, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, portakal kabuğu, muz kabuğu, elma kabuğu, pamuk sapı (büyük ve küçük parçalar halinde), öğütölmüş darı ve mısır kaba unu 3'er g tartılıp her biri farklı 100 mL'lik erlenmayerler içerisine konuldu. Üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er mL bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

4.2.6.2. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

1500 μ m boyunda olan pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapları (küçük parça) alındı. 3'er g tartılıp 100 mL'lik erlenmayerler içerisine konuldu ve 10 mL çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er mL bakteri ekimi yapılarak. 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Her inkübasyon süresi sonunda 24 saatte bir dokuz gün süreyle (12; 24; 48; 72; 96; 120, 144, 168 ve 192 saat) örneklerin bulunduğu KSF'li ortamlara 10 mL çeşme suyu eklendi ve 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Bu süre sonunda örnekler steril sargı

bezleri ile süzöldükten sonra enzim aktivitesi kontrol edilerek uygun inkübasyon süresi belirlendi.

4.2.6.3. KSF'de Enzim Üretimi Üzerine Üreme Sıcaklığının Etkisi

Katı substrat olarak 1500 µm boyunda olan pirinç kabuğu, pamuk sapı (küçük parça) ve mercimek kabuğu 3'er g tartılarak 100 mL'lik erlenmayerler içerisine konuldu ve 10 mL çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra ortama sıvı besiyerinden alınan 3 mL bakteri ekimi yapıldı. 30, 37, 40, 45 ve 50 °C'lerde besiyerleri inkübasyona bırakıldı. β-Galaktosidaz için 48. ve 120., α-amilaz için 72. ve proteaz için 120. saatlik örneklerin üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Bu süre sonunda örnekler steril sargı bezleri ile süzöldükten sonra santrifüjlenen materyalin üst sıvısından α-amilaz, proteaz ve β-galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.4. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapından (küçük) daha önceki deney basamağında belirlenen miktarlarda katı bitki atıkları tartılıp 100 mL'lik erlenmayerlere konulup otoklavlandı. Otoklav işleminin sonrası her aktivite tayini için daha önceden belirlenen miktarlarda ekim yapıldı ve daha sonra farklı çalkalama hızlarında (60- 100- 120- 150- 180 ve 200 rpm) inkübasyona bırakılan örneklere α-amilaz için 72. saatte 50 mM NaCl ve proteaz için 120. saatte %1 Triton X100 eklenerek (10 mL) 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyallerin üst sıvısından α-amilaz, proteaz ve β-galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.5. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Kaynağının Etkisi

Pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapı (küçük parça) 3 g tartılıp 100 mL'lik erlenmayerler içerisine konuldu ve 10 mL çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er mL bakteri ekimi

yapılarak. 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek amacıyla β -galaktosidaz için 48. ve 120., α -amilaz için 72. ve proteaz için 120. saatin sonunda KSF'li ortamlara ekstraksiyon kaynakları olarak; çeşme suyu (kontrol) , tampon (amilaz için 0.1 M pH:7.0 fosfat tamponu, proteaz için 0.1 M pH:9.0 Tris-HCl tamponu ve β -galaktosidaz için 0.1 M pH:6.8 fosfat tamponu), çeşme suyu ile 10 mL olacak şekilde hazırlanan %1 SDS, 50 mM NaCl, %1 Tween- 40, %1 Triton X- 100, %1 CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane- sulfonate) çözeltileri ve saf su (10 mL) eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Bu süre sonunda örnekler steril sargı bezlerinde süzildikten sonra santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.6. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi

Pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapından (küçük parça) 3 g tartılıp 100 mL'lik erlenmayerler içerisine konuldu ve 10 mL çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Uygun inokülüm hacminin belirlenmesi için sıvı besiyerinden KSF'li ortama 0,5-1-1,5-2-2,5-3-3,5-4-6 ve 8 mL'ye kadar artırılarak bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 150 rpm'de çalkalandı. α -Amilaz için 72. saat sonunda ekstraksiyon medyumunu olarak 10 mL 50 mM NaCl çözeltisi, proteaz için 120. saatin sonunda ekstraksiyon medyumunu olarak %1 Triton X- 100 ve β -galaktosidaz için 48 ve 120. saatin sonunda 10 mL çeşme suyu uygun ekstraksiyon çözeltisi olarak eklendi ve 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Bu süre sonunda örnekler steril sargı bezlerinde süzildikten sonra santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.7. KSF Ortamında Uygun Substrat Miktarının Belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine kepek miktarının oranını belirlemek için pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapı (küçük) alındı. % 20'den başlayarak %30, %40, %50 ve %60'a kadar (2g- 3g- 4g- 5g- 6g) kepek tartılıp üzerlerine ayrı ayrı 100 mL'lik erlenmayerler içerisine bırakılarak üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklenip

otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her bir ortama gerekli oranda bakteri ekimi yapılarak çalkalayıcıda 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. β -galaktosidaz için 48. ve 120., α -amilaz için 72. ve proteaz için 120. saate bırakılan örneklerle inkübasyon süresi sonunda her aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 mL) eklendi ve 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.8. KSF Ortamında Başlangıç pH'nın Belirlenmesi

Pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapından (küçük) önceki deney basamağında belirlenen miktarlarda katı bitki atıkları tartılıp 100 mL'lik erlenmayer içerisine konuldu. Otoklav işleminden önce KSF'li ortama eklenecek 10 mL çeşme suyunun pH'sı 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH çözeltileri kullanılarak sırasıyla pH: 4.0' dan başlayarak (4.0- 4.5- 5.0- 5.5- 6.0- 6.5- 7.0- 7.5- 8.0- 8.5- 9.0- 9.5- 10.0) pH 10.0'a kadar ayarlandı. Değişik pH'lardaki çeşme suları ayrı ayrı (10 mL) katı bitki atıklarının bulunduğu 100 mL'lik erlenmayerlerin içerisine konulup otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her bir aktivite tayini için gerekli oranda bakteri ekimi yapılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. β -Galaktosidaz için 48 ve 120, α -amilaz için 72 ve proteaz için 120 saat inkübasyona bırakılan örneklerle inkübasyon süresi sonunda her aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 mL) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.9. KSF Ortamında En İyi Aktivite Elde Edilen Substrat Karışım Miktarlarının Belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine kepek karışım miktarını belirlemek için β -galaktosidaz aktivite tayini için 48 ve 120 saat pirinç kabukları ile pamuk sapları (küçük), α -amilaz aktivite tayini için 72 saat pamuk sapları (küçük) ile pirinç kabukları ve proteaz için 120 saat mercimek kabukları ile pamuk sapları (büyük) toplam kütleleri

5 g olacak şekilde 0.5 gramdan başlanarak (0.5 g+4.5 g; 1 g +4 g; 1.5g+3.5g, 2g+3 g; 2.5 g+2.5, 3g+2g, 3.5+1.5 g, 4g+1g, 4.5+ 0.5 g) farklı karışım oranlarında karıştırıldı. 5 g tartılan bitki atıkları her biri farklı 100 mL'lik erlenmayerler içerisinde konuldu. Üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er mL bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 150 rpm'de çalkalandı. Her inkübasyon süresi sonunda KSF'li ortamlara 10 mL çeşme suyu ilave edilerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.10. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi

%1 olacak şekilde 0.1 g miktarında tartılan farklı karbon kaynaklarından maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, mannoz, laktoz, arabinoz ve sukroz steril edildikten sonra pirinç kabukları, mercimek kabukları ve pamuk sapları (küçük parça) daha önceki deney basamağında belirlenen miktarlarda tartılıp 100 mL'lik erlenmayerlere 10 mL çeşme suyu eklenerek otoklavlanmış KSF besiyerlerine eklendi. Her aktivite tayini için daha önceden belirlenen miktarlarda ekim yapıldı. Daha sonra β -galaktosidaz için 48. ve 120, α -amilaz için 72 ve proteaz için 120. saatin sonunda her aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 mL) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. β -Galaktosidaz için 48. ve 120, α -amilaz için 72 ve proteaz için 120. saatin sonunda elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.11. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynakları Etkisi

%1 olacak şekilde 0.1 g miktarında tartılan azot kaynaklarından pepton, beef extract, kazein, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl), sodyum nitrat (NaNO_3), üre, yeast extract, amonyum sülfat (NH_4)₂SO₄ ve tryptone daha önce tartılıp hazırlanmış 100 mL'lik erlenmayerler içerisinde bulunan pirinç kabukları, mercimek kabukları ve pamuk sapları (küçük parça) bulunan KSF'li ortamlara

eklenerek otoklavlandı. Otoklav sonrası her aktivite tayini için daha önceden belirlenen miktarlarda ekim yapıldı. β -Galaktosidaz için 48 ve 120, α -amilaz için 72 ve proteaz için 120 saat inkübasyona bırakılan örneklere inkübasyon süresi sonunda her aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 mL) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.12. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi

Pirinç kabukları, mercimek kabukları ve pamuk sapıları daha önceki deney basamağında belirlenen miktarlarda tartılıp 100 mL'lik erlenmayerlere konuldu. Daha sonra %0.1 olacak şekilde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve CaCl_2 0.01 g miktarlarında metal tuzlarından tartıldı ve KSF'li besiyerlerine eklenip otoklavlandı. Otoklav sonrası her aktivite tayini için daha önceden belirlenen miktarlarda ekim yapıldı. β -Galaktosidaz için 48. ve 120, α -amilaz için 72 ve proteaz için 120. saat inkübasyona bırakılan örneklere inkübasyon süresi sonunda her aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 mL) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

α -amilaz ve proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için sıcak su banyosunda 25 °C'den başlayarak 30; 37; 40; 45; 50; 60; 70; 80 ve 90 °C'ye kadar değişen sıcaklıklarda 30 dakika boyunca ön-inkübasyona bırakılan enzim üst sıvılarında α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.14. Farklı Hacimlerdeki KSF Ortamlarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Mercimek kabuğu ve pamuk sapından (küçük) 100, 250, 500 ve 1000 mL'lik erlenmayerler için sırasıyla 3, 7.5, 15 ve 30 g miktarlarında tartılan katı bitki atıkları dört farklı hacimdeki erlenmayerler içerisine konulup üzerlerine her biri için sırasıyla 10, 25, 50 ve 100 mL çeşme suyu eklendikten sonra otoklavlandı. Otoklav işlemi sonrası pamuk saplarının bulunduğu KSF ortamlarına sırasıyla 3.5, 8.75, 17.5 ve 35 mL ve mercimek kabuklarının bulunduğu KSF ortamlarına sırasıyla 3, 6, 15 ve 30 mL bakteri ekimi yapıldı. 37°C'de 150 rpm'de α -amilaz için 72 ve proteaz için 120. saate çalkalayıcılara bırakılan farklı örneklere inkübasyon süresi sonunda her aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10, 25, 50 ve 100 mL) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

4.2.6.15. Verilerin İstatistik Analizi

Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen verilerin analizi ANOVA'ya göre yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın belirlenmesinde Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Ortamlar arasındaki fark, $p < 0.05$ olduğu zaman önemli kabul edilmiştir.

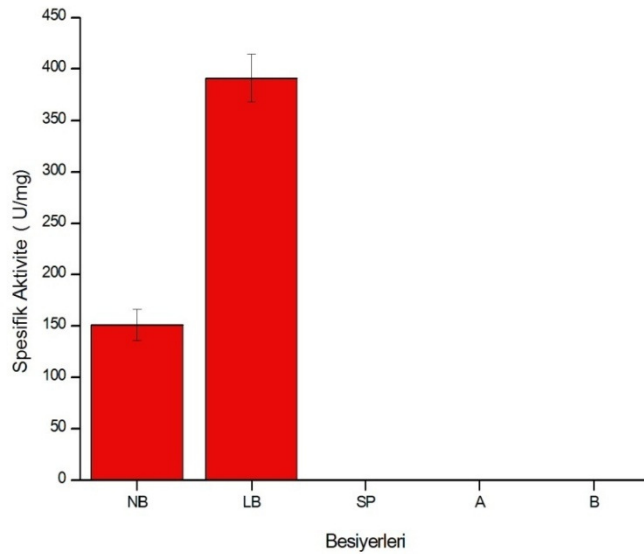
5. BULGULAR

5.1. Sub-merged Fermantasyonu (SmF)

5.1.1. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkisi

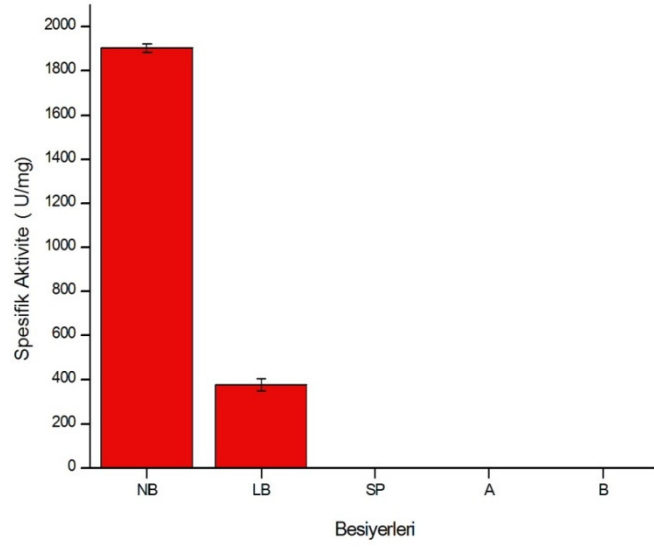
B. subtilis RSK96 NB, LB, SP, A ve B olmak üzere 5 farklı besiyerinde kültür edilmiştir. Şekil 5.1 ve Şekil 5.2.'de *B. subtilis* RSK96'nın değişik SmF ortamlarında kültür edilmesi sonucu elde edilen α -amilaz ve proteaz aktivite sonuçları verilmiştir.

B. subtilis RSK96 beş farklı besiyerinde inkübasyona bırakıldığında LB ve NB besiyerlerinde α -amilaz aktivitesine rastlanmıştır. SP ve B besiyerlerinde üreme olmuş ancak aktivite görülmemiştir. A besiyerinde ise üreme olmamıştır. En yüksek α -amilaz aktivitesi LB besiyerinde 391.9 U/mg olarak ölçülmüştür (Şekil 5.1.).



Şekil 5. 1. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı besiyerlerinin etkisi

B. subtilis RSK96 beş farklı besiyerinde inkübasyona bırakıldığında LB ve NB besiyerlerinde proteaz aktivitesine rastlanmıştır. SP ve B besiyerlerinde üreme olmuş ancak aktivite görülmemiştir. A besiyerinde ise üreme olmamıştır. En yüksek proteaz aktivitesi LB besiyerinde 1903.2 U/mg olarak ölçülmüştür (Şekil 5.2).



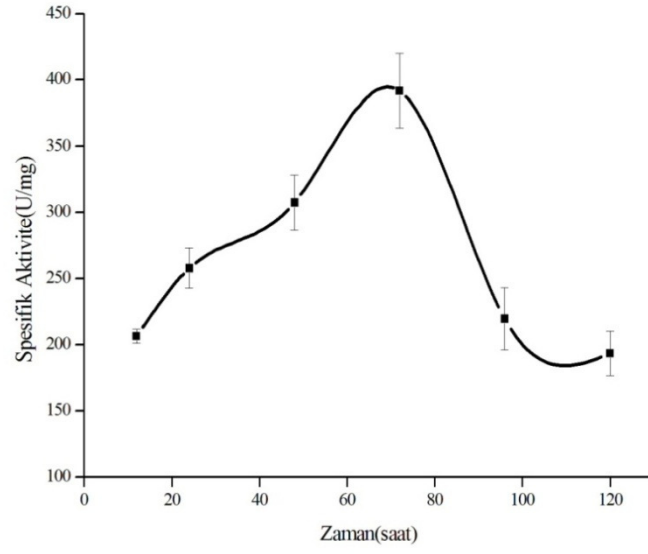
Şekil 5. 2. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı besiyerlerinin etkisi

5.1.2. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

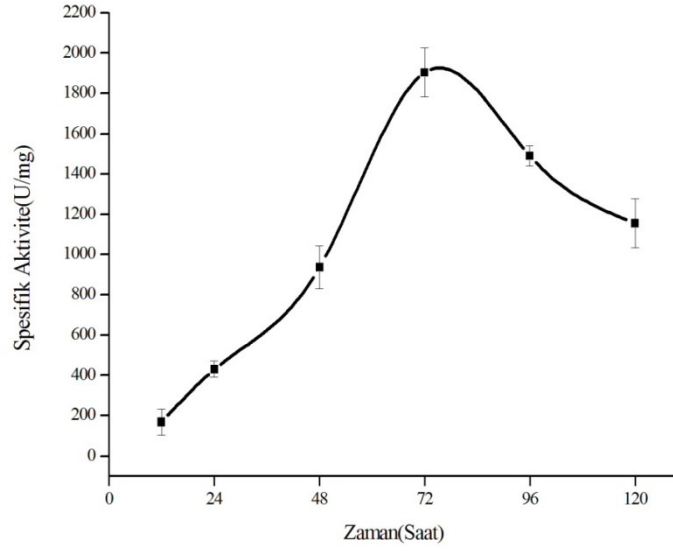
B. subtilis RSK96 LB besiyerinde 12. saatten başlayarak 120. saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda alınan örneklerden α -amilaz ve proteaz aktivitelerine bakılmıştır.

B. subtilis RSK96 LB besiyerinde 12. saatten başlayarak 120. saate kadar kültür edilmesi sonucunda alınan örneklerden en yüksek α -amilaz aktivitesi 72. saatte 391.9 U/mg ve en düşük α -amilaz aktivitesi 120. saatte 193.3 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 5.3.).

B. subtilis RSK96 LB besiyerinde 12. saatten başlayarak 120. saate kadar kültür edilmesi sonucunda alınan örneklerden en yüksek proteaz aktivitesi 72. saatte 1903.2 U/mg ve en düşük α -amilaz aktivitesi 12. saatte 168 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 5.4.).



Şekil 5. 3. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi



Şekil 5. 4. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı inkübasyon sürelerinin etkisi

5.1.3. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği SmF ortamına %1 olacak şekilde 0.2 g miktarında tartılan karbon kaynaklarından çözümlü nişasta, patates nişastası, mısır nişastası, buğday nişastası, pirinç unu, mısır unu ve buğday unu 100 mL erlenler içerisine ilave edildikten sonra hacim LB besiyeri ile 20 mL'ye tamamlandı. Gliserol ise sıvı halde bulunduğundan 200 µL alınıp 20 mL'ye tamamlandı. Karbon kaynakları olarak kullanılacak şekerlerin yapısı otoklav işlemi sırasında bozulduğundan otoklav sonucu steril hale getirilen LB besiyerlerine %1 olacak şekilde 0.2 g arabinoz, mannoz, ksiloz, laktoz, sükroz, fruktoz, galaktoz ve glukoz eklendi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

SmF ortamına eklenen farklı karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde kontrole (521 U/mg) göre daha az α -amilaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında mısır unu ve çözümlü nişasta içeren ortamlarda α -amilaz aktivitesi diğer karbon kaynaklarına göre nispeten daha iyi, kontrole göre ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında en yüksek α -amilaz aktivitesi mısır unu (444.6 U/mg), en düşük arabinoz (21 U/mg) bulunan ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.1.'de gösterilmiştir.

SmF ortamına eklenen farklı karbon kaynaklarının bulunduğu ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde kontrole (1837 U/mg) göre daha az proteaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında buğday unu, sakkaroz, pirinç unu ve mannoz içeren ortamlarda proteaz aktivitesi diğer karbon kaynaklarına göre nispeten daha iyi, kontrolden ise daha düşüktür. Karbon kaynakları arasında en yüksek proteaz aktivitesi buğday unu (1729 U/mg), en düşük proteaz aktivitesi gliserol (406 U/mg) bulunan ortamda elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 1. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynakları (%1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	521.0±31.8 ^a
Çözünür Nişasta	419.3±38.5 ^{bc}
Buğday Nişastası	389.0±32.8 ^{bcd}
Patates Nişastası	248.1±47.9 ^{gh}
Mısır Nişastası	370.4±18.5 ^{bcd}
Buğday unu	314.6±22.3 ^{def}
Pirinç unu	344.6±52.7 ^{cde}
Mısır unu	444.6±40.0 ^b
Gliserol	51.7±38.4 ^{mn}
Mannoz	141.4±48.1 ^{kl}
Ksiloz	237.4±10.6 ^{gh}
Laktoz	86.1±41.8 ^{lm}
Galaktoz	327.9±25.2 ^{def}
Arabinoz	21.1±3.9 ^{mn}
Glukoz	253.0±40.8 ^{fg}
Sukroz	365.6±47.7 ^{bcd}
Fruktoz	279.9±23.8 ^{def}

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı karbon kaynaklarına ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Tablo 5. 2. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynakları (%1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1837±15.4 ^a
Çözünür Nişasta	1223±37.7 ^c
Buğday Nişastası	843±41.3 ^h
Patates Nişastası	864±48.2 ^h
Mısır Nişastası	1030±46.6 ^{fg}
Buğday unu	1729±41.7 ^{ab}
Pirinç unu	1686±23.3 ^b
Mısır unu	850±49.5 ^h
Gliserol	406±22.8 ^k
Mannoz	1623±76.8 ^{bc}
Ksiloz	1394±68.0 ^d
Laktoz	1513±91.9 ^c
Galaktoz	1131±25.3 ^{ef}
Arabinoz	918±39.6 ^{gh}
Glukoz	692±128.2 ^l
Sukroz	688±32.0 ^l
Fruktoz	1604±49.2 ^{bc}

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı karbon kaynaklarına ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.1.4. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği SmF ortamına %1 olacak şekilde 0.1 g miktarında tartılan azot kaynaklarından pepton, beef extract, kazein, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl), sodyum nitrat (NaNO_3), üre, yeast extract, amonyum sülfat (NH_4)₂SO₄, tryptone ve soya unu %1 oranında ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

SmF ortamına eklenen farklı azot kaynakları bulunan ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde %1'lik azot kaynakları arasında kazein içeren ortamdaki α -amilaz aktivitesi 554.1 U/mg olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değer kontrol olarak kullanılan ortamdan elde edilen değerden (521 U/mg) yüksektir. SmF ortamına eklenen farklı azot kaynakları arasında en düşük α -amilaz aktivitesi sodyum nitrat (10.4 U/mg) bulunan ortamda elde edilmiştir.. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 3. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları(%1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	521.0±31.8 ^a
Yeast extract	346.0±45.9 ^{bc}
Tryptone	261.6±54.3 ^{cd}
Beef extract	284.2±29.7 ^{cd}
Peptone	285.4±37.8 ^{cd}
Amonyum nitrat	205.6±48.4 ^{cd}
Amonyum klorid	95.1±42.0 ^e
Amonyum sülfat	42.9±31.3 ^e
Sodyum nitrat	10.4±11.7 ^e
Urea	398.7±43.5 ^b
Kazein	554.1±57.4 ^a
Soya unu	174.2±20.2 ^{cd}

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı azot kaynaklarına ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Tablo 5. 4. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları(% 1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1837.5±100.3 ^a
Yeast extract	66.3±53.7 ^f
Tryptone	486.1±72.2 ^{de}
Beef extract	516.7±48.9 ^{de}
Peptone	611.4±116.9 ^d
Amonyum nitrat	1005.3±80.2 ^c
Amonyum klorid	1393.9±86.0 ^b
Amonyum sülfat	1044.4±63.8 ^c
Sodyum nitrat	330.5±79.7 ^c
Urea	575.1±92.3 ^d
Kazein	562.2±72.2 ^d
Soya unu	1385.5±60.8 ^b

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı azot kaynaklarına ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.1.5. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Aminoasitlerin Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği SmF ortamına %0.01 olacak şekilde 0.002 g miktarında tartılan aminoasitlerden L-fenilalanin, L-trozin, L-lizin, L-sistein, L-metyonin, glisin, glutamik asit, L-alanin, L-triptofan, L-izoleusin ve L-valin ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

SmF ortamına farklı aminoasitlerin bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde en yüksek α -amilaz aktivitesi glutamik asit (629.0 U/mg) içeren ortamda elde edilmiştir. Lizin içeren ortamda elde edilen değer de yüksektir (619.2 U/mg). Kontrolde elde edilen değer (521.0 U/mg) glutamik asit ve lizin bulunan ortamlarda elde edilen değerlere göre düşük diğer aminoasitleri içeren ortamlara göre yüksek olarak bulunmuştur.

Aminoasitleri içeren ortamlar arasında en düşük α -amilaz aktivitesi valin (183.1 U/mg) bulunan ortamda elde edilmiştir (Tablo 5.5.).

Tablo 5. 5. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı aminoasitlerin etkisi

Aminoasitler (%0.01)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	521.0±60.1 ^{abc}
Glisin	382.0±56.9 ^{cde}
L-lizin	619.2±59.5 ^a
L-trozin	358.5±73.9 ^{de}
L-sistein	335.5±64.3 ^{de}
Glutamik asit	629.0±61.5 ^a
L-alanin	268.4±53.2 ^{ef}
L-triptofan	415.8±55.1 ^{bcd}
L-fenilalanin	538.4±60.8 ^{ab}
L-izolözin	510.0±39.7 ^{abc}
L-valin	183.1±58.2 ^f
L-metyonin	445.3±63.8 ^{bcd}

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı aminoasitlere ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

SmF ortamına eklenen farklı aminoasitlerin bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde aminoasit bulunan ortamlardaki proteaz aktivitesi izölosin (2342 U/mg) içeren ortamda elde edilmiştir. Kontrolden elde edilen değer 1842.5 U/mg'dır. Diğer aminoasitleri içeren ortamlardaki tüm aktivite tayinleri kontrole göre düşük çıkmıştır (Tablo 5.6.).

Tablo 5. 6. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı aminoasitlerin etkisi

Aminoasitler (%0.01)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1842.5±79.1 ^b
Glisin	1796.4±76.5 ^{bc}
L-lizin	1623.8±88.0 ^{cd}
L-trozin	1611.4±56.7 ^{cd}
L-sistein	1436.4±51.3 ^{de}
Glutamik asit	1431.4±69.4 ^{de}
L-alanin	1414.7±94.7 ^e
L-triptofan	1539.8±92.9 ^{de}
L-fenilalanin	1745.2±129.3 ^{bc}
L-izolözin	2342.9±59.7 ^a
L-valin	1755.8±77.6 ^{bc}
L-metyonin	1535.8±64.6 ^{de}

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı aminoasitlere ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.1.6. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal Tuzlarının Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği SmF ortamına %0.1 olacak şekilde 0.2 g miktarında tartılan metal tuzlarından ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

SmF ortamına eklenen farklı metal tuzlarının bulunduğu ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde kontrole (669.2 U/mg) göre daha yüksek α -amilaz aktivitesi belirlenmemiştir. SmF ortamına eklenen metal tuzları arasında en yüksek aktivite CaCl_2 bulunan ortamda elde edilmiştir. FeSO_4 , CuSO_4 ve ZnSO_4 tuzlarını içeren SmF ortamlarında bakteri üremesi gerçekleşmemiştir (Tablo5.7).

Tablo 5. 7. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı metal tuzlarının etkisi

Metal Tuzları(%0.1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	669.2±50.2 ^a
FeSO ₄	Üreme yok
MgSO ₄	401.2±40.9 ^b
CaCl ₂	618.5±29.2 ^a
CuSO ₄	Üreme yok
ZnSO ₄	Üreme yok

Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı metal tuzlarına ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

SmF ortamına eklenen farklı metal tuzlarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde kontrole (1837.5 U/mg) göre daha yüksek proteaz aktivitesi belirlenmemiştir. SmF ortamına eklenen metal tuzları arasında en yüksek aktivite CaCl₂ bulunan ortamda elde edilmiştir. FeSO₄, CuSO₄ ve ZnSO₄ tuzlarını içeren SmF ortamlarında bakteri üremesi gerçekleşmemiştir (Tablo 5.8.).

Tablo 5. 8. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı metal tuzlarının etkisi

Ağır metaller(%0.1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1837.5±79.1 ^a
FeSO ₄	Üreme yok
MgSO ₄	1474.3±40.9 ^b
CaCl ₂	1835,0±29.2 ^a
CuSO ₄	Üreme yok
ZnSO ₄	Üreme yok

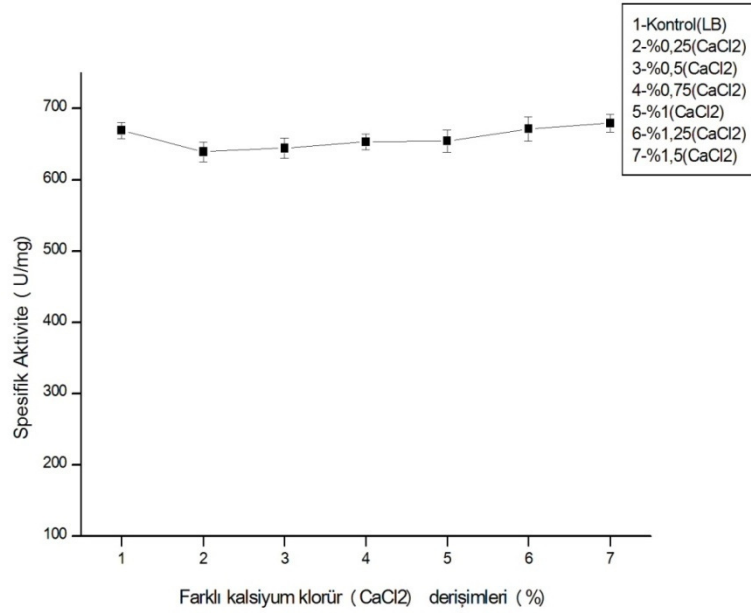
Kontrol: LB besiyeri

Tabloda farklı metal tuzlarına ait ortalamalar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.1.7. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Konsantrasyonlardaki Kalsiyum (CaCl_2) Tuzlarının Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği SmF ortamına %0.25, %0.5, %0.75, %1, %1.25 ve %1.5 olacak şekilde 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 ve 0.3 g CaCl_2 tuzlarından ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz aktivite tayinine yapıldı.

SmF ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda CaCl_2 tuzlarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivitesinin tayinlerinde CaCl_2 tuzları %0.25, %0.5, %0.75, %1 ve %1.25 konsantrasyonlarında kontrole göre α -amilaz aktivitesinin düşük olduğu ancak %1.5 oranında CaCl_2 tuzlarının bulunduğu ortamda elde edilen aktivite değerinin kontrolden daha fazla olduğu saptanmıştır. (679.3 U/mg). Kontrol olarak kullanılan ortamdan elde edilen enzim aktivitesi 669.2 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 5.5).

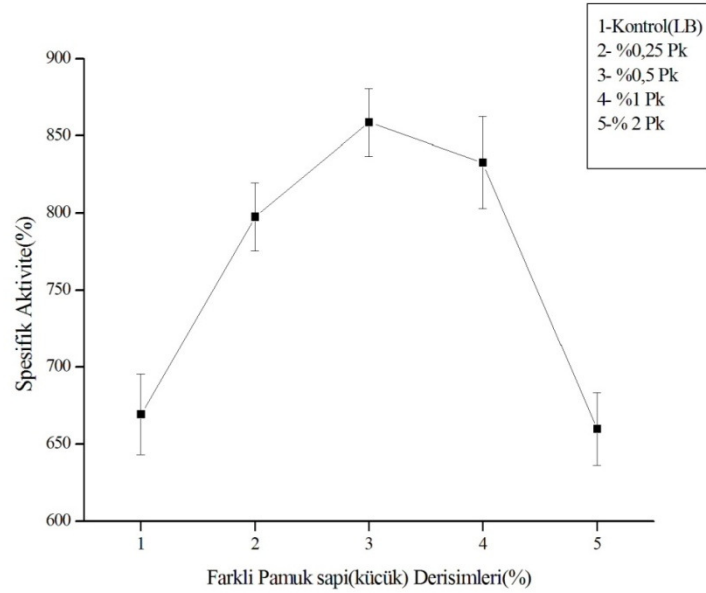


Şekil 5. 5. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı konsantrasyonlardaki kalsiyum klorür (CaCl_2) tuzlarının etkisi

5.1.8. SmF Ortamında α -amilaz Üretimi Üzerine Farklı Konsantrasyonlardaki Pamuk Saplarının (küçük) Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği SmF ortamına %0.25, %0.5, %1 ve %2 olacak şekilde 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 g pamuk saplarından ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

SmF ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda pamuk saplarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde en yüksek aktivite %0.5 oranında pamuk saplarının bulunduğu ortamda 858.6 U/mg olarak elde edilmiştir. %2 oranında pamuk sapı içeren ortam hariç farklı derişimlerde pamuk saplarının bulunduğu tüm ortamlarda elde edilen α -amilaz aktivite değerleri kontrole göre yüksek bulunmuştur (Şekil 5.6.).



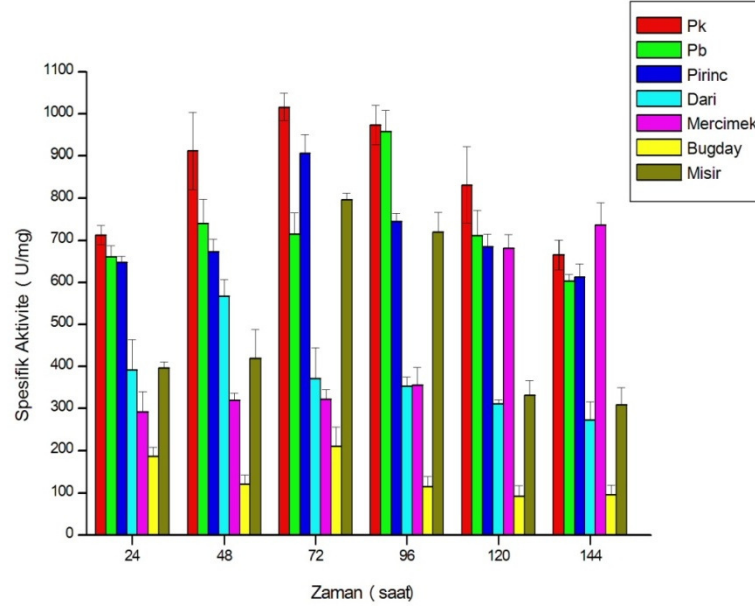
Şekil 5. 6. SmF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı konsantrasyonlardaki pamuk saplarının (küçük) etkisi

5.2 Katı Faz Fermantasyonu (KSF)

5.2.1. KSF Ortamında Uygun substratın Seçimi

KSF ortamında buğday kepeği, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, portakal kabuğu, muz kabuğu, elma kabuğu, pamuk sapı (büyük ve küçük parçalar halinde), öğütülmüş darı ve mısır kaba unu substrat olarak kullanılarak *B. subtilis* RSK96'nın kültür edilmesi sonucu elde edilen α -amilaz aktivite değerleri Şekil 5.1.2.1'de gösterilmiştir.

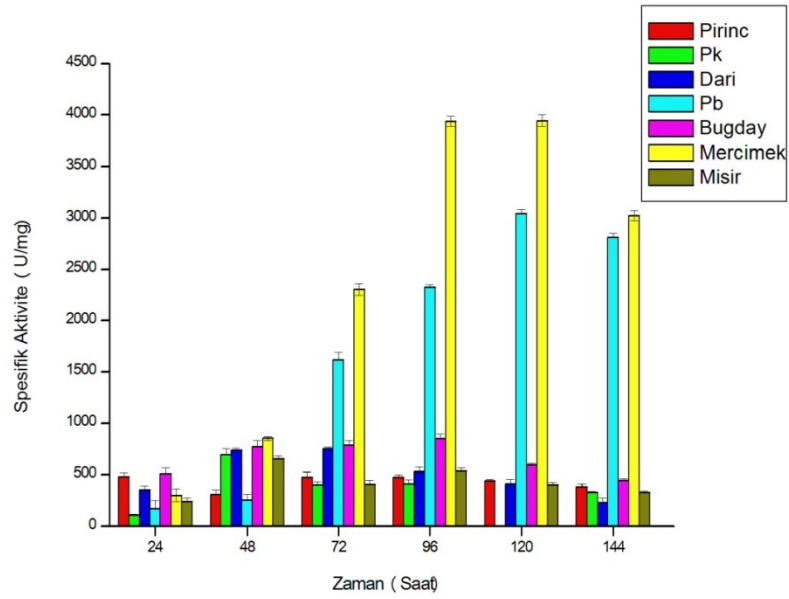
B. subtilis RSK96'nın farklı bitki atıklarının bulunduğu KSF ortamlarında 144 saat üretilmesiyle ilgili sonuçlara göre maksimum α -amilaz üretimi 72. saatte 1016.3 U/mg olarak pamuk saplarının (küçük) bulunduğu ortamda elde edilmiştir. Bunun dışındaki inkübasyon sürelerinde α -amilaz aktivite değerleri 72. saate göre daha düşük bulunmuş ve en düşük α -amilaz değeri 144. saatte 665.6 U/mg olarak elde edilmiştir. Pamuk saplarının (büyük) katı substrat olarak kullanıldığı ortamda α -amilaz üretimi pamuk saplarının (küçük) bulunduğu ortama yakın olarak bulunmuş olup en yüksek α -amilaz değeri 96. saatte elde edilmiştir. Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı ortamda en yüksek α -amilaz aktivite değeri 72. saatte elde edilmiştir. Öğütülmüş mısır kaba ununun bulunduğu ortamda 144 saat süreyle inkübasyona bırakılan *B. subtilis* RSK96'nın en yüksek α -amilaz üretimi 72. saatte elde edilmiştir. Bunun dışındaki inkübasyon sürelerinde birbirine yakın sonuçlar elde edilmiş ve en düşük α -amilaz aktivite değerine 144. saatte rastlanmıştır. Öğütülmüş darı kaba ununun bulunduğu ortamda en yüksek α -amilaz aktivite değeri 48. saatte elde edilmiştir. Mercimek kabuklarının bulunduğu ortamlarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde birbirine yakın aktivite sonuçları elde edilmiştir, ancak 120 ve 144. saatlerde α -amilaz üretimi en yüksek değerine ulaşmıştır. Buğday kepeğinin bulunduğu ortamda 72. saatte α -amilaz üretiminde hızlı bir artış gerçekleşmiştir. Diğer inkübasyon sürelerinde α -amilaz aktivite değerleri düşük bulunmuştur. Elma kabuğu, portakal kabuğu ve muz kabuklarının bulunduğu ortamda α -amilaz üretimine rastlanmamıştır.



Şekil 5. 7. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi

B. subtilis RSK96'nın farklı bitki atıklarının bulunduğu KSF ortamlarında 144 saat inkübasyona bırakılması ile ilgili sonuçlara göre mercimek kabuğunun bulunduğu ortamda en yüksek proteaz üretimi gerçekleşmiştir. Mercimek kabuğunun bulunduğu ortamda 24 ve 48. saatlerin aksine 72. saatte proteaz aktivite değerinde hızlı bir artış gerçekleşmiş ve maksimum proteaz üretimi 120. saatte 3937.0 U/mg olarak gerçekleşmiştir. Bunun dışındaki inkübasyon sürelerinde proteaz aktivite değerleri 120. saate göre daha düşük bulunmuş olup en düşük proteaz aktivite değeri 24. saatte 303.3 U/mg olarak elde edilmiştir. Mercimek kabuğunun kullanılması ile en yüksek proteaz üretiminin elde edildiği bitki atıkları arasında en fazla proteaz üretiminin elde edildiği ikinci katı substrat pamuk sapının (büyük) kullanıldığı ortamdır. Pamuk sapının (büyük) bulunduğu ortamda proteaz üretiminde 48. saatten sonra hızlı bir artış gerçekleşmiş olup 120. saatte en yüksek proteaz üretimine rastlanmıştır. Buğday kepeğinin bulunduğu ortamda en yüksek proteaz aktivite değerine 72. saatte en düşük değere ise 144. saatte rastlanmıştır. Öğütülmüş darı ve mısır kaba unlarının bulunduğu ortamda en yüksek proteaz aktivite değeri her iki bitki atığı içinde 48. saate elde edilmiştir. Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 144. saat süreyle benzer proteaz aktivite sonuçları elde

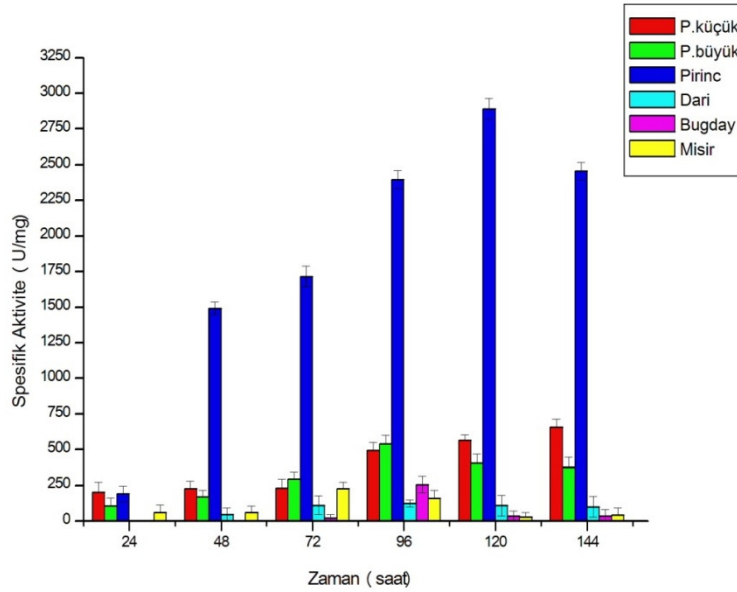
edilmiştir. Pamuk sapının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 24. saatten sonra proteaz üretiminde artış gerçekleşmiştir. En yüksek proteaz aktivite değeri 48. saatte elde edilmiş ve diğer sürelerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Elma kabuğu, portakal kabuğu ve muz kabuklarının bulunduğu ortamda α -amilaz üretimine rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 5. 8. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi

B. licheniformis ATCC12759 farklı bitki atıklarının bulunduğu KSF ortamlarında 144 saat inkübasyona bırakılması ile ilgili sonuçlara göre pirinç kabuklarının katı substrat olarak bulunduğu ortamda en yüksek β -galaktosidaz üretimi gerçekleşmiştir. Pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda 48. saatten sonra β -galaktosidaz üretiminde hızlı bir artış gerçekleşmiş ve maksimum β -galaktosidaz aktivite değeri 120. saatte 2891.3 U/mg olarak elde edilmiştir. Bunun dışındaki inkübasyon sürelerinde β -galaktosidaz aktivite değerleri 120. saate göre daha düşük bulunmuş ve en düşük β -galaktosidaz aktivite değeri 24. saatte 190.8 U/mg olarak elde edilmiştir. Pamuk sapının (küçük) bulunduğu ortamda β -galaktosidaz üretiminde 24., 48. ve 72. saatlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. 72. saatten sonra

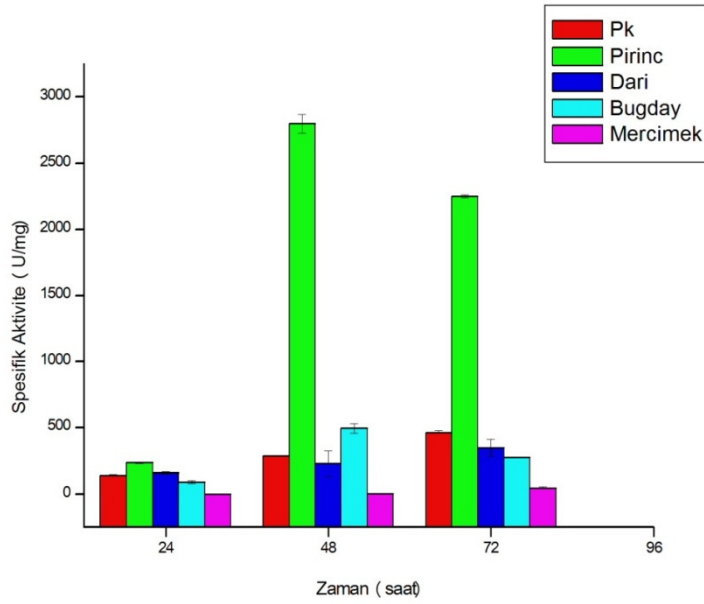
enzim üretiminde artış meydana gelmiş ve 144. saatte en yüksek β -galaktosidaz üretimine rastlanmıştır. Pamuk sapının (büyük) kullanıldığı ortamda en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi 72. saatte elde edilmiştir. Öğütülmüş darı ununun kullanıldığı KSF ortamlarında 24. saatte aktivite gözlenmemiştir. Diğer inkübasyon sürelerindeki β -galaktosidaz aktivitesi düşük şekilde gözlenmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buğday kepeğinin bulunduğu ortamda 24. ve 48. saatlerde β -galaktosidaz aktivitesine rastlanmamıştır. En yüksek β -galaktosidaz aktivite değeri 96. saatte elde edilmiştir. Öğütülmüş mısır ununun kullanıldığı KSF ortamında en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi 72. saatte elde edilmiştir. Diğer sürelerde benzer sonuçlara rastlanmıştır. Elma kabuğu, portakal kabuğu ve muz kabuklarının bulunduğu ortamda α -amilaz üretimine rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 5. 9. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759'da β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi

B. licheniformis yabani suşunun farklı bitki atıklarının bulunduğu KSF ortamlarında 72 saat inkübasyona bırakılması ile ilgili sonuçlara göre pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda en yüksek β -galaktosidaz üretimi gerçekleşmiştir.

Pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda en yüksek β -galaktosidaz aktivite değeri 48. saatte 2795.7 U/mg olarak gerçekleşmiştir. En düşük β -galaktosidaz aktivite değeri 24. saatte 235.1 U/mg olarak elde edilmiştir. Pamuk sapının (küçük) bulunduğu ortamda en yüksek β -galaktosidaz üretimine 72. saatte en düşük β -galaktosidaz üretimine 24. saatte rastlanmıştır. Öğütülmüş darı ununun bulunduğu ortamda en yüksek β -galaktosidaz üretimine 72. saatte en düşük β -galaktosidaz üretimine 24. saatte rastlanmıştır. Buğday kepeğinin bulunduğu ortamda en yüksek β -galaktosidaz üretimine 48. saatte en düşük β -galaktosidaz üretimine 24. saatte rastlanmıştır. Mercimek kabuğunun bulunduğu ortamda 24. saatte β -galaktosidaz üretimi gerçekleşmemiştir. En yüksek β -galaktosidaz üretimine 48. saatte rastlanmıştır. Elma kabuğu, portakal kabuğu ve muz kabuklarının bulunduğu ortamda α -amilaz üretimine rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.10.'da gösterilmiştir.

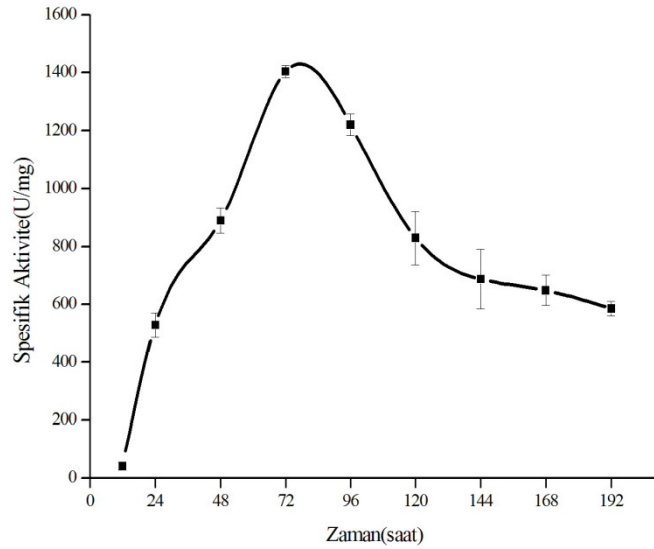


Şekil 5. 10. KSF ortamında kültür edilen *B. licheniformis*'in yabani suşunun β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi

5.2.2. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

B. subtilis RSK96 ve değişik bitki atıklarının KSF ortamında kullanılması ile yapılan denemeler sonucu en yüksek α -amilaz aktivite değerleri pamuk sapının (küçük) kullanıldığı ortamda elde edildiğinden bu bitkisel katı atık uygun substrat olarak seçildi. Uygun inkübasyon süresini tespit etmek için 12. saatten 192. saate kadar ilk örnek 12 saatte alındıktan sonra her 24 saatlik sürelerde *B. subtilis* RSK96'nın kültür edildiği ortamlardan örnekler alınıp α -amilaz aktivite tayini yapıldı. Bulunan değerler Şekil 5.2.2.1'de gösterilmiştir.

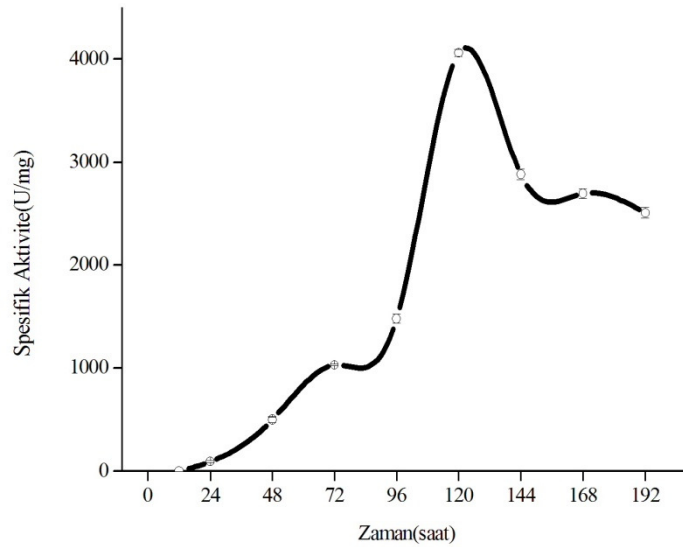
B. subtilis RSK96 pamuk sapının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarında en yüksek α -amilaz üretimi 72. saatte 1403.7 U/mg olarak gerçekleştirmiştir. α -Amilaz aktivitesinin diğer inkübasyon sürelerinde 72. saatte göre azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 5. 11. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi

B. subtilis RSK96 ve değişik bitki atıklarının KSF ortamında kullanılması ile yapılan denemeler sonucu en yüksek proteaz aktivite değerleri mercimek kabuğunun kullanıldığı ortamda elde edildiğinden bu bitkisel katı atık en uygun substrat olarak seçildi. Uygun inkübasyon süresini tespit etmek için 12. saatten 192. saate kadar ilk örnek 12 saatte alındıktan sonra her 24 saatlik sürelerde *B. subtilis* RSK96'nın kültür edildiği ortamda örnekler alınıp proteaz aktivite tayini yapıldı. Bulunan değerler Şekil 5.11.'de gösterilmiştir.

B. subtilis RSK96'nın mercimek kabuğunun katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında en yüksek proteaz üretimi 120. saatte 4059.9 U/mg olarak tespit edilmiştir. Proteaz aktivitesinde 96. saatten sonra hızlı bir artma gözlenmiş ve 120. saatten sonra düşüş gözlenmiştir.

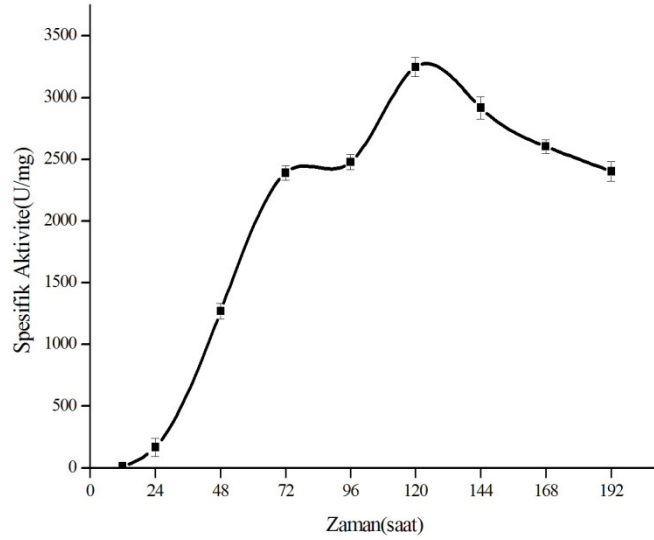


Şekil 5. 12. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi

B. licheniformis ATCC12759 ve değişik bitki atıklarının KSF ortamında kullanılması ile yapılan denemeler sonucu en yüksek β -galaktosidaz aktivite değerleri pirinç kabuklarının kullanıldığı ortamda elde edildiğinden bu bitkisel katı

atık en uygun substrat olarak seçildi. Uygun inkübasyon süresini tespit etmek için 12. saatten 192. saate kadar ilk örnek 12 saatte alındıktan sonra her 24 saatlik sürelerde *B. licheniformis* ATCC12759'un kültür edildiği ortamda örnekler alınıp β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı. Bulunan değerler Şekil 5.12.'de gösterilmiştir.

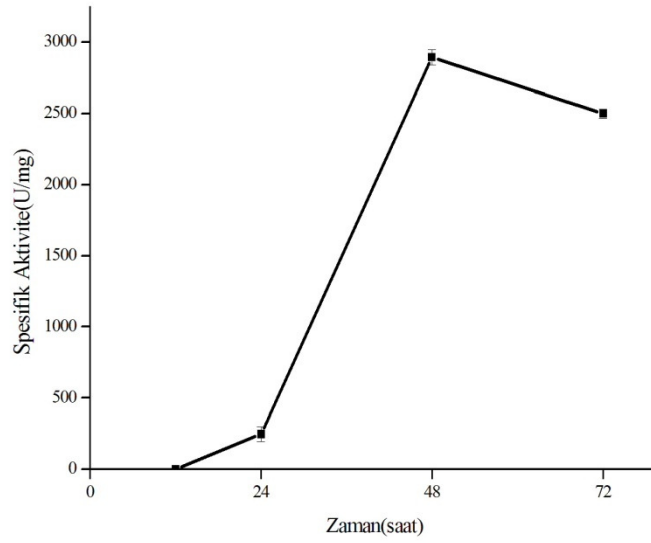
B. licheniformis ATCC12759'un pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında en yüksek β -galaktosidaz üretimi 120. saatte 3244.7 U/mg olarak tespit edilmiştir. β -galaktosidaz aktivitesinde 24. saatten sonra hızlı bir artışa rastlanmıştır ve 120.saatten sonra düşüş gözlenmiştir.



Şekil 5. 13. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi

Yabani suş *B. licheniformis* ve değişik bitki atıklarının KSF ortamında kullanılması ile yapılan denemeler sonucu en yüksek β -galaktosidaz aktivite değerleri pirinç kabuklarının kullanıldığı ortamda elde edildiğinden bu bitkisel katı atık en uygun substrat olarak seçildi. Uygun inkübasyon süresini tespit etmek için 24. saatten 72. saate kadar her 24 saatlik sürelerde yabani suş *B. licheniformis*'in kültür edildiği ortamda örnekler alınıp β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı. Bulunan değerler Şekil 5.13.'te gösterilmiştir.

Yabani suş *B. licheniformis*'in pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında en yüksek β -galaktosidaz üretimi 48. saatte 2893.9 U/mg olarak tespit edilmiştir. β -galaktosidaz aktivitesinde 24. saatten sonra hızlı bir artışa rastlanmıştır ve 48.saatten sonra düşüş gözlenmiştir (Şekil 5.14.).



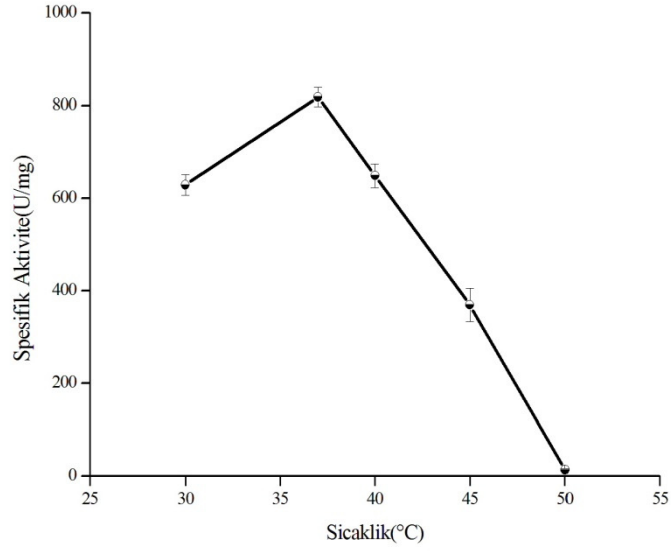
Şekil 5. 14. KSF ortamında yabani suş *B. licheniformis*'in β galaktosidaz üretimi üzerine değişik inkübasyon sürelerinin etkisi

5.2.3. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Üreme Sıcaklığının Etkisi

Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için KSF'li besiyeri 30, 37, 40, 45 ve 50°C'lerde inkübasyona bırakıldı. *B. subtilis* RSK96 pamuk saplarının (küçük) bulunduğu KSF ortamında α -amilaz aktivite tayini için 72 saat, mercimek kabuklarının bulunduğu KSF ortamında proteaz aktivite tayini için 120 saat, *B. licheniformis* ATCC 12759 ve *B. licheniformis* pirinç kabuklarının bulunduğu KSF ortamlarında sırasıyla 120 ve 48 saat kültür edildikten sonra β -galaktosidaz aktivitelere bakıldı.

B. subtilis RSK96 pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında kültür edilip α -amilaz aktivitesi incelendiğinde en uygun α -amilaz

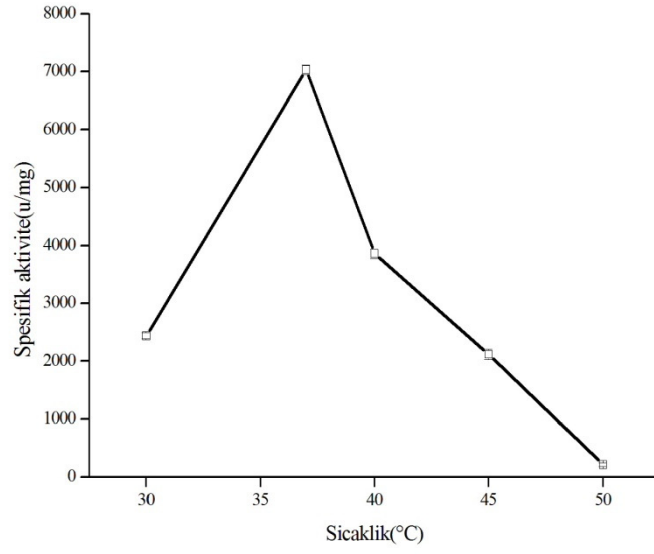
üretim sıcaklığı olarak 37°C (818.3 U/mg) olarak tespit edilmiştir. Bulunan değerler Şekil 5.15.'te gösterilmiştir.



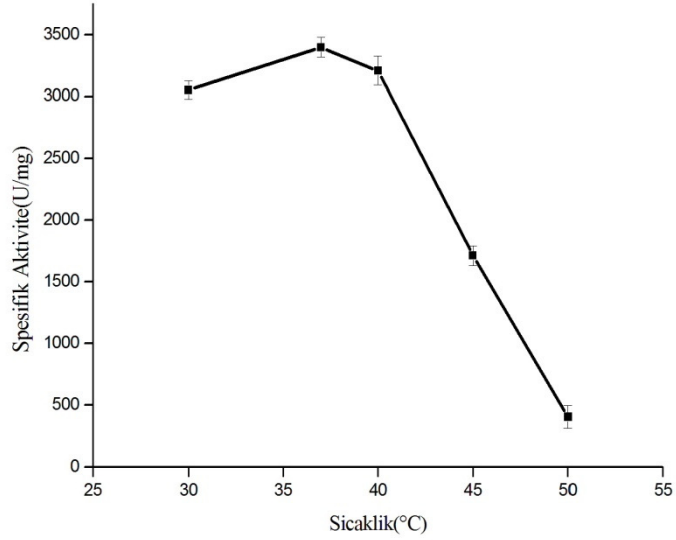
Şekil 5. 15. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi

B. subtilis RSK96 mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında kültür edildiğinde en uygun proteaz üretim sıcaklığı 37°C (7031.7 U/mg) olarak tespit edilmiştir. Bulunan değerler Şekil 5.16.'da gösterilmiştir.

B. licheniformis ATCC 12759 pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında kültür edildiğinde β -galaktosidaz üretimi için en uygun sıcaklık 37°C (3396.8 U/mg) olarak tespit edilmiştir. Bulunan değerler Şekil 5.17.'de gösterilmiştir.

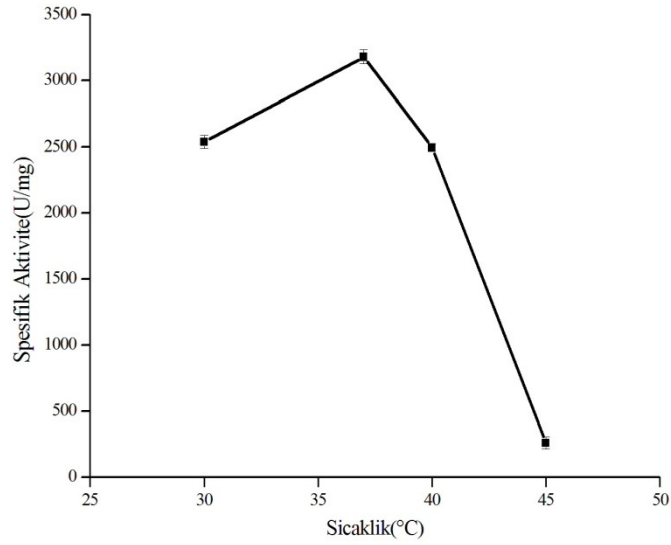


Şekil 5. 16. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi



Şekil 5. 17. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi

Yabani suş *B. licheniformis* pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında kültür edildiğinde β -galaktosidaz üretimi için en uygun sıcaklık 37°C (3180 U/mg) olarak tespit edilmiştir. Bulunan değerler Şekil 5.18.'de gösterilmiştir.



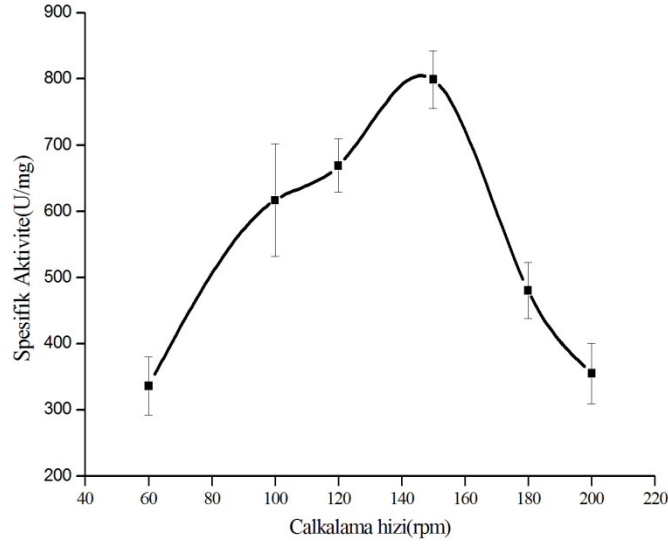
Şekil 5. 18. KSF ortamında yabani suş *B. licheniformis*' in β -galaktosidaz üretimi üzerine üreme sıcaklığının etkisi

5.2.4. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Enzim üretimi üzerine çalkalama hızının etkisini belirlemek için *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi için pamuk sapları (küçük) ve proteaz için mercimek kabuklarının bulunduğu KSF ortamlarında 60, 100, 120, 150, 180 ve 200 rpm hızlarında kültür işlemi yapıldı. Kültür işlemi sonunda elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

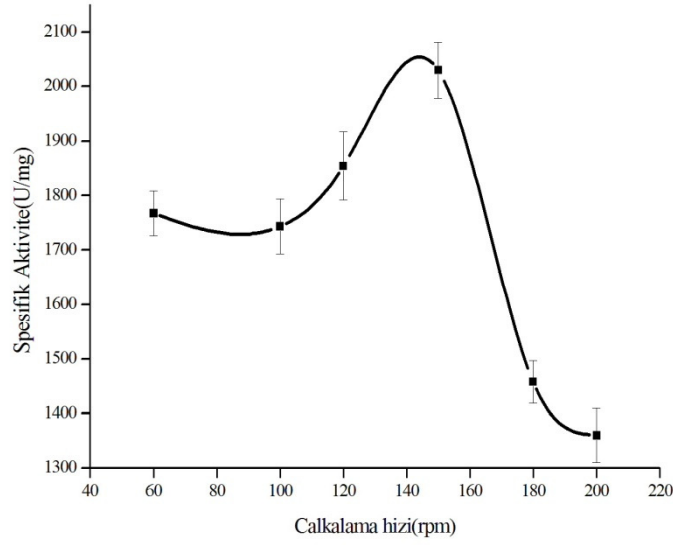
B. subtilis RSK96'nın pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında 150 rpm çalkalama hızında kültür işlemi yapıldığında en yüksek α -amilaz üretimi elde edilmiştir (799.1 U/mg). En düşük α -amilaz üretimi

kültür işleminin yapıldığı 60 rpm hızında elde edilmiştir (335.8 U/mg). Bulunan değerler Şekil 5.19.'da gösterilmiştir.



Şekil 5. 19. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi

B. subtilis RSK96'nın mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında 150 rpm çalkalama hızında kültür işlemi yapıldığında en yüksek proteaz üretimi elde edilmiştir (2029.6 U/mg). En düşük proteaz üretimi kültür işleminin yapıldığı 200 rpm hızında elde edilmiştir (1360.0 U/mg). Bulunan değerler Şekil 5.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 5. 20. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine çalkalama hızının etkisi

5.2.5. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik Ekstraksiyon Ortamının Etkisi

Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemede uygun katı substratların bulunduğu KSF ortamlarının her biri için ayrı ayrı 10 mL 50 mM NaCl, %1 CHAPS, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween40, saf su, pH:7.0 Sodyum Fosfat (α -amilaz), pH:9.0 Tris-HCl (proteaz) ve pH: 6.8 Sodyum Fosfat (β -galaktosidaz) tamponları ve çeşme suyu (kontrol) eklenerek elde edilen üst sıvılar α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz aktiviteleri için enzim kaynağı olarak kullanıldı.

B. subtilis RSK96'nın pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında eklenen 50 mM NaCl'nin diğer ekstraksiyon ortamlarına göre daha yüksek oranda amilaz üretimi (847 U/mg) meydana geldiği belirlenmiştir. Saf suyun ekstraksiyon medyumunu olarak kullanıldığı ortamda en düşük α -amilaz üretimine rastlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 5. 9. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi

Ekstraksiyon Medyumu(10 mL)	Spesifik aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
50 mM NaCl	847.8±53.7 ^a
%1 CHAPS	820.6±17.4 ^{ab}
%1 TritonX100	809.6±64.4 ^{ab}
%1 SDS	602.6±24.8 ^c
Saf su	541.9±69.1 ^c
pH=7 Sodyum Fosfat	549.2±28.4 ^c
%1 Tween40	730.2±17.1 ^b
Çeşme suyu	748.4±30.9 ^{ab}

Tabloda farklı ekstraksiyon ortamlarına ait değerlerin arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

B. subtilis RSK96'nın mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen %1 Triton X100'ün diğer ekstraksiyon ortamlarına göre daha yüksek oranda proteaz üretimi (3781.5 U/mg) meydana geldiği belirlenmiştir. Saf suyun ekstraksiyon medyumu olarak kullanıldığı ortamda en düşük proteaz üretimine rastlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.10.'da gösterilmiştir.

B. licheniformis ATCC12759'un pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında eklenen çeşme suyunun diğer ekstraksiyon ortamlarına göre daha yüksek oranda β -galaktosidaz üretimi (3239 U/mg) meydana geldiği belirlenmiştir. %1 Tween40'ın ekstraksiyon medyumu olarak kullanıldığı ortamda en düşük β -galaktosidaz üretimine rastlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 10. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi

Ekstraksiyon medyumu(10 mL)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala±standart hata)
50 mM NaCl	2514.3±39.4 ^c
%1 CHAPS	3140.2±37.3 ^b
%1 Triton	3781.5±12.0 ^a
%1 SDS	2853.0±34.4 ^c
Saf su	1521.7±14.5 ^h
pH=9 Tris-HCl	2338.0±21.7 ^f
%1 Tween40	2696.5±35.6 ^d
Çeşme suyu	1673.5±35.2 ^g

Tabloda farklı ekstraksiyon ortamlarına ait değerlerin arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Tablo 5. 11. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi

Ekstraksiyon Medyumu	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala±standart hata)
50 mM NaCl	2522.2±66.4 ^c
%1 CHAPS	2505.4±75.6 ^c
%1 Triton	1840.6±65.6 ^d
%1 SDS	2507.4±82.7 ^c
Saf su	2961.4±74.9 ^b
pH=6.8 Sodyum Fosfat	2954.1±63.9 ^b
%1 Tween40	1820.2±64.7 ^d
Çeşme suyu	3239.0±85.1 ^a

Tabloda farklı ekstraksiyon ortamlarına ait değerlerin arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

B. licheniformis yabani suşunda pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında eklenen çeşme suyunun diğer ekstraksiyon ortamlarına göre daha yüksek oranda β -galaktosidaz üretimi (2045.4 U/mg) meydana geldiği belirlenmiştir. %1 SDS'nin ekstraksiyon medyumu olarak kullanıldığı ortamda en düşük β -galaktosidaz üretimine rastlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.12.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 12. KSF ortamında yabani suş *B. licheniformis*' in β -galaktosidaz üretimi üzerine değişik ekstraksiyon ortamlarının etkisi

Ekstraksiyon Medyumu	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala \pm standart hata)
50 mM NaCl	1745.0 \pm 9.8 ^b
%1 CHAPS	1348.6 \pm 48.3 ^d
%1 Triton	1339.8 \pm 49.6 ^d
%1 SDS	1203.5 \pm 9.8 ^c
Saf su	1537.7 \pm 23.3 ^c
pH: 6.8 Sodyum-Fosfat Tamponu	1732.7 \pm 21.3 ^b
%1 Tween40	1296.7 \pm 29.5 ^d
Çeşme suyu	2045.4 \pm 26.3 ^a

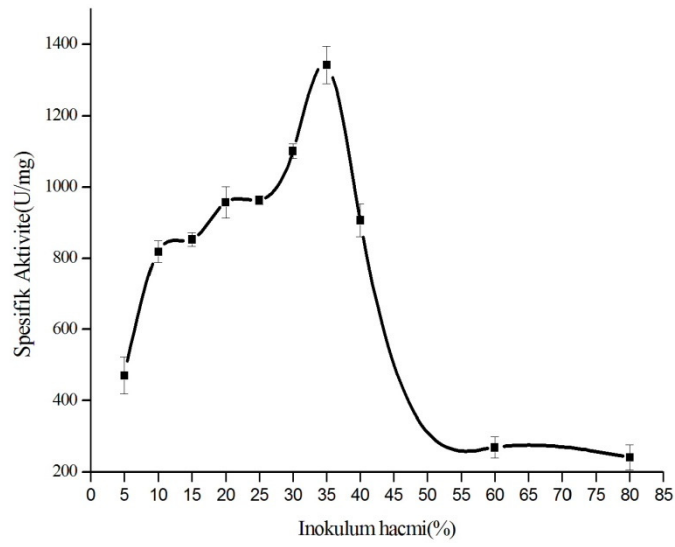
Tabloda farklı ekstraksiyon ortamlarına ait değerlerin arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.2.6. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi

KSF ortamında uygun inokülüm hacminin belirlenmesi için yapılan deneylerde 0.5 ml'de 8 mL'ye kadar bakteri ekimi yapılarak *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz için 72. saatte, proteaz için 120. saatte, *B. licheniformis* ATCC12759 ve *B.*

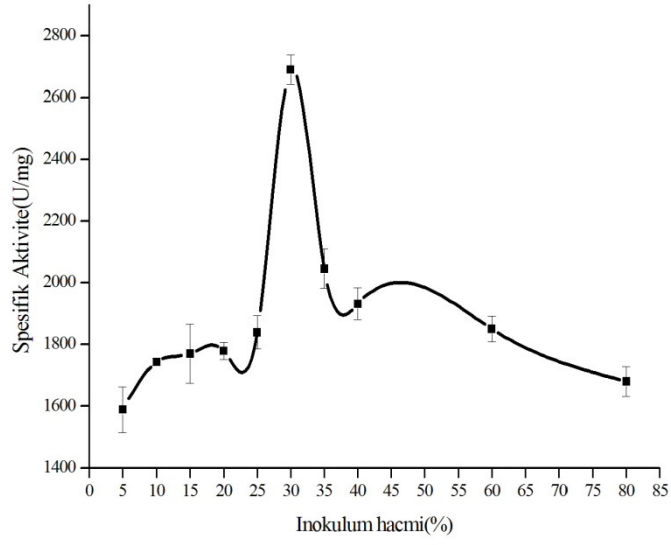
licheniformis yabani suşunda β -galaktosidaz için 120. ve 48. saatlerdeki enzim aktivitelere bakıldı.

B. subtilis RSK96'nın pamuk sapının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına bakteri inokülüm hacmi 3.5 mL olarak yapıldığında 72. saate en yüksek α -amilaz aktivitesi elde edilmiştir (1341.7 U/mg, Şekil 5.21.).



Şekil 5. 21. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisi

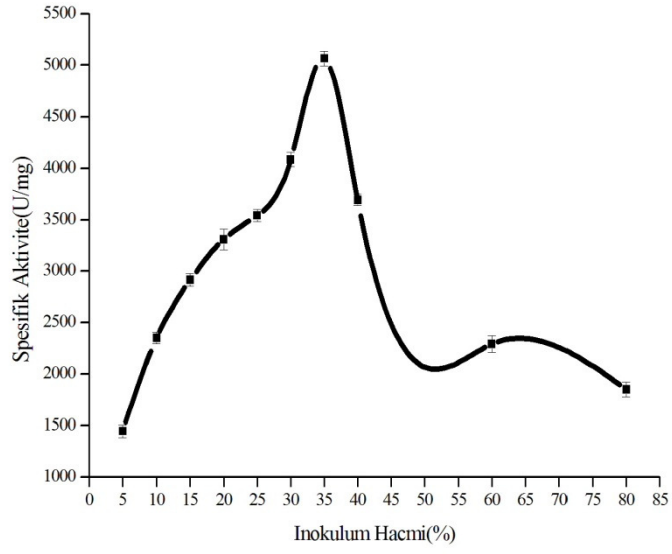
B. subtilis RSK96'nın mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına bakteri inokülüm hacmi 3 mL olarak aktarıldığında 120. saatte en yüksek proteaz aktivitesi elde edilmiştir (2689.1 U/mg, Şekil 5.22.).



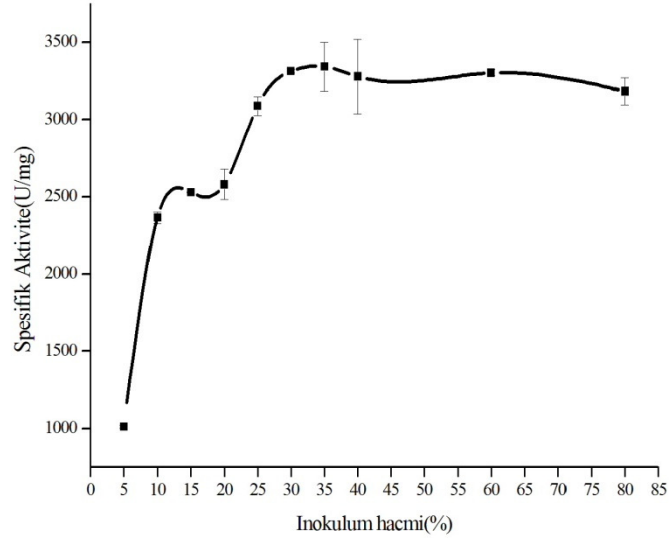
Şekil 5. 22. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine inokülüm etkisi

B. licheniformis ATCC12759'un pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına bakteri inokülüm hacmi 3.5 mL olarak aktarıldığında en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi elde edilmiştir (5064.2 U/mg, Şekil 5.23.).

B. licheniformis yabani suşu pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına bakteri inokülüm hacmi 3.5 mL olarak aktarıldığında en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi elde edilmiştir (3342.7 U/mg, Şekil 5.24.).



Şekil 5. 23. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759' da β -galaktosidaz üretimi üzerine inokülüm etkisi

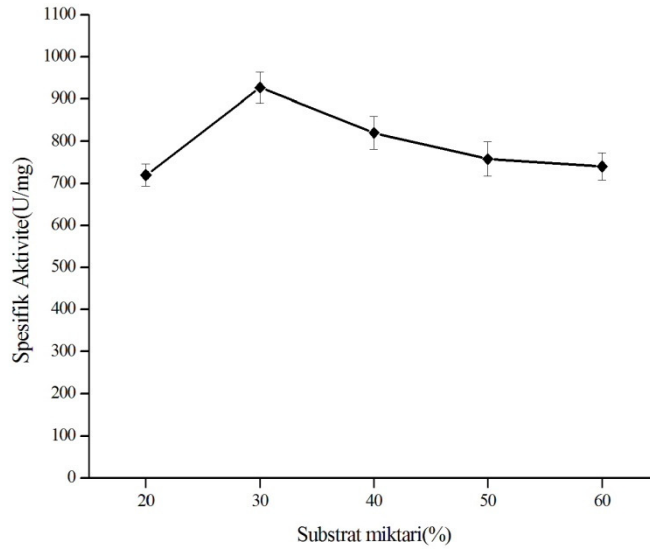


Şekil 5. 24. KSF ortamında *B. licheniformis* yabani suşunun β -galaktosidaz üretimi üzerine inokülüm etkisi

5.2.7. KSF Ortamında Farklı Substrat Miktarlarının Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine substrat miktarının oranını belirlemesine yönelik yapılan çalışmalarda *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz aktivite tayini için pamuk sapları (küçük), proteaz aktivite tayini için mercimek kabukları, *B. licheniformis* ATCC12759 ve yabani suş *B. licheniformis* bakterilerinde β -galaktosidaz aktivite tayini için pirinç kabukları alındı. %20'den başlayarak %60'a kadar substrat miktarlarının arttırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

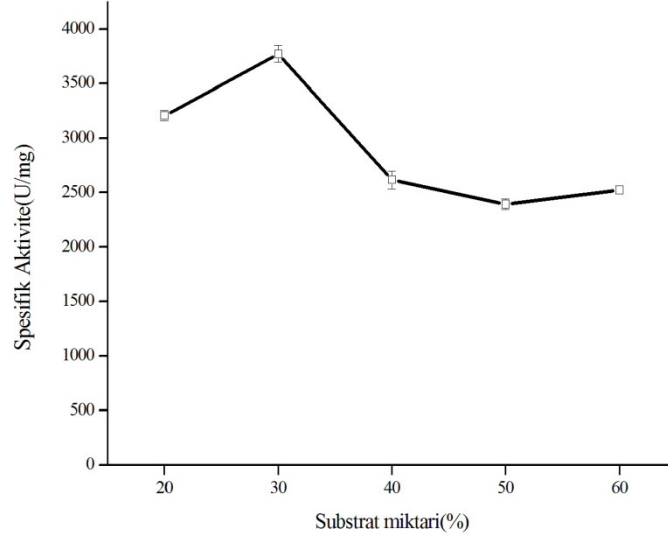
B. subtilis RSK96'nın pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında α -amilaz üretimi için en uygun substrat miktarı olarak %30'luk (3 g) substrat miktarının kullanıldığı ortamda α -amilaz aktivitesi 926.9 U/mg olarak belirlenmiştir. Kepek miktarı arttırıldığında α -amilaz aktivitesinin aşamalı olarak düştüğü görülmüştür. Çalışmada elde edilen α -amilaz aktivite sonuçları Şekil 5.2.7.1'de verilmiştir.



Şekil 5. 25. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi

B. subtilis RSK96'nın mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında proteaz üretimi için en uygun substrat miktarı olarak %30'luk (3 g) substrat miktarının kullanıldığı ortamda proteaz aktivitesi 3770.7

U/mg olarak belirlenmiştir. Kepek miktarı arttırıldığında proteaz aktivitesinin kademeli olarak düştüğü görülmüştür. Çalışmada elde edilen proteaz aktivite sonuçları Şekil 5.25.'te verilmiştir.

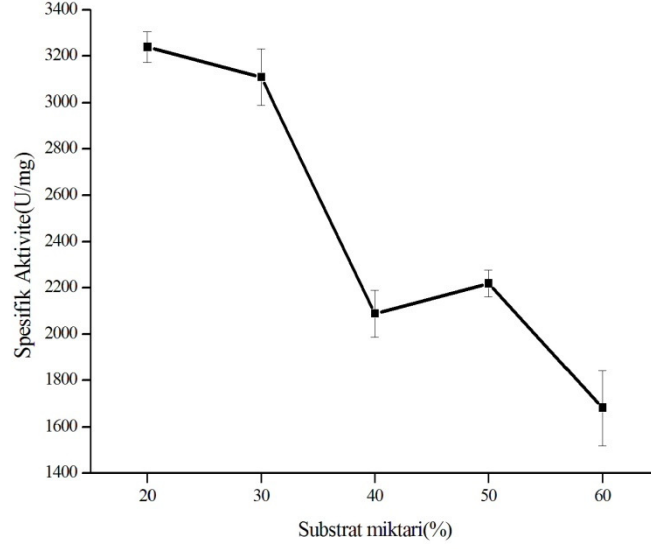


Şekil 5. 26. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi

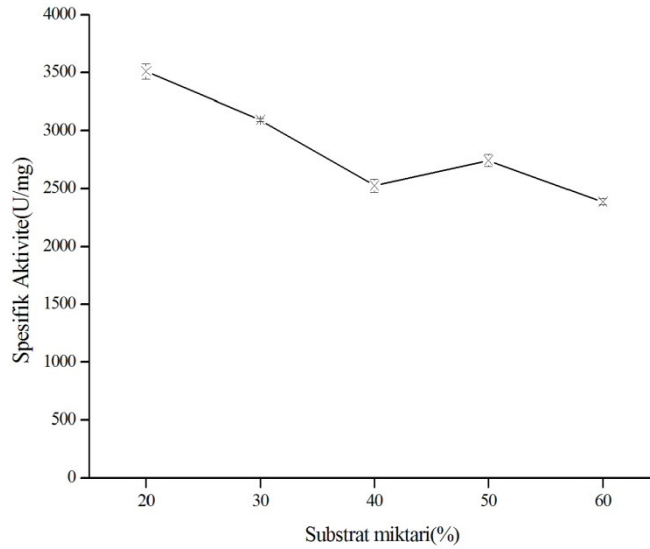
B. licheniformis ATCC 12759'un pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında β -galaktosidaz üretimi için en uygun substrat miktarı olarak %20'lik (2 g) substrat miktarının kullanıldığı ortamda β -galaktosidaz aktivitesi 3238.4 U/mg olarak belirlenmiştir. Kepek miktarının arttırılması ile β -galaktosidaz aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Çalışmada elde edilen β -galaktosidaz aktivite sonuçları Şekil 5.27.'de verilmiştir.

Yabani suş *B. licheniformis*'in pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında β -galaktosidaz üretimi için en uygun substrat miktarı olarak %20'lik (2 g) substrat miktarının kullanıldığı ortamda β -galaktosidaz aktivitesi 3509.5 U/mg olarak belirlenmiştir. Kepek miktarının arttırılması ile β -

galaktosidaz aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Çalışmada elde edilen β -galaktosidaz aktivite sonuçları Şekil 5.28.'de verilmiştir.



Şekil 5. 27. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759'da β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi

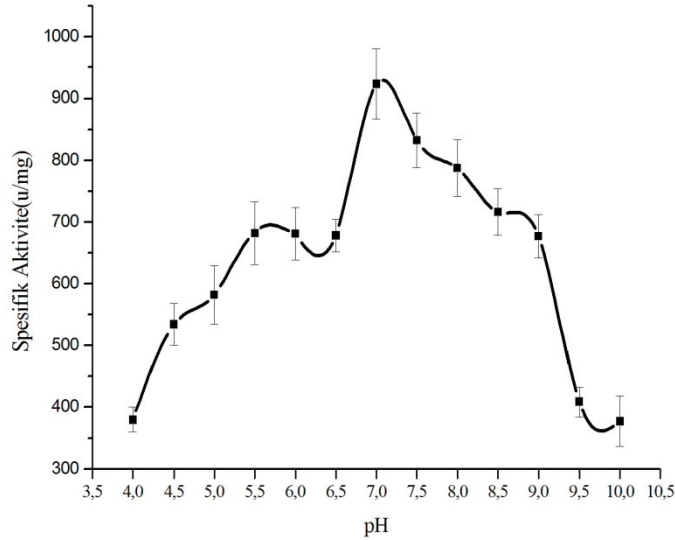


Şekil 5. 28. KSF ortamında yabani suş *B. licheniformis*'in β -galaktosidaz enzim üretimi üzerine farklı substrat miktarlarının belirlenmesi

5.2.8. KSF Ortamında Başlangıç pH'nın Belirlenmesi

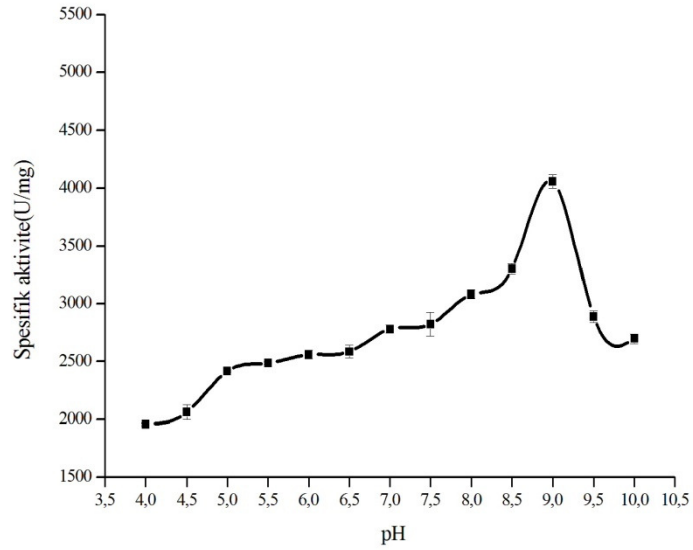
Başlangıç pH'nın belirlenmesi için çeşme suyunun pH'sı 0.5 birim aralıklarla pH 4'ten pH 10'a kadar 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile ayarlandı. Daha sonra *B. subtilis* RSK96 kültür edileceği ortamda α -amilaz aktivite tayini için pamuk sapı (küçük), proteaz aktivite tayini için mercimek kabuğu, *B. licheniformis* ATCC12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'ten β -galaktosidaz aktivite tayini için pirinç kabuğu bulunan KSF besiyerlerine farklı pH'larda hazırlanmış olan çeşme sularından 10 mL ilave edilerek örnekler otoklavlandı. Sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra KSF besiyerleri 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği ortamda α -amilaz aktivite tayini için pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında pH:4.0 ile başlayan ortamda α -amilaz aktivitesinde giderek bir artış gözlenmiş ve en uygun başlangıç pH'ı 7.0 olarak belirlenmiştir. pH:7.0'daki α -amilaz aktivitesi 923.3 U/mg olarak ölçülmüştür. Bu pH değerinden sonra α -amilaz aktivite değerinde giderek azalma görülmüştür (Şekil 5.29.).



Şekil 5. 29. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği ortamda proteaz aktivite tayini için mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında pH: 4.0 ile başlayan ortamda proteaz aktivitesinde giderek bir artış gözlenmiş ve en uygun başlangıç pH 9.0 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi pH:9.0'da 3558.6 U/mg olarak ölçülmüştür. pH:4.0-6.5 değerlerinde en düşük proteaz aktivite değerleri kaydedilmiştir (Şekil 5.30.).

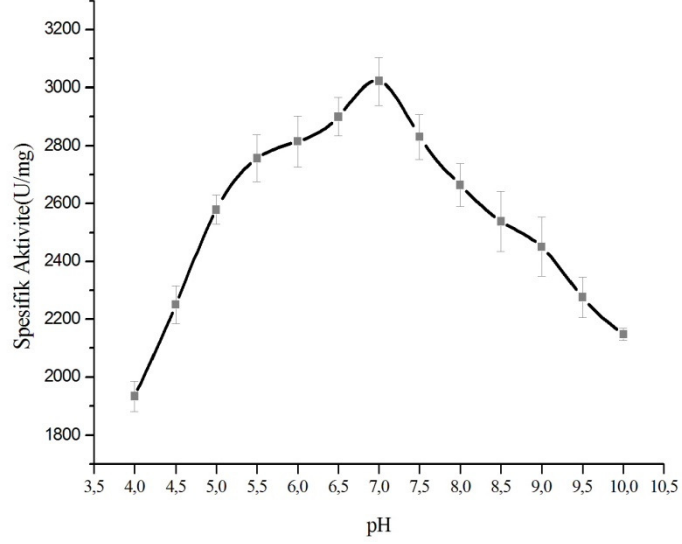


Şekil 5. 30. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi

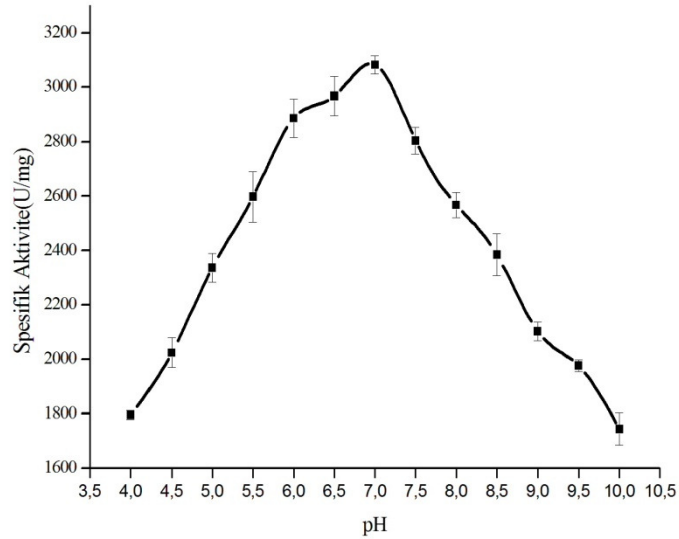
B. licheniformis ATCC12759'un kültür edileceği ortamda β -galaktosidaz aktivite tayini için pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında pH: 4.0 ile başlayan ortamda β -galaktosidaz aktivitesinde giderek bir artış gözlenmiş ve en uygun başlangıç pH 7.0 olarak belirlenmiştir. β -galaktosidaz aktivitesi pH: 7.0'da 3022.1 U/mg olarak ölçülmüştür. Bu pH değerinden sonra β -galaktosidaz aktivite değerinde giderek azalma görülmüştür (Şekil 5.31.).

Yabani suş *B. licheniformis*'in kültür edileceği ortamda β -galaktosidaz aktivite tayini için pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında pH: 4.0 ile başlayan ortamda β -galaktosidaz aktivitesinde giderek bir artış gözlenmiş ve en uygun başlangıç pH 7.0 olarak belirlenmiştir β -galaktosidaz

aktivitesi pH:7.0'de 3082 U/mg olarak ölçülmüştür. Bu pH değerinden sonra β -galaktosidaz aktivite değerinde giderek azalma görülmüştür (Şekil 5.32.).



Şekil 5. 31. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi



Şekil 5. 32. KSF ortamında yabani suş *B. licheniformis*'in β -galaktosidaz üretimi üzerine başlangıç pH'nın etkisi

5.2.9. KSF Ortamında En İyi Aktivite Elde Edilen Substrat Karışım Miktarlarının Belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine kepek karışım miktarlarını belirlemek için *B. subtilis* RSK96 bakterinde α -amilaz aktivitesi için pamuk sapı (küçük) ile birlikte en iyi aktivite veren pirinç kabuğu, proteaz aktivite tayini için mercimek kabuğu ve pamuk sapı (büyük), *B. licheniformis* ATCC12759 ve yabani suş *B. licheniformis* bakterilerinde β -galaktosidaz aktivitesi için pirinç kabuğu ve pamuk sapı (küçük) alınarak farklı oranlarda karıştırıldı.

B. subtilis RSK96'nın α -amilaz aktivitesi için pamuk sapı (küçük) ve pirinç kabuklarının en iyi aktivite veren substratlar olarak belirlendiği ortamda optimum enzim aktivitesi %90 pamuk sapı (küçük) ve %10 pirinç kabuğu karışımının bulunduğu ortamda 1073.2 U/mg olarak belirlenmiştir. Karışımdaki pamuk sapı (küçük) miktarı azalıp pirinç kabuğu miktarı arttıkça aktivitenin giderek azaldığı, pirinç miktarı %90'nın altına indikten sonrada aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.13.'te gösterilmiştir.

Tablo 5. 13. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi

Kepek Karışımları (%)	Spesifik aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
10 Pk ¹ +90 P ²	653.0±56.2 ^c
20 Pk+ 80 P	663.5±31.3 ^c
30 Pk+ 70 P	736.7±41.7 ^{de}
40 Pk+ 60 P	749.2±48.1 ^{de}
50 Pk+ 50 P	821.8±63.9 ^{cd}
60 Pk+ 40 P	893.4±20.6 ^{bc}
70 Pk +30 P	934.9±23.6 ^b
80 Pk+ 20 P	968.8±42.0 ^b
90 Pk+10 P	1073.2±33.8 ^a

Pk¹: Pamuk sapı (küçük), P²: Pirinç kabuğu

Tabloda substrat karışımlarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

B. subtilis RSK96'nın proteaz aktivitesi için mercimek kabuğu ve pamuk sapının (büyük) en iyi aktivite veren substratlar olarak belirlendiği ortamda optimum enzim aktivitesi %90 mercimek kabuğu ve %10 pamuk sapı (büyük) karışımının bulunduğu ortamda 9566.6 U/mg olarak belirlenmiştir. Karışımındaki mercimek kabuğu miktarı azalıp pamuk sapı (büyük) miktarı arttıkça aktivitenin giderek azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.14.'te gösterilmiştir.

Tablo 5. 14. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi

Kepek karışımları (%)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
10 M ¹ +90Pb ²	2442.0±30.6 ^l
20 M+80 Pb	3369.1±36.8 ^h
30 M+70 Pb	3691.5±44.9 ^h
40 M+60 Pb	3798.2±36.1 ^f
50 M+50 Pb	4663.7±46.0 ^e
60 M+40 Pb	5365.4±64.7 ^d
70 M+30 Pb	5643.1±44.4 ^c
80 M+20 Pb	6300.9±18.7 ^b
90 M+10 Pb	9566.6±56.4 ^a

M¹: Mercimek kabuğu Pb²:Pamuk sapı (büyük)

Tabloda substrat karışımlarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

B. licheniformis ATCC12759'un β -galaktosidaz aktivitesi için pirinç kabuğu ve pamuk sapının (küçük) en iyi aktivite veren substratlar olarak belirlendiği ortamda optimum enzim aktivitesi %90 pirinç kabuğu ve %10 pamuk sapı (küçük) karışımının bulunduğu ortamda 3099.2 U/mg olarak belirlenmiştir. Karışımdaki pirinç kabuğu miktarı azalıp pamuk sapı (küçük) miktarı arttıkça aktivitenin giderek azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.15'te gösterilmiştir.,

Tablo 5. 15. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC12759'un β -galaktosidaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi

Kepek karışımları(%)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala \pm standart hata)
10 P ¹ +90 Pk ²	3099.2 \pm 70.5 ^a
20 P+80 Pk	2789.6 \pm 50.8 ^b
30 P+70 Pk	2220.9 \pm 83.0 ^c
40 P+40 Pk	1910.7 \pm 104.4 ^d
50 P+50 Pk	1794.5 \pm 9.3 ^d
60 P+ 40 Pk	1101.0 \pm 70.7 ^e
70 P+30 Pk	1090.7 \pm 55.7 ^e
80 P+20 Pk	1007.2 \pm 51.7 ^f
90 P+10 Pk	932.6 \pm 56.0 ^f

P¹: Pirinç kabuğu, Pk²: Pamuk sapı (küçük)

Tabloda substrat karışımlarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Yabani suş *B. licheniformis*'in β -galaktosidaz aktivitesi için pirinç kabuğu ve pamuk sapının (küçük) en iyi aktivite veren substratlar olarak belirlendiği ortamda optimum enzim aktivitesi %90 pirinç kabuğu ve %10 pamuk sapı (küçük) karışımının bulunduğu ortamda 2744.4 U/mg olarak belirlenmiştir. Karışımdaki pirinç kabuğu miktarı azalıp pamuk sapı (küçük) miktarı arttıkça aktivitenin giderek azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.16.'da gösterilmiştir.

Tablo 5. 16. KSF ortamında yabancı suş *B. licheniformis* β -galaktosidaz üretimi sırasında en iyi aktivite elde edilen substrat karışım miktarlarının belirlenmesi

Kepek Karışımları (%)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala \pm standart hata)
10 P ¹ +90 Pk ²	991.6 \pm 59.7 ^g
20 P+ 80Pk	1296.3 \pm 37.9 ^f
30 P+ 70 Pk	1755.4 \pm 13.3 ^e
40P+ 60 Pk	2061.2 \pm 27.1 ^d
50 P+ 50 Pk	2199.5 \pm 18.8 ^c
60 P+ 40 Pk	2435.2 \pm 27.1 ^b
70 P+ 30 Pk	2744.4 \pm 60.4 ^a
80 P+ 20 Pk	2790.5 \pm 18.2 ^a
90 P+ 1 Pk	2801.0 \pm 19.1 ^a

P¹: Pirinç kabuğu, Pk²: Pamuk sapı (küçük)

Tabloda substrat karışımlarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.2.10. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği KSF ortamına derişimi %1 olacak şekilde maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, mannoz, laktoz, arabinoz ve sukroz ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı. *B. licheniformis* ATCC12759 ve yabancı suş *B. licheniformis* bakterilerinin kültür edileceği KSF ortamlarına derişimi %1 olacak şekilde maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz ve sukroz ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

Pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen %1 konsantrasyonundaki karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96 ile ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde kontrole (1142.8

U/mg) göre daha az α -amilaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında galaktozun (1128.2 U/mg) kontrole göre oldukça yakın sonuç verdiği saptanmıştır. Arabinoz (979.2 U/mg) ve sükroz (973.0 U/mg) içeren ortamlardaki α -amilaz aktivitesi diğer karbon kaynaklarına göre nispeten daha iyi, kontrolden ise düşüktür. Karbon kaynakları arasında en yüksek α -amilaz aktivitesine galaktoz, en düşük α -amilaz aktivitesine de ksiloz (413.3 U/mg) içeren KSF ortamında rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.17.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 17. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Karbon Kaynakları(%1)	Spesifik aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1142.8±40.9 ^a
Mannoz	458.6±36.8 ^e
Arabinoz	979.2±79.8 ^b
Sükroz	973.0±34.6 ^b
Glukoz	597.6±39.0 ^d
Galaktoz	1128.2±37.5 ^a
Fruktoz	802.2±37.3 ^c
Laktoz	877.7±25.7 ^c
Ksiloz	413.3±23.4 ^e

Kontrol: katı substrat olarak pamuk sapının bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı karbon kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen %1 konsantrasyonundaki karbon kaynakları bulunan ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde arabinoz (4688.2 U/mg), laktoz (4460.2 U/mg), galaktoz (3812,7 U/mg), fruktoz (3600.8 U/mg), glukoz

(3462.0 U/mg), sükröz (3345,5 U/mg) ve mannoz (2918.7 U/mg) bulunan KSF ortamlarından elde edilen proteaz aktivite sonuçlarının kontrole (2788.9 U/mg) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında ksilozun (1907.8 U/mg) ise kontrole göre daha düşük sonuç verdiği saptanmıştır. Karbon kaynakları arasında en yüksek proteaz aktivitesine arabinoz (4688.2 U/mg), en düşük proteaz aktivitesine de ksiloz (1907.8 U/mg) içeren KSF ortamında rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.18.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 18. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Karbon Kaynakları (%1)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	2788.9±87.0 ^f
Mannoz	2918.7±71.3 ^f
Arabinoz	4688.2±57.3 ^a
Sukroz	3345.5±62.4 ^c
Glukoz	3462.0±58.6 ^{de}
Galaktoz	3812.7±39.7 ^c
Fruktoz	3600.8±68.3 ^d
Laktoz	4460.2±72.4 ^b
Ksiloz	1907.8±112.8 ^h

Kontrol: katı substrat olarak mercimek kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı karbon kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen %1 konsantrasyonundaki karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. licheniformis* ATCC 12759'un ürettiği β -galaktosidaz aktivite tayinlerinde kontrole (3674.3 U/mg) göre daha az β -galaktosidaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir.

Karbon kaynakları arasında galaktozun (3524.7 U/mg) kontrole göre yakın bir sonuç verdiği saptanmıştır. Fruktoz (3101.2 U/mg) ve sükroz (3083.3 U/mg) içeren ortamlarda β -galaktosidaz aktivitesi diğer karbon kaynaklarına göre nispeten daha iyi, kontrolden ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında en yüksek β -galaktosidaz aktivitesine galaktoz (3524 U/mg), en düşük β -galaktosidaz aktivitesine de glukoz (2903.2 U/mg) içeren KSF ortamında rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.19.'da gösterilmiştir.

Tablo 5. 19. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759'un β -galaktosidaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Karbon Kaynakları (%1)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala \pm standart hata)
Kontrol	3674.3 \pm 78.3 ^a
Sükroz	3083.3 \pm 61.5 ^b
Glukoz	2903.2 \pm 75.9 ^{bc}
Galaktoz	3524.7 \pm 192.3 ^a
Fruktoz	3101.2 \pm 80.3 ^b
Laktoz	2928.8 \pm 71.4 ^{bc}

Kontrol: katı substrat olarak pirinç kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı karbon kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen %1 konsantrasyonundaki karbon kaynaklarının bulunduğu ortamda kültür edilen yabani suş *B. licheniformis*'in ürettiği β -galaktosidaz aktivite tayinlerinde kontrole (3720.8 U/mg) göre daha az β -galaktosidaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında en yüksek β -galaktosidaz üretimi galaktoz (3274.9 U/mg), en

düşük β -galaktosidaz üretimi laktoz (1263.6 U/mg) bulunan KSF ortamında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.20.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 20. KSF ortamında yabancı suş *B. licheniformis*'in β -galaktosidaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynaklari(%1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	3720.8±60.2 ^a
Sükroz	2834.4±49.4 ^d
Glukoz	3045.7±42.9 ^c
Galaktoz	3274.9±34.9 ^b
Fruktoz	1786.2±27.3 ^f
Laktoz	1263.6±43.7 ^g

Kontrol: katı substrat olarak pirinç kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı karbon kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.2.11. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynakları Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği KSF ortamına derişimi %1 olacak şekilde azot kaynaklarından pepton, beef extract, kazein, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl), sodyum nitrat (NaNO_3), üre, yeast extract, amonyum sülfat (NH_4)₂SO₄ ve tryptone ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı. *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabancı suş *B. licheniformis* bakterilerinin kültür edileceği KSF ortamına derişimi %1 olacak şekilde pepton, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl), yeast extract, amonyum sülfat (NH_4)₂SO₄ ve tryptone kuru ağırlığa göre %1 oranında ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

Pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen % 1 konsantrasyonundaki azot kaynakları bulunan ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde en yüksek değer amonyum nitrat bulunan ortamda 1483.1 U/mg olarak elde edilmiştir. Üre (1172.7 U/mg) kontrole (1185.7 U/mg) yakın α -amilaz aktivite değeri vermiştir. KSF ortamına eklenen azot kaynakları arasında en yüksek α -amilaz aktivitesi amonyum nitrat, en düşük α -amilaz aktivitesine kazein (633.6 U/mg) bulunan KSF ortamlarında rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.21.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 21. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları(% 1)	Spesifik aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1185.7±59.1 ^b
Sodyum nitrat	852.9±45.2 ^d
Amonyum sülfat	846.9±37.8 ^d
Amonyum nitrat	1483.1±32.5 ^a
Amonyum klorür	1043.6±61.9 ^c
Beef extract	886.1±64.3 ^d
Tripton	850.5±56.7 ^d
Pepton	1012.3±40.8 ^c
Yeast extract	685.1±39.2 ^e
Üre	1172.7±35.9 ^b
Kazein	633.6±38.6 ^e

Kontrol: katı substrat olarak pamuk sapının bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı azot kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen % 1 konsantrasyonundaki azot kaynakları bulunan ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde beef extract (4346.2 U/mg) ve sodyum nitrat (3013.0 U/mg) bulunan ortamlarda en yüksek proteaz aktivite değeri elde edilmiştir. Aynı zamanda bu azot kaynakları kontrole (2788.9 U/mg) göre daha yüksek proteaz aktivitesi göstermişlerdir. Kontrol dahil KSF ortamına eklenen tüm azot kaynaklarının bulunduğu KSF ortamlarında proteaz aktivitesi elde edilmiştir. KSF ortamlarına eklenen azot kaynakları arasında en yüksek proteaz aktivitesi beef extract, en düşük proteaz aktivitesine tripton (1242.3 U/mg) bulunan KSF ortamlarında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.22.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 22. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları (%1)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	2788.9±71.4 ^c
Sodyum nitrat	3013.0±75.3 ^b
Amonyum sulfat	1962.5±46.0 ^f
Amonyum nitrat	2209.6±71.5 ^e
Amonyum klorur	2451.2±45.5 ^d
Beef ekstrakt	4346.2±35.8 ^a
Tripton	1242.3±46.2 ^h
Pepton	2510.5±36.9 ^d
Yeast ekstrakt	1271.1±37.3 ^h
Ure	1600.4±77.3 ^g
Kazein	1680.1±76.1 ^g

Kontrol: katı substrat olarak mercimek kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı azot kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen %1 konsantrasyonundaki azot kaynaklarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. licheniformis* ATCC 12759'un ürettiği β -galaktosidaz aktivite tayinlerinde azot kaynaklarının tümü kontrole (3674.3 U/mg) göre düşük β -galaktosidaz aktivitesi vermişlerdir. Amonyum sülfat ve tryptone birbirine yakın β -galaktosidaz aktivitesi göstermişlerdir. Kontrol dahil KSF ortamlarına eklenen tüm azot kaynaklarının bulunduğu ortamlarda β -galaktosidaz aktivitesi elde edilmiştir. KSF ortamına eklenen azot kaynakları arasında en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi tryptone bulunan KSF ortamında (3209.0 U/mg), en düşük β -galaktosidaz aktivitesine ise pepton (1944.5 U/mg) bulunan KSF ortamlarında rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.23.'te gösterilmiştir.

Tablo 5. 23. KSF ortamında *B. licheniformis* ATCC 12759'un ürettiği β -galaktosidaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları(%1)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	3674.3±63.0 ^a
Amonyum sülfat	3200.4±93.5 ^b
Amonyum nitrat	2280.0±73.5 ^d
Amonyum klorür	1995.6±63.6 ^e
Tryptone	3209.0±104.0 ^b
Pepton	1944.5±90.5 ^e
Yeast extract	1974.4±121.5 ^e

Kontrol: katı substrat olarak pirinç kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı azot kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen %1 konsantrasyonundaki azot kaynaklarının bulunduğu ortamda kültür edilen yabancı suş

B. licheniformis'in ürettiği β -galaktosidaz aktivite tayinlerinde azot kaynaklarının tümü kontrole (3720,8 U/mg) göre düşük β -galaktosidaz aktivitesi vermişlerdir. Amonyum sülfat ve amonyum nitrat birbirine yakın β -galaktosidaz aktivitesi göstermişlerdir. Kontrol dahil eklenen tüm azot kaynaklarının bulunduğu KSF ortamlarında β -galaktosidaz aktivitesi elde edilmiştir. KSF ortamına eklenen azot kaynakları arasında en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi amonyum sülfat (3477.2 U/mg), en düşük β -galaktosidaz aktivitesi ise pepton (2165.2 U/mg) bulunan KSF ortamlarında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.24.'te gösterilmiştir.

Tablo 5. 24. KSF ortamında *B. licheniformis* yabancı suşunun ürettiği β -galaktosidaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları (%1)	Spesifik Aktivite(U/mg) (ortamala \pm standart hata)
Kontrol	3720.8 \pm 31.9 ^a
Amonyum sülfat	3477.2 \pm 32.5 ^b
Amonyum nitrat	3328.1 \pm 34.5 ^c
Amonyum klorür	2824.4 \pm 31.0 ^e
Tripton	3153.2 \pm 38.9 ^d
Pepton	2165.2 \pm 16.9 ^f
Yeast extract	2168.1 \pm 25.1 ^f

Kontrol: katı substrat olarak pirinç kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı azot kaynaklarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.2.12. KSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği KSF ortamlarına derişimi %0.1 olacak şekilde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve CaCl_2 kuru

ağırlığa göre %0.1 oranında ilave edildi. Kültür işleminden sonra elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

Pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen % 0.1 konsantrasyonundaki metal tuzları bulunan ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde elde edilen değerler kontrole (1185.7 U/mg) göre düşük bulunmuştur. KSF ortamına eklenen metal tuzları arasında en yüksek α -amilaz aktivitesi demir tuzları (1087.6 U/mg), en düşük α -amilaz aktivitesine çinko tuzları (776.4 U/mg) bulunan KSF ortamlarında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.25'te gösterilmiştir.

Tablo 5. 25. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın α -amilaz üretimi üzerine metal tuzlarının etkisi

Metal Tuzları(%0.1)	Spesifik aktivite(U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	1185.7±30.8 ^a
MgSO ₄	949.4±46.6 ^c
ZnSO ₄	776.4±41.3 ^d
CaCl ₂	1053.0±61.2 ^{bc}
CuSO ₄	1041.3±36.9 ^{bc}
FeSO ₄	1087.6±29.8 ^{ab}

Kontrol: katı substrat olarak pamuk sapının bulunduğu KSF ortamı

Tabloda farklı metal tuzlarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

Mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen metal tuzları bulunan ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde elde edilen değerlerde kontrole (3440.8 U/mg) göre en yüksek değerler demir, magnezyum ve kalsiyum tuzlarının bulunduğu ortamlarda en yüksek proteaz aktivite değeri elde edilmiştir. KSF ortamına eklenen metal tuzları

arasında en yüksek proteaz aktivitesi demir tuzlarının (5997.6 U/mg), en düşük proteaz aktivitesine çinko tuzlarının (647.0 U/mg) bulunduğu KSF ortamlarında rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.26.'da gösterilmiştir.

Tablo 5. 26. KSF ortamında *B. subtilis* RSK96'nın proteaz üretimi üzerine metal tuzlarının etkisi

Metal Tuzları(%0.1)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ortamala±standart hata)
Kontrol	3440.8±71.6 ^d
MgSO ₄	4710.0±23.5 ^b
ZnSO ₄	647.0±59.3 ^f
CaCl ₂	3662.1±60.1 ^c
CuSO ₄	3185.1±58.4 ^e
FeSO ₄	5997.6±43.2 ^a

Kontrol: katı substrat olarak mercimek kabuğunun bulunduğu KSF ortamı

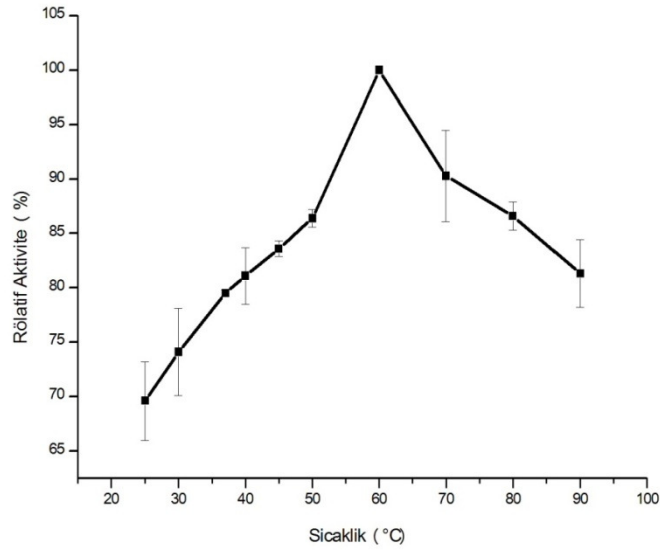
Tabloda farklı metal tuzlarına ait ortamlar arasındaki farkların karşılaştırılmasında aynı harfle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$), farklı harfle gösterilenler ise anlamlılık ($p<0.05$) göstermektedir.

5.2.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

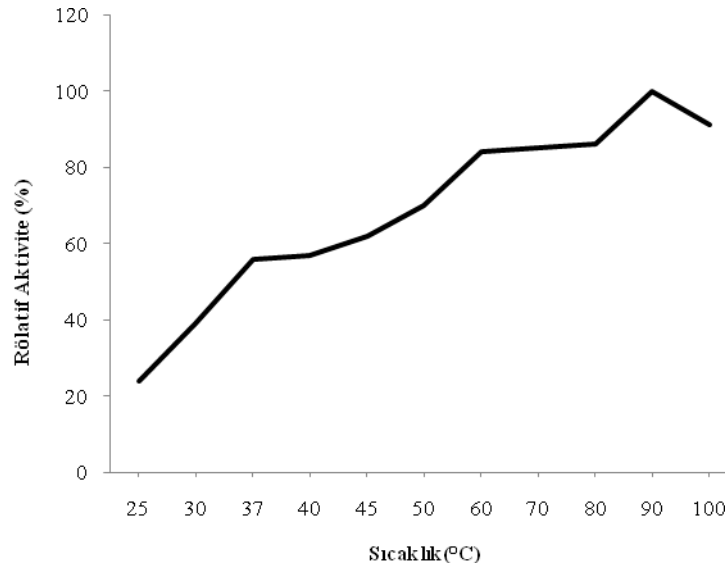
α -Amilaz ve proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için 25-100°C aralıklarında çalışıldı. Amilaz için 72. saatte, proteaz için 120. saatte elde edilen üst sınırlardan enzim aktivitelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.33. ve 5.34.'te gösterilmiştir.

Pamuk saplarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında α -amilaz aktivitesi için elde edilen enzim içeren üst sınırların 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda bekletildikten sonra enzim aktivitesinin 60°C'de bekletildiğinde en yüksek aktiviteyi verdiği belirlenmiştir.

Mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında proteaz aktivitesi için elde edilen enzim içeren üst sıvıların 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda bekletildikten sonra enzim aktivitesinin 90°C'de bekletildiğinde en yüksek aktiviteyi verdiği belirlenmiştir.



Şekil 5. 33. KSF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'dan elde edilen α -amilaz üzerine aktivite sıcaklığının etkisi

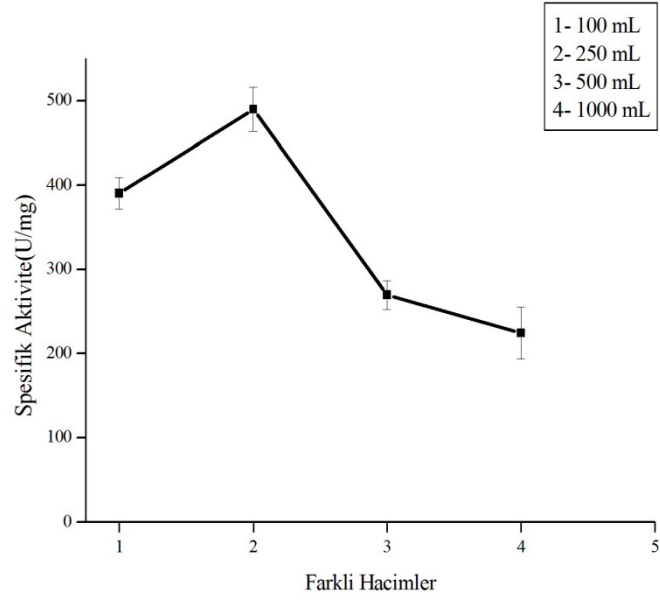


Şekil 5. 34. KSF ortamında kültür edilen *B. subtilis* RSK96'dan elde edilen proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

5.2.14. Farklı Hacimlerdeki KSF Ortamlarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

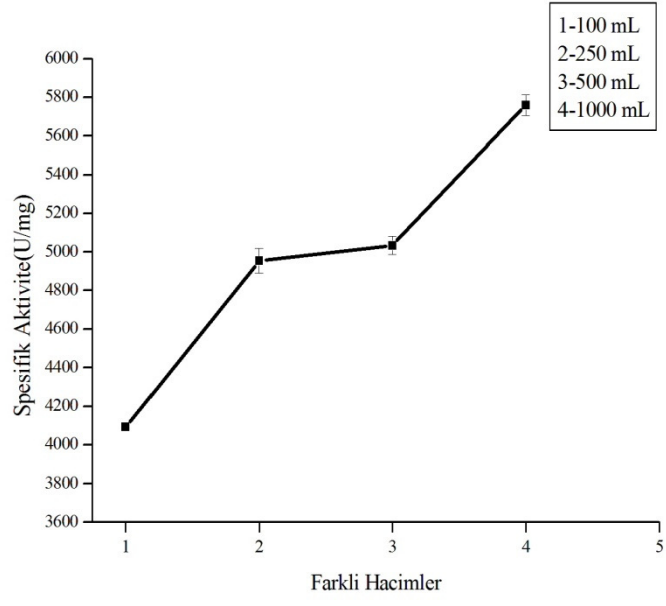
Enzim üretimi üzerine ortam hacminin etkisini belirlemek için *B. subtilis* RSK96'dan α -amilaz ve proteaz üretimi için sırasıyla pamuk sapları (küçük) ve mercimek kabukları farklı miktarlarda (3, 7.5, 15 ve 30 g) tartılarak 100, 250, 500 ve 1000 mL'lik erlenler içerisine konulup kültür işlemi yapıldı. Kültür işlemi sonunda elde edilen üst sıvılardan α -amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

Katı substrat olarak pamuk saplarının (küçük) 250 mL hacimdeki erlen (489.9 U/mg) içinde kullanılması ile KSF ortamında en yüksek α -amilaz üretimi gerçekleştirmiştir. En düşük α -amilaz üretimi kültür işlemi yapılan 1000 mL erlen (224.6 U/mg) ortamından elde edilmiştir. Bulunan değerler Şekil 5.35.'te gösterilmiştir.



Şekil 5. 35. Farklı hacimlerdeki KSF ortamlarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi

B. subtilis RSK96 mercimek kabuklarının 1000 mL hacimdeki erlen (5759.2 U/mg) içerisinde katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında en yüksek proteaz üretimi gerçekleştirilmiştir. En düşük proteaz üretimi kültür işlemi yapılan 100 mL hacmindeki erlen (4091.4 U/mg) ortamından elde edilmiştir. Bulunan değerler Şekil 5.36.'da gösterilmiştir.



Şekil 5. 36. Farklı hacimlerdeki KSF ortamlarının proteaz üretimi üzerine etkisi

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, bazı *Bacillus* türlerinden submerged (SmF) ve tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı, katı substrat fermantasyon (KSF) tekniği ile α -amilaz, β -galaktosidaz ve proteaz üretimi incelenmiştir. *Bacillus* cinsi bakterilerin tercih edilmelerinin nedeni; değişik ekstrasellüler enzimleri sentezleyebilme ve bu enzimleri çok miktarlarda salgılama yeteneğinde olmaları ve büyüme gereksinimlerinin basit oluşudur. En önemli avatanjlarından biri de kuşkusuz patojen olmamalarıdır¹⁵¹.

Ekstrasellüler enzimlerin üretimi biyokütle gelişimi ile ilişkilidir. Bakteri hücreleri tarafından üretilen proteazların birçoğu ekstrasellüler yapıdadır ve hücre büyümesi için ihtiyaç duyulan amino bileşikleri sağlamak için fermantasyon ortamında bulunan kompleks proteinli bileşiklerin işlenmesine yardımcı olurlar. Metabolitlerin artışı büyüme fazının logaritmik artış evresi boyunca meydana gelir. *Bacillus curcilians*'ın fermantasyon süresince çeşitli fermantasyon, fizyolojik ve ortam bileşenlerinden etkilenecek şekilde alkaline proteaz ürettiği rapor edilmiştir^{30,152-154}.

Bacillus türlerinin çoğu bazı ortamlarda pH ve tuz konsantrasyonlarının değiştirilmesine ihtiyaç duymalarına rağmen çoğunluğu ticari olarak hazırlanmış besiyeri ortamlarında mesofilik sıcaklıklarda gelişirler.

Bacillus türü bakteriler logaritmik artış öncesi ve durağan fazlarda ekstrasellüler proteazları üretirler, proteaz üretimi aynı zamanda büyüme ile ilişkilidir. Benzer sonuçlar diğer enzimleri üreten mikrobiyal türlerden de rapor edilmiştir^{103,152}.

B. subtilis RSK96 beş farklı besiyerinde kültür edildiğinde maksimum α -amilaz ve proteaz aktiviteleri 72. saatte LB besiyeri ortamında sırasıyla 391,9 U/mg

ve 1903,2 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.) *Bacillus* türleri ile yapılan önceki çalışmalarda α -amilaz ve proteaz için uygun inkübasyon süreleri farklı saatlerde rapor edilmiştir^{55,155,156}.

Genel olarak mikroorganizmaların meydana getirdiği α -amilaz ve proteazlar doğada temel ve kısmen birçok kültür şartlarında indüklenirler. Mikroorganizmaların ürettiği ekstraselüler proteazlar aynı zamanda C/N oranındaki farklılardan, glukoz gibi kolay metabolize edilen şekerler ve metal iyonları gibi ortam bileşenlerinden yoğun şekilde etkilenirler^{129,157,158}. Proteaz sentezi ortamdaki aminoasitler gibi hızlı metabolize edilebilen azot kaynaklarından da etkilenir¹⁰².

Mikroorganizmalarda azot (organik ve inorganik formda) aminoasitler, nükleikasitler, proteinler ve hücre duvarı bileşenlerinin sentezinde metabolize edilirler. Karbon ve azot kaynakları bakterilerin üremeleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Mikroorganizmaların enzim sentezi kültür ortamında bulunan farklı aminoasit ve azot kaynaklarının bulunup bulunmaması ile ilişkilidir.

Proteaz üretimi ortamdaki azot ve karbon kaynaklarının varlığına sıkı bir şekilde bağlıdır. Azot ve karbon kaynaklarının her ikisi de enzim sentezi üzerinde regülasyon etkiye sahiptir¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Ortamdaki azot oranı az olunca bu oran enzim üretimi için yetersiz gelmektedir. Bununla birlikte azot oranındaki fazlalık enzim üretiminde inhibisyona neden olabilir¹⁶².

Daha önceki yapılan çalışmalarda rapor edildiğine göre *Bacillus* cinsinin birçok türünde karbonhidrat indirgeyen enzimlerin kolayca metabolize edilen substratların varlığında katabolit represyona uğradığı rapor edilmiştir¹⁶³⁻¹⁶⁷. Yapılan bu çalışmalara benzer şekilde yaptığımız çalışmada SmF ortamına eklenen %1

konsantrasyonundaki karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde kontrole (521 U/mg) göre daha az α -amilaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Kültür ortamına eklenen karbon kaynaklarının hiçbiri α -amilaz üretiminde arttırıcı rol oynamamıştır. SmF ortamına eklenen karbon kaynaklarından kontrole göre arabinoz %96, gliserol %91 ve laktoz %84 oranında α -amilaz üretimini inhibe etmiştir (Tablo 5.1.). Proteaz aktivite tayinlerinde ise kontrole (1837 U/mg) göre daha az proteaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Karbon kaynaklarından gliserol kontole göre proteaz sentezini yaklaşık olarak %78 oranında baskılamıştır (Tablo 5.2.).

Yapılan önceki çalışmalarda karbon kaynakları *B. subtilis*'in kültür edildiği ortamlara eklenmiş ve proteaz biyosentezi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Genelde saf karbon kaynakları proteaz üretimini inhibe etmekte ve aynı zamanda proteaz biyosentezinin katabolik represyonuna neden olabilmektedir¹⁰².Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde diğer araştırmalarda da ortama glukoz eklenmesi sonucu proteaz üretiminde düşüş gözlenmiştir¹⁶⁷⁻¹⁷⁰.

Kullandığımız mikroorganizma mono ve dissakkaritlerin bulunduğu ortamlarda üreme göstermiş ancak α -amilaz ve proteaz üretimleri baskılanmıştır. Bu sonuçlar bize enzimlerin sentezinde doğrudan bir inhibisyonun olduğunu ve muhtemelen enzim sentezi üzerine karbon kaynaklarının katabolik represyonundan dolayı α -amilaz ve proteaz üretiminde azalmanın olduğunu düşündürmektedir.

SmF ortamına eklenen % 1 konsantrasyonundaki azot kaynakları bulunan ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde azot kaynakları arasında organik azot kaynaklarından kazein içeren ortamda en yüksek α -amilaz aktivitesi (554,1 U/mg) elde edilmiştir. SmF ortamına inorganik

azot kaynaklarının organik azot kaynaklarına göre daha fazla baskılayıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. İnorganik azot kaynaklarından sodyum nitrat yaklaşık olarak %99 ve amonyum sülfat %92 oranında α -amilaz üretimini baskılamıştır. Elde ettiğimiz proteaz aktivite tayinlerinde kontrole (1837 U/mg) göre daha az proteaz üretimi meydana geldiği belirlenmiştir. Azot kaynakları arasında yeast extract proteaz aktivitesini kontrole göre yaklaşık olarak %97 oranında inhibe etmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.'te gösterilmiştir.

Önceki çalışmalarda rapor edilen sonuçlar incelendiğinde elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde bazı organik azot kaynaklarının (yeast extract ve pepton) α -amilaz üretimini arttırdığı rapor edilmiştir^{171,172}. Organik azot kaynaklarından yeast extract ve peptone genelde amilaz sentezini olumlu yönde etkilemektedirler^{57,196,197}. Elde ettiğimiz sonuçlar *Bacillus* türleri ile yapılan daha önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde amonyum tuzları tarafından üreme ve enzim üretiminin baskılandığı olgusunu desteklemektedir^{162,171-175}.

SmF ortamına eklenen %0.01 konsantrasyonundaki aminoasitlerin bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde kültür ortamına eklenen glutamik asit ve lizin içeren ortamlarda kontrole göre yaklaşık olarak sırasıyla %20 ve %18 daha fazla α -amilaz aktivitesi elde edilmiştir. Kontrolden elde edilen değer (521,0 U/mg) glutamik asit ve lizin bulunan ortamlarda elde edilen değerlere göre düşük diğer aminoasitleri içeren ortamlara göre yüksek olarak bulunmuştur. Aminoasitleri içeren ortamlar arasında en düşük α -amilaz aktivitesi valin (183,1 U/mg) bulunan ortamda elde edilmiştir (Tablo 5.5). Proteaz aktivite tayinlerinde aminoasit bulunan ortamlardaki proteaz aktivitesi izölosin içeren ortamda kontolden elde edilen değerden %27 daha fazla bulunmuştur. Diğer

aminoasitleri içeren ortamlardaki tüm aktivite tayinleri kontrolden düşük çıkmıştır. L-alanin içeren ortamda önemli oranda enzim üretimi baskılamıştır (Tablo 5.6.).

Yapılan önceki bir çalışmada Ile, Cys, Phe, Asp, Glu, Met içeren ortamların *B. stearothermophilus*'un büyümesini uyardığı rapor edilmiştir¹⁶⁷. Aynı şekilde *B. subtilis*'in kültür edildiği ortama arjinin, sistein, glutamik asit, izolösin, lizin, metyonin, aspartik asit, prolin, fenil alanin, glisin, valin ve triptofan eklediğinde en yüksek proteaz aktivitesi valin bulunan ortamda elde edilmiştir¹¹⁸.

SmF ortamına eklenen %0.1 konsantrasyonundaki metal tuzlarının bulunduğu ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α -amilaz ve proteaz üretimleri üzerine herhangi bir arttırıcı etkisi tespit edilmemiştir. SmF ortamına eklenen metal tuzları arasında en yüksek aktivite CaCl_2 bulunan ortamda elde edilmiştir. FeSO_4 , CuSO_4 ve ZnSO_4 tuzlarını içeren SmF ortamlarında bakteri üremesi gerçekleşmemiş ve dolayısı ile enzim sentezi de olmamıştır (Tablo 5.7 ve Tablo 5.8).

Çalışmamıza benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda da kültür ortamlarına eklenen metal tuzlarının enzim üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir^{132,170}. İnhibisyon, ortamdaki katyonlar ile proteinlerle ilişkili katyonlar arasındaki rekabetten dolayı enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuş olabilir.

α -Amilazlar, aktiviteleri için herhangi bir koenzime gereksinimi olmayan ve kalsiyum taşıyan metalo proteinlerdir. Kalsiyum, enzim substrat ikilisinin oluşumuna katılmaz, fakat enzimi maksimum dayanıklılık ve yüksek aktivite için doğru konformasyonda tutar¹⁷¹. Enzimin stabilizasyon ve proteolitik etkilere karşı korunması için mutlaka ortamda etkili metal iyonlarının bulunması gerekmektedir¹⁷²⁻¹⁷⁴. Farklı kaynaklardan saflaştırılan α -amilazların mol başına 1 mol kalsiyum iyonu bağladıkları belirtilmektedir¹⁷⁵. Ayrıca, araştırmacılar kalsiyumun bakteri fizyolojisi

ve metabolizması üzerinde önemli etkileri olduğunu düşünmektedirler^{176,177}. Gıda içeriklerinde bulunan spesifik metal iyonları varlığında amilaz aktivitesi inhibe veya aktif olur ve böylece sindirim oranı belirlenir. Metal iyonlarının etkisi farklı türlerde bulunan amilazlar üzerinde farklı rol oynar.

SmF ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki CaCl₂ tuzlarının bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α-amilaz aktivitesi tayinlerinde %1.5 konsantrasyonunda CaCl₂ iyonlarının bulunduğu ortamda kontrole göre yaklaşık olarak %102 daha fazla elde edilmiştir (Şekil 5.5.).

Deterjanlarda kullanılan α-amilazların sınırlamalarından biri de kalsiyuma duyarlılık göstermeleri ve düşük kalsiyum içeren ortamlarda stabilitelerinin ciddi bir şekilde riske girmesidir⁴⁶. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α-amilaz enziminin bu yönüyle avantaj sağlayacağını düşünmekteyiz.

SmF ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda pamuk saplarının bulunduğu ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği α-amilaz aktivite tayinlerinde en yüksek aktivite %0.5 oranında pamuk saplarının bulunduğu ortamdaki kontrole göre %128 daha fazla aktivite elde edilmiştir. Sadece %2 konsantrasyonunda pamuk sapı içeren ortam hariç %0.25, 0.5 ve 0.75 konsantrasyonların pamuk saplarının bulunduğu ortamlarda kontrole göre sırasıyla %128,124 ve 119 daha fazla α-amilaz üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 5.6.).

Elde ettiğimiz bu sonuç bize *B. subtilis* RSK96'nın kültür edildiği SmF ortamında pamuk sapının karbon ve azot kaynağı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Katı substrat fermantasyonu (KSF) serbest halde suyun olmadığı ve sınırlı oranda nemin bulunduğu ortamda mikroorganizmaların gelişimine dayalı bir

metottur. Bu yöntemde mikroorganizmalar nemli katı bir yüzey üzerinde gelişir ve ortamda bulunan serbest hava kullanılır. Böylece fermantasyon ortamı ideal olarak bazı mikroorganizmalardan belirli metabolitleri elde etmek için uygun olan doğal bir büyüme ortamına benzer hale gelmektedir. KSF buğday, pirinç, soya, manyok gibi nem içeriğine sahip polimer yapıdaki tarım substratlarını dönüştürmede kullanılmaya başlanmıştır³⁴.

KSF'de fermantasyon süreci için uygun katı substrat seçimi oldukça önemli bir faktördür. Bu yüzden mikrobiyal büyüme ve ürün eldesi için çok sayıda tarımsal sanayi atıkları kullanılmaktadır. KSF'de kullanılan başlıca substratlar daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi genellikle pirinç, buğday, darı, mısır, soya fasulyesi gibi yöresel olarak farklı kullanım oranları gösteren sanayi ve tarımsal atıklardır¹¹.

Çalışmamızda, KSF yöntemiyle katı substrat olarak buğday kepeği, pirinç kabuğu, muz kabuğu, mercimek kabuğu, portakal kabuğu, elma kabuğu, pamuk sapı, öğütülmüş darı ve mısır kaba unları gibi tarımsal atıklar KSF yönteminde substrat olarak kullanılarak bazı *Bacillus* türlerinin α -amilaz, β -galaktosidaz ve proteaz üretimleri incelenmiştir.

Farklı tarım atıklarının bulunduğu KSF ortamlarında kültür edilen *B. subtilis* RSK96 en yüksek α -amilaz üretimini pamuk saplarının (küçük), en yüksek proteaz üretimini mercimek kabuklarının, *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabancı suş *B. licheniformis* en iyi β -galaktosidaz üretimini pirinç kabuklarının bulunduğu ortamlarda gerçekleştirmişlerdir. KSF'de pirinç kabuğu kullanımı daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi oldukça yaygındır^{131,178}. Pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk sapının karbonhidratlarca zengin olması, önemli oranda vitamin ve

mineral madde içermeleri mikroorganizmaların üremesini kolaylaştırmış ve enzim üretme kapasitelerini arttırmış olabilir.

Yapılan incelemelerde mikroorganizmalar tarafından üretilen α -amilaz veya diğer enzimlerin desteklenmesinde bazı katı substratların diğer bazı katı substratlarla karşılaştırıldığında daha yüksek bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Örneğin buğday kepeği ve patates kabuğu diğer katı substratlara göre benzer KSF şartları altında daha fazla α -amilaz üretimi sağlamaktadır. Ancak bazı spesifik katı substratlar üzerinde büyüyen mikroorganizmaların yüksek miktarda enzim üretimi gerçekleştirme nedenleri hakkında şimdiye kadar yeterli bir açıklama yapılmamıştır¹³⁶.

Bu çalışma pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve pamuk saplarının katı substrat olarak kullanılması ile büyük ölçüde endüstriyel enzimlerin üretilmesini ve ayrıca bu organik atıkların çöp yığınları haline gelerek çevre sorunlarına yol açan bu katıların, hem ekonomik hem de güvenli şekilde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Mikrobiyal metabolizma kompleks bir süreç olup fermantasyon ve ortam bileşenleri tarafından etkilenir. Maksimum enzim üretimi gerçekleşen inkübasyon sürelerinden sonra enzim aktivitelerinde görülen azalmaların nedeni fermantasyon ortamında bulunan diğer bileşenler ile meydana gelen enzim etkileşimleri sonucunda enzim yapısında oluşan konformasyonel değişiklik ve meydana gelen denatürasyondan kaynaklı olabilir. Bunun yanında ortama salgılanan diğer hidrolitik enzimlerin etkisi sonucu enzim üretiminde azalma meydana gelmiş olabilir.

Biyokütle mikroorganizmaların enzim üretme kapasitesi ile ilgili olabilir. Mikroorganizmalar maksimum üreme fazında iken enzim üretimi de maksimumdur.

Mikroorganizmaların enzim üretimleri ile büyümeleri arasında bir ilişki söz konusudur¹⁸⁰. İnkübasyon zamanı ortamın özellikleri tarafından kontrol edilir ve bu olay doğal olarak büyüme ve enzim üretimine bağlıdır^{142,180}.

Bu çalışmada katı substrat olarak pamuk saplarının bulunduğu ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96 en yüksek α -amilaz üretimini 72. saatte 1403,7 U/mg; mercimek kabuklarının bulunduğu ortamda en yüksek proteaz üretimi ise 120. saatte 4059,9 U/mg ölçülmüş olup elde edilen sonuçlar Şekil 5.7. ve 5.8.'de gösterilmiştir. Yabani suş *B. licheniformis* ve *B. licheniformis* ATCC 12759 katı substrat olarak pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda kültür edildiklerinde maksimum β -galaktosidaz aktiviteleri sırasıyla 48. saatte 2893,9 U/mg ve 120. saatte 3244,7 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.).

Benzer şekilde diğer araştırmacılar tarafından yapılan önceki çalışmalarda da KSF koşulları altında α -amilaz için uygun inkübasyon süresi 72. saat olarak belirlenmiştir^{136,181}. Önceki çalışmalarda 24. saatler ile 120. saatler arasında en yüksek α -amilaz üretimi rapor edilmiştir^{44,131,143,169,179,181-183}. Bunun yanında *Bacillus subtilis* CM3'ten maksimum α -amilaz üretimi 144. saatte elde edilmiştir¹⁸⁴. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Proteaz üretimi 12. saatte üretim az olup artan saatlere bağlı olarak 120. saatte maksimum seviyeye çıkmış ve bu süreden sonra üretim düşmeye başlamıştır. Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde proteazın 24. saatten sonra üretiminin artmaya

başladığı yapılan diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalara paralellik göstermektedir^{138,143,185-188}.

KSF ve SmF yöntemleri ile gerçekleşen proteaz üretimini karşılaştırma amacı ile yapılan bir çalışmada 1 g kepeğin yaklaşık 100 mL sıvı besiyerine denk geldiği belirlenmiştir¹⁰².

B. subtilis RSK96 KSF ve SmF ortamlarında 72 saat kültür edildiğinde KSF ortamında elde edilen α -amilaz aktivitesi SmF ortamında elde edilen enzim aktivitesinden yaklaşık olarak 3.6 kat daha fazla bulunmuştur. Benzer şekilde KSF ortamından 120. saatte elde edilen proteaz aktivite değeri, SmF ortamında 72. saatte elde edilen proteaz aktivite değerinden yaklaşık olarak 2 kat daha fazla bulunmuştur.

Kullandığımız mikroorganizmalardan yabancı suş *B. licheniformis* ile *B. licheniformis* 12759 substrat olarak pirinç kabuklarının kullanıldığı KSF ortamlarında kültür edildiğinde β -galaktosidaz üretme kabiliyetlerine göre karşılaştırıldığında yabancı suşun 48. saatte 2893,9 U/mg, *B. licheniformis* 12759'un ise 120. saatte 3244,7 U/mg β -galaktosidaz üretimi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerden de anlaşılacağı gibi *B. licheniformis* 12759 yabancı suştan daha fazla enzim üretmiştir. Ancak inkübasyon süreleri dikkate alındığında yabancı suş *B. licheniformis* daha avantajlı görünmektedir.

İnkübasyon sürelerinden sonra ortamda oluşmaya başlayan sekonder metabolitlerin, enzimin denatürasyonuna neden olup enzim miktarında düşüşe yol açtığı düşünülmektedir^{44,183,189}. Kullanılan bakterinin büyüme hızı ve enzim üretme özelliği de inkübasyon süresini etkilemektedir^{44,143}. Aynı zamanda inkübasyon sürelerinin farklı olması, çalışmalarda kullanılan mikroorganizma özelliklerinin

farklı olması ve katı substratların içerdikleri besin maddelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sıcaklık biyokimyasal reaksiyon oranlarını etkiler ve KSF'de önemli bir parametredir, ancak kontrolü SmF'ten daha zordur²². Birçok kültür işleminde enzim üretimi için optimum sıcaklığın mesofilik düzeyde uygun olduğu rapor edilmiştir¹⁰².

Fermantasyon sıcaklığı genelde ısıya duyarlı olan enzimler ve metabolitlerin sentezlenmesi ve mikroorganizma büyümesi için çok önemli bir faktördür⁴⁴. Daha yüksek sıcaklıklar bakteri için olumsuz etki yapmış ve dolayısı ile enzim sentezinde düşüşe neden olmuş olabilir. KSF işleminde boyunca sıcaklık doğrudan orantılı şekilde mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini etkilemiştir.

Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için yaptığımız çalışmada amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz için maksimum enzim üretimi 37°C'lik inkübasyon ortamından elde edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir^{44,143,180,181}. Bunun yanında yapılan çalışmalarda uygun inkübasyon sıcaklıkları 25 ile 45°C arasında değişiklik göstermektedir^{44,130,143,182,183,188,190-194}.

Sıcaklığın 37°C'den 45 °C'ye çıkarılmasıyla da enzim üretimlerinde önemli azalmanın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca fermantasyon sıcaklığındaki bu azalma ortamın buharlaşma hızını düşürmesi açısından da avantaj sağlamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız bakterilerin optimum üreme sıcaklıkları 37°C'dir. Kültür ortamlarının da bu sıcaklığa benzer koşullarda olması enzim üretme yeteneklerini arttırmış olabilir.

KSF'de sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın gelişebilmesi, enzim ya da metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığıyla yakından

ilişkili olduğu belirtilmektedir⁴³. Genellikle katı substrat fermantasyonunda ortam sıcaklığı 25-37°C aralığında değişmektedir ve mikroorganizmaların büyüme kinetiğine bakıldığında sıcaklığa bağlı olarak bu sıcaklık aralıklarında kararlı kaldığı belirtilmektedir¹³¹. Maksimum enzim üretimi 37°C’de yapılan deneylerde elde edilmiştir ve bu sıcaklık literatürde belirtilen sıcaklık değerlerine oldukça yakındır.

Yabani suş *B. licheniformis* ile *B. licheniformis* 12759 substrat olarak pirinç kabuklarının kullanıldığı KSF ortamlarında β -galaktosidaz üretimi için farklı inkübasyon sıcaklıklarında (30-37-40-45 ve 50°C) kültür edildiklerinde *B. licheniformis* 12759 β -galaktosidaz üretmesi yönüyle bu sıcaklık değişimlerine daha fazla toleranslı davranmış ve daha fazla enzim üretimi göstermiştir. Bu yönüyle *B. licheniformis* 12759 β -galaktosidaz üretimine yönelik kullanımda daha avantajlı görünmektedir.

Fermantasyon sisteminde çalkalama sistemdeki homojeniteyi artırır ve gradientleri bozar. Bakteri hücreleri substrat yüzeyine sıkıca bağlanmadıklarından, çalkalama ile başlıca hava akımıyla ilişkili biyokütle engeli ortadan kaldırılabilir. Karmaşık moleküller olan enzimleri mekanik güce duyarlıdır ve uygun olmayan çalkalama hızlarında enzim denatürasyonu meydana gelebilir¹⁹⁵. Düşük çalkalama hızı fermantasyon ortamında organizmanın büyümesi ve enzim üretimi için gerekli olan zayıf havalandırma oranına neden olabilir.

Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanında ortam şartlarının da etkin olduğu sentetik ortama göre, doğal substratların kullanıldığı ortamlarda oksijen transferinin daha yavaş olduğu bilinmektedir. Oksijen transferini önemli oranda etkileyen çalkalama hızının incelendiği deney sonuçlarımız Şekil 5.19. ve Şekil 5.20.’de verilmiştir. 60, 100, 120, 180 ve 200 rpm de yapılan deney sonucunda enzim

üretimini azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, derin fermantasyona göre daha viskoz olan katı substratın kullanıldığı ortamda düşük karıştırma hızında oksijen transferi sınırlanmakta, yüksek karıştırma hızlarında ise mikroorganizmanın gelişmesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Düşük karıştırma hızında enzim aktivitesindeki azalma fermantasyonun oksijen sınırlandırmasından ve/veya katı substrata bağlı besinlerin ortama yeterince geçememesinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada KSF ortamlarında *B. subtilis* RSK96'dan maksimum α -amilaz ve proteaz üretimleri için uygun çalkalama hızı 150 rpm olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir^{193,197}. Mikroorganizmalardan enzim optimizasyonu çalışmalarında çalkalama hızları farklılık göstermektedir. Bunun yanında diğer araştırmacılar tarafından yapılan önceki çalışmalarda enzim üretimi için uygun çalkalama hızları 120, 180, 200, 250 ve 260 rpm olarak tespit edilmiştir^{21,44,142,143,181,184,187,193,197}.

Ekstraksiyon fermente olmuş biyokütleden enzim elde etmek için önemlidir ve bundan dolayı uygun bir solvent seçimi gereklidir. Ekstraksiyon işlemi için düşük solvent hacmi kullanılırsa total aktivitede azalma gözlenir ve bu yetersiz solvent hacmi fermente olmuş katı substrat kütesine yeterince nüfus edemez¹⁹⁷. Uygun ekstraksiyon sıvısı seçimi enzim elde etme aşamasında maliyeti azaltan önemli bir faktördür.

Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek için katı substrat olarak pamuk sapının (küçük) kullanıldığı KSF ortamında en yüksek α -amilaz aktivitesi ekstraksiyon ortamı olarak 50 mM NaCl kullanılan ortamda (847 U/mg) (Şekil), mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF

ortamında en yüksek proteaz aktivitesi ekstraksiyon ortamı olarak %1 Triton X 100 kullanılan ortamda (3781,5 U/mg), *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabani suş *B. licheniformis* pirinç kabuklarının bulunduğu KSF ortamında ekstraksiyon medyumunu olarak çeşme suyunun kullanıldığı ortamda en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi elde edilmiştir. Yabani suş *B. licheniformis* ile *B. licheniformis* 12759 β -galaktosidaz üretimi için farklı ekstraksiyon ortamları ile ekstrakte edildiğinde *B. licheniformis* 12759 β -galaktosidaz üretimi bakımından tüm ekstraksiyon ortamlarında yabani suş *B. licheniformis*'e göre daha fazla üretim gerçekleşmiştir. Çeşme suyunun mineral madde bakımından zengin olması mikroorganizmanın enzim üretme yeteneğini stabilitesini arttırmış olabilir.

Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz üretimine yönelik önceki çalışmalarda farklı tamponlar, deterjanlar ve saf su ekstraksiyon sıvısı olarak kullanılmıştır^{15,44,142,195,198}.

Genelde canlı hücreler ortamın %70-80 nem içeriği ile karakterize edilir ve bu nedenle su içeriği yeni hücrelerin sentezini belirleyen önemli bir faktördür. Bir faktör olarak nem, KSF'nin tanımlanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu parametrenin kontrolü mikroorganizmanın metabolik aktivitesindeki değişimi kontrol etmek için kullanılabilir. Bakteriler için katı matriks nem oranının %70'ten fazla olması gerektiği belirlenmiştir¹⁹⁹. KSF yönteminde az suyun bulunduğu şartlarda hızla gelişen bir organizma kullanılır ve eğer aktif bir inokülüm işlemi substrat yüzeyine yapılırsa kullanılan organizma kontaminant mikroorganizmalarla rekabet edebilir³⁴.

İnokülüm seviyesindeki artış genelde organizmanın büyümesi ve büyüme ile ilgili aktiviteleri belirli oranda arttırmaktadır. İnokülüm seviyesindeki artış besin

azlığından dolayı mikrobiyal aktivitede azalmaya neden olabilir. Düşük inokülüm hacmi üretim ortamındaki hücrelerin sayısında azalmayla sonuçlanabilir. Bu istenen ürün oluşumu ve substrat kullanımı için daha fazla zaman gereksinimine yol açar^{195,200}.

Yüksek miktarda bakteri ekimi nem seviyesini arttırarak yüzeyde emilmeyen bir tabaka oluşumuna ve difüzyon bariyeri gibi görev yapmasına ve katı substratın olumsuz etkilenmesine yol açar. Bu durum mikrobiyal aktiviteyi azaltacağından enzim üretiminde düşüşe yol açabilir^{44,143, 195}.

Doğal ortamlarda enzim üretimi diğer ortamlara nazaran daha yavaş gerçekleşmektedir¹⁹⁶. Mikroorganizmanın besiyerinde bulunan glukoz ve nişasta gibi besinleri doğal substratlara göre daha hızlı metabolize etmesi beklenen bir sonuçtur. Katı substratın ortama geçmesi, bu substratları mikroorganizmanın kullanacak forma getirmesi gibi ara kademeler sonucu ortamdaki enzim aktivitesi daha geç belirlenebilmiştir.

Enzim üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda *B. subtilis* RSK96'da α -amilaz ve proteaz için uygun inokülüm hacmi sırasıyla 3.5 mL ve 3 mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.21. ve 5.22.). *B. licheniformis* ATCC12759 ve yabani suş *Bacillus licheniformis*'ten en yüksek β -galaktosidaz üretimleri için uygun inokülüm hacmi her iki mikroorganizma içinde 3.5 mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.23. ve 5.24.). Araştırmacılar tarafından yapılan önceki çalışmalarda, kullanılan mikroorganizma ve substrat türüne bağlı olarak inokülüm hacimleri farklı değerlerde (%10, 20, 25 ve 30) belirlenmiştir^{136,143,195,201-203}. Elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Ortamda bulunan bakteri miktarının azlığı üremenin yavaş olmasına ve dolayısı ile düşük enzim üretimine neden olur. İnokülüm hacmi arttıkça, ortamda bulunan bakteri yoğunluğu da artar ve doğal olarak sentezlediği metabolitler de artar. Bu metabolitlerin artışı α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz üretimini indüklemiş ve dolayısıyla bu enzimlerin miktarlarını da arttırmış olabileceği düşünülmektedir. İnokülüm hacmi çok fazla olunca da enzim üretiminde düşüş gözlenmiştir. Bunun nedeni biyokütledeki artışın yanında sınırlı besin varlığından kaynaklanabilir.

Katı substrat fermantasyonunda ortamın nem içeriğinin kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Enzimin biyosentezi ve salgılanması katı haldeki substratın nemle etkileşimiyle ilişkilendirilebilir. Yüksek nem içeriği substratın gözeneklerini tıkar, yapışkanlık özelliğini artırır, gaz hacmini azaltır, difüzyonu düşürür ve oksijen sınırlanması ile sonuçlanabilirken, düşük nem içeriği katı haldeki besinlerin ortama geçebilmesi için yeterli olmayabilir ve substrat şişkinliğini azaltmaktadır, aynı zamanda yüksek oranda su gerilimleri meydana gelir^{43,44,204-208}. Ortamın su aktivitesi hücre membranından madde geçişinde su ve solütlerin kütle transferi için temel olarak göz önüne alınabilir. Bu parametrenin kontrolü mikroorganizmanın metabolik aktivitesindeki değişimi kontrol etmek için kullanılabilir³⁰.

Başlangıç nem içeriğinin (%30-80) büyüme, farklı metabolitlerin biyosentez ve salgılanmasını etkilediği için katı substrat fermantasyonu için önemli bir faktör olduğu rapor edilmiştir²⁰².

B. subtilis RSK96'nın kültür edileceği KSF ortamına katı substrat olarak eklenen substrat miktarının (nem) α -amilaz ve proteaz üretimi üzerine etkisini

belirlemek için yapılan çalışmada %30'luk (3 g) substrat miktarının uygun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.25.ve 5.26.). Maksimum düzeyde β -galaktosidaz üretimi için *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'in kültür edildiği KSF ortamlarında katı substrat olarak kullanılan substrat miktarları her iki bakteri içinde %20'lik (2 g) tespit edilmiştir (Şekil 5.27. ve 5.28.).

Ortamın nem içeriğindeki değişimler fermantasyon süresince havalandırma ve metabolik aktivitelerde değişimlere yol açar bu yüzden KSF işleminde nem oranını optimize etmek oldukça önemlidir⁴⁴. Ortamın nem içeriğinin de değiştiği bu deneylerde, düşük substrat konsantrasyonlarında enzim üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Kepek miktarı azlığında ortamda substrat az olacağından üreme ve enzim üretimi de yavaş olacaktır. Substrat miktarı belli bir miktarın üzerine çıktığında ise mikroorganizmalar için havalandırmanın güçlüğü, su oranının düşmesi gibi nedenlerden dolayı enzim üretimi de azalmış olabilir.

KSF tekniği kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda, kullanılan substrat miktarları farklı değerlerde (%15, 20, 70, 85 ve 90) belirlenmiştir^{44,131,195,196}. Elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

pH çeşitli metabolik aktiviteler üzerinde etki göstererek hücre zarından geçen bazı bileşikleri etkileyen her fermantasyon işleminde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür²⁰⁸. Enzimler pH'a karşı oldukça duyarlıdırlar. Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı, enzimin primer ve sekonder yapısını oluşturan aminoasitlerin iyonlaşması pH'dan etkilenir. Bu durum enzim aktivitesine de etki eder. pH'da meydana gelen herhangi bir değişiklik protein yapısında anlamlı değişikliklere yol açar. pH enzimlerin aktivasyon ve inaktivasyonunda önemli bir oynar. Her enzim maksimum enzim aktivitesi için optimum bir pH değerine sahiptir.

Katı substrat fermantasyonlarında (KSF) fermantasyon süresince pH kontrolü yapılamaz, sadece substratın başlangıç pH'ı inokülasyondan önce ayarlanabilir. Bazı tarım endüstrisi atıkları eşsiz bir tampon özelliğine sahiptirler ve enzim üretimi için avantajlar sağlamaktadır. Örneğin buğday ve pirinç kabuğu ile nemlendirilmiş bir karışımda %25 buğday kepeği yaklaşık pH 5.5 başlangıç pH'ına sahiptir²⁰⁹.

B. subtilis RSK96, *B. licheniformis* ATCC12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'in kültür edileceği KSF ortamlarının başlangıç pH'sı 4.0-10.0 değerleri arasında α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz üretimleri açısından incelendiğinde maksimum α -amilaz ve β -galaktosidaz üretimleri için uygun başlangıç pH'ı 7.0 ve proteaz için pH:9.0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.29-Şekil 5.32.).

Organizmanın büyümesi sırasında pH değişimi ortamdaki ürün stabilitesini etkiler. Birçok *Bacillus* türü amilaz üretimi için pH 6.0 ve 9.0 arasında ticari olarak SmF ile üretilmektedir^{67,210,211}. Mikrobiyal büyüme ve metabolizma hidrojen iyon dengesini ve dolayısıyla kültür ortamının pH'ını bozar²¹². Daha önceki çalışmalarda amilaz için optimum aktivite pH'sı genellikle 5-6,5 arasında olduğu rapor edilmiştir^{159,181}. Proteaz üretimi üzerine başlangıç pH etkisi ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir^{213,214}.

Mikrobiyal türler tarafından enzim üretimi dış ortam pH'ına sıkı bir şekilde bağlıdır. Çünkü kültür pH'sı birçok enzimatik işlemde etkilenir ve pH değeri sadece enzimlerin değil tüm proteinlerin yapısını etkileyen bir faktördür¹⁴⁶.

pH'daki bu değişim başlangıçtan itibaren doğal substratın bünyesinde bulunan proteinlerin ortama salgılanmasıyla ve daha sonraki pH artışı ise mikroorganizmanın protein üretimi ile açıklanabilir²¹⁵. Enzim üretiminin maksimum

olduğu zaman dilimlerinde ortam pH'sında yaklaşık olarak aynı ve paralel bir trend izlediği görülmektedir.

Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde önceki çalışmalarda uygun başlangıç pH'sı α -amilaz üretimi için 7.0 olarak tespit edilmiştir^{169,194,215,216}. β -galaktosidaz için yapılan çalışmalarda pH:5.0, 5.5 ve 6.5 olarak tespit edilmiştir²¹⁷⁻²¹⁹.

Proteazlarda özellikle alkalın olanlar için pH genellikle 8.0 ve üzeri olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda proteaz üretimi için uygun başlangıç pH'ı 9.0 olarak tespit edilmiştir. Serin proteazların (E.C. 3.4.21) bir alt tipi olan "alkalin proteazlar" yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olmalarından dolayı başta deterjan endüstrisi olmak üzere deri, gıda, ipek ve kâğıt endüstrilerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır²²⁰.

Yapılan bir çalışmada sterilizasyon için otoklavlanan örneklerin başlangıç pH'larının farklı olmasına rağmen örneklerin aynı pH özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun üzerine çalışmada katı substrat olarak kullanılan substratın içerdiği yüksek yapıdaki proteinlerden (yaklaşık %60) dolayı bu proteinlerin tampon olarak görev yaptığı düşünülmüştür²¹⁵.

Fizikokimyasal parametreler arasında büyüme ortamının pH'sı organizma ve enzim salgılanmasını içeren morfolojik değişiklikler üzerinde önemli bir rol oynar ve daha önce yapılan çalışmalarda enzim üretiminin fermantasyon ortamının başlangıç pH'ına karşı oldukça duyarlı olduğu rapor edilmiştir^{195,221}.

Son zamanlarda, protein mühendisliği sayesinde, deterjanlarda ağartıcı madde olarak kullanılan perborata dayanıklı alkalın proteazlar kullanılmakta olup günümüzde deterjanın alkalinite derecesine ve içeriğine göre en uygun proteaz

seçilerek formulasyon yapılabilir. Çalışmamızda, elde ettiğimiz proteazın özellikle deterjan, kâğıt, gıda ve ipek sanayinde istenilen özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

KSF ortamında en iyi aktivite veren substrat karışımlarının kullanılması ile yaptığımız deneylerde maksimum α -amilaz, proteaz ve β -galaktosidaz üretimleri için sırasıyla %90 pamuk sapı (küçük)-%10 pirinç kabuğu, % 90 mercimek kabuğu-%10 pamuk sapı (büyük) ve %90 pirinç kabuğu-% 10 pamuk sapı (küçük) substrat olarak kullanılan KSF ortamlarında maksimum enzim üretimleri gerçekleşmiştir.

Yapılan önceki çalışmalarda farklı tarım atıkları farklı oranlarda karıştırılarak KSF ortamlarında substrat olarak kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir^{44,194,202,209,217,222}.

Pamuk sapı (küçük)+pirinç kabuğu, mercimek kabuğu+pamuk sapı (büyük) ve pirinç kabuğu+pamuk sapı (küçük) karışımları yukarıda belirtilen oranlarda karıştırılırsa kullandığımız mikroorganizmalardan maksimum enzim üretimi elde edilebilir. Bu katı atıklar fermantasyonda substrat olarak mikroorganizmalar tarafından kullanıldıklarında çevre kirlenmelerini önleme ve ekstrasellüler enzim elde edilmesi için düşük maliyetli bir mikrobiyal teknoloji olanağı sağlayabilir.

Genelde birçok mikroorganizma hücresel fonksiyonlarını sağlamak, biyokütle formasyonu ve metabolit üretimi için bir karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bakteriyel türler proteaz üretimi sırasında karbon kaynağı türüne ve konsantrasyonuna göre farklı tepkiler verirler. Ortama eklenen karbon kaynakları mikroorganizmaların beslenebilmeleri, üremeleri ve enerji üretebilmeleri için gereksinim duydukları en büyük besin kaynağıdır.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikroorganizmaların kültür edildiği KSF ortamlarına farklı karbon kaynakları (%1 maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, mannoz, laktoz, arabinoz ve sukroz) ilave edilmiştir. Pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamına eklenen karbon kaynakları α -amilaz üretimi üzerinde herhangi bir artırıcı etki göstermemiştir. İncelenen proteaz aktivite değerlerinde arabinoz, laktoz, galaktoz, fruktoz, sukroz ve mannoz bulunan ortamlarda proteaz üretiminde artış gözlenmiştir. Benzer sonuçlar önceki çalışmalarda da mevcuttur^{32,136}. Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen farklı karbon kaynaklarının (%1) bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'ten β -galaktosidaz üretimi üzerine artırıcı etki göstermemiştir.

Düşük molekül ağırlıklı şekerler represyondan dolayı α -amilaz sentezini azaltmış olabilir. Bu sonuç bize katı substrat fermantasyon ortamında substrat olarak kullanılan pamuk saplarının (küçük) *B. subtilis* RSK96 için iyi bir destekleyici olmasının yanından aynı zamanda da iyi bir karbon kaynağı olduğu fikrini vermektedir. Elde ettiğimiz bu sonuç önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir^{164,223,224}.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikroorganizmaların kültür edildiği KSF ortamlarına farklı organik ve inorganik azot kaynakları (%1) ilave edilmiştir. Pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen azot kaynaklarından amonyum nitrat bulunan ortamda α -amilaz üretimi artmıştır. Benzer sonuçlar önceki çalışmalarda da mevcuttur^{66,135,202,215,221,223-229}.

İncelenen proteaz aktivite değerlerinde organik azot kaynaklarından beef extract ve sodyum nitrat bulunan ortamlarda enzim üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Organik azot kaynaklarının (yeast extract, pepton, beef extract) bakteriyel suşlarda maksimum enzim üretimi sağladığı yapılan birçok çalışmada ifade edilmektedir^{181,230}. Beef extract ve sodyum nitrat gibi azot kaynaklarının bulunduğu KSF ortamlarında enzim üretiminin artması, bakterinin besiyerindeki bu azot kaynaklarını kullanarak proteine dönüştürdüğü fikrini vermektedir. Bu azot kaynakları birçok kimyasal madde içerdiğinden, içeriklerindeki hangi maddelerin enzim üretimini arttırdığını saptamak güçtür. Uygun karbon ve azot kaynaklarının veya diğer besinlerin seçimi etkili ekonomik bir işlemin geliştirilmesinde çok önemli bir faktördür. Benzer sonuçlar önceki çalışmalarda da mevcuttur^{21,72,136,178,199,231-233}.

Azot ve karbon kaynaklarının seçimi enzim üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde önceki çalışmalarda olduğu gibi 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^{21,32,136}.

Mercimek kabuklarının substrat olarak kullanıldığı ortamlara eklenen karbon (arabinoz, laktoz, galaktoz, fruktoz, glukoz, sükroz, mannoz) ve azot kaynaklarının (beef extract ve sodyum nitrat) proteaz sentezini arttırmaları bu maddelerin *B. subtilis* RSK96'ya besin teşkil etmesi ve enzim üretimini olumlu yönde etkilemesi şeklinde açıklanabilir.

Pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen farklı azot kaynakları (%1) bulunduğu ortamlarda kültür edilen *B. licheniformis*

ATCC 12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'ten β -galaktosidaz üretimi üzerine artırıcı etki göstermemiştir.

Substrat olarak pirinç kabuklarının bulunduğu katı substrat fermantasyon ortamlarına eklenen karbon ve azot kaynakları varlığında kültür edilen *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'te β -galaktosidaz üretimlerinde düşüş gözlenme sebebi ortamda bulunan fazla besin miktarından kaynaklı olabilir. Çünkü ortamda bulunan fazla besin mikroorganizmanın üreme süresini etkilediği ve buna bağlı olarak uygun inkübasyon süresinde değiştiği düşünülmektedir.

Çalışmalarımızda tarımsal atıkların substrat olarak kullanılması ile azot ihtiyacı bu substratlardan karşılanmış olabilir. Kültür ortamında karbon kaynakları gibi tarım maddelerinin kullanımı enzim üretim maliyetini azaltmaktadır.

Pamuk saplarının (küçük) katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen % 0.1 konsantrasyonundaki metal tuzları bulunan ortamda kültür edilen *B. subtilis* RSK96 ürettiği α -amilaz aktivite tayinlerinde elde edilen aktivite değerleri kontrole (1185.7 U/mg) göre düşük bulunmuştur. Metal tuzlarını içeren ortamlardan en fazla enzim üretimini baskılayıcı etki gösteren $ZnSO_4$ içeren ortam olmuştur.

Çalışmamızda kültür ortamında Zn^{2+} iyonlarının bulunması α -amilaz sentezini azaltmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda Zn^{2+} etkisi α -amilaz üzerinde farklı etkiler göstermiştir²³⁴⁻²³⁶.

Metal tuzlarının kullanımının enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığının tespit edilmesi kullandığımız bakterinin tuz ihtiyacını substrat olarak kullanılan pamuk sapı ve çeşme suyundan karşıladığı fikrini vermektedir. Bu

yönüyle *B. subtilis* RSK96 ile yapılacak enzim üretim çalışmalarında üretim maliyeti azalabilir.

Mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarına eklenen % 0.1 konsantrasyonundaki metal tuzları bulunan ortamlarda kültür edilen *B. subtilis* RSK96'nın ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde FeSO₄, MgSO₄ ve CaCl₂ içeren ortamlardan elde edilen aktivite değerleri kontrole göre daha fazla çıkmıştır. Metal tuzlarını içeren ortamlardan ZnSO₄ içeren ortamda proteaz baskılanmıştır. Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda kültür ortamında eklenen çeşitli tuzların enzim aktivitesini arttırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur^{169,237,238}.

Nişasta sıvılaştırma işlemi genelde 70–90°C gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Bu açıdan termostabil amilazlara yönelik büyük bir ilgi vardır⁴⁵.

Çalışmamızda α-amilaz için optimum aktivite sıcaklığı 60°C, proteaz için ise 90°C olarak belirlenmiştir. α-Amilaz 100°C'de aktivitesini yaklaşık olarak %73 olarak muhafaza ettiği Şekil 5.33.'te gösterilmektedir. Bezer şekilde yapılan önceki çalışmalarda yüksek ısılara dayanıklı α-amilaz enzimlerinin varlığı rapor edilmiştir^{45,239}. Bu yönüyle kullandığımız bakteriden elde edilen α-amilaz nişasta sıvılaştırma işlemlerinde kullanılabilir.

Elde ettiğimiz proteazın optimum sıcaklığı 90°C'dir. Enzim 100°C'de aktivitesinin yaklaşık %89'unu korumaktadır. Özellikle deterjan ve deri işleme sanayii sıcaklığa bağlı süreçler olduğundan belirli sıcaklıklarda bu enzimin kullanılabilceği düşünülmektedir. Buna benzer olarak daha önceki çalışmalarda *B.*

pumilus, *B. cereus* BG1, *B. mojavensis*'den elde edilen proteazların optimum aktivite sıcaklıkları 60°C olarak rapor edilmiştir²⁴⁰⁻²⁴².

Kullandığımız proteazın sıcaklık uygunluğu şuan Savinase ve Esperase ticari isimleriyle deterjan endüstrisinde kullanılan *Bacillus* sp. tarafından üretilen iki alkalın proteaz ile uyuşmaktadır.

Kullandığımız mikroorganizma (*B. subtilis* RSK96) mezofilik olmasına rağmen diğer mesofilik kaynaklardan elde edilen enzimlerle karşılaştırıldığında daha dikkat çekmektedir. *B. subtilis* RSK96 termofilik α -amilaz ve proteaz üretmektedir. Bu enzimlerin deterjan katkı maddeleri gibi kullanımı için gerekli olan önemli bir özelliktir. Daha önce birçok *Bacillus* türünden yüksek sıcaklıklarda iş gören enzimler rapor edilmiştir²⁴³⁻²⁴⁷.

B. subtilis RSK96 pamuk saplarının (küçük) KSF ortamında substrat olarak kullanıldığı deneylerde fermantasyon ortam büyüklüğünü artırmaya yönelik deneylerde en yüksek α -amilaz üretimi fermantasyon ortamı olarak 250 mL hacimdeki erlen ortamından elde edilmiştir (Şekil 5.35.). Mercimek kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamlarında fermantasyon ortam büyüklüğünü arttırmaya yönelik çalışmalarda en yüksek proteaz aktivitesi 1000 mL hacimdeki erlen ortamından elde edilmiştir (Şekil 5.36.).

Kullandığımız *B. licheniformis* ATCC 12759 ve yabani suş *B. licheniformis*'ten elde ettiğimiz β -galaktosidaz laktozun enzimatik hidrolizinde kullanılarak sonuçta laktozdan dört kat daha fazla tatlı ve üç kat daha fazla çözünür glukoz ve galaktozdan meydana gelen bir şeker karışımı elde edilebilir. Bu şeker karışımı yoğun bir şeker şurubu gibi iş görebilir ve bu sayede fırınlama

endüstrisinde, şekerleme ürünlerinde, dondurma ve diğer ürünlerin hazırlanmasında kullanılabilir.

Laktozun sindirilememe durumunu azaltmak için düşük oranda laktoz içeren süt üretimine yönelik endüstriyel uygulamalarda elde ettiğimiz β -galaktosidazın kullanılmasıyla bu sorunun üstesinden gelinebilir.

Amilazlar dünya pazarında önemli bir sermaye payına sahiptirler. Bugünkü senaryoda amilazlar gıdalar, deterjanlar, tekstil ve kâğıt endüstrileri gibi tüm endüstriyel uygulamalarda nişasta hidrolizi için kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda farmakolojik ve değerli kimyasalların meydana getirildiği endüstriyel alanlarda da kullanılabilirler.

Geçen son 30 yıldan beri α -amilazlar nişasta hidrolizatlarının meydana getirilmesinde asit hidroliz işlemlerinin yerini alarak kullanılmaktadırlar. Bu enzim aynı zamanda bira, meyve suyu, giysiler ve porselenlerdeki nişastanın uzaklaştırılması için kullanılmaktadırlar. Biyoteknolojinin ışığında α -amilazlar biyofarmakolojik uygulamalarda önem kazanmıştır. Gıda ve nişastaya dayalı endüstrilerde önemli bir pazardır ve gelecekte bu sektörlerde her zaman canlı kalacaktır.

Yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren proteazlar eczacılık, deterjan, deri, tabakhane, aminoasit üretimi, kontakt lenslerin temizlenmesi, atık ıslahı vb. gibi uygulamalarda kullanılabilir.

Proteazlar deterjanların hazırlanmasında kullanılırlar. Çamaşır deterjanlarının pH'sı genelde 9-10.5 arasında değişmektedir ve sıcaklık 90°C'ye kadar olabilir¹¹³. Bu yönüyle elde ettiğimiz proteaz enzimi deterjan katkı maddeleri gibi kullanılabilir.

Çamaşır yıkanması dünya genelinde ortak bir gereksinimdir. Sağlık, hijyen güvenliği ve yaşam tarzı açısından memnun edici olmalıdır. Temizlik alışkanlıkları yeni teknolojiler, yeni kirletici kaynakları ve su farklılıklarından dolayı günden güne değişmektedir. Deterjan pazarındaki hızlı gelişim ve çeşitlilikte sürekli olarak ihtiyaçları karşılamak için meydana getirilen modern, gelişmiş ve modifiye ürünler dikkate alınmalıdır¹⁰⁷.

SmF ile karşılaştırıldığında genelde daha az kompleks karbon kaynakları kullanılır, katı maddeler mikrobiyal metabolizmada induksiyon, inhibisyon ve represyona neden olabilen yüksek moleküler ağırlığa sahip karbon bileşiklerinin substratlarla karışmasını engeller. KSF'nin bu eşsiz özelliği mikroorganizmaya düşük oranda nem içeren ortamda seçici bir büyüme ortamı sağlar ve böylece organizma değişik ekstrasellüler enzimleri bağlı ya da serbest halde üretir aynı zamanda katı yüzeylere yakın yüksek besin konsantrasyonlarında gelişebilir²⁴⁸.

KSF'de amaçlanan enzim üretimi için oluşturulacak ortamın üretim maliyetini azaltmak oldukça önemlidir. Bakteriyel α -amilazların üretilmesinde KSF tekniğinin kullanılması maliyet ve işlem için gerekli olan araç gereksinimlerinin önemli derecede azalmasını sağlar ve daha az fermantasyon süresi gerektirir.

Sonuç olarak, mikroorganizmalar kullanılarak KSF'li ortamda enzim üretme çalışmaları son yıllarda giderek artmaya ve SmF'e alternatif bir teknik haline gelmeye başlamıştır. Dünya genelinde artan tarımsal atıkların tekrar kullanılmaları ekolojik ve ekonomik olarak oldukça önemlidir. Birçok tarımsal atığın hayvan yemi vb. alanlarda kullanılabildiği bilinen bir gerçektir. Fakat KSF tekniğinin kullanımı ile bu atıklardan daha ekonomik yararlar sağlamak mümkün olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Strickland, D., *Guide to Biotechnology*. 2007: Biotechnology Industry Organization. 136.
2. Schmid, R.D., *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*. 1 ed. 2003, Darmstadt: Wiley-VCH. 2-3.
3. Diversity, C.o.B. *Convention on Biological Diversity* 2009 [cited 2009 Nisan 2009], Available from: <http://www.cbd.int/convention/articles.shtml?a=cbd-02>.
4. Diversity, S.o.t.C.o.B., *Catagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: Text and annexes*. 2000, Convention on Biological Diversity: Montreal.
5. John, E. S. *Biotechnology* 5 th. ed. University of Strathclyde, 2009 pp.14-16 ISBN-13:978-0-511-46394-5
6. Schaechter, M. *Encyclopedia of Microbiology* 3 th 2009 San Diego, CA, USA Elsevier Inc. pp. 349-361
7. www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/genetik2.pdf
8. Telefoncu, A., Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu 21-27 Eylül 1997 Kuşadası Aydın- Türkiye Bölüm 1 s. 1
9. Telefoncu, A., Lisansüstü Yaz Okulu 21-27 Eylül 1997 Kuşadası Aydın- Türkiye Bölüm 1 s. 5-8
10. John, E. S. *Biotechnology* 5 th. ed. University of Strathclyde 2009 pp.73-94
11. Pandey, A. *Enzyme technology*, Webb C., Soccol, C.R., Larroche, C. Edt. Springer, 2006 ISBN 0387292942, 9780387292946 pp. 533-545
12. Priest, F.G., in C.R. Harwood ed., *Biotechnology Handbook 2: Bacillus*, Plenum Press, New York, 1989, pp. 27–56.
13. Priest, F.G., in A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993, pp. 1–16.
14. Claus,D., Berkeley, in P.H.A. Sneath ed., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams&Wilkins, Baltimore, Md., 1986, pp. 1105–1141.
15. Priest, F.G., and Harwood, C.R. in Y.H. Hui and G.G. Khachatourians eds., *Food Biotechnology Micro-organisms*, VCH, New York, 1994, pp. 377–421.

16. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 7(4):204-211.
17. http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra005.htm
18. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis
19. John, E. S. *Biotechnology* 5 th. ed. University of Strathclyde, **2009** pp. 661-672 ISBN-13: 978-0-511-46394-5
20. Pandey, A. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Soccol, C. R., Larroche, C., **2008**. pp.3-11 ISBN: 978-0-387-75212-9
21. Pandey, A., Soccol, C.R. Mitchell, D. *Process Biochem.* **2000**, 35: 1153–1169
22. Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2000b**, 68: 61–138
23. Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, 64,175-186
24. Longo, M.A., Sanromfin, M.A. *Food Technology and Biotechnology* **2006**, 44, 335-353.
25. Couto, S.R., Sanromán, M.R. *Journal of Food Engineering* **2006**, 76, 291–302
26. Singhaniana, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. *Biochemical Engineering Journal* **2009**, 44, 13–18
27. Viniegra-Gonzalez G., Favela-Torres, E. *Food Technology and Biotechnology* **2006**, 44, 397-406.
28. Viniegra-Gonzalez, G., Favela-Torres, E.C., Noe Aguilar, J. de Jesus Romero-Gomez, G., Diaz-Godinez, C. Augur, *Biochem. Eng. J.* **2003**, 13, 157–167.
29. Pandey, A. *Encyclopedia of Bioresource Technology*, **2004** pp.702-708
30. Prakasham, R.S., Rao ChS., Sarma, P.N. *Bioresource Technology* **2006**, 97 (13), 1449-1454.
31. Naveena, B.J., Altaf, Md, Bhadrappa, K., Madhavendra, S.S., Reddy, G. *Process Biochem.* **2005b**, 40:6 81–90.
32. Naveena, B.J., Altaf, Md., Bhadrappa, K., Reddy, G. *Biores. Technol.* **2005a**, 96:4 85–90.
33. Naveena, B.J., Altaf, Md., Bhadrappa, K., Reddy, G. *Ind. J. Biotechnol.* **2005c**, 4(3): 30 1–28.

34. Pandey, A. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Soccol, C. R., Larroche, C., **2008**. pp.183-204 ISBN: 978-0-387-75212-9
35. Barrios-Gonzalez, J., Gonzalez, H., Mejia, A. *Biotechnology Advances*. **1993**, vol. 11, p. 539–547.
36. Liu, B. L., Tzeng, Y. M. *Biotechnology Letters*. **1999**, vol. 21, p. 657–661.
37. Graminha, E.B.N. , Goncálves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R. , Gomes, E. *Animal Feed Science and Technology* **2008**, 144, 1–22
38. Parker and Collier, Topley and Wilson's *Principles, Virology and Immunity*, Eighth edition **1990**, Systematic Bacteriology, Volume 2
39. Virupakshi, S., Gireesh Babu, K., Gaikwad, S.R. Naik, G.R. *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 431-435
40. Prakasham, R.S., Rao, Ch.S., Sarma PN. *Bioresource Technology* **2006**, 97 (13), 1449-1454.
41. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. **2001**, 17, 125-129.
42. Kashyap, DR., Soni, SK., Tewari, R. *Bioresource Technology*. **2003**, 88, 251-254.
43. Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K., Soni, S.K. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (2), 525-534.
44. Baysal, Z., Uyar, F., Aytakin, C. *Process Biochemistry* **2003**, 38, 1665-1668.
45. Soni, S.K., Kaur, A., Gupta, J.K., *Process Biochemistry* **2003**, 39, 185-192
46. Pandey, A. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Soccol, C. R., Larroche, C., Edt. Springer, **2006**, ISBN 0387292942, 9780387292946 pp.189-220
47. Henrissat, B., *Biochem. J.* **1991**, 280, 309–316.
48. Schaechter, M. *Encyclopedia of Microbiology* 3 th **2009** San Diego, CA, USA Elsevier Inc. All rights reserved. pp. 164-173
49. Nielsen, J.E., Torben, V. Borchert. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, 1543, 253-274
50. Bordbar, A.K., Omidian, K., Hosseinzadeh, R. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2005**, 40, 67–71.

51. Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44 (2), 173–184
52. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. *Enzyme and Technology.* **2003**, vol. 38 p. 1599-1616
53. Vihinen, M., Mantsala, P. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, 24: 329- 418.
54. Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. *J. Biotechnol.* **2002**, 94:1 37-55.
55. Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. *Process Biochemistry.* **1999a**, 35, 27-31.
56. Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21:11 1-5.
57. Coronado, M.J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., Nieto, J.J. *FEMS Microbiol Lett.* **2000**, 183:67-71.
58. <http://www.avatar.se/molscript/>
59. <http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/>
60. Richard, F., Tester, R.Y., Kettlitz, B., Röper., H. *Food Chemistry* **2007**, 105, 926–931
61. Burrell, M.M. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 382, *Regulation of Carbon Metabolism Special Issue*, January **2003** pp. 451-456
62. Muralikrishna, G., Nirmala, M. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 60, 163–173
63. Kuriki, T., Imanaka, T. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, 87: 557-565.
64. Reddy, N.S., Nimmagadda, A., Sambasiva Rao, K. R. S. *African Journal of Biotechnology* **2003**, Vol. 2 (12), pp. 645-648
65. Jan H. van Ee., *Enzymes in detergency*, Misset, O., Erik J. B. Eds: CRC Press, **1997**, ISBN 082479995X, 9780824799953 pp. 2
66. Erem, F., Certel, M. 24-26 Mayıs **2006**, Türkiye 9. Gıda Kongresi.
67. Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G. *Process Biochem.* **2003**, 38, 1397–1403.
68. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, 31:1 35-52.

69. Van Dam, H.W., Hille, J.D.R. *Cereal Foods World* **1992**, 37:2 45-52.
70. Poutanen, K. *Trends in Food Science and Technology*. **1997**, 8:300-306.
71. Saldamlı, İ **1998**. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara.
72. Linko, Y., Javanainen, P., Linko, S. *Trends in Food Science and Technol.* **1999**, 8:339.
73. Kim, H.J., Maeda, T., Morita, N. *Food Research International* **2006**, 39:117-126.
74. Elgün, A., Ertugay, Z. **2002**. Atatürk Ü. Ziraat Fak. Ofset Tesisi, Erzurum
75. Bruinenberg, P.M., Hulst, A.C., Faber, A., Voogd, R.H. *European Patent Application EP.* **1996**, 0,690,170 A1.
76. Li-li Lu, Min Xiao, Zheng-yi Li, Yu-mei Li, Feng-shan Wang. *Process Biochemistry* **2009**, 44, 232–236
77. Dagbagli, S., Goksungur, Y. *Electronic Journal of Biotechnology*. October 15 **2008**, Vol.11 No.4, Issue
78. Mbuyi K.A., Schnek, A.G., Leonis, J. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 178, 437–443
79. Elliott, A.C., Sinnott, S.K, M.L., Smith, P.J., Bommuswamy, J., Guo, Z., Hall, B.G., Zhang, Y., *Biochem. J.* **1992**, 282, 155–164
80. Sakaguchi K., Yamaguchi, T. *J. Ferment. Technol.* **1973**, 51, 750–752
81. Harada, M., Inohara, M., Nakao, M., Nakayama, T., Kakudo, A., Shibano, Y., Amachi, T. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 22021–22026 (1994).
82. Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D., *Biochemical Engineering Journal* **2001**, 9, 33-40
83. Alazzeh, A.Y., Ibrahim, S.A., Song, D., Shahbazi A., AbuGhazaleh, A.A. *Food Chemistry* **2009**, 117, 654–659
84. Ibrahim, S. A., O'Sullivan, D. J. *Journal of Dairy* **2000**, 5, 923-930.
85. Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. *Food Chemistry* **2007**, 104, 10-20.
86. Manera, A.P., Ores, J.C., Ribeiro, V.A., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J. *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, 46 (1) 66–72
87. Higashiyama, T., Watanabe, H., Aga, H., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339:1603–8.
88. Miyasato, M., Ajisaka, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68: 2086–90.

89. Nieder, V., Marx, SP., Gallego, RG., Kamerling, JP., Vliegthart, JFG., Elling, L. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2003**, 21:157–66.
90. Shimizu, R., Shimabayashi, H., Moriwaki, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70:940–8.
91. Zeng, X., Uzawa, H. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340:2469–75.
92. Schneider, A.L.S., Merkle, R., Carvalhojonas, M.F., Jonas, R. and Furlan, S. *Biotechnology Letters* April **2001**, vol. 23, no. 7, p. 547-550.
93. Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J.M. *Enzyme and Microbial Technology* January **2004**, vol. 34 no. 1, p. 33-40.
94. Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Villamiel, M. *Food Chemistry* **2008**, 107, 258–264
95. Miller, J. N., Whistler, R. L. *Carbohydrates*. In O. Fennema (Ed.), *Food chemistry* **2000**, (pp. 207). New York: Marcel Dekker
96. Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., Moracci, M. *Trends in Biotechnology* **2004**, 22, 31–37.
97. Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. *International Dairy Journal* **1999**, 9, 69–80.
98. Tuohy, K.M., Rouzard, G.C. M., Brück, W.M., Gibson, G.R. *Current Pharmaceutical Design* **2005**, 11, 75–90.
99. Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, S.K. *Food Chemistry* **2006**, 97, 426–430.
100. Kim, J.W., Rajagopal, S.N. *Folia Microbiologica* **2000**, 45(1), 29-34.
101. Splechna, B., Nguyen, T. H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., Haltrich, D. *Food Chemistry* **2006**, 54, 4999–5006.
102. Pandey, A. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Soccol, C. R., Larroche, C., Edt. Springer, **2006**, ISBN 0387292942, 9780387292946 pp.319-328
103. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2002**, 59: 15–32
104. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge V.V. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* **1998**, 62, 597-635

105. Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., Izo, S. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, 103: 501-508
106. Kumar, D., Bhalla, T.C. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68: 726-736
107. Kumar, D., Savitri, N. T., Verma R., Bhalla, T.C. *Research Journal Of Microbiology.* **2008**, 3(12): 661-672
108. Kumar, D., Gajju, H., Bhalla, T.C. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* **2002**, 4:535-540
109. Najafi, M.F., Deobagkar D. *Electronic J. Biotechnol.* **2005**, 8: 197-2003
110. Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44 (2) 211–220
111. Oh, Y. S., Shih, I. L., Tzeng, Y. M., Wang, S. L. *Enzymes Microb. Technol.* **2000**, 27: 3-10.
112. Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, Miyaji, M. Nishimura, K., de Campos-Takaki, G. M. *Brazilian Journal of Microbiology* **2002**, 33: 106-110.
113. Pandey,A., *Concise encyclopedia of bioresource technology.* **2004**. ISBN 1-56022-980-2 TP248.16.C65 pp. 578-584
114. El Enshasy, H., Abuoul Enein, A., Helmy, S., El Azaly, Y. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **2008**, 2(3): 583-593
115. <http://en.wikipedia.org/wiki/Protease>
116. Gupta, R., Beeg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002b**, 60(4): 381-395.
117. Gupta, R., Beeg, QK., Loran, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002a**, 59(1): 15-32.
118. El-Safey, E.M., Abdul-Raouf, U.M. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, Assiut Univ., March 23-25, **2004**, p 14.
119. Dayanandan, A., Kanagaraj, J., Sounderraj, L., Govindaraju, R., Rajkumar, G.S. *J. Cleaner Production.* **2003**, 11: 533-536.
120. Kumar, C.G., Takagi, H. *Biotechnol. Adv.* **1999**, 17:561–594
121. Kumar, C.G., Tiwari, M.P. *Biotechnol. Tech.* **1999**, 13: 235-238.

122. Anwar, A., Saleemuddin, M.P. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2003**, 31: 85-89.
123. Haki, G.D., Rakshit, S.K. *Biores. Technol.* **2003**, 89: 17-34.
124. Hameed A, Keshavarz T, Evans CS. In: Gupta, Q.K., Beg, P., Lorenz. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2002**, 59:15–32
125. Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R. *Curr. Microbiol.* **2002**, 44:286–290
126. Boyacı, M. Un Mamülleri Teknolojisi. **2000**, Yıl:9, Sayı:5.
127. Kara, M., Sivri, D., Köksel, H. *Food Research International* **2005**, 38:479-486.
128. Kumar, CG., Malik, RK., Tiwari, MP. *Curr Sci.* **1999**, 75:1312–1318
129. Beg, Q.K, Saxena,RK., Gupta, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2002b**, 78:289–295
130. Oberoi, R., Beg, QK., Puri, S., Saxena, R.K, Gupta, R. *World J Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 17:493–497
131. Krisha, C., Chandrasekaran, M. *Microbial Biotechnology* **1996**, vol. 46 p. 106-11
132. Kıran, E. Ö., Çömlekçiöğlü, U., Arıkan, B. *Turkish Journal of Biology* **2005**, p. 99-103
133. Shukla, J., Kar, R. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2006**, 22: 417–422
134. Xu D.L., Yan X. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.**2007**.08.040
135. Singh, J., Verma, V., doi: 10.1016/j.jbiotech.**2008**.07.1878
136. Mukherjee, A.K., Borah, M., Sudhir, K. Rai. *Biochemical Engineering Journal* **2009**, 43 149–156
137. Chakraborti, S., Sani, RK., Banerjee, U.C., Sobti, R.C. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2000**, 24, 58–63
138. Batra, N., Singh, J., Banerjee, U. C., Patnaik, P. R., Sobti, R. C. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 36 (1) Colchester: Portland Press, **2002**, 1-6
139. Todorova-Balvay, D., Stoilova, I., Gargova, S., Vijayalakshmi, M.A. *J. Mol. Recognit.* **2006**, 19: 299–304

140. Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. *Bioresource Technology* **2007**, 98, 150–157
141. Alazzeah, A.Y., Ibrahim, S.A., Song, D., Shahbazi A., AbuGhazaleh, A.A. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.**2009**.04.065
142. Kumar, C.G., *Letters in Applied Microbiology* 2002, 34, 13-17
143. Uyar, F., Baysal, Z. *Process Biochemistry* **2004**, Vol. 39, P.1893-1898
144. Han-Seung, J., Chung-Soon, C. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 38 176–183
145. Wei-Hua Chu. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2007**, 34:241–245
146. Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Qurat-ul-Ain Syed. *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, 46 (4) 388–394
147. Hmidet, N., Ali, NEA., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.K, Nasri M. *Biochem. Eng. J.* doi:10.1016/j.bej.**2009**.07.005
148. Bernfeld, P., *In Methods In Enzymology Academic Press*, **1955**, 17, 149-158
149. Leighton, T.J., Dor, R.H., Warren RA, Kelln RA. *J Mol Biol.* **1973** May 5,**76**(1):103–122.
150. Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193: 265.
151. Jose , J., Kurup, M., *J. Of experimental biology.***1999**, 37, 1217-1231
152. Prakasham, R.S., Subba, R.C., Sreenivas, R.R., Sarma, P.N. *J Appl Microbiol.* **2007**,102:204–211
153. Subba, R.C., Sathish, T., Mahalaxmi, M., Suvarna, L.G., Sreenivas, R.R., Prakasham, R.S. *J Appl Microbiol.***2008**, 104:889–898
154. Subba, R.C., Madhavendra, S.S., Sreenivas, R.R., Hobbs, P.J., Prakasham, RS. *Appl Biochem Biotechnol* **150**:65–83 (2008).
155. Mamo, G., Gessesse, A., *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, 25, 433–438
156. Riaz, N., Ikram-Ul-Haq, Qadeer, M.A. *Int. J. Agri. Biol.* **2003**, Vol. 5, No. 3

157. Varela, H., Ferrari, M.D., Belobradic, L., Weyrauch, R., Loperena, M.L. *World J Microbiol Biotechnol.* **1996**, 12: 643-645
158. Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. *Process Biochemistry* **2002**, 37, 1103-1109
159. Patel, R., Dodia, M., Singh, P.S. *Process Biochemistry* **2005**, 40,3569–3575
160. Chu, M.I., Lee, C., Li, S-T. *Enzyme Microbiol Technol.* **1992**, 14:755–61.
161. Moon, S., Parulekar, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37:467–83.
162. Kole, M.M., Draper, I., Gerson, D.F. *Appl Microbiol Biotechnol.***1988**, 28:404–8.
163. Lin, L.L., Chyau, C.C., Hsu, W.H. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1998**, 28: 61-68
164. Teodoro, C.E.S, Martins, M.L.L. *Brazilian Journal of Microbiology* **2000**, 31: 1-9
165. Bajpai, P., Bajpai, P.K. *Biotechnol Bioengineering*, 33:72-78, 1989.
166. Albayrak, N., Donmez, S., Balk, M. *Tr. J. of Biology.* **1996**, 20: 47-54.
167. Wind, R.M., Buitelaar, G., Eggink, H.J., Huizing, L. *Appl Microbiol Biotechnol.* **1994**, 41:155-162
168. Wei-Hua, C. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2007**, 34:241–245
169. Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 79, 950-955
170. Leveque, E., Janecek, S., Haye, B., Belarbi, A. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, 26, 3–14.
171. Greenwood, C.,T. *Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, Vol II, second edition, Academic Pres, New York, **1970**, 471-514.
172. Manning, G.B., Cambell, L.L., *J. Biol. Chem.* **1961** 236, 2952-2957.
173. Larabeke V., Eagler, G., Holster , M., *Nature* **1974**, 252, 169-170.
174. Srivastana, R.,A.,K. *Enzyme Microbial Technology* **1987**, 9, 12, 749-754.
175. Fishcher, E.H., Stein E.A., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **1961**, 313
176. Hamada, N., Fukumoto, J., Yamamoto, T., *Agric. Biol. Chem.* **1971**, 35: 1052-1060
177. Deshpande, S.S., Cheryan, M. *J. Food Sci.* **1984**, 49: 516-519

178. Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 26:406–413
179. Phadatare, S.U., Deshpande, V. V., Srinivasan, M. C. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1993**, 15:72-76.
180. Hamilton, L.M., Kelly, T.C., Fogarty, W.M., Kelly, C.T., Bolton, D.J., Fogarty WM. *Biotechnol Lett.* **1997**, 19:675–7.
181. Jin, F., Cheng, X., Shi, Y., Zhang, C., J. *Gen. Appl. Microbiol.* **1990**, 36: 415-424
182. Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, 45:327–32.
183. Johnvesly, B., Naik, G.R. *Process Biochem.* **2001**,37:139–44.
184. Heineken, F.G., Connor, R.J.O. *J. Gen. Microbiol.* **1972**, 73:35–44.
185. Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. *Process Biochemistry* **2005**, 40, 2689–2694
186. Anandan, D., Marmer, N.W., Dudley, R.L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 34:339–347
187. Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G., Sreeramulu, K. *Process Biochemistry* **2009**, 44, 210–215
188. McTigue, M.A., Kelly, C.T., Doyle, E.M., Fogarty, W.M. *Biotechnol Lett.* **1994**, 16:569–74.
189. Fogarty, W. M., Kelly, C. T. *Microbial enzymes and bioconversions: Amylases*. Eds. New York: Academic Press, **1980**, pp. 115–170.
190. Hewitt, C. J., Solomons, G. L. *Journal of Industrial Microbiology* **1996**, 17, 96–99.
191. Makino, K., Koshikawa, T., Nishihara, T., Ichikawa, T., and Kondo, M. *Microbios.* **1981**, 31(124):103-12.
192. Kadziola, A., Abe, J.I., Svensson, B., Haser, R., *J. Mol. Biol.* **1994**, 239: 104-121
193. Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J., McPherson, A. J. *Mol. Biol.* **1994**, 235: 1560-1584
194. Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M, Pandey, A. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44 (2) 269–274

195. Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2005**, 100, 168-171
196. Kokab, S., Asghar, M., Rehman, K., Asad, M. J., Adedyo, O. *International Journal of Agriculture and Biology* 5 (1) Faisalabad: Friends Science Publishers, **2003**, 36-39
197. Swain, M.R., Ray, R.C. *Journal of Basic Microbiology* **2007**, Volume 47 Issue 5, pp. 417 - 425
198. Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S.M., Elyas, K.K., Bhat, S.G., Chandrasekaran, M. *Process Biochemistry* **2006**, 41, 956-961.
199. Lazim, H., Mankai, H., Slama, N., Barkallah, I., Limam, F. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2008**, 531-537
200. Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. *Biotechnology Letters* **1987**, 9, 323-328
201. Sphor, A., Carleen, M., Nielsen, J., Villadsen, J. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1998**, 86 (1), 49-56.
202. Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., Srinophakun, P. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, 83:1012-1018
203. Zadrazil, F., H. Brunnert, H. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1981**, 11, 183-188.
204. Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon J.A., Nigam, P. **2001**, Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, p. 221
205. Ellaiah, P., Adinarayana K., Pardhasaradhi, S.V., Srinivasulu, B. *Indian Journal of Microbiology* **2002**, 42, 173-175
206. Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiatman, S., Ramakrishna, S.V. *Enzyme Microb. Technol.* **1985**, 7, 258-265.
207. Castro, P. M. L., Hayter, P. M., Ison, A. P., Bull, AT. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1992**, 38, 84-90.
208. Battal, M. **2004** *Yüksek Lisans Tezi*. Gebze Yük. Tek. Enst, KOCAELİ
209. Murthy, P.S., Naidu, M.M., Srinivas, P., *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2009**, Volume 84 Issue 8, Pages 1246 - 1249
210. Jin, B., Van-Leeuwen, J. H., Patel, B. *Process Biochemistry* **1999**, 34, 335-340.
211. Elibol, M., Moreira, A.R. *Proc Biochem.* **2005**, 40 (5), 1951-1956.

212. Pedersen, H., Nielsen, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 53, 278–281.
213. Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. *African J. Biotechnol.* **2005**, 4(8), 776-779.
214. Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C. , *International Journal of Food Microbiology*, **2005**, 104, 197-206
215. Souza, C.F.V., Rodrigues, R.C., Heck, J.X., Ayub, M.A.Z. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2008**, Volume 83 Issue 9, Pages 1306 – 1313
216. Krishna, C. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2005, 25:1–30
217. Tanyıldız, M.Ş., Özer, D., Elibol, M. *Biochemical Engineering Journal* **2007**, 37, 294-297
218. Rajoke, M.I., Samia, K., Riaz, S. *Food Technol. Biotechnol.* **2005**, 41(4): 315- 320.
219. Basil, J.M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1981**,13: 161-164.
220. Abu Sayem, S.M., Alam, M.J., Mozammel Hoq, M.D. *Proc. Pakistan Acad. Sci.* **2006**, 43(4), 257-262.
221. Narayana, K.J.P., Vijayalakshmi, M. *Asian Journal of Biochemistry*, **2008**, vol. 3 p. 194-197
222. Yoo, Y.J., Cadman, T.W., Hong, J., Hatch, T., *Biotechnology and Bioengineering* **1987**, 31, 357–365. 174
223. Rajagopalan, G., Krishnan, C., *Bioresource Technology* **2008**, 99, 3044–3050
224. Agger, T., Petersen, J.B., Connor, S.M., Murphy, R.L., Kelly, J.M., Nielsen, J. *Journal of Biotechnology* **2002**, 92, 279–285.
225. Pandey, A., Selvakumar, P., Ashakumary, L. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, 10, 348–349
226. Narang, S., Satyanarayana, T. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, 32, 31–35. 16.
227. Chandra, A.K., Medda, S., Bhadra, A.K., *J. Ferment. Technol.* **1980**, 58, 1-10.
228. Vihinen, M., Mantsala, P. *Biotechnol Appl Biochem.* **1990**, 12: 427-435.
229. Sanjeev, K., Soni, A.K., Gupta, J.K. *Process Biochemistry* **2003**, 39 85- 192
230. Cheng, S.W., Hu, H.M., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M., Tsai, Y.C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, 59, 2239–2243.
231. Cheng, C.Y., Yabe, I., Toda, K. *J. Ferment Bioeng.* **1989**, 67, 176-181.
232. Sinha, N., Satyanarayana, T. *Ind. J. Microbiol.* **1991**, 31, 425–430.

233. Chakraborty, R., Srinivasan, M., Sarkar, S.K., Raghvan, K.V. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, 10:17–30
234. Kadrekar, S.N., Ramasarma, G.B. *J. Fd. Sci. Technol.* **1990**, 27: 4-6
235. Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H. *Appl Environ Microbiol.* **1998**, 64: 9, 3282-3289
236. Wu, W.X., Mabinadji, J., Bertrand, T.F. *Agric. Life Sci.* **1999**, 45, 404–408.
237. Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. *Biotechnol Lett.* **1989**, 11, 49–50.
238. Kumar, C.G. *Lett Appl. Microbiol.* **2002**, 34:13-7.
239. Goto, C.E., Barbosa, E. P., Kistner, L. C. L., Gandra, R. F., Arrias, V. L., Peralta, R.M. *Revista de Microbiologia* **1998**, 29, 99-103
240. Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L., Nasri, M. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 32:186-94.
241. Beg, Q.K., Gupta, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 32:294-304.
242. Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, R.D. *Process Biochem.* **1999**, 34:441-9.
243. Banerjee, U.C., Rajesh, K.S., Azmi, W., Raman, S. *Process Biochem.* **1999**,35:213–9.
244. Kohji, O., Takashi, K., *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, 65, 4652–4658.
245. Nurmatov, S., Akhmedova, Z. *Chemistry of Natural Compounds* **2001**, 37, 364–368.
246. Srivastava, R. *Enzyme and Microbial Technology* **1987**, 9, 749–754
247. Uguru, G., Robb, D., Sani, A. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **1997**, 19, 273–279.
248. Ramakrishnan, S., Venkataraman, R., *Rasayan J. Chem.* **2008**, 1 (2), 204-206

EKLER

Ek.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması:

pH: 7.0; 0.1 M Tris- HCl Tamponu: 50 mL 0.1 M Tris-baz ve 46.6 ml 0.1 M HCl hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH 8.0; 0.1 M Tris- HCl Tamponu: 50 mL 0.1 M Tris-baz ve 29.2 mL 0.1 M HCl hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH 9.0; 0.1 M Tris- HCl Tamponu: 50 mL 0.1 M Tris- baz ve 5.7 mL 0.1 M HCl hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 6.8; 0.1 M Fosfat Tamponu: 24.5 mL 0.1 M Na_2HPO_4 ve 25.5 ml 0.1 M NaH_2PO_4 hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 7.0; 0.1 M Fosfat Tamponu: 30 mL 0.1 M Na_2HPO_4 ve 19 mL 0.1 M NaH_2PO_4 hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Ek.2. Alkalın Çözeltisi

%4 Na_2CO_3

%4 Na-K tartarat

%2 CuSO_4

100 mL Na_2CO_3 üzerine 1mL Na-K tartarat, 1mL CuSO_4 ilave edilir.

Ek.3. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması:

20 g 3,5 dinitro salisilik asit 400 ml distile su içinde çözüldü. Başka bir beherde 32 g /300 ml NaOH çözeltisi magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra

yavaş yavaş 3,5 dinitro salisilik asit üzerine eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Sonra 600 g Na-K-Tartarat azar azar eklendi. Hacim saf su ile 2000 mL'ye tamamlandı (Bernfeld, 1955)²³⁸.

Ek.4 Deterjan Çözeltilerin Hazırlanması:

SDS (Sodium dodecil sulphate) ve CHAPS (3-[(3-Cholamido-propyl)-dimethylammonio]-propane- sulfonate)'den 0,1g, Tween- 40, Triton X- 100'den 100 µL alınıp üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklendi.

Ek.5 Nişastanın Hazırlanması

%0.5' lik nişasta 0.1M pH 7 sodyum fosfat tamponu içerisinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

Ek.6 ONPG' nin Hazırlanması

10 mL için 0.018g O-nitro-fenil-β-D-galactopyranoside (ONPG), 0.1M pH 6.8 sodyum fosfat tamponu içerisinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

Ek.7 Azo-kazein hazırlanması

10 ml için 0,02 gr azokazein 0,1 M pH 9 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmesi sağlanır.

8.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurullah AKCAN

Doğum Yeri : Diyarbakır

Doğum Tarihi: 02.09.1978

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum Ve Yıl)

Lise : Fatih Lisesi 1992-1995

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1997-2001

Yüksek Lisans: Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2002-2004

Doktora : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2004-2009

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Araştırma Görevlisi, Kafkas Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, 2006- ----