

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI FAZ FERMANTASYON
(SOLID STATE FERMENTATION; SSF) TEKNİĞİYLE
Bacillus circulans'tan
 α -AMİLAZ ve β -GALAKTOZİDAZ
ÜRETİMİ

Besi SERİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Fikret UYAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
AĞUSTOS 2009

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Besi SERİN tarafından yapılan bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Doç. Dr. Fikret UYAR (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL

Üye : Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

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

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

ÖZ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan araştırmalar gittikçe önem kazanmaktadır.

α -amilaz ve β -galaktozidaz günümüz biyoteknolojisinin en önemli enzimleri arasındadır. Bu enzimlerin çok sayıda endüstriyel uygulamaları bulunmaktadır. α -amilaz; yiyecek, fermantasyon, tekstil, kağıt, deterjan endüstrisi ve tıp gibi pek çok kullanım alanına sahiptir. β -galaktozidaz ise laktozun enzimatik hidrolizini katalizleyerek sağlık ve yiyecek teknolojisi açısından oldukça faydalı sonuçlar sağlamaktadır.

Çalışmamızda SSF yöntemiyle *Bacillus circulans*'tan α -amilaz ve β -galaktozidaz üretimi ve bu enzimlerin bir takım optimizasyonları tespit edilmeye çalışıldı. SSF besiyerini oluşturmak için katı substrat olarak pamuk küspesi, mısır küspesi, elma kabuğu, muz kabuğu, portakal kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve darı kullanıldı. En iyi aktivite pirinç kabuğunda elde edildi. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarımızda pirinç kabuğu katı substrat olarak kullanıldı.

Enzimlerin üretimi için en iyi inkübasyon süresi 48. saat, en iyi inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak tespit edildi. Uygun ekim miktarı, uygun nem miktarı ve başlangıç pH tespiti amacıyla yapılan deneylerde, α -amilaz için uygun ekim miktarı %25, β -galaktozidaz için %35; uygun nem miktarı her iki enzim için %20 ve başlangıç pH'sı 7.5'te elde edildi.

50mM NaCl, %1 CHAPS, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween 40, saf su, pH 6.8 ve pH 7.0 sodyum fosfat tamponu ve çeşme suyu kullanılarak uygun

ekstraksiyon ortamı belirlenmeye çalışıldı. Her iki enzim için en iyi aktivite çeşme suyunda elde edildi.

25°C – 90°C sıcaklık aralıklarında yapılan aktivite tayinlerinde α -amilaz için optimum aktivite sıcaklığı 70°C ve β -galaktozidaz için 60°C olarak tespit edildi.

Enzimlerin üretiminde en iyi aktivite katı substrat karışımlarından 0.5g darı + 4.5g pirinç kabuğu karışımında elde edildi.

%1 oranındaki farklı azot ve karbon kaynaklarının enzimlerin üretimi üzerine etkisi incelendi. α -amilaz için en iyi azot kaynağı amonyum klorür ve amonyum nitrat iken β -galaktozidaz için azot kaynaklarının enzim üretimini arttırıcı bir etkisinin olmadığı belirlendi. %1 oranındaki karbon kaynaklarının ise enzimlerin üretimini arttırmadığı tespit edildi.

%0.1 oranındaki metal iyonlarının enzimlerin üretimi üzerine etkisi incelendi. Her iki enzim için $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 'da aktivite görülmezken $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CaCl_2$ 'nin kontrole göre düşük çıktığı belirlendi.

Anahtar sözcükler : SSF, α -amilaz, β -galaktozidaz, *Bacillus circulans*.

ABSTRACT

Because of the gradual development of the enzyme technology, the variety of usage areas and high economic value of products, the researches on the industrial enzyme of bio-technology are becoming more significant.

α -Amylase and β -galactosidase are among the most important enzymes of modern biotechnology. There are a great number of industrial usages of these enzymes. α -Amylase has many different usage areas such as food, fermenting, textile, paper, the industry of detergent and medicine while β -galactosidase provides relatively beneficial results for the health and food technology by catalyzing the enzymatic hydrolysis of lactose.

In our study, we have worked on the obtaining α -amylase and β -galactosidase from the bacteria of *Bacillus circulans* with the help of SSF method and some optimizations of these enzymes have been determined. In order to form SSF medium; cotton pulp, corn gluten meal, the crust of apple, the crust of banana, the crust of orange, rice husk, wheat bran and millet were used as solid substrate. The best result was gained with rice husk. Therefore, rice husk was used as solid substrate in the following studies.

The suitable incubation time for the obtaining of the enzymes has been determined as 48th hour and the suitable incubation temperature has been found as 37°C. In studies done for the purposes of determining the proper planting amount, humidity amount and pH the proper planting amount for α -amylase has been stated as %25 and for β -galactosidase as %35 whereas the proper humidity amount has been determined as %20 and suitable initial pH 7.5 for both of the enzymes

By using 50mM NaCl, %1 CHAPS, %1 Triton, %1 SDS, %1 Tween 40, deionize water, pH 6.8 and pH 7.0 sodium, the buffer of phosphate and tap water, the proper environment of extraction was specified. The best result for both enzymes was gained by using the tap water.

While designating the activations done at temperatures around 25 °C – 90 °C, the ideal activation temperature for α - amylase was determined as 70°C and for β -galactosidase as 60°C.

While obtaining the enzymes, the best activation was seen with the mixture of 0.5g millet and 4.5g rice husk, out of the other solid substrate blends.

The effect of different nitrogen and carbon sources in % 1 ratios on the production of enzymes was observed. While the best nitrogen source for α -amylase was determined as ammonium chloride and ammonium nitrate it was found that there is no effect of nitrogen sources on β -galactosidase in terms of increasing the activation. It was determined that carbone sources in % 1 ratios do not induce the activation of enzymes.

The effect of metal ions in %0.1 ratios on the activation of enzyme was observed. Enzyme activity could not be seen in $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ for both enzymes. It was revealed that the amount of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CaCl_2$ was lower than the control group.

Key words : SSF, α -amylase, β -galactosidase, *Bacillus circulans*

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bilim adamları “ Biyoloji, serüven düşkünü zihinlerin bilimidir ” sözüyle biyolojiyi tanımlamışlardır. Şüphesiz her serüvenin bir kahramanı bir de emeğini ve yeteneğini esirgemeyen destekçileri vardır. Bu anlamda, yüksek lisansım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, sabırlı dikkatiyle destek olan ve danışmanım olmasından kıvançlı bir sevinç duyduğum Değerli Hocam Doç. Dr. Fikret UYAR’a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuar çalışmalarım sırasında gerekli imkanları sağlayarak desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bilgisi ve manevi desteğiyle yardımlarını gördüğüm Sayın Hocam Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ’a, ihtiyaç duyduğum kaynaklara ulaşmamı sağlayan Celal Bayar Üniversitesinden Sayın Dr. Halil TOSUN’a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca yaşadığım sorunlarda hep yanımda olan, bana iyi niyet, sabır ve anlayış gösteren Dr. Delal Emine AYÇİÇEK’e sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuar çalışmalarım ve tezimi hazırlama aşamasında özverili çalışmalarıyla katkıda bulunan Arş.Gör. Nurullah AKCAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini ve yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım; Yasemin AKGÖZ, Süleyman ÖZAKIN, İlknur PORSUK ve Özgür BADEMCİ’ye, 450 Evler Sağlık Ocağı personellerinden Şeyhmus ERİNÇ, Şaban POLAT, Ayhan AKBOZ, Leyla KARAGÖZ, Osman KANGAL, Murat SÜT ve Dr.Sevim POLAT’a, İngilizce çeviriye yardım eden Mehtap İNCE’ye ve bana uygun çalışma ortamı sağlayan Uz.Dr.Buket YAYLA’ya teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi hazırlamamda yorulmaz gayretleriyle destek olan eniştelерim, Burhanettin ERDİNÇ ve Mazlum KARABİBER’e ve hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana emek veren sevgili aileme, sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv

1. GİRİŞ

1.1 α -Amilaz	1
1.2 β -Galaktozidaz	2
1.3 Katı Faz Fermantasyon (Solid State Fermentation; SSF)	3
KAYNAKLAR	6

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Genel Bilgiler	9
2.2 α -Amilazın Endüstride Kullanım Alanları	11
2.2.1 α -Amilazın Fırıncılıkta Kullanımı	11
2.2.2 α -Amilazın Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanımı	11
2.2.3 α -Amilazın Tekstil Endüstrisinde Kullanımı	12
2.2.4 α -Amilazın Kağıt Endüstrisinde Kullanımı	12

2.2.5	α -Amilazın Deterjan Endüstrisinde Kullanımı	12
2.2.6	α -Amilazın Tıpta Kullanımı	13
2.3	β -Galaktozidazın Genel Özellikleri	13
2.4	β -Galaktozidazın Endüstride Kullanım Alanları	16
2.4.1	β -Galaktozidazın Sütteki Laktozun Uzaklaştırılmasında Kullanımı	16
2.4.2	β -Galaktozidazın Peynir Altı Suyundaki Laktozun Uzaklaştırılmasında Kullanımı	16
2.4.3	β -Galaktozidazın Galaktooligosakkaritlerin Sentezlenmesinde Kullanımı	17
2.5	SSF'in Tarihçesi	17
2.6	SSF'in SmF'e Göre Avantajları, Dezavantajları	18
2.7	SSF'te Dikkat Edilecek Hususlar	18
2.7.1	Mikroorganizma Seçimi	18
2.7.2	Substrat Seçimi	19
2.7.3	Substratın Partikül Büyüklüğü	19
2.7.4	Nem İçeriği ve Su Aktivitesi	19
2.7.5	Ekim Miktarı	20
2.7.6	Sıcaklık ve pH'nın Etkisi	20
2.7.7	Havalandırma	21
2.8	Önceki Çalışmalar	22
	KAYNAKLAR	31

3. MATERYAL ve METOT

3.1	Biyolojik Materyal	37
-----	--------------------	----

3.2	Kimyasal Maddeler	37
3.2.1	Azot Kaynakları	37
3.2.2	Karbon Kaynakları	37
3.2.3	Metal İyonları	37
3.2.4	Deterjanlar	37
3.3	Besiyerleri	37
3.3.1	Katı Besiyeri	37
3.3.2	Sıvı Besiyeri	38
3.3.2.1	Nutrient Broth (NB) Besiyeri	38
3.3.2.2	Luria Broth (LB) Besiyeri	38
3.3.3	SSF Besiyeri	38
3.4	Çözeltiler	38
3.4.1	Tampon Çözeltiler	38
3.4.2	Nişastanın Hazırlanması	39
3.4.3	ONPG' nin Hazırlanması	39
3.4.4	Sodyum Karbonatın Hazırlanması	39
3.4.5	Alkalin Çözeltisi	39
3.4.6	Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması	40
3.5	Kullanılan Cihazlar	40
3.6	Bakteri Üretimi	41
3.7	SSF Besiyerinden Enzim Üretimi	41
3.8	Enzim Aktivite Tayini	41
3.8.1	α- Amilaz Enzim Aktivite Tayini	41
3.8.2	β- Galaktozidaz Enzim Aktivite Tayini	42

3.8.3	Protein Miktar Tayini	42
3.9	Enzimlerin Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi	42
3.9.1	Uygun Substrat Seçimi	42
3.9.2	Uygun İnkübasyon Süresinin Seçimi	43
3.9.3	Uygun İnkübasyon Sıcaklığının Seçimi	43
3.9.4	Uygun Ekstraksiyon Ortamının Seçimi	43
3.9.5	Başlangıç pH'nın Seçimi	43
3.9.6	Optimum Aktivite Sıcaklığının Seçimi	44
3.9.7	Uygun Ekim Miktarının Seçimi (İnokülüm Hacmi)	44
3.9.8	Uygun Nem Miktarının Seçimi (Moisture Level)	44
3.9.9	En İyi Aktivite Veren Substratların Karışımı	44
3.9.10	Enzimlerin Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi	45
3.9.11	Enzimlerin Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi	45
3.9.12	Enzimlerin Üretimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi	45
KAYNAKLAR		46

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 BULGULAR

4.1.1	Enzim Üretimi Üzerine Farklı Substratların Etkisi	47
4.1.2	Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	47
4.1.3	Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi	47
4.1.4	Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Ortamının Etkisi	48

4.1.5	Başlangıç pH	48
4.1.6	Optimum Aktivite Sıcaklığı	49
4.1.7	Enzim Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Etkisi	49
4.1.8	Enzim Üretimi Üzerine Nem Miktarının Etkisi	49
4.1.9	Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Veren Substratların Karışımı	50
4.1.10	Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	50
4.1.11	Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	51
4.1.12	Enzim Üretimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	51
4.2	TARTIŞMA	52
4.3	ŞEKİLLER	62
	KAYNAKLAR	74
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	77
	KAYNAKLAR	80
	ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı enzimlerin kullanım alanları ve elde edildikleri mikroorganizmalar

Çizelge 2.2. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan β -galaktozidazın aktif bölgesi ve fiziksel özellikleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. α -Amilazın nişastayı hidrolizi

Şekil 1.2. β -Galaktozidazın laktozu hidrolizi

Şekil 2.1. β -Galaktozidaz tarafından hidroliz edilen laktozun şematik mekanizması

Şekil 4.1. α -Amilaz üretimine farklı substratların etkisi

Şekil 4.2. β -Galaktozidaz üretimine farklı substratların etkisi

Şekil 4.3. α -Amilaz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisi

Şekil 4.4. β -Galaktozidaz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisi

Şekil 4.5. α -Amilaz üretimine ekstraksiyon ortamının etkisi

Şekil 4.6. β -Galaktozidaz üretimine ekstraksiyon ortamının etkisi

Şekil 4.7. α -Amilaz üretimine başlangıç pH' nın etkisi

Şekil 4.8. β -Galaktozidaz üretimine başlangıç pH' nın etkisi

Şekil 4.9. α -Amilaz için optimum aktivite sıcaklığı

Şekil 4.10. β - Galaktozidaz enzimi için optimum aktivite sıcaklığı

Şekil 4.11. α - Amilaz üretimine ekim miktarının etkisi

Şekil 4.12. β - Galaktozidaz üretimine ekim miktarının etkisi

Şekil 4.13. α -Amilaz üretimine nem miktarının etkisi

Şekil 4.14. β -Galaktozidaz üretimine nem miktarının etkisi

Şekil 4.15. α -Amilaz üretimine en iyi aktivite veren substrat karışımlarının etkisi

Şekil 4.16. β -Galaktozidaz üretimine en iyi aktivite veren substrat karışımlarının etkisi

Şekil 4.17. α -Amilaz üretimine %1 azot kaynaklarının etkisi

Şekil 4.18. β -Galaktozidaz üretimine %1 azot kaynaklarının etkisi

Şekil 4.19. α -Amilaz üretimine %1 karbon kaynaklarının etkisi

Şekil 4.20. β -Galaktozidaz üretimine %1 karbon kaynaklarının etkisi

Şekil 4.21. α -Amilaz üretimine % 0.1 metal iyonlarının etkisi

Şekil 4.22. β -Galaktozidaz üretimine % 0.1 metal iyonlarının etkisi

SİMGELER ve KISALTMALAR

- SSF** ; Solid State Fermentation,
SmF ; Submerged Fermentation
GOS ; Galaktooligosakkaritler
GH ; Glikosid Hidrolaz
ONPG ; o-nitropheniyl-beta-D-galactoside
IMC ; Initial Moisture Content
WB ; Wheat Bran
RH ; Rice Husk
CGM ; Corn Gluten Meal
YE ; Yeast Extract
SDS ; Sodyum Dodesil Sülfat
RGPW ; Red Gram Plant Waste
LB ; Laura Broth
NB ; Nutrient Broth
DNS ; Dinitrosalisilik Asit
FCR ; Folin Ciocalteu Reagent
CSL ; Corn Speed Luquor

1. GİRİŞ

Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilen, katalitik aktiviteye sahip genellikle protein yapısında olan moleküllerdir. Enzimlerin aktivite göstermesi için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Enzimler bugün hücreden çıkmış ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bugün ekmek, bira, peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve bir sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadır¹.

Endüstriyel enzimler oldukça geniş bir pazar payına sahiptir. Dünya pazarlarında tahmin edilen yaklaşık değerleri iki milyar dolardır. Enzimlerin endüstrideki dağılımı incelendiğinde deterjanlar %37, tekstil %12, nişasta %11, ekmek %8 ve hayvan yemi %6 toplamda da %75' lik bir paya sahiptirler².

1.1. α -Amilaz

Amilazlar nişastayı hidroliz ederek dekstrin, oligosakkarid ve glukoz molekülleri gibi ürünlere parçalayan endüstriyel öneme sahip hidrolitik enzimler arasındadır³.

Amilazların tarihçesi 1811'de ilk olarak Kirchoff'un nişastayı parçalayan enzimi keşfetmesiyle başladı. Bunu sindirim amilazlarının ve malt amilazlarının bulunması izledi⁴. Daha sonra 1930'da Ohlsson malttaki amilazların nişastayı parçalaması sonucu oluşan şeker tiplerine göre amilazların α -amilaz ve β -amilaz şeklinde sınıflandırılmasını önerdi⁴.

Bakteriyel amilazlar, nişastayı hidrolizleme durumuna göre endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Bir endoamilaz olan α -amilaz

(E.C 3.2.1.1; α -1,4 glukan, glukanhidroksilaz) hidrolazlar sınıfının en önemli üyelerinden biridir ve nişastadaki glikozidik bağlarını rastgele yerlerden hidrolizler. Bir ekzoamilaz olan β -amilaz (E.C 3.2.1.2; α -1,4, glukanmalthidrolaz) ise nişastanın indirgen olmayan ucundan başlayarak glikozidik bağlarını hidrolizler. Ayrıca bir glukoamilaz olan γ -amilaz (E.C 3.2.1.3) amilopektinin dallanma noktalarındaki glikozidik bağları kırar⁵ .(Şekil 1.1. α -amilazın nişastayı hidrolizi)⁶ .

Amilazlar bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar gibi birçok kaynaktan sağlanabilmekle birlikte endüstriyel alanda amilaz üretimi için mikroorganizmalar daha çok tercih edilmektedir^{3,7} . Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmaması, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajlarından dolayıdır. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir⁸ .

1.2. β -Galaktozidaz

β -galaktozidaz (E.C.3.2.1.23) genellikle laktaz olarak bilinir ve laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizler. Laktoz sütün başlıca bileşenidir ve sütün yaklaşık %4-5'ini oluşturmaktadır⁹ . Laktoz hidrolizi gerçekleştiğinde sütün tatlılık oranı artar ve bu durum özellikle 'laktoz intoleransı' olan kişilerin süt tüketimini kolaylaştırır^{10,11} (Şekil 1.2. β -galaktozidazın laktozu hidrolizi).

β -galaktozidaz galaktooligosakkaritlerin (GOS) transgalaktozilasyonunu da gerçekleştirir¹² . GOS'un geri dönüşüm reaksiyonu insan bağırsağında yararlı

bakterilerin gelişmesini sağlayarak sindirime yardımcı olur. β -galaktozidaz bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar gibi birçok kaynaktan elde edilebilir^{13,14}.

β -galaktozidazlar aminoasit benzerliklerine göre glikozid hidrolazlar (GH) ailesinde dört sınıfa ayrılır : 1, 2, 35 ve 42. Termofilik, psikrofilik ve halofilik organizmalar GH 42 ailesindeyken çoğu β -galaktozidaz GH 2 ailesindedir¹⁵.

β -galaktozidaz *E.coli*'de lac Z geninin ürünüdür ve genellikle moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanıldığı rapor edilmektedir¹⁶.

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

Katı faz fermantasyon (SSF) mikroorganizmaların susuz veya suyun az bulunduğu katı ortamlarda fermantasyonu olarak tanımlanır^{17,18}. Biyoteknolojide enzimlerin kullanım alanlarının gittikçe artması enzim üretimi için yeni yöntemlerin gelişmesine neden olmuştur⁵. SSF enzim üretimi için zengin potansiyel bir kaynaktır^{5,7,17,19,20}. SSF tarımsal sanayi atıklarının değerlendirilmesinde sayısız avantaj sağlamaktadır^{17,21,22,23}. SSF yöntemlerinin çok daha az atık su oluşturması, yüksek verim sağlaması, düşük maliyetli olması, çevre dostu olması bunların arasında sayılabilir^{17,22,23}.

SSF, tarımsal sanayi atıklarının biyolojik olarak detoksifikasyonu, ekin artıklarının besinsel yönden zenginleşmesi için biyodönüşümü, biyoyileştiricilerin üretimi, antibiyotikler, alkaloidler, bitki büyüme faktörleri, enzimler, organik asitler, biyopestisitler, biyoherbisitler, biyoyakıt ve aroma bileşiklerinin üretimi gibi bir çok kullanım alanına sahiptir^{17,18}.

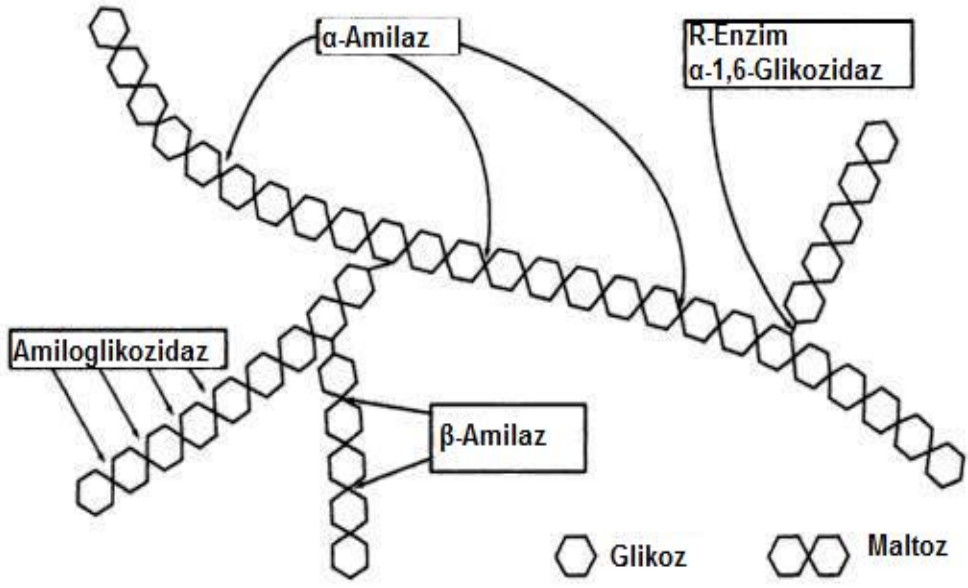
SSF tekniğinin daha çok mantarlar için uygun olduğu düşünülmüştür. Bakteri kültürleri daha fazla su aktivitesi gerektirdiğinden dolayı bakteriler için

uygun olamayacağına inanılıyordu. Ancak bakteriler SSF tekniğini kullanarak başarılı bir büyüme göstermişlerdir^{17,18,19}. SSF mikroorganizmaların doğal habitat ortamına benzer ve bu nedenle mikroorganizmaların büyümesi için tercih edilmektedir. Denizde yaşayan mikroorganizmalar bile suda serbest halde yaşamayı sevmezler. Çünkü deniz ortamında bulunan canlıların %98'inden fazlası su altındaki katı substratların yüzeyinden izole edilmiştir¹⁷.

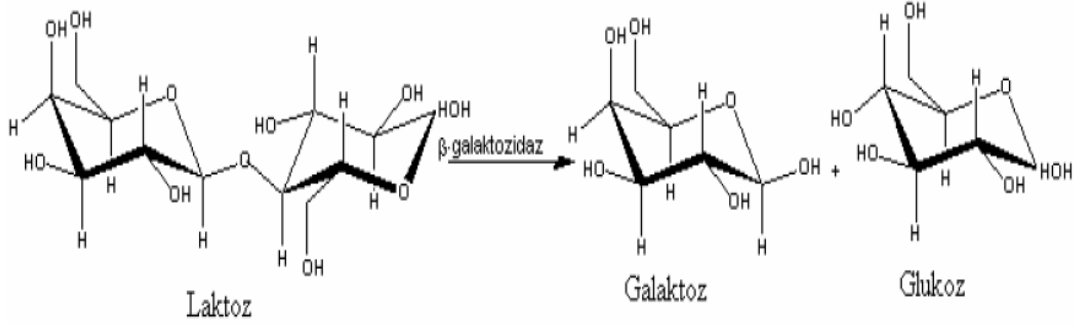
SSF tekniğinde çeşitli katı substratlar, örneğin, buğday kepeği, pirinç kabuğu¹⁹, buğday unu, soya unu, pirinç unu, mısır unu, nohut unu, muz kabuğu, çay kabuğu, manyok kökü vb. kullanılabilir⁵. Ancak en yaygın kullanılan ve en iyi sonuç veren buğday kepeğidir^{5,19}. Bu substratların dışında karbon ve azot kaynakları da gereklidir^{18,19}.

SSF'te dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli nokta da parametrelerin ve optimum koşulların seçimidir. Bunlar; partikül büyüklüğü, pH, substrat seçimi, bağıl nem, inkübasyon, çalkalama, havalandırma sıcaklığı, inokülüm hacmi, ortama eklenen azot, fosfor, iz elementler ve karbon kaynaklarıdır^{17,18,24}.

Bugün çevremiz büyük bir değişim içerisinde ve teknolojik gelişmelerdeki süreklilik bu yarışta katalizör rol oynamaktadır. SSF şimdilik laboratuvar ölçeğinde olmasına rağmen yüksek fermantasyon verimliliği, yüksek ürün konsantrasyonu, yüksek ürün stabilitesi, düşük katabolik represyon, daha az sterilite ve su aktivitesi gerektirmesi açısından birçok biyoteknolojik avantaja sahip görünmektedir¹⁷.



Şekil 1.1. α -amilazın nişastayı hidrolizi ⁶



Şekil 1.2. β -galaktozidazın laktozu hidrolizi

KAYNAKLAR

1. Gözükar, M.E. *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, **2001**
2. Industrial Enzymes, **2007**. Erişim: <http://www.ezinearticles.com>, 20.04.2009
3. Mukherje, A.K.; Borah, M.; Rai, S.K. *To Study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by Bacillus subtilis DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations*, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 43, 149-156.
4. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1599-1616.
5. Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. *Solid state fermentation for the production of industrial enzymes*, *Current Science*, **1999**, 77, 149-162
6. Uhlig, H.; Linsmaier-Bednar, E.M., *Industrial Enzymes and Their Applications*, Wiley IEEE, **1998**
7. Kunamneni, A.; Permaul, K.; Singh, S. *Amylase production in Solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 100, 168-171
8. Kıran, Ö.E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları*, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**, 9 (1)

9. Osejevi, K.; Cuadra, K.; Batista-Viera, F. *Development of a continuous solid phase process for reduction and thiol-dependent immobilization of yeast β -galactosidase*, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, **2009**, 57, 188-193
10. Haider, T.; Quayyum, H. *Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin a layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk*, *International Dairy Journal*, **2009**, 19, 172-177
11. Haider, T.; Quayyum, H. *Immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support*, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 43, 307-314
12. Neri, D.F.M.; Balcao, V.M.; Carnerio-da-Cunha, M.G.; Carvalho Jr, L.B.; Teixeira, J.A. *Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic(mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis*, *Catalysis Communications*, **2008**, 9, 2334-2339
13. Kestwal, R.M.; Bhide, S.V. *Purification of β -galactosidase from *Erythrina indica* involvement of tryptophan in active site*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1770, 1506-1512
14. Neri, D.F.M.; Balcao, V.M.; Dourado, F.O.Q.; Carvalho Jr, L.B.; Teixeira, J.A. *Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol*, *Reactive & Functional Polymers*, **2009**, 69, 246-251
15. Li, L.; Zhang, M.; Jiang, Z.; Tang, L.; Cong, Q. *Characterisation of a thermostable family 42 β -galactosidase from *Thermotoga maritima**, *Food Chemistry*, **2009**, 112, 844-850

16. Gong, H.; Zhang, B.; Little, G.; Kovar, J.; Chen, H.; Xie, W.; Schutz-Geschwender, A.; Olive, D.M. *β -galactosidase activity assay using far-red-shifted fluorescent substrate DDAOG*, *Analytical Biochemistry*, **2009**, 386, 59-64
17. Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A. *Recent advances in solid state fermentation*, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 44, 13-18
18. Pandey, A. *Solid state fermentation*, *Biochemical Engineering Journal*, **2003**, 13, 81-84
19. Baysal, Z.; Uyar, F.; Aytekin, Ç. *Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant Bacillus subtilis from hot spring water*, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1665-1668
20. Couto, S.R.; Sanroman, M.A. *Application of solid state fermentation to food industry-a review*, *Journal of Food Engineering*, **2006**, 76, 291-302
21. Graminha, E.B.N.; Gonçalves, A.Z.L.; Pirota, R.D.P.B.; Balsalobre, M.A.A.; Da Silva, R.; Gomes, E. *Enzyme production by solid state fermentation: application to animal nutrition*, *Animal Feed Science and Tech.* **2008**, 144,1-22
22. Tanyıldızı, M.Ş.; Özer, D.; Elibol, M. *Production of bacterial α -amylase by Bacillus amyloliquefaciens under solid state fermentation*, *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 37, 294-297
23. Hölker, U.; Lenz, J. *Solid state fermentation are there any biotechnological advantages*, *Current Opinion in Microbiology*, **2005**, 8, 301-306
24. Balkan, B.; Ertan, F. *Production of α -amylase from Penicillium chrysogenum under solid state fermentation by using some agricultural by products*, *Food Technol. Biotecchnol.*, **2007**, 45(4), 439-442

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Genel Bilgiler

Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks moleküllerdir. Enzimler *in vitro* koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmaların bu proteinleri bol miktarda üretmeleri sonucu izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler.

Günümüzde enzimler süt ürünlerinin üretiminde, biracılıkta, etlerin işlenmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında, fruktoz şurubu üretiminde kullanılmalarıyla gıda sektöründe, protein ve yağ artıklarını parçalamak üzere deterjan endüstrisinde, deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırarak tekstilde, teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar. Bazı enzimlerin kullanım alanları ve elde edildikleri mikroorganizmalar Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı Enzimlerin Kullanım Alanları ve Elde Edildikleri Mikroorganizmalar¹

ENZİM	KULLANIM ALANI	MİKROORGANİZMA
α -amilaz	Maltoz ve dekstrinin yıkılması	<i>Bacillus subtilis</i>
	Leke çıkarıcı	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Unun zenginleştirilmesi	<i>Bacillus licheniformis</i>
β -glukanaz	Glikoz şurubu	
	β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus subtilis</i>

Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önlemek için	<i>Aspergillus niger</i>
Sellaz	Deterjan katkı maddesi Atıkların değerlendirilmesi	<i>Penicillum spp.</i>
Glikoz izomeraz	Glikoz, Fruktoz dnşümü	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Streptomyces spp</i>
Glikoz oksidaz	Biyosensor	<i>Aspergillus niger</i>
Laktaz	Laktoz Glukoz+Galaktoz (Peynir altı suyu) Laktozsuz gıda retimi	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Lipaz	Deterjan katkı maddesi Yağların paralanması Peynir Endstrisi	<i>Aspergillus oryzae</i>
Pektinaz	Meyve suyu ekstraksiyonu şarap ve meyve suyu berraklaştırılması	<i>Erwinia spp.</i>
Proteaz	Deterjan katkı maddesi Deri Endüstrisi, et ekstraksiyonu Sindirime yardımcı	<i>Bacillus subtilis</i>
Renin	Peynir Endüstrisi	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Mucor spp.</i>
Sukraz (invertaz)	şekerleme Endüstrisi	<i>Saccharomyces spp.</i>

2.2. α -Amilazın Endüstride Kullanım Alanları

α -Amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzimdir². Amilazlar nişastayı temel alan endüstriler için en önemli enzimler arasındadır. Günümüzde amilazlar gıda, deterjan, tekstil, kağıt, ilaç gibi endüstriyel alanlarda kullanıma uygun bulunmuştur^{3,4,5,6}. Bu anlamda mikrobiyal amilazlar nişastayı temel alan endüstrilerde neredeyse tamamen kimyasal hidrolizlerin yerini almıştır^{3,7}.

2.2.1. α -Amilazın Fırıncılıkta Kullanımı

Yüzyıllardan beri mikrobiyal α -amilazlar fırıncılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler ekmeğin daha hacimli olmasını, daha güzel kızarmasını ve daha yumuşak olmasını sağlar. α -Amilaz yalnızca fermantasyon oranını arttırmaz aynı zamanda hamurun vizkozitesinin düşürülmesini de sağlar³. α -Amilazın fırıncılıkta yeni sayılan bir uygulama alanı da ekmeğin bayatlamasını geciktirerek raf ömrünün uzamasını sağlamaktır².

2.2.2. α -Amilazın Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanımı

Amilazlar nişastanın maltoz, dekstrin ve glukoza hidrolizini sağlarlar⁸. Bu şekilde meydana gelen ürün glukoz şurubu olarak adlandırılır. Ancak glukozun izomeri olan fruktozun tatlandırıcılık özelliği glukozun iki katıdır. Bu nedenle düşük kalorili gıdalarda fruktoz tercih edilmektedir³.

Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda

bulanıklık meydana gelmektedir. Bu sorun ortama α -amilaz ilave edilerek giderilmektedir^{2,9}.

2.2.3. α -Amilazın Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bunun için haşıl alma ajanı olarak da bilinen α -amilaz kullanılmaktadır².

2.2.4. α -Amilazın Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Kağıt endüstrisinde, kağıdın işlenmesi için nişastayla muamele edilmesi gerekir. Böylece kağıdın boyutları işlem esnasında mekanik zararlardan korunmuş olur. Kağıda sertlik ve dayanıklılık kazandırır, kağıdın kolay silinebilmesini sağlar. Kağıtla muamele edilen fazla nişastalar enzim yardımıyla ortamdan uzaklaştırılır³.

2.2.5. α -Amilazın Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

α -Amilazlar 1975'ten beri toz halindeki çamaşır deterjanlarına katılmaktadır. Günümüzde ise bütün sıvı deterjanların %90'ında α -amilaz mevcuttur ve artık bulaşık makinesi deterjanlarına da katılmaktadır³. Son yıllarda özellikle kuru temizleme gibi yeni alanlarda da giderek artan şekilde kullanım alanı bulmuştur. Nötrofilik özelliğe sahip amilazlar genel olarak pH 5.0-7.5 aralığında aktivite gösterirken, özellikle deterjan sanayisinde kullanılan amilazlar pH 8.0-11.0

aralığında aktivite göstermekte olup, alkalifilik *Bacillus* türlerinden izole edilmektedirler¹⁰.

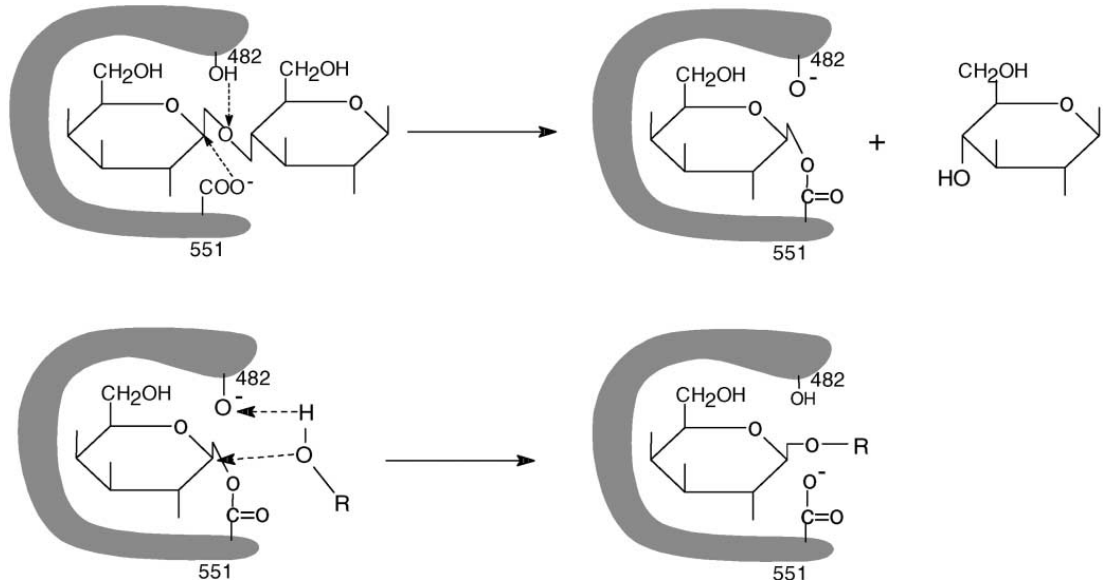
2.2.6. α -Amilazın Tıpta Kullanımı

Amilaz pankreas, tükürük bezleri ve bazı tümörlerden (örn. akciğer) salgılanmaktadır. Kandaki amilazın genellikle üçte biri pankreas, üçte ikisi ise tükürük bezleri kaynaklıdır. Dolaşıma giren amilaz esas olarak böbrekler aracılığıyla vücuttan atılmaktadır. Yüksek kan amilaz düzeyi pankreatitte meydana gelir. Ayrıca karın ağrısıyla ortaya çıkan bazı acil hastalıklarda, şiddetli şeker komasında, kabakulakta, morfin enjeksiyonundan sonra da amilaz düzeyleri bir miktar yükselebilmektedir. Amilaz değerinde düşüklüğün klinik bir önemi yoktur. Kandaki normal değeri 60-180 U/L dir¹¹.

2.3. β -Galaktozidazın Genel Özellikleri

β -galaktozidaz'ın varlığının belirlenmesi amacıyla o-nitrofenilbeta-D-galaktozid (ONPG) testi yapılmaktadır. β -galaktozidaz ortamda bulunan basit galaktozidler (laktoz dahil) hidrolizleyen bir enzimdir. Bakterilerin laktozu fermantasyon kabiliyeti, ortamda bulunan ONPG'nin ayrışması için gerekli olan β -galaktozidazın varlığına bağlıdır. Eğer besiyerinde galaktozidaz pozitif bir bakteri varsa, renksiz olan ONPG hidroliz edilerek, sarı kromojenik bir madde olan O-nitrofenol (ONP) serbest kalır. Pozitif reaksiyon da bu maddenin tespiti üzerine dayanır. Serbest kalan O-nitrofenol, alkali bir solüsyonda bulunursa, tautomerik değişimlere maruz kalarak sarı renk meydana gelir¹².

β -galaktozidazın aktif bölgesinde proton verici olarak sistein ve proton alıcı olarak ise histidin aminoasiti bulunmaktadır. Son zamanlarda ise β -galaktozidaz için yeni bir aktif bölgenin olduğu ileri sürülmüştür. Bu aktif bölgede glutamik asit artığı bulunmaktadır. Mikrobiyal kökenli bazı β -galaktozidazlarda iki tane glutamik asit artığı bulunmaktadır (Glu⁴⁸² ve Glu⁵⁵¹ gibi). Bunlardan birisi proton alıcı ve diğeri ise proton verici olarak görev yapmaktadır. Reaksiyonun mekanizması Şekil 2.1.'de gösterilmektedir¹³.



Şekil 2.1. β -galaktozidaz tarafından hidroliz edilen laktozun şematik mekanizması¹³

Şeklin birinci adımında enzim-galaktozil kompleks oluşumu ve aynı zamanda glukozun serbest bırakılması, ikinci adımında ise enzim-galaktozil kompleksinin hidroksil grubu içeren bir akseptöre transfer edilmesi gösterilmektedir. Şekilde β -galaktozidazın aktif bölgesinde proton verici ve proton alıcı olarak iki tane glutamik asit artığı bulunmaktadır.

β -galaktozidazlar çeşitli mikrobiyal kaynaklardan sağlanabilmekle birlikte aktif bölgesindeki glutamik asitlerin pozisyonları, protein zincirinin uzunluğu, molekül ağırlığı farklıdır. Çizelge 2.2' de bazı örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan β -galaktozidazın aktif bölgesi ve fiziksel özellikleri¹³

Enzim Kaynağı	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Molekül Kütle (Da)	117.618	116.351	118.016	119.160
Uzunluk (AA)	1025	1023	1031	1006
Proton verici	Glu ⁴⁸²	Glu ⁴⁶¹	Glu ⁴⁴⁹	Glu ²⁰⁰
Nükleofil/Baz	Glu ⁵⁵¹	Glu ⁵³⁷	Glu ⁵¹²	Glu ²⁹⁸

2.4. β -Galaktozidazın Endüstride Kullanım Alanları

Laktozun enzimatik hidrolizi ya asit etkiyle yüksek sıcaklıkta (150°C) ya da β -galaktozidazın ılımlı pH ve sıcaklık şartlarında enzimatik kataliziyle gerçekleşir. Laktozun enzimatik hidrolizi sağlık, yiyecek teknolojisi ve çevre açısından oldukça faydalı sonuçlar sağlamaktadır¹⁴.

2.4.1. β -Galaktozidazın Sütteki Laktozun Uzaklaştırılmasında Kullanımı

Dünyadaki yetişkin popülasyonunun %75'i süt ve süt ürünlerini yeterli miktarda tüketememektedir. Bunun nedenlerinden biri, bu insanların β -galaktozidaz eksikliği nedeni ile süt ve süt ürünlerindeki laktozu sindirememeleridir. Tüketilen süt, karın ağrısı, diyare, gaz sancısı gibi ağrılara neden olmaktadır^{14,15}. Bu problemin önüne geçmek için sütteki laktoz, β -galaktozidaz ile hidroliz edilerek glukoz ve galaktoza ayrışması sağlanmaktadır. Yine yüksek miktarda laktoz içeren süt ürünlerinden biri olan dondurmada, laktoz kristalleşmesi sonucu kumlu bir görüntü meydana gelir. Ancak β -galaktozidazın kullanılmasıyla bu tür donmuş süt ürünlerindeki laktoz konsantrasyonu azaltılabilir¹⁵.

2.4.2. β -Galaktozidazın Peynir Altı Suyundaki Laktozun Uzaklaştırılmasında Kullanımı

Peynir endüstrisinde laktoz atıktır ve bu durum ekonomik ve çevresel problemlere neden olmaktadır. Dünyada yıllık üretilen peynirin %47'si atıl haldedir. Laktozun hidrolizi ile peynir altı suyu faydalı şekerli içeceklerde, pastalarda ve tatlılarda kullanılabilir¹⁵.

2.4.3. β -Galaktozidazın Galaktooligosakkaritlerin Sentezlenmesinde Kullanımı

Laktozun hidrolizi sonucu galaktooligosakkaritler (GOS) oluşur. Bu bileşikler bağırsakta bulunan yararlı bakterilerin gelişimini sağlayarak sindirime yardımcı olur. Son günlerde oldukça ucuz ve etkili bir yöntem olduğu için GOS üretimine olan talep gittikçe artmaktadır^{15,16}.

2.5. SSF'in Tarihçesi

SSF tarihine göz atıldığında II. Dünya Savaşı sırasında penisilinin çok önemli olmasından dolayı SmF (Submerged Fermentation) fermantasyonla bileşik oluşturmada model teknoloji oldu. Araştırmacılar zamanlarını ve dikkatlerini SmF üzerine yoğunlaştırdıkları için muhtemelen bilinmeyen SSF ihmal edildi. Ancak 1950-1960 yıllarında mantar kültürleri kullanılarak steroid dönüşüm açıklandığında, küçük çapta araştırmalar da devam etti. SSF için bir diğer kilometre taşı 1960-1970 yıllarında bu yöntemle mitotoksinlerin üretimi oldu. Tarımsal sanayi artıklarından proteinle zenginleştirilmiş hayvan yemi üretimi bir diğer önemli gelişme oldu. Böylece bir çok araştırmacı SSF yöntemiyle ilgilenmeye başladı. Özellikle SSF yöntemine olan ilgi artarak devam etti^{17,18}.

SSF sürecine bakıldığında Asya ülkelerinde çok uzun zamandan beri var olduğu ancak batı ülkelerinde daha çok yeni olduğu görülür. SSF, Asya ülkelerinde özellikle yiyecek endüstrisinde pek çok uygulama alanı bulmuştur. Örneğin *Aspergillus oryzae*'den elde edilen ve pirincin yapımına katılan "koji", pirincin şekerlendirilmesiyle üretilen alkollü bir içecek olan "sake", *Monascus purpurea*

metabolitlerinden elde edilen ve pirince kırmızı renk vermede kullanılan “angkak” SSF tekniğiyle üretilmektedir¹⁹.

2.6. SSF’in SmF’e Göre Avantajları, Dezavantajları

Avantajları

Yüksek miktarda ürün,

Daha iyi oksijen sirkülasyonu,

Düşük maliyetli ekipman,

Problemlerin çözümünde az çaba gerektirmesi,

Düşük enerji ve araç gereksinimi,

Basit teknoloji,

Basit kontrol sistemi,

Birçok mikroorganizma için doğal habitat ortamına benzemesi.

Dezavantajları

Düşük etki,

Parametrelerin (pH, sıcaklık, nem vb.) kontrolünün zor olması,

Sıcaklık seviyesinin belirlenmesinin zor olması,

Yüksek miktarda saf olmayan ürün eldesi ve ürünlerin maliyetinin artması²⁰.

2.7. SSF’te Dikkat Edilecek Hususlar

2.7.1. Mikroorganizma Seçimi

Bir bakterinin özgül özellikleri, (bir karbonhidratı kullanma, amino asit sentezleyebilme v.b.) belirli bir enzim ya da enzimleri sentezleme yeteneğine sahip

olmasına bağlıdır. Bir bakteri türünü diğer bir türden farklı yapan nedenlerden biri belirli enzimleri sentezleme yeteneklerindeki farktan kaynaklanmaktadır²¹.

Daha önce SSF için mantar ve mayaların uygun olduğu, yüksek su aktivitesi gerektiği için bakteri kültürlerinin uygun olamayacağı düşünülüyordu. Ancak bakteri kültürleri SSF sürecinde oldukça başarılı büyüme göstermişlerdir¹⁸.

2.7.2. Substrat Seçimi

SSF sürecini etkileyen en önemli faktörlerden biri katı substratın işlevidir. Substrat seçilirken ekonomik değerinin düşük olması, kolay ve ucuz elde edilebilmesi, tarımsal sanayi artıklarından oluşması gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. SSF’te substrat sadece kültür ortamına besin desteği sağlamaz; aynı zamanda mikrobiyal hücreler için tutunma yüzeyi oluşturur^{20,22,23}.

2.7.3. Substratın Partikül Büyüklüğü

Genellikle küçük substrat partikülleri mikrobiyal büyüme için daha geniş yüzey alanı sağladığından daha çok tercih edilen bir durumdur. Ancak çok küçük substrat partikülleri substrat birikmesine ve dolayısıyla havalandırmaya engel olur; bu nedenle verimsiz büyümeyle sonuçlanır. Daha büyük partiküller ise daha iyi havalandırma sağlar ancak mikrobiyal büyümeyi sınırlar. Bu nedenle her bir süreç için uygun partikül büyüklüğünü seçmek gerekir^{20,24}.

2.7.4. Nem İçeriği ve Su Aktivitesi

Su mikroorganizmaların temel bileşenidir ve SSF’te enzim üretiminde besin maddelerinin katı substrata difüzyonunda anahtar rol oynamaktadır. SSF’te en iyi

başlangıç nem içeriği (IMC: Initial Moisture Content), substratın doğasına ve substratın su tüketme kapasitesine bağlıdır. Bu yüzden farklı substratlar farklı IMC değeri gösterebilir²⁵.

Düşük nem içeriği substrattaki besin maddelerinin çözünürlüğünü azaltır, şişme oranını düşürür ve yüksek oranda su gerilimine neden olur. Öte yandan yüksek nem içeriği substratın por açıklığını azaltarak oksijen geçişine engel olduğundan enzim üretiminin azalmasına neden olur. SSF süreçlerinde nem içeriği %30-85 arasında değişiklik gösterir. Optimum nem içeriği mikroorganizmanın büyüme ve substratı kullanmasına bağlıdır²⁶.

2.7.5. Ekim Miktarı

Yüksek ekim miktarı (inokülüm konsantrasyonu), nem içeriğini belirli bir seviyeye kadar arttırır. Aşırı sıvı faz, absorbe edilemeyen bir form oluşmasına, difüzyon bariyerinin yükselmesine, katı substratın olumsuz etkilenmesine ve sonuçta enzim miktarının azalmasına neden olur. Düşük ekim miktarı ise mikrobiyal hücre sayısının azalmasına neden olur. Bu durum mikroorganizmaların büyüme, substrattan yararlanmak için optimum sayıya ulaşma ve istenilen ürün eldesi için uzun bir zamana gereksinim göstermesine neden olur²⁶.

2.7.6. Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Her mikroorganizmanın büyüebilmesi ve aktivite gösterebilmesi için sahip olduğu bir pH aralığı vardır. SSF süreçlerinde pH dalgalanmalarındaki problemin üstesinden gelmek için uygun tampon kullanılarak biyolojik aktivitenin zarar görmesi önlenir.

Mikroorganizmanın büyümesi ve enzim üretimi açısından substrat yatağının sıcaklık kontrolü de oldukça önemlidir²³.

2.7.7. Havalandırma

SSF’te önemli faktörlerden biri de havalandırma dır. Havalandırmanın birkaç fonksiyonu vardır. Bunlar oksijenlenme, CO₂’in uzaklaştırılması, ısının yayılması, buharlaşan suyun dağılması, metabolizma esnasında oluşan uçucu bileşiklerin dağıtılması sayılabilir. Havalandırma oranı; gözenek sayısına, O₂ ve CO₂ optimizasyonuna bağlıdır²⁷.

2.8. Önceki Çalışmalar

Krishna ve Chandrasekaran²⁸ (1996) SSF tekniğiyle muz kabuğunu katı substrat olarak kullanarak *Bacillus subtilis* CBTK 106'dan α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. Çalışmada SSF ortamının bazı optimizasyonlarını; başlangıç nem içeriğini, partikül büyüklüğünü, inkübasyon sıcaklığını, inkübasyon süresini, pH'sını ve ortama eklenen azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Uygun başlangıç nem içeriği %70, uygun partikül büyüklüğü 400 μ m, başlangıç pH 7.0 ve inkübasyon sıcaklığı 35°C olarak tespit edilmiştir. Azot kaynağı olarak %1'lik amonyum sülfat/sodyum nitrat, %0.5'lik et özütü/pepton; karbon kaynağı olarak ise %0.1'lik glukoz, sükroz, nişasta ve maltozun enzim üretimini arttırdığını belirtmişlerdir.

Shaikh ve ark.²⁹ (1997) Termofilik mantar *Rhizomucor* sp.'den β -galaktozidaz üretmeye çalışmışlardır. Çalışmada SmF tekniğiyle elde edilen maksimum enzim aktivitesi 0.21 Um g^{-1} iken SSF tekniğiyle SMF'e göre 9 kat daha fazla aktivite elde edilmiş olup 2.04 Um g^{-1} değeriyle ifade edilmiştir. Sıcaklık aralığı 38-55°C olarak belirlenmiş ve en iyi aktivite 45°C'de, optimum pH 4.5, sıcaklık 60°C'de elde edilmiştir. Divalent katyonlarından Co²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ ve Zn²⁺ nin enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir.

Vetere ve Paoletti³⁰ (1998) *Bacillus circulans*'tan elde edilen üçüncü çeşit β -galaktozidaz enziminin karakterizasyonunu yapmaya çalışmışlardır. Çalışmada daha önce tanımlanmış β -galaktozidazlarla birlikte üç çeşit β -galaktozidazın özellikleri karşılaştırılmıştır. Bu üç enzimin moleküler ağırlıkları sırasıyla 212 kDa,

145 kDa ve 86 kDa olup Km değerleri ONPG ve laktozu hidroliz durumlarına göre 3.6, 5.0 ve 3.3 mM olarak tespit edilmiştir. Kinetik parametreler o-nitrofenil- β -galaktopiranozit (ONPG) ve laktozun hidrolizine göre belirlenmiştir.

Kotwal ve ark.³¹ (1998) Termofilik mantar *Humicola sp.*'den SSF tekniğiyle α -galaktozidaz üretmeye çalışmışlardır. 45°C sıcaklıkta ve karbon kaynağı olarak soya unu kullanıldığında maksimum enzim aktivitesinin 44.6 U/g olarak elde edildiğini belirtmişlerdir.

Baysal ve ark.³² (2003) Diyarbakır-Çermik sıcak su kaynağından izole ettikleri termotoleran *Bacillus subtilis* bakterisinden SSF tekniğiyle α -amilaz elde etmişlerdir. Çalışmada buğday kepeği (Wheat Bran, WB) ve pirinç kabuğu (Rice Husk, RH) substrat olarak kullanılmış ve optimum enzim üretme şartları belirlenmeye çalışılmıştır. Yaklaşık inkübasyon süresini, nem seviyesini, parçacık büyüklüğünü ve inokülüm konsantrasyonunu belirlemişlerdir. Maksimum ürün miktarı 159.520 ve 21.760 U g⁻¹ ile buğday kepeği ve pirinç kabuğunda, 0.1M pH 7 fosfat tamponunda %30 nem seviyesi ile 24. ve 48. saatlerde elde etmişlerdir. Partikül büyüklüğü ve inokülüm konsantrasyonunu 1000 μ m, %20 ve 500 μ m, %15 ile buğday kepeği ve pirinç kabuğunda sırasıyla tespit etmişlerdir. Enzim miktarının buğday kepeğinde, pirinç kabuğundan 7 kat daha fazla bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Soni ve ark.³³ (2003) SSF tekniğiyle buğday kepeğini substrat olarak kullanıp *Bacillus sp.* AS1 ve *Aspergillus sp.* AS2'de yüksek oranda α -amilaz

(198950 U/g) ve glukoamilaz (3426 U/g) sırasıyla elde etmişlerdir. 50°C sıcaklıkta %15 nişasta solüsyonunda glukoamilaz %87 şekerlenme etkisi gösterirken, α -amilazın %96 sıvılaştırma etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Peksel ve ark.³⁴ (2005) Küf mantarı *Trichoderma reesei* anamorfı olan ascomycete *Hypocrea jeorina* kullanarak kültür ortamında β -galaktozidaz sentezini araştırmışlardır. Bunun için 10 g/L karbon kaynağı içeren kültür ortamlarını 30°C'de inkübe etmişlerdir. Enzim aktivite deneylerini substrat olarak O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit kullanarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirmişlerdir. Optimizasyona yönelik çalışmaları fizyolojik ve kimyasal koşulları değiştirerek sağlamışlardır. Çalışmalar sonucunda ortam koşullarının optimize edilmesiyle enzim aktivitesinde artış tespit etmişlerdir.

Rahardjo ve ark.³⁵ (2005) SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'nin aerial miselinden α -amilaz üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada bu mantarın aerial miselinde hem α -amilaz üretimi gerçekleştiğini hem de mantarın kütlesinde güçlü bir artış olduğu tespit edilmiştir. Mantar filamentlerinin morfolojileri, koloni oluşturabilmeleri ve katı substrata işleyebilme yeteneklerinden dolayı SSF için uygun mikroorganizmalar olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada total α -amilaz aktivitesinin 20–65. saatlerde artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Najafi ve ark.³⁶ (2005) *Bacillus subtilis* AX20'den ekstrasellüler α -amilaz üretmişlerdir. Optimum pH 6.0, optimum sıcaklığı 55°C olarak tespit etmişlerdir. Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Hsu ve ark.³⁷ (2005) *Bifidobacteria* türlerinden çeşitli kültür şartlarında β -galaktozidaz üretmeye çalışmışlardır. Optimum enzim üretiminin pH 6.5 ve 37°C sıcaklık şartlarında meydana geldiğini belirtmişlerdir. Azot ve karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi ve transgalaktosilasyon aktivitesini de incelenmişlerdir.

Baysal ve ark.³⁸ (2005) SSF tekniğiyle kavun kabuğu kullanarak *Bacillus coagulans*'tan lipaz üretmeye ve bu enzimin bazı optimizasyonlarını bulmaya çalışmışlardır. Enzimin en iyi üretildiği süre 24 saat, optimum pH 7.0, optimum sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur. %2 zeytinyağının enzim üretimini arttırdığı gözlenmiş, farklı azot, karbon kaynakları ve surfaktantların etkisi incelenmiştir. Sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum nitrat (NH₄NO₃), nişasta ve maltoz enzim üretimini arttırmıştır. Metal iyonların etkisi sonucu Mn²⁺, Ni²⁺ nin enzimi sırasıyla %32 ve %26 düzeyinde inhibe ettiğini, Ca²⁺ iyonlarının ise enzim aktivitesini %105 arttırdığını tespit etmişlerdir.

Tanyıldızı ve ark.²² (2007) *Bacillus amyloliquefaciens*'ten SSF tekniğiyle α -amilaz elde etmeye çalışmışlardır. En iyi enzim aktivitesini elde etmek için hayvan yemi olarak kullanılan ve oldukça ucuz olan mısır küspesini (CGM; corn gluten meal), yedi farklı konsantrasyonda incelemişlerdir. 5-40 g/L arasında değişen miktarlarda kullanılan CGM'de en iyi enzim aktivitesini 30 g/L'de bulmuşlardır. Farklı nitrojen kaynaklarından pepton ve yeast üzerinde yapılan çalışmada en yüksek aktivite 10 g/L ile yeast extract (YE)'ta tespit etmişlerdir. MgSO₄ ve CaCl₂'nin enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde herhangi önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Çalkalama hızının enzim üretimine etkisini

incelemek için yaptıkları deneyde, 100-150-200 rpm çalkalama hızlarından en iyi etkiyi 150 rpm olarak bulmuşlardır. 25 ile 45°C arasında altı farklı inkübasyon sıcaklığında en iyi aktivite 33°C'de ve pH 5.0 ile 8.0 arasında yapılan dört farklı pH'da en iyi aktiviteyi pH 7.0'da tespit etmişlerdir.

Balkan ve Ertan²⁶ (2007) *Penicillium chrysogenum*'dan SSF tekniğiyle bazı tarımsal ürünler kullanarak α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. Katı substrat olarak mısır koçanı, çavdar samanı, buğday samanı ve buğday kepeği kullanmışlardır. Nem miktarının, partikül büyüklüğünün, ve ekim miktarının *Penicillium chrysogenum*'da enzim üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Optimum nem miktarını; mısır koçanı, çavdar samanı, buğday samanı ve buğday kepeği için sırasıyla %75-65-60 ve 55 olarak, partikül büyüklüğü ve ekim miktarını α -amilaz üretimi için sırasıyla 1mm, %20; 1mm, %20; 1mm, %20 ve 1mm %30 olarak tespit etmişlerdir. En yüksek enzim miktarını buğday kepeğinde 160 U/ml olarak bulmuşlardır.

Asgher ve ark.³⁹ (2007) Termofilik *Bacillus subtilis* JS 2004'ten termostabil α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. Kalsiyum, maya özütü ve glukoz katkılarının bakterinin büyümesi ve enzim üretmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimini 72 U/ml, 48. saatte, pH 7.0'da ve 50°C'de elde etmişlerdir. Kalsiyum ve maya özütü eklentisinin mikrobiyal büyümeyi ve enzim üretimini artırdığını, %1 glukozun ise azalttığını belirtmişlerdir. Enzimin 1-6 saatlerinde ve 70°C 'de oldukça stabil olduğunu 80°C'de %12 ve 90°C'de %48 aktivite kaybı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ca^{2+} nin enzim aktivitesini %117 civarında arttırdığını Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} nın inhibe ettiğini Mg^{2+} ,

Zn²⁺, Fe²⁺ ve Mn²⁺ nın da çok az etkilediğini belirtmişlerdir. *Bacillus subtilis* JS 2004'ün oldukça yüksek miktarda termostabil α -amilaz ürettiğini bu nedenle hem nişastanın hidroliz edilmesinde hem de yiyecek endüstrisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Shankar ve Mulimani⁴⁰ (2007) SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'den α -galaktozidaz elde etmeye çalışmışlardır. Çalışmada kırmızı nohut bitkisinin atığı (Red Gram Plant Waste, RGPW) ve buğday kepeği katı substrat olarak kullanılmıştır. RGPW'den elde edilen α -galaktozidaz aktivitesi 3.4 U/g iken buğday kepeğinde 2.7 U/g olarak tespit edilmiştir. RGPW ve buğday unununun 1:1 oranındaki kombinasyonunun α -galaktozidaz aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir.

Konsoula ve Kyriakides⁴¹ (2007) *Bacillus subtilis*'ten ekstrasellüler termostabil α -amilaz ve β -galaktozidazın birlikte üretimi üzerine karbon, organik azot ve kompleks organik kaynakların etkisini araştırmışlardır. Organik azot kaynakları içerisinde tripton ve mısır küspesinin enzim üretimini desteklediğini belirtmişlerdir. Çalışmada çözünebilir nişasta yerine başka nişastalı substratlar, örneğin, mısır unu kullanılmış ve her iki enzim üzerine pozitif etki oluşturmuştur. Ayrıca mısır küspesi ve triptonun farklı unlarla karıştırılması enzimlerin üretimini 2 kat arttırmıştır. *Bacillus subtilis*'ten elde edilen α -amilaz ve β -galaktozidazın sırasıyla 135°C ve 65°C sıcaklıkta maximum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Liu ve Xu⁴² (2008) *Bacillus sp.* YX-1'den α -amilaz üretmeye çalışmışlardır. Maksimum enzim aktivitesi (53 U/ml⁻¹), 45°C'de ve 44. saatte pH 5.0'da tespit

edilmiştir. Amonyum sülfat kullanılarak saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisinde Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforeziyle (SDS-PAGE) 56 kDA olarak bulmuşlardır. Substrat olarak mısır, buğday ve patates nişastasını kullanılmış en iyi aktivite mısır nişastasında tespit edilmiştir.

Gangadharan ve ark.⁴³ (2008) SmF tekniğiyle *Bacillus amyloliquefaciens*'ten α -amilaz sentezi ve bu enzimin bazı optimizasyonları üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu optimizasyonlar arasında substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve CaCl₂ konsantrasyonu gibi parametrelerin belirlenmesinin önemli olduğunu açıklamışlardır. Substrat konsantrasyonunu %12.5, inkübasyon süresini 42.saat ve CaCl₂ konsantrasyonunu 0.0275M olarak tespit etmişlerdir.

Ray ve ark.⁴⁴ (2008) *Bacillus brevis* MTCC 7521'den ekstrasellüler α -amilaz elde etmeye çalışmışlardır. Optimum sıcaklık 50°C, pH 6.0 ve inkübasyon süresi 36. saat olarak tespit edilmiştir. Kullanılan azot kaynaklarından et özütü (beef extract), diğer azot kaynaklarından pepton, maya özütü (yeast extract) ve kazein ile karşılaştırıldığında daha çok amilaz ürettiğini, asparajin, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve ürenin enzim üretimini azalttığını belirtmişlerdir. Ca²⁺ veya surfaktantların (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, sodyum lauryl sülfat %0.02) enzim aktivitesini arttırmadığını da belirtmişlerdir.

Rajagopalan ve Krishnan⁴⁵ (2008) *Bacillus subtilis* KCC103'ten α -amilaz elde etmeye ve bazı optimizasyonlarını tespit etmeye çalışmışlardır. Bakterinin

katabolit represyon yokluğunda basit şekerleri kullanarak α -amilaz ürettiğini belirtmişlerdir. 37°C sıcaklık, pH 7.0, %1 inokülüm hacmi, 200 rpm çalkalama hızı ve 48. saat inkübasyon süresi belirlenen deney şartları olup enzim üretimini bu şartlar altında gerçekleştirmişlerdir. %1 w/v oranındaki karbon kaynaklarından en iyi enzim üretimini 145 IU mL⁻¹ değeriyle ham patatesten, %1 w/v oranındaki organik azot kaynaklarından 119 IU mL⁻¹ değeriyle maya özütünde elde etmişlerdir. Çeşitli mikronütrientlerin örneğin, vitaminler, aminoasitler ve metal iyonlarının da α -amilaz sentezine etkisini incelemişlerdir. %0.01 oranındaki vitaminlerden tiaminin 2.35 kat, aminoasitlerden sistin'in ise 2 kat α -amilaz üretimini arttırdığını ancak metal iyonlarından Hg²⁺ nin ve surfaktantlardan Tween 20-40'ın enzim üretimini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Nizamuddin ve ark.⁴⁶ (2008) SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'den β -galaktozidaz üretmeye çalışmışlardır. Çalışmada buğday kepeği ve pirinç kabuğu desteğiyle *Aspergillus oryzae*'den maksimum düzeyde β -galaktozidaz elde etmişlerdir. Enzim üretimi için karbon kaynaklarından glukoz, laktoz, maltoz ve sükroz kullanmışlar ve en iyi aktiviteyi glukozda tespit etmişlerdir. Azot kaynaklarında ise en iyi aktiviteyi sodyum nitratta elde etmişlerdir. Başlangıç pH, nem içeriği, inkübasyon sıcaklığı gibi bazı parametrelere de bakmışlardır. En yüksek enzim aktivitesini ve protein miktarını buğday kepeği ve pirinç kabuğu 1:1 oranında karıştırıldığında elde etmişlerdir. Nem içeriği %90, başlangıç pH 5.0, glukoz miktarı %12.5 (w/w), sodyum nitrat %1 (w/w), optimum sıcaklık 30°C tespit ettikleri optimizasyonlardır.

Mukherjee ve ark.⁴⁷ (2009) SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis* DM03'ten sentezlenen ekstrasellüler α -amilaz üzerine fermente substratların etkisi hakkında çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada enzim üretimi için patates kabuğu en iyi substrat olarak tespit edilmiştir. Katabolit represyondan dolayı yüksek oranda şeker içeriğinin enzim sentezi üzerinde negatif bir etki oluşturduğunu ancak çeşitli analizlerin yüksek oranda nişasta içeren fermente substratların α -amilaz sentezini tetiklediğini belirtmişlerdir.

Neri ve ark.¹⁶ (2009) *Aspergillus oryzae*'de β -galaktozidaz tarafından galaktoolisakkaritlerin sentezlenmesini ve enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır.

KAYNAKLAR

1. Tosun, H. *Biyoteknolojide Enzimler*, Celal Bayar Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Dersi (yayımlanmamış ders notu)
2. Kıran, Ö.E.; Çömlekçioğlu, U.; Dostbil, N. *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları*, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **2006**, 9 (1)
3. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1599-1616.
4. Gangadharan, D.; Nampoothiri, K.M.; Sivaramakrishnan, S.; Pandey, A. *Immobilized bacterial α - amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch* (baskıda), **2009**
5. Mukherjee, A.K.; Borah, M.; Rai, S.K. *To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by Bacillus subtilis DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations*, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 43, 149-156
6. Gangadharan, D.; Sivaramakrishnan, S.; Nampoothiri, K.M.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. *Response surface methodology for the optimization of α -amylase production by Bacillus amyloliquefaciens*, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4597-4602
7. Kunamneni, A.; Permaul, K.; Singh, S. *Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 100, 168-171

8. Vural, N. *Besin Analizleri*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, **1992**, 69, p21
9. Ekşi, A. *Meyve suyu durultma tekniği*, *Gıda Teknolojisi Derneği Dergisi*, Ankara, **1988**, 127, p9
10. Igarashi, K.; Hatada, Y.; Hagihara, H.; Saeki, K.; Takaiwa, M.; Uemura, T.; Ara, K.; Ozaki, K.; Kawai, S.; Kobayashi, T.; Ito, S. *Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic Bacillus isolate and entire nucleotide and amino acid sequences*, *Applied and Environmental Microbiology*, **1998**, 64, 3282-3289
11. Amilaz, **2005**, Erişim: <http://www.hekimce.com>, 25.04.2009
12. Arda, M. *Temel Mikrobiyoloji*, Medisan Yayın, Ankara, **2000**
13. Zhou, Q.Z.K.; Chen, X.D. *Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from Kluyveromyces lactis*, *Biochemical Engineering Journal*, **2001**, 9, 33-40
14. Ramakrishnan, S.; Venkataraman, R. *Impact of herbal additives on lactose status of milk*, *Rasayan J. Chem*, **2008**, 1 (2), 204-206
15. Grosova, Z.; Rosenberg, M.; Rebroš, M. *Production of D-galactose using β -galactosidase and Saccharomyces cerevisiae entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel*, *Czech. Food Sci.* **2008**, 26, 1-14
16. Neri, D.F.M.; Balcao, V.M.; Dourado, F.O.Q.; Oliveria, J.M.B.; Carvalho Jr, L.B.; Teixeira, J.A. *Immobilization of β -galactosidase from Kluyveromyces lactis onto a polysiloxane-polyvinil alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis*, *Reactive & Functional Polymers*, **2009**, 69, 246-251

17. Singhanian, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A. *Recent advances in solid state fermentation, Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 44, 13-18
18. Pandey, A. *Solid state fermentation, Biochemical Engineering Journal*, **2003**, 13, 81-84
19. Hölker, U.; Lenz, J. *Solid state fermentation are there any biotechnological advantages, Current Opinion in Microbiology*, **2005**, 8, 301-306
20. Couto, S.R.; Sanroman, M.A. *Application of solid state fermentation to food industry, Journal of Food Engineering*, **2006**, 76, 291-302
21. Uyar, F. *Prokaryotlarda Proteolitik Aktivite, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır*, 30s, **1993**
22. Tanyıldızı, M.S.; Özer, D.; Elibol, M. *Production of bacterial α -amylase by Bacillus amyloliquefaciens under solid substrate fermentation, Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 37, 294-297
23. Sodhi, H.K.; Sharma, K.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. *Production of a thermostable α -amylase from Bacillus sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergitic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, Process Biochemistry*, **2005**, 40, 525-534
24. Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. *Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, Curr. Sci.*, **1999**, 77, 149-169
25. Pandey, A.; Soccol, C.R.; Larroche, C. *Current developments in solid state fermentation*, Springer, 517s, **2008**
26. Balkan, B.; Ertan, F. *Production of α -amylase from Penicillium chrysogenum under solid state fermentation by using some agricultural by products, Food Technol. Biotechnol.* **2007**, 45 (4), 439-442

27. Graminha, E.B.N.; Gonçalves, A.Z.L.; Pirota, R.D.P.B.; Balsalobre, M.A.A.; Da Silva, R.; Gomes, E. *Enzyme production by solid state fermentation: application to animal nutrition, Animal Feed Science and Technology*, **2008**, 144, 1-22
28. Krishna, C.; Chandrasekaran, M. *Banane waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* CBTK 106 under solid state fermentation, Microbial Biotechnology*, **1996**, 46, 106-111
29. Shaikh, S.A.; Khire, J.M.; Khan, M.I. *Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp., Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **1997**, 19, 239-245
30. Vetere, A.; Paoletti, S. *Seperation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulans*, Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, 1380, 223-231
31. Kotwal, S.M.; Gote, M.M.; Sainkar, S.R.; Khan, M.I.; Khire, J.M. *Production of α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. In solid state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis, Process Biochemistry*, **1998**, 33(3), 337-343
32. Baysal, Z.; Uyar, F.; Aytakin, Ç. *Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot spring water, Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1665-1668
33. Soni, K.S.; Kaur, A.; Gupta, J.K. *A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch, Process Biochemistry*, **2003**, 39, 185-192

34. Peksel, A.; Atlas, N.; Ataç, İ.A. *XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, 2005*
35. Rahardjo, Y.S.P.; Weber, F.J.; Haemers, S.; Tramper J.; Rinzema, A. *Aerial mycelia of Aspergillus oryzae accelerate α -amylase production in a model solid state-fermentation system, Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36, 900-902*
36. Najafi, M.F.; Deobagkar, D.; Deobagkar, D. *Purification and characterization of an extracellular α -amylase from Bacillus subtilis AX20, Protein Expression and Purification, 2005, 41, 349-354*
37. Hsu, C.A.; Yu, R.C.; Chou, C.C. *Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions, International Journal of Food Microbiology, 2005, 104, 197-206*
38. Baysal, Z.; Alkan, M.H.; Uyar, F.; Doğru, M. *XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, 2005*
39. Asgher, M.; Asad, M.J.; Rahman, S.U.; Legge, R.L. *A thermostable α -amylase from moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing, Journal of Food Engineering, 2007, 79, 950-955*
40. Shankar, S.K.; Mulimani, V.H. *α -Galactosidase production by Aspergillus oryzae in solid state fermentation, Bioresource Technology, 2007, 98, 958-961*
41. Konsoula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M. *Co-production of α -amylase and β -galactosidase by Bacillus subtilis in complex organic substrates, Bioresource Technology, 2007, 98, 150-157*

42. Liu, X.D.; Xu, Y. *A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated Bacillus sp. YX-1: purification and characterization*, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4315-4320
43. Gangadharan, D.; Sivaramakrishnan, S.; Nampoothiri, K.M.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. *Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by Bacillus amyloliquefaciens*, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4597-4602
44. Ray, R.C.; Kar, S.; Nayak, S.; Swain, M.R. *Extracellular α -amylase production by Bacillus brevis MTCC7521*, *Food Biotechnology*, **2008**, 22, 234-246
45. Rajagopalan, G.; Krishnan, C. *Optimization of medium and process parameters for a constitutive α -amylase production from a catabolite derepressed Bacillus subtilis KCC103*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2008**, 83, 654-661
46. Nizamuddin, S.; Sridevi, A.; Narasimha, G. *Production of β -galactosidase by Aspergillus oryzae in solid state fermentation*, *African Journal of Biotechnology*, **2008**, 7 (8), 1096-1100
47. Mukherjee, A.K.; Borah, M.; Rai, S.K. *To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by Bacillus subtilis DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations*, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 43, 149-156

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Biyolojik Materyal

Çalışmalarımızda biyolojik materyal olarak *Bacillus circulans* (ATCC 4516) kullanıldı.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. Azot Kaynakları

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

3.2.2. Karbon Kaynakları

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

3.2.3. Metal İyonları

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

3.2.4. Deterjanlar

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

3.3. Besiyerleri

3.3.1. Katı Besiyeri

8g Nutrient Broth (Oxoid) ve 16g agar (Merck), 1000ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

3.3.2. Sıvı Besiyeri

3.3.2.1. Nutrient Broth (NB) Besiyeri

8g NB, 1000ml saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

3.3.2.2. Luria Broth (LB) Besiyeri

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

3.3.3. SSF Besiyeri

Pamuk küspesi, mısır küspesi, elma kabuğu, muz kabuğu, portakal kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve darı kurutularak blendırdan geçirildi. Farklı gözenek büyüklüğündeki eleklerden geçirilerek 500 μ m, 1000 μ m, 1500 μ m, 2000 μ m olmak üzere dört farklı parça büyüklüğünde substratlar elde edildi. 1500 μ m büyüklüğünde olanlar alındı. 100ml'lik erlenmayer içerisinde hacim %30 olacak şekilde 3g tartılıp üzerine 10ml çeşme suyu eklendi. 121°C'de 15dk otoklavlanarak steril edildi. Soğuduktan sonra 600nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden %30 inokulum besiyerinden katılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.4. Çözeltiler

3.4.1. Tampon Çözeltiler

0.1M pH 6.8 ve 0.1M pH 7.0 sodyum fosfat tamponu hazırlandı.

3.4.2. Nişastanın Hazırlanması

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

3.4.3. ONPG' nin Hazırlanması

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

3.4.4. Sodyum Karbonatın Hazırlanması

1M sodyum karbonat çözeltisi β -galaktozidaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı. Çözelti, 10.6g Na_2CO_3 100ml saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

3.4.5. Alkalın Çözeltisi

% 4 Na_2CO_3

% 4 Na-K tartarat

% 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Bir beherde 100ml için %4 oranında Na_2CO_3 hazırlandı. Ayrı tüplerde hazırlanan Na-K tartarat ve CuSO_4 'tan 1'er ml ilave edilerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Alkalın çözeltisi protein miktar tayininde kullanıldı.

3.4.6. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

Bir beherde 20g 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS veya DCA), 400ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandı. Başka bir beherde 32g NaOH çözeltisi 300ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandı. DNS karıştırıcıda karışmaya devam ederken üzerine yavaş yavaş NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Üzerine 600g Na-K tartarat azar azar eklendi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 2000ml'ye tamamlandı¹. Bernfeld reaktifi α -amilaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı.

3.5. Kullanılan Cihazlar

Otoklav	(Hırayama)
Etüv	(Heraeus)
Steril Kabin	(Telstar AV 100)
Çalkalayıcı	(Selecta P)
Elektronik Terazı	(GEC Avery)
İnkübatör	(EN 400)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K 15)
pH Metre	(METTLER MP220)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Mikropipet	(Eppendorf)
Blendir	(Waring Commercial Laboratory Blender)
Spektrofotometre	(Varian)
Deep-Freeze	(Sanyo Medical Freezer)
Vorteks	(Fisons Whirli Mixer)
Küvet	(Light path)

3.6. Bakteri Üretimi

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

3.7. SSF Besiyerinden Enzim Üretimi

SSF besiyeri 144. saate kadar inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir SSF besiyeri üzerine 10ml çeşme suyu eklenip 30dk çalkalandıktan sonra karışım steril gazlı bezle süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne aktarılarak soğutmalı santrifüjde 10.000rpm'de 5dk santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite tayinlerinde kullanıldı.

3.8. Enzim Aktivite Tayini

3.8.1. α -Amilaz Enzim Aktivite Tayini

α -amilaz enzim aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı¹. Bu yöntemle göre 150 μ l enzim çözeltisi ve 200 μ l %0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1M, pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda çözünmüş) 37°C'de 30dk inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 400 μ l DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) çözeltisi ilave edilerek 5dk kaynar su banyosunda bekletildi. DNS, sıcakta indirgen şeker uçlarıyla tepkimeye girerek reaksiyonun durmasını ve renk oluşumunu sağlar. Örnekler soğuduktan sonra üzerine 8ml saf su ilave edilerek seyreltme yapıldı. Daha sonra vorteksten geçirildi ve 489nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

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

3.8.2. β -Galaktozidaz Enzim Aktivite Tayini

β -Galaktozidaz aktivitesi 0.1M, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu içerisinde 6mM O-nitro fenil- β -D-galactopyranoside (ONPG) çözeltisinden O-nitrophenol ürününün salınımı ile tespit edildi. 200 μ l enzim çözeltisine 500 μ l substrat (ONPG) ilave edilerek 37°C'de 30dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon, 1M 500 μ l sodyum karbonat çözeltisi ile durduruldu. 420nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı².

Bir enzim ünitesi, deney şartları altında dakikada ONPG'den 1 μ mol ONP'nin oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.8.3. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapıldı³. Tüplere 2.5ml alkalın çözeltisi konulduktan sonra üzerine 25 μ l enzim ve 225 μ l saf su ilave edildi. Örnekler 15dk 40°C'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 250 μ l Folin Reaktifi (FCR, Sigma) ilave edilerek 30dk karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen Bovin Serum Albumin'den (BSA) bir seri standart çözelti hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı.

3.9. Enzimlerin Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi

3.9.1. Uygun Substrat Seçimi

Pamuk küspesi, mısır küspesi, elma kabuğu, muz kabuğu, portakal kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve darı 3g tartılarak erlenlere aktarıldıktan sonra

üzerine çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra 600nm’de 0.6 OD’ye gelen bakterilerden 3000µl ekim yapılarak α -amilaz ve β -galaktozidaz üretimi üzerine farklı substratların etkisi incelendi.

3.9.2. Uygun İnkübasyon Süresinin Seçimi

Hazırlanan SSF besiyerleri, sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra inkübasyona bırakıldı. 144. saate kadar her 24 saatte bir enzim aktivite tayini yapılarak en uygun inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışıldı.

3.9.3. Uygun İnkübasyon Sıcaklığının Seçimi

SSF besiyerleri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra bakteri ekimi yapıldı. Örnekler 30, 37, 40, 45 ve 50°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. 144. saate kadar her 24 saatte bir örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

3.9.4. Uygun Ekstraksiyon Ortamının Seçimi

50mM NaCl, %1 CHAPS, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween 40, saf su, pH 6.8 ve pH 7 sodyum fosfat tamponu ve çeşme suyu kullanılarak enzimlerin üretimi üzerine etki eden en iyi ekstraksiyon ortamı tespit edilmeye çalışıldı.

3.9.5. Başlangıç pH’nın Seçimi

Enzimlerin üretimi üzerine pH’nın etkisini incelemek için çeşme suyunun pH’sı pH 4’ten pH 10’a kadar 0.5 birim aralıklarla 0.1M HCl ve 0.1M NaOH ile ayarlandı. Hazırlanan SSF besiyerlerine çeşme suyu eklendikten sonra sterilizasyon ve ekim yapıldı. Daha sonra örnekler inkübasyona bırakıldı.

3.9.6. Optimum Aktivite Sıcaklığının Seçimi

Enzimlerin üretimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'lerdeki sıcaklık aralıklarında bekletildi ve aktivite tayini yapılarak optimum aktivite sıcaklığı bulunmaya çalışıldı.

3.9.7. Uygun Ekim Miktarının Seçimi (İnokülüm Hacmi)

SSF besiyerlerine besiyeri hacminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80'i olacak şekilde 500µl'den 8000µl'ye kadar değişen miktarlarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. 144. saate kadar her 24 saatte bir örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayini yapıldı.

3.9.8. Uygun Nem Miktarının Seçimi (Moisture Level)

α -amilaz ve β -galaktozidaz üretimine etki eden uygun nem miktarını tespit etmek için SSF besiyerine, besiyeri hacminin %5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60'i olacak şekilde sırasıyla; 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 3g, 4g, 5g ve 6g ağırlığında pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10ml çeşme suyu eklenerek otoklavlandı. Daha sonra SSF besiyerlerine bakteri ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı. 144.saate kadar her 24 saatte bir örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

3.9.9. En İyi Aktivite Veren Substratların Karışımı

α -amilaz ve β -galaktozidaz üretiminde en iyi aktiviteyi veren iki substrat 0.5-4.5; 1-4; 1.5-3.5; 2-3; 2.5-2.5; 3-2; 3.5-1.5; 4-1; 4.5-0.5g olacak şekilde tartıldıktan

sonra üzerine 10 ml çeşme suyu eklenerek otoklavlandı. Elde edilen üst sıvıdan enzim aktivite tayini yapıldı.

3.9.10. Enzimlerin Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besiyerleri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin %1'i olacak şekilde azot kaynaklarından; sodyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorür, et özütü, tripton, pepton, maya özütü, üre ve kazein SSF besiyerlerine eklendi. Örneklere 10ml çeşme suyu eklendikten sonra otoklavlandı. Daha sonra ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından enzim aktivite tayinlerine bakıldı.

3.9.11. Enzimlerin Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besiyerleri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin %1'i olacak şekilde karbon kaynaklarından; mannoz, arabinoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sakkaroz, ksiloz SSF besiyerlerine eklendi. Daha sonra ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

3.9.12. Enzimlerin Üretimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi

SSF besiyerleri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin % 0.1'i olacak şekilde metal iyonlarından CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve

CuSO₄.5H₂O SSF besiyerlerine eklendi. 10ml saf su ilave edilip sterilizasyon ve ekim yapıldı.

KAYNAKLAR

1. Bernfeld, P. *Enzymes carbohydrate metabolism, In Methods In Enzymology Academic Press, 1955, 17, 149-158*
2. Konsula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides M. *Co-Production α -amylase and β -galactosidase by Bacillus subtilis in complex organic substrates, Bioresource Tecnology, 2007, 98, 150-157*
3. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. *Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275*

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Enzim Üretimi Üzerine Uygun Substratın Etkisi

Farklı SSF kaynaklarından pamuk küspesi, mısır küspesi, elma kabuğu, muz kabuğu, portakal kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve darı katı substrat olarak kullanıldı. En yüksek aktivite pirinç kabuğunda elde edildiği için bundan sonraki çalışmalarımızda pirinç kabuğu katı substrat olarak kullanıldı. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi α -amilaz üretiminde en yüksek aktivite pirinç kabuğunda elde edilmiş ve maximum aktivite değeri 4019 U/mg olarak bulunmuştur. Şekil 4.2’de ise β -galaktozidaz için pirinç kabuğunda elde edilen aktivite değeri 5359 U/mg değeriyle ifade edilmiştir. Her iki enzimin üretimi açısından en düşük aktivite portakal kabuğunda tespit edilmiştir.

4.1.2. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Pirinç kabuğu en uygun substrat olarak seçildikten sonra uygun inkübasyon süresini tespit etmek için çalışma yapıldı. Bunun için 144. saate kadar her 24 saatte bir enzimlerin aktivite tayinine bakıldı. En uygun inkübasyon süresi α -amilaz ve β -galaktozidaz için 48. saat olarak tespit edildi. Şekil 4.3 ve 4.4’te görüldüğü gibi pirinç kabuğu bulunan SSF ortamındaki en yüksek enzim üretimi 48.saat olarak tespit edilmiş ve bu saatten sonra ise enzim üretiminde düşüş meydana gelmiştir.

4.1.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

SSF besiyelerini hazırlamak için 3g pirinç kabuğu tartılarak erlenlere eklendi ve üzerine 10ml çeşme suyu ilave edilerek otoklavlandı. Bu şekilde sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra örnekler 30, 37, 40, 45 ve 50°C sıcaklık aralıklarında inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir örneklerin üst sıvısından yapılan aktivite tayininde her iki enzimin üretimi bakımından en iyi inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak tespit edildi (Şekil 4.5 ve 4.6).

4.1.4. Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Ortamının Etkisi

Pirinç kabuğu içeren SSF besiyerine, 50mM NaCl, %1 CHAPS, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween 40, saf su, pH 7.0 ve pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ve çeşme suyu eklenerek bakteri üretimi yapıldı. Çalışmada en iyi ekstraksiyon ortamı α -amilaz ve β -galaktozidaz için çeşme suyunda tespit edildi. En düşük aktivite ise α -amilaz için sırasıyla Tween 40 ve SDS'de, β -galaktozidaz için Tween 40 ve CHAPS'ta tespit edildi (Şekil 4.7 ve 4.8).

4.1.5. Başlangıç pH

En iyi ekstraksiyon ortamı çeşme suyunda elde edildiği için bundan sonraki çalışmalara çeşme suyunun pH'sı ayarlanarak devam edildi. Çeşme suyunun pH'sı pH 4.0'dan pH 10.0'a kadar 0.5 birim aralıklarla 0.1M HCl ve 0.1M NaOH ile ayarlandıktan sonra pirinç kabuğu bulunan SSF besiyerlerine farklı pH'larda hazırlanmış olan çeşme suyundan 10ml ilave edilerek örnekler otoklavlandı. Sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra SSF besiyerleri 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Örneklerin üst sıvısından yapılan enzim aktivite tayin sonuçlarına göre

α -amilaz ve β -galaktozidaz için en iyi aktivite pH 7.5'te tespit edildi (Şekil 4.9 ve 4.10).

4.1.6. Optimum Aktivite Sıcaklığı

Enzimlerin optimum aktivite sıcaklığını tespit etmek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler 25, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklık aralıklarında inkübasyona bırakıldı. 30dk inkübasyon süresi sonunda yapılan enzim aktivite tayin sonuçlarına göre α -amilaz için optimum aktivite sıcaklığı 70°C, β -galaktozidaz için ise 60°C olarak tespit edildi (Şekil 4.11 ve 4.12).

4.1.7. Enzim Üretimi Üzerine Ekim Miktarının Etkisi

Pirinç kabuğu bulunan SSF besiyerine, sterilizasyon işleminden sonra besiyeri hacminin %5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60 ve 80'i olacak şekilde 600nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden 500 μ l'den 8000 μ l'ye kadar değişen miktarlarda ekim yapıldı ve daha sonra inkübasyona bırakıldı. İnkübasyona bırakılan örneklerden yapılan aktivite tayinlerinde α -amilaz için en yüksek aktivite %25, β -galaktozidaz için %35 ekim miktarında tespit edildi (Şekil 4.13 ve 4.14).

4.1.8. Enzim Üretimi Üzerine Nem Miktarının Etkisi

SSF besiyerine, besiyeri hacminin %5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60'ı olacak şekilde sırasıyla 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 3g, 4g, 5g ve 6g pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10ml çeşme suyu eklendikten sonra otoklavlandı. Bu şekilde sterilizasyon ve ekim işlemlerinden sonra en iyi aktivite hem α -amilaz hem de β -galaktozidaz için %20 nem miktarındaki pirinç kabuğunda elde edildi (Şekil 4.15 ve 4.16).

4.1.9. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Veren Substratların

Karışımı

α -Amilaz ve β -galaktozidaz enzim aktivite tayinlerinde en iyi aktivite veren substratlar sırasıyla pirinç kabuğu ve darı olarak bulunmuştur.

Bunun için bu iki substrat:

0.5g Pirinç + 4.5g Darı

1g Pirinç + 4g Darı

1.5g Pirinç + 3.5g Darı

2g Pirinç + 3g Darı

2.5g Pirinç + 2.5g Darı

3g Pirinç + 2g Darı

3.5g Pirinç + 1.5g Darı

4g Pirinç + 1g Darı

4.5g Pirinç + 0.5g Darı

oranlarında karıştırılarak aktivite tayini yapıldı. En iyi aktivite hem α -amilaz hem de β -galaktozidaz için 4.5g pirinç + 0.5g darıda elde edildi (Şekil 4.17 ve 4.18).

4.1.10. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Pirinç kabuğu bulunan SSF besiyerine, besiyeri hacminin %1'i olacak şekilde azot kaynaklarından sodyum nitrat, amonyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür, et özütü, tripton, pepton, maya özütü, üre ve kazein eklendikten sonra 10ml çeşme suyu eklenip örnekler otoklavlandı. Bakteri ekimi yapıldıktan sonra

inkübasyona bırakılan örneklerin aktivite tayinlerine bakıldı. Yapılan aktivite tayinlerinde α -amilaz için amonyum klorürün ve az miktarda da amonyum nitrat'ın enzim üretimini arttırdığı, diğer azot kaynaklarının ise enzim üretimini arttırmadığı tespit edildi. β -galaktozidaz içinse azot kaynaklarının enzim üretimini arttırıcı etkisi görülmedi (Şekil 4.19 ve 4.20).

4.1.11. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

SSF besiyeri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin %1'i olacak şekilde karbon kaynaklarından mannoz, arabinoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sakkaroz ve ksiloz eklendi. Ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin yapılan aktivite tayinlerinde her iki enzim için de karbon kaynaklarının aktiviteyi arttırmadığı tespit edildi (Şekil 4.21 ve 4.22).

4.1.12. Enzim Üretimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

SSF besiyeri hazırlandıktan sonra besiyeri hacminin %0.1'i olacak şekilde metal iyonlarından $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ eklendi. Üzerine 10ml saf su ilave edilip otoklavlandı. Ekim yapıp inkübasyona bırakılan örneklerin yapılan aktivite tayinlerinde her iki enzim için de metal iyonlarının aktiviteyi arttırmadığı tespit edildi (Şekil 4.23 ve 4.24).

4.2. TARTIŞMA

SSF'te fermantasyon süreci için uygun katı substrat seçimi oldukça önemli bir faktördür. Bu yüzden mikrobiyal büyüme ve ürün eldesi için çok sayıda tarımsal sanayi atıkları kullanılmaktadır¹.

Çalışmamızda pamuk kütspesi, mısır kütspesi, elma kabuğu, muz kabuğu, portakal kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve darı katı substrat olarak kullanıldı. En iyi aktivite hem α -amilaz hem de β -galaktozidaz için pirinç kabuğunda elde edildi. α -Amilaz için pirinç kabuğunda tespit edilen maximum aktivite değeri 4019 U/mg'dır. Elde edilen α -amilaz aktivitesine göre sıralama pirinç kabuğundan sonra sırasıyla darı, buğday kepeği, pamuk kütspesi ve mısır kütspesi şeklindedir. Darıda elde edilen aktivite, mısırdaki elde edilen aktivitenin 4 katı olup 922 U/mg değeriiyle ifade edildi. β -galaktozidaz için pirinç kabuğunda tespit edilen maximum aktivite değerii ise 5359 U/mg'dır. β -galaktozidaz aktivitesi pirinç kabuğundan sonra sırasıyla darı, mısır kütspesi, pamuk kütspesi ve buğday kepeğinde elde edildi. Her iki enzim için en düşük aktivite değerleri sırasıyla muz kabuğu, elma kabuğu ve portakal kabuğunda tespit edildi. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarımızda pirinç kabuğu katı substrat olarak kullanılmıştır.

Kunamneni ve ark.¹ *Thermomyces lanuginosus*'tan SSF tekniğiiyle α -amilaz üretmede katı substrat olarak buğday kepeği, melas kepeği, pirinç kepeği, darı unu, akdarı gevreği, buğday taneleri, arpa kepeği, mısır koçanı, öğütölmüş mısır ve öğütölmüş buğday kullanmışlardır. En iyi aktiviteyi buğday kepeğinde elde etmişlerdir.

Tanyıldızı ve ark.² *B.amyloliquefaciens* 'ten SSF tekniğiiyle α -amilaz üretmede katı substrat olarak mısır kütspesi (Corn Gluten Meal; CGM) kullanmışlardır.

Rahardjo ve ark.³ *Aspergillus oryzae* misellerinden SSF tekniğiiyle α -amilaz üretmede katı substrat olarak buğday unu kullanmışlardır.

Balkan ve Ertan⁴ SSF tekniğiyle *Penicillium chrysogenum*'dan α -amilaz üretimde katı substrat olarak mısır koçanı, çavdar samanı, buğday samanı ve buğday kepeği kullanmışlardır. En iyi aktivite buğday kepeğinde elde edilmiştir.

Baysal ve ark.⁵ SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz üretimde katı substrat olarak buğday kepeği ve pirinç kabuğu kullanmışlardır.

Mukherjee ve ark.⁶ SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis* DM03'ten α -amilaz elde etmede katı substrat olarak buğday kepeği, pirinç kepeği, melas kepeği, arpa kepeği, mısır unu, soya unu, patates kabuğu, coconut oil cake (COC) kullanmışlardır.

Nizamuddin ve ark.⁷ SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'den β -galaktozidaz üretimde katı substrat olarak buğday kepeği ve pirinç kabuğu kullanmışlardır.

Mukherjee ve ark.'nın⁶ belirttiğine göre literatürlerde yapılan incelemelerde mikroorganizmalar tarafından üretilen α -amilaz veya diğer enzimlerin desteklenmesinde bazı katı substratlar diğer katı substratlarla karşılaştırıldığında daha yüksek bir potansiyele sahiptirler. Örneğin buğday kepeği ve patates kabuğu diğer katı substratlara nazaran benzer SSF şartları altında daha fazla α -amilaz üretir. Ancak bazı spesifik katı substratlar üzerinde büyüyen mikroorganizmaların yüksek miktarda enzim üretiminin sebebiyle ilgili şimdiye kadar keşfedilmiş ve gözlemlenmiş etkisi hakkında makul bir açıklama yapılmamıştır.

Çalışmamızda pirinç kabuğunda uygun inkübasyon süresi hem α -amilaz hem de β -galaktozidaz için 48. saat olarak tespit edilmiştir. En iyi inkübasyon süresinin 48. saatte tespit edilmesi SSF tekniğinin fazla zaman almaması açısından olumlu bir sonuçtur. İnkübasyon süresinin 48.saatten sonra düşme sebebi fermantasyon ortamında bulunan diğer bileşenlerle enzimin etkileşiminin sonucunda enzimin yapısında meydana gelen konformasyonel değişiklik olabilir. Ayrıca ortama

salgılanan diğer hidrolitik enzimlerin ekisi sonucu enzim üretiminde azalma meydana gelmiş olabilir.

Gangadharan ve ark.'nın⁸ belirttiğine göre inkübasyon süresi, kültür ortamının karakteristik özelliklerine ve büyüme oranına bağlıdır.

Literatürlerde yapılan incelemelerde tespit edilen inkübasyon sürelerinin farklı olması, çalışmalarda kullanılan bakterilerin özelliklerinin farklı olması ve katı substratların içerdikleri besin maddelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Baysal ve ark.⁵ SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz üretmede en iyi inkübasyon süresini pirinç kabuğu için 24. saat, buğday kepeği için 48. saat olarak tespit etmişlerdir.

Asgher ve ark.⁹ patates nişastası içeren kültür ortamında *Bacillus subtilis*'in 48. saatte en yüksek α -amilaz aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Mukherjee ve ark.⁶ SSF tekniğiyle *Bacillus subtilis* DM03'ten α -amilaz üretmede uygun inkübasyon süresini 72. saatte patates kabuğunda tespit etmişlerdir.

Kunamneni ve ark.¹ *Thermomyces lanuginosus*'tan SSF tekniğiyle α -amilaz üretmede uygun inkübasyon süresini 120.saat olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda optimum inkübasyon sıcaklığını tespit etmek için örnekler 30, 37, 40, 45 ve 50°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. Her iki enzim için en uygun inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak tespit edildi.

Nizamuddin ve ark.⁷ SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'den β -galaktozidaz üretmişler ve optimum inkübasyon sıcaklığını 30°C olarak tespit etmişlerdir.

Rajagopalan ve Krishnan¹⁰ *Bacillus subtilis* KCC103'ten α -amilaz üretmişler ve optimum inkübasyon süresini 48. saat, optimum inkübasyon sıcaklığını 37°C olarak tespit etmişlerdir.

Sodhi ve ark.¹¹ *Bacillus sp.* PS7'den SSF tekniğiyle ürettikleri α -amilazın optimum inkübasyon süresini ve sıcaklığını sırasıyla 48. saat ve 37°C olarak rapor etmişlerdir. Bu durum bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Najafi ve ark.¹² *Bacillus subtilis* AX20 bakterisinden α -amilaz üretmede maksimum enzim aktivitesini 37°C kültür ortamında elde etmişlerdir.

Çalışmamızda enzimlerin ekstraksiyon ortamının tespitinde en iyi aktivite çeşme suyunda tespit edildi. En iyi enzim üretiminin çeşme suyunda elde edilmesinin nedeni çeşme suyundaki tuz oranının az olmasından kaynaklanabilir. α -amilaz için aktivite sıralaması yapılacak olursa çeşme suyu > pH 7.0 sodyum fosfat tamponu > saf su > 50 mM NaCl > %1 Triton > %1 CHAPS > %1 SDS > %1 Tween 40 şeklinde sonuç elde edilir. β -galaktozidaz için ise sıralama çeşme suyu > saf su > %1 Triton > %1 SDS > 50mM NaCl > pH 6.8 sodyum fosfat tamponu > %1 CHAPS > %1 Tween 40 şeklindedir. α -Amilaz için çeşme suyunda elde edilen maximum aktivite değeri 2006 U/mg iken en düşük α -amilaz aktivitesi Tween 40'da 1002 U/mg olarak tespit edilmiştir. Çeşme suyunda elde edilen en yüksek β -galaktozidaz aktivitesi 3119 U/mg olup Tween 40'da elde edilen β -galaktozidaz aktivitesinin yaklaşık 1.5 katından fazla olduğu görülmüştür.

Çalışmalarımızda başlangıç pH tespiti çeşme suyunun pH'sının ayarlanmasıyla elde edildi. Çalışmamızda α -amilazın pH 6.0-8.5 arasında kararlılık gösterdiği en iyi aktivitenin ise pH 7.5'te olduğu tespit edilmiştir. β -galaktozidazın ise pH 6.5-8.0'da kararlılık gösterdiği, en iyi aktivitenin de pH 7.5 olduğu

belirlenmiştir. α -Amilaz için pH 7.5'te tespit edilen enzim aktivite değeri 2191 U/mg iken, β -galaktozidaz için ise 3141 U/mg'dır.

Tanyıldızı ve ark.² *B. amyloliquifaciens*'ten α -amilaz üretimde başlangıç pH'nın enzim üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. pH 5.0'dan pH 8.0'a kadar 1.0 birim aralıkla çeşme suyunun pH'sı ayarlanmıştır. Sterilizasyon için otoklavlanan örneklerin başlangıç pH'larının farklı olmasına rağmen örnekler, aynı pH özelliği göstermiştir. Bunun üzerine çalışmada katı substrat olarak kullanılan mısır küspesinin içerdiği yüksek proteinden dolayı tampon olarak görev yaptığı düşünülmüştür. Ard arda yapılan tekrarlarından sonra fermantasyon ortamı pH 7.0'da elde edilmiştir.

Mukherjee ve ark.⁶ *Bacillus subtilis* DM03'ten alkalın α -amilaz üretimde distile su veya çeşme suyunun pH 8.5 ve 9.0 olduğunda enzim üretiminin daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. SSF süreçlerinde distile su veya çeşme suyunun kullanılmasının daha uygun olacağını rapor etmişlerdir. Bunun nedenini tamponların yüksek tuz konsantrasyonundan dolayı *Bacillus subtilis* DM03 tarafından üretilen α -amilaz üzerine negatif etki yapabileceği ancak distile suda tuz olmadığından ve çeşme suyunda da ihmal edilecek kadar tuz bulunduğundan amilaz sentezini engellemeyeceği şeklinde açıklamışlardır.

Hsu ve ark.¹³ *Bifidobacteria longum*'dan β -galaktozidaz üretimde başlangıç pH'yı 6.5 olarak elde etmişlerdir.

Çalışmamızda 25-90°C sıcaklık aralıklarında enzimlerin optimum aktivite sıcaklığı belirlenmeye çalışıldı ve α -amilaz için optimum aktivite sıcaklığı 70°C, β -galaktozidaz için ise 60°C olarak tespit edildi.

Asgher ve ark.'nın⁹ belirttiğine göre α -amilaz üzerinde yapılan çalışmalar optimum aktivitenin 70°C ve pH 8.0 değerleriyle karakterize olduğu ortaya çıkmıştır. Enzimin ilk 1 saatte 60°C ve 70°C'de oldukça stabil olduğunu 80°C ve 90°C'de sırasıyla %12 ve %48 orijinal aktivitesini kaybettiğini rapor etmişlerdir.

Vetere ve Paoletti¹⁴ *Bacillus circulans*'tan izole ettikleri üç çeşit β -galaktozidazın optimum sıcaklık aktivitelerini β -galaktozidaz I, II, III için sırasıyla 44°C, 74°C ve 60°C olarak rapor etmişlerdir.

Sodhi ve ark.¹¹ nişasta sıvılaştırma reaksiyonlarında α -amilazlar için genellikle uygulanan sıcaklık aralıklarının 65-80°C olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Bacillus sp.* PS-7'den α -amilaz üretmede elde edilen optimum sıcaklığı 60°C olarak rapor etmişlerdir.

Shaikh ve ark.¹⁵ *Rhizomucor sp.*'den β -galaktozidaz üretmişler ve optimum sıcaklığını 60°C olarak belirtmişlerdir.

Çalışmamızda enzimlerin üretimi üzerine ekim miktarının (inokülüm hacmi) ve nem miktarının (moisture level) etkisi incelendi. α -amilaz için en uygun ekim miktarı %25, nem miktarı ise %20 iken, β -galaktozidaz için sırasıyla %35 ve %20 olarak tespit edildi. α -Amilaz için %25 inokülüm konsantrasyonundaki maximum enzim aktivitesi 2135 U/mg olup en düşük aktivite %5 inokulum konsantrasyonunda tespit edildi ve 1327 U/mg değeriyle ifade edildi. %20 nem miktarındaki α -amilaz aktivite değeri 1251U/mg olarak tespit edildi. β -Galaktozidazın %35 inokülüm konsantrasyonundaki enzim aktivite değeri 2580 U/mg, %20 nem miktarındaki ise 2915 U/mg olarak bulunmuştur.

Baysal ve ark.⁵ *Bacillus subtilis*'ten SSF yöntemiyle ürettikleri α -amilazın buğday kepeği ve pirinç kabuğundaki inokülüm konsantrasyonu ve nem miktarını

incelemişlerdir. Buğday kepeğinde inokülüm konsantrasyonunu %20, nem miktarını %30, pirinç kabuğunda sırasıyla %15 ve %30 olarak rapor etmişlerdir. Yüksek nem içeriğinde enzim üretiminin azalmasının nedenini substratın gözenek sayısının azalması, substratın partikül yapısının değişmesi ve gaz hacminin düşmesi olarak yorumlamışlardır.

İnokülüm konsantrasyonunun yüksek olması ortamın nem içeriğini önemli derecede artırır. Ancak aşırı sıvı faz absorbe edilemeyen bir form oluşmasına difüzyon bariyerinin yükselmesine katı substratın olumsuz etkilenmesine ve enzim üretiminde azalmaya neden olur^{4,5}.

Balkan ve Ertan⁴ SSF tekniği ile *Penicillium chrysogenum*'dan α -amilaz üretmişler ve katı substrat olarak kullandıkları mısır koçanı (corn cob leaf, CL), çavdar samanı (rye straw, RS), buğday samanı (wheat straw, WS), ve buğday kepeği (wheat bran, WB) için inokülüm konsantrasyonunu ve nem miktarını incelemişlerdir. Bu dört katı substratın CL, RS, WS, WB için nem miktarını sırasıyla %75, %55, %65 ve %65 inokülüm konsantrasyonunu ise CL, WS, WB için %20 ve RS için %30 olarak elde etmişlerdir.

Çalışmamızda en iyi aktivite veren iki substrat sırasıyla pirinç kabuğu ve darı olarak tespit edildi. Bu nedenle toplam ağırlık 5g olacak şekilde pirinç kabuğu ve darı kaştırılarak enzimlerin aktivitesine bakıldı. En iyi aktivite 0.5g darı + 4.5g pirinç kabuğunda tespit edildi. 0.5g darı + 4.5g pirinç kabuğu karışımından elde edilen α -amilaz aktivitesi 0.5g pirinç kabuğu + 4.5g darı karışımından elde edilen α -amilaz aktivitesinin yaklaşık 3 katıdır. Aynı durum β -galaktozidaz için değerlendirildiğinde, pirinç kabuğunun yoğun olduğu ortamdan elde edilen enzim

aktivitesinin, darının yoğun olduğu ortamdan elde edilen enzim aktivitesinin yaklaşık 5 katı değere sahip olduğu görölür.

Nizamuddin ve ark.⁷ *Aspergillus oryzae*'den SSF yöntemiyle β -galaktozidaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada buğday kepeği ve pirinç kabuğunu 1:1 oranında 65g olacak şekilde substratları karıştıarak enzim aktivitesine bakmışlardır.

Sodhi ve ark.¹¹ *Bacillus sp.*'den α -amilaz üretmede katı substratlardan buğday kepeği + pirinç kepeği, buğday kepeği + mısır kepeği, pirinç kepeği + mısır kepeği karışımlarını 5g'a tamamlayarak enzim aktivite tayinine bakmışlardır.

Çalışmamızda enzimlerin üretimi üzerine karbon kaynaklarının, azot kaynaklarının ve metal iyonlarının etkisi incelendi. %1 oranındaki karbon kaynaklarının α -amilaz üzerine etkisi incelendiğinde karbon kaynaklarının kontrole göre düşük çıktığı tespit edildi. Karbon kaynakları içerisinde en yüksek α -amilaz aktivitesi 2014 U/mg değeriyle galaktozda, en düşük aktivite ise 631 U/mg değeriyle glukozda elde edildi. Karbon kaynaklarından elde edilen α -amilaz aktivite sıralaması galaktoz > sakkaroz > mannoz > ksiloz > laktoz > arabinoz > fruktoz > glukoz şeklindedir. β -galaktozidaz üretimine karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde elde edilen değerlerin kontrole göre düşük çıktığı belirlendi. Karbon kaynakları içerisinde en yüksek β -galaktozidaz aktivitesi 3071 U/mg değeriyle fruktozda, en düşük 49 U/mg değeriyle glukozda elde edildi. Karbon kaynaklarından elde edilen β -galaktozidaz aktivite sıralaması fruktoz > galaktoz > sakkaroz > ksiloz > mannoz > laktoz > arabinoz > glukoz şeklindedir. Her iki enzim için de en düşük değer glukoz'da elde edilmiştir.

α -amilaz üretimine %1 oranındaki azot kaynaklarının etkisi incelendi ve en iyi aktivite sırasıyla amonyum klorür ve amonyum nitrat'ta elde edildi. Diğer azot

kaynaklarının ise aktivite değerlerinin kontrole göre düşük çıktığı görüldü. Azot kaynaklarından elde edilen α -amilaz üretimine göre sıralama amonyum klorür > amonyum nitrat > amonyum sülfat > sodyum nitrat > et özütü > üre > maya özütü > pepton > tripton > kazein şeklindedir. Sonuçtan da anlaşıldığı üzere en iyi α -amilaz aktivitesi azot kaynağı olarak amonyum bulunan SSF ortamından elde edilmiştir. Amonyum klorür'den elde edilen α -amilaz aktivitesi kazeinden elde edilen α -amilaz aktivitesinin yaklaşık 2.5 katı olup 2716 U/mg değeriyle ifade edilmiştir. β -galaktozidaz üretimine %1 oranındaki azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde elde edilen aktivite değerlerinin kontrole göre düşük olduğu tespit edildi. Azot kaynaklarından elde edilen β -galaktozidaz aktivitesine göre sıralama yapılacak olursa amonyum klorür > amonyum sülfat > maya özütü > sodyum nitrat > amonyum nitrat > pepton > et özütü > kazein > tripton > üre şeklinde sonuç elde edilir. Amonyum klorürden elde edilen β -galaktozidaz aktivitesi üre'den elde edilen β -galaktozidaz aktivitesinin yaklaşık 5 katı değere sahiptir.

Çalışmamızda SSF ortamına eklenen karbon ve azot kaynaklarında enzim aktivitesi elde edilememesi SSF ortamındaki katı substratın bu kaynaklarının yeterli olabileceği şeklinde açıklanabilir.

Ray ve ark.¹⁶ *Bacillus brevis* MTCC 7521'den α -amilaz üretmeye çalışmışlar ve enzim üretimi üzerine karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. %1 oranındaki karbon kaynaklarından çözünebilir nişasta, manyok kökü nişastası, manyok kökü unu, patates nişastası, buğday unu, tatlı patates nişastası ve tatlı patates unu kullanmışlar ve maksimum aktiviteyi patates nişastasında elde etmişlerdir. %1 oranındaki azot kaynaklarından et özütü, maya özütü, pepton, kazein, amonyum klorid, asparajin, üre, amonyum sülfat, potasyum nitrat, amonyum molibdat ve

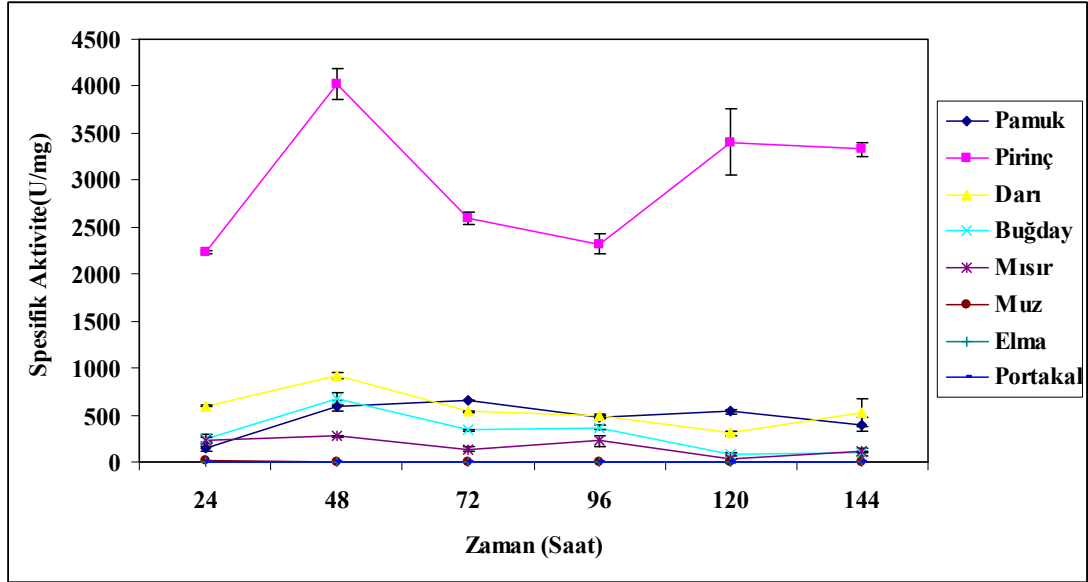
amonyum nitrat kullanmışlar ve en iyi aktiviteyi et özütünde elde etmişlerdir.

Sodhi ve ark.¹¹ SSF yöntemiyle *Bacillus* sp. PS-7'den α -amilaz üretme çalışmalarında %1 oranındaki karbon ve azot kaynaklarından en iyi karbon kaynağı olarak glukoz ve en iyi azot kaynağı olarak soyayı tespit etmişlerdir.

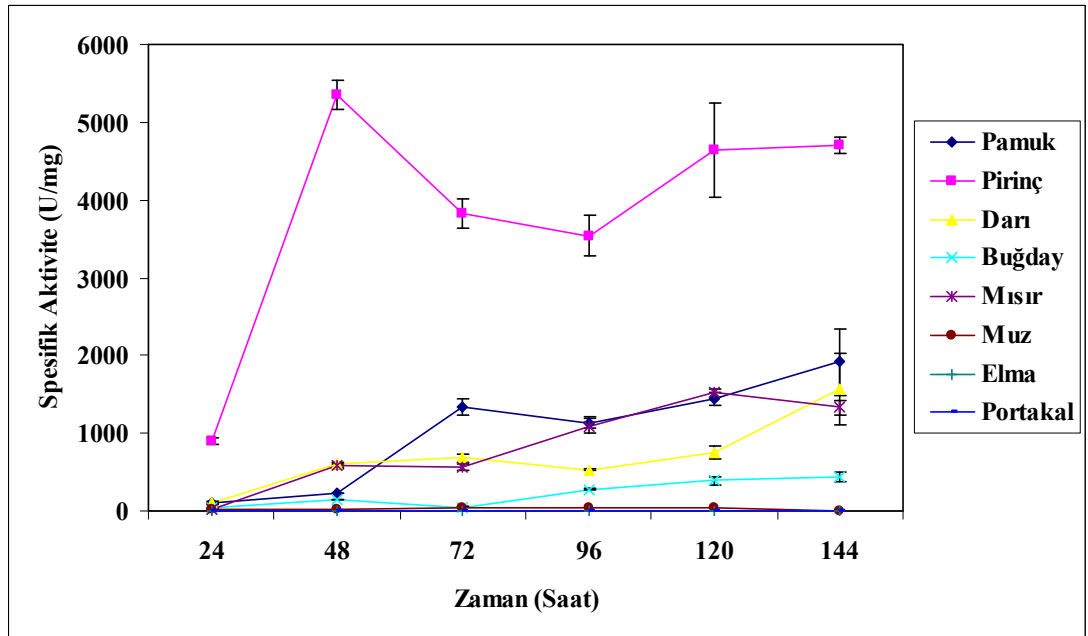
Nizamuddin ve ark.⁷ SSF tekniğiyle *Aspergillus oryzae*'den β -galaktozidaz üretmede enzim üretimi üzerine karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında karbon kaynağı olarak %1 oranında dört farklı şeker; laktoz, glukoz, maltoz, sükroz; azot kaynağı olarak %1 oranında pepton, üre, sodyum nitrat, amonyum nitrat, amonyum sülfat, corn step liquor (CSL) kullanmışlardır. Karbon kaynaklarında en iyi enzim aktivitesi glukozda tespit edilmiştir. Azot kaynakları için enzim üretiminde elde edilen aktivite sıralaması sodyum nitrat > pepton > amonyum sülfat > üre > amonyum nitrat > CSL şeklindedir. Sodyum nitrat kontrolden 4.8 kat daha fazla enzim üretmiştir.

Çalışmamızda α -amilaz üzerine % 0.1 oranındaki metal iyonlarının etkisini belirlemek için beş farklı metal iyonu kullanıldı. Bunlar CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Elde edilen aktivite değerlerine göre CaCl_2 kontrole yakın ancak kontrolden düşük, MgSO_4 ve FeSO_4 ise kontrolden düşük çıkmıştır. En düşük aktivite sırasıyla CuSO_4 ve ZnSO_4 'te elde edilmiştir. β -galaktozidaz üzerine %0.1 oranındaki metal iyonlarının etkisi incelendiğinde metal iyonlarının enzim üretimini arttırmadığı görülmüştür.

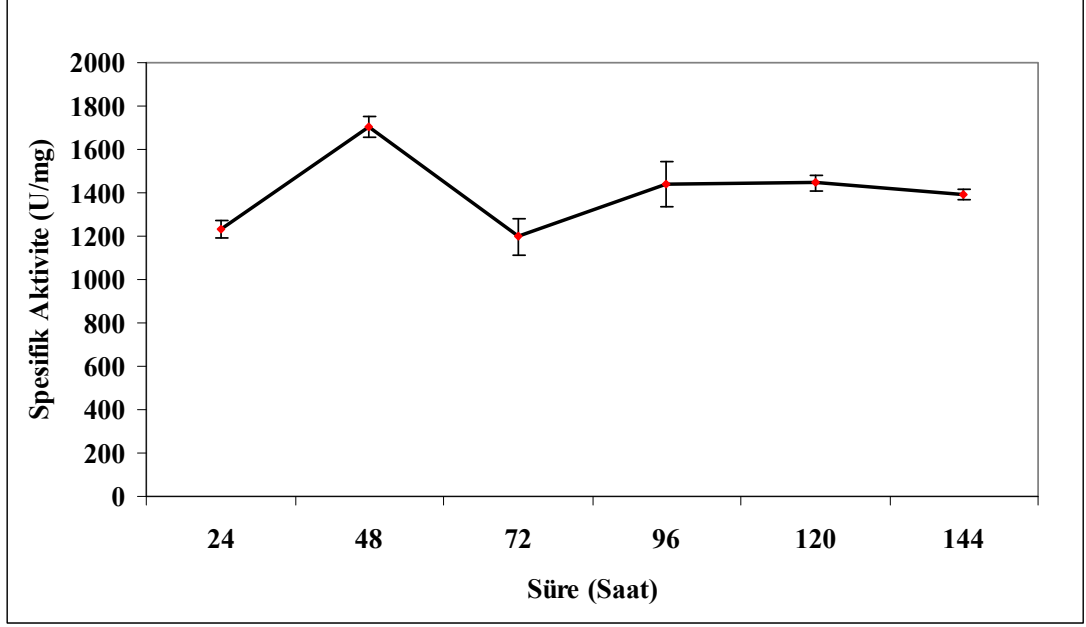
4.3. ŞEKİLLER



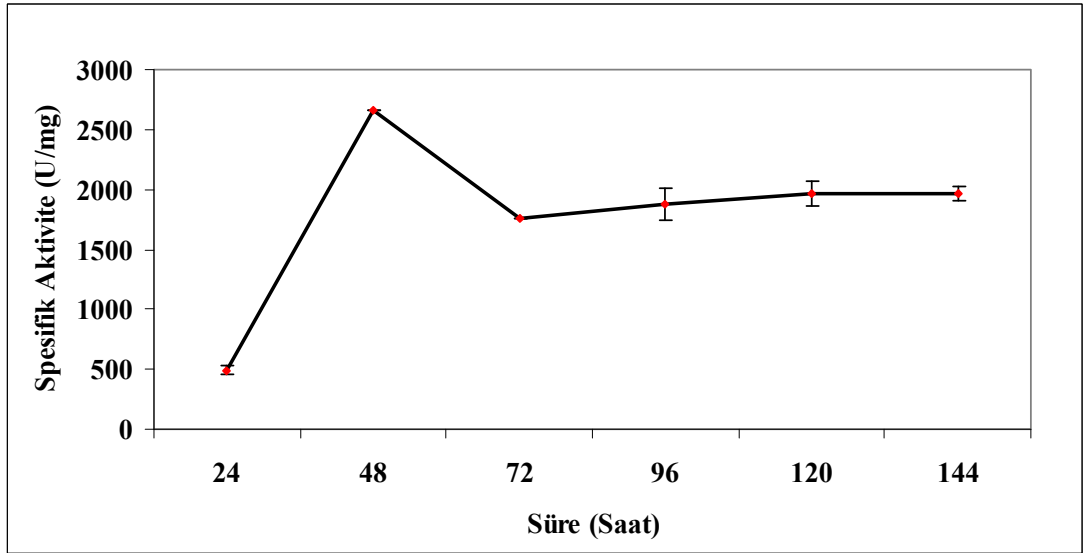
Şekil 4.1. α -Amilaz üretimine uygun substratın etkisi



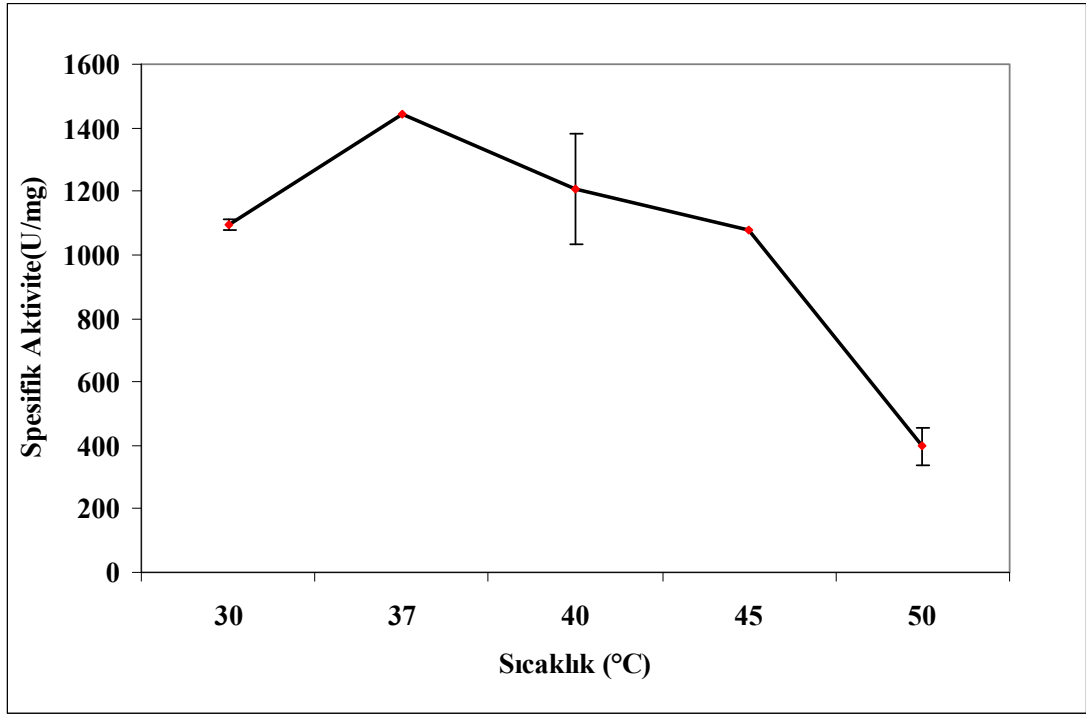
Şekil 4.2. β -Galaktozidaz üretimine uygun substratın etkisi



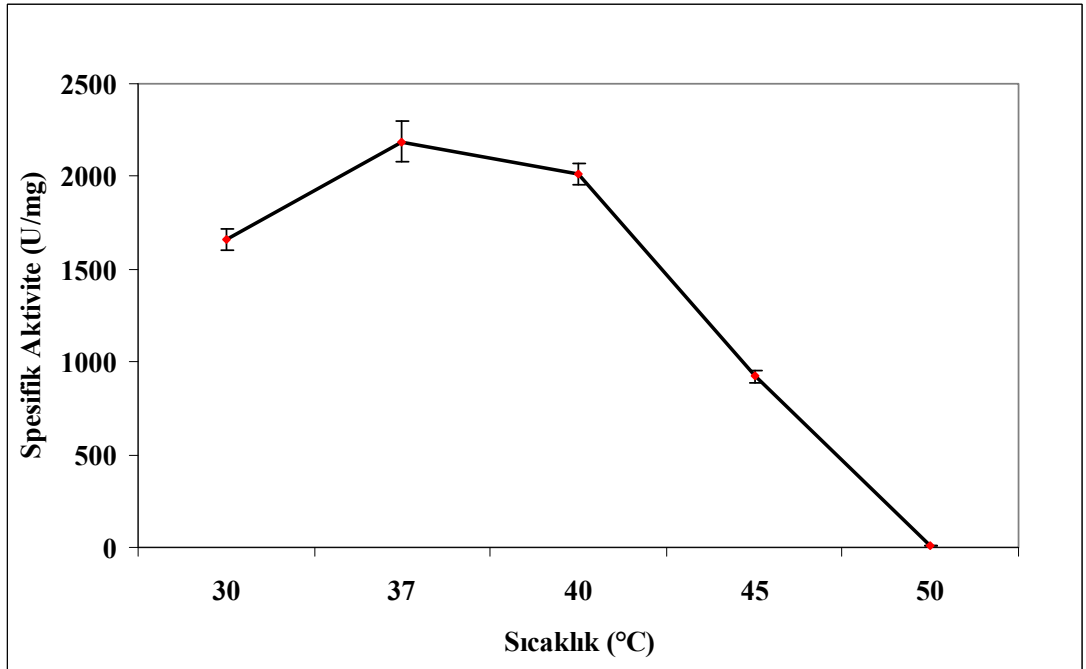
Şekil 4.3. α -Amilaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi



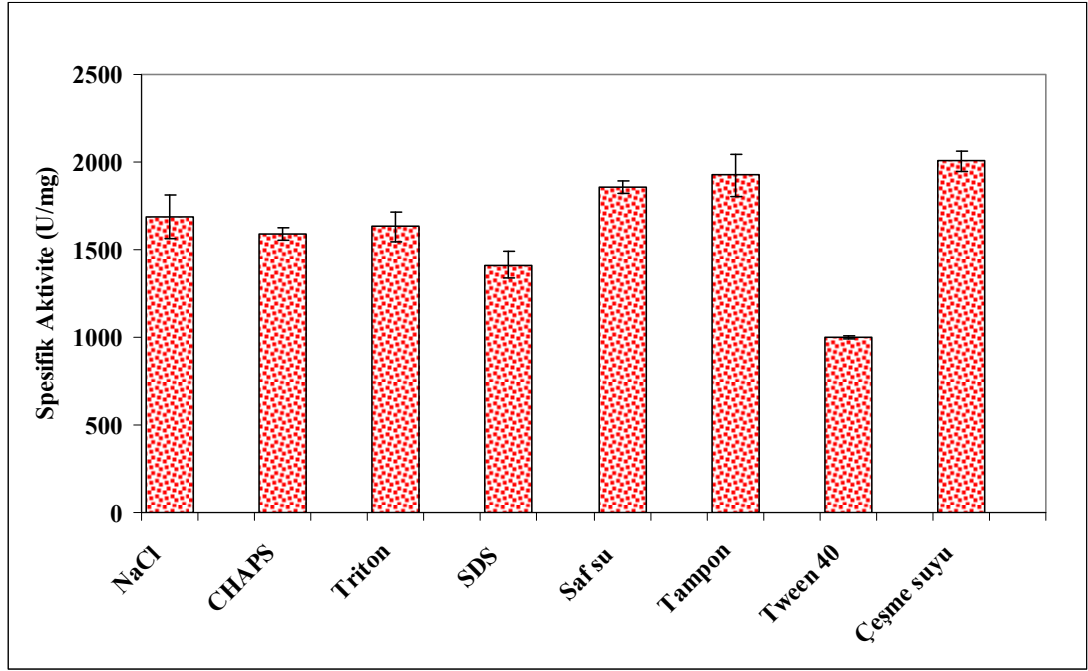
Şekil 4.4. β -Galaktozidaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi



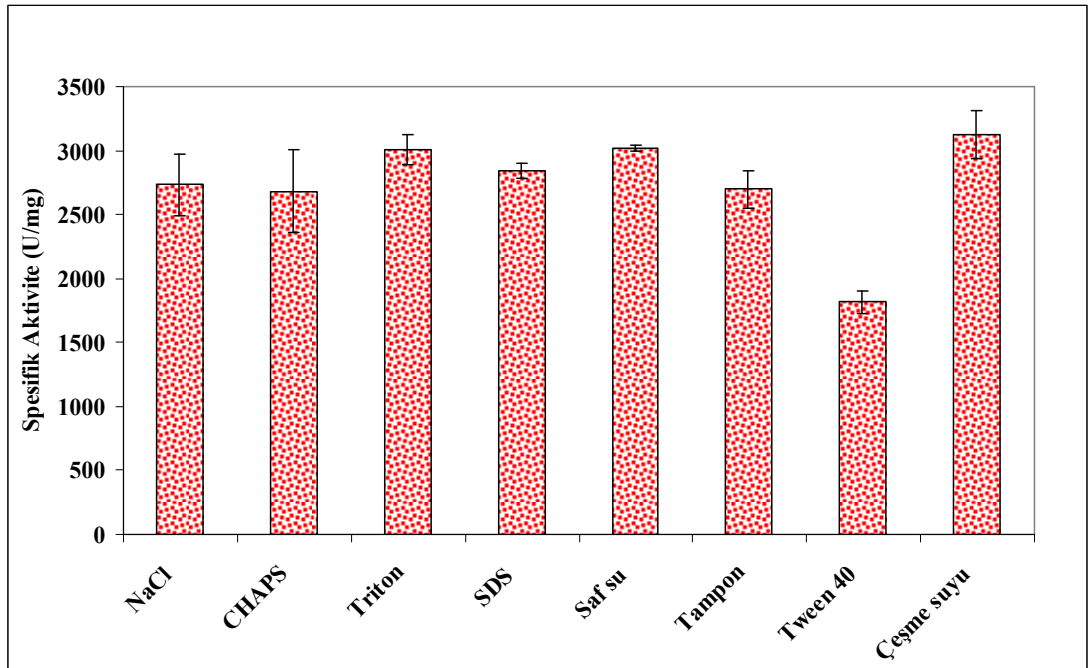
Şekil 4.5. α -Amilaz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisi



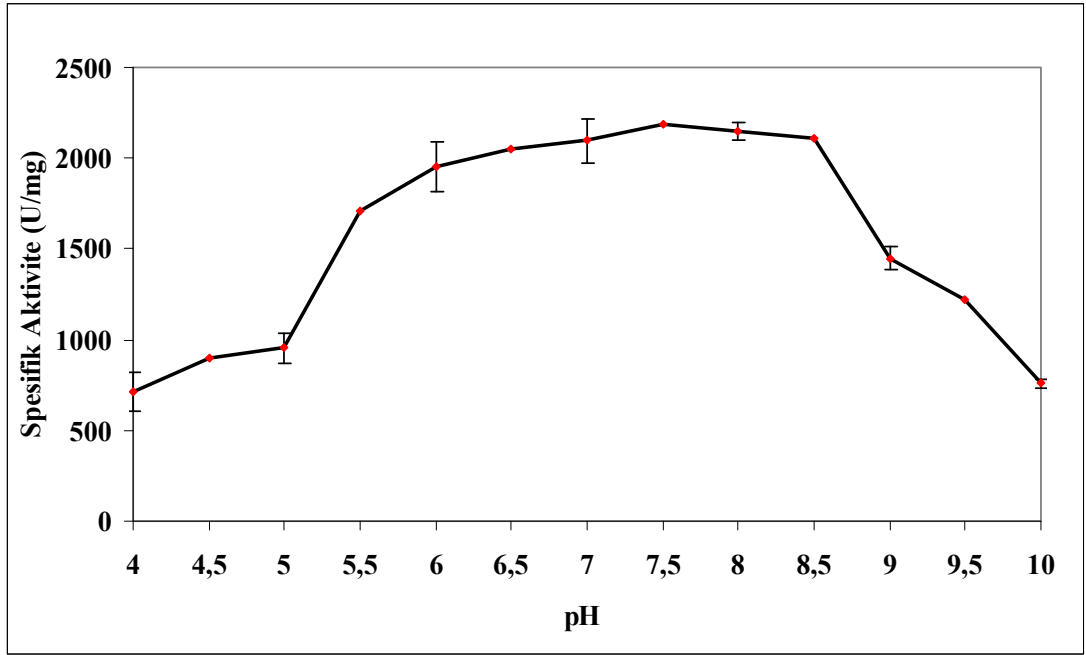
Şekil 4.6. β -Galaktosidaz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisi



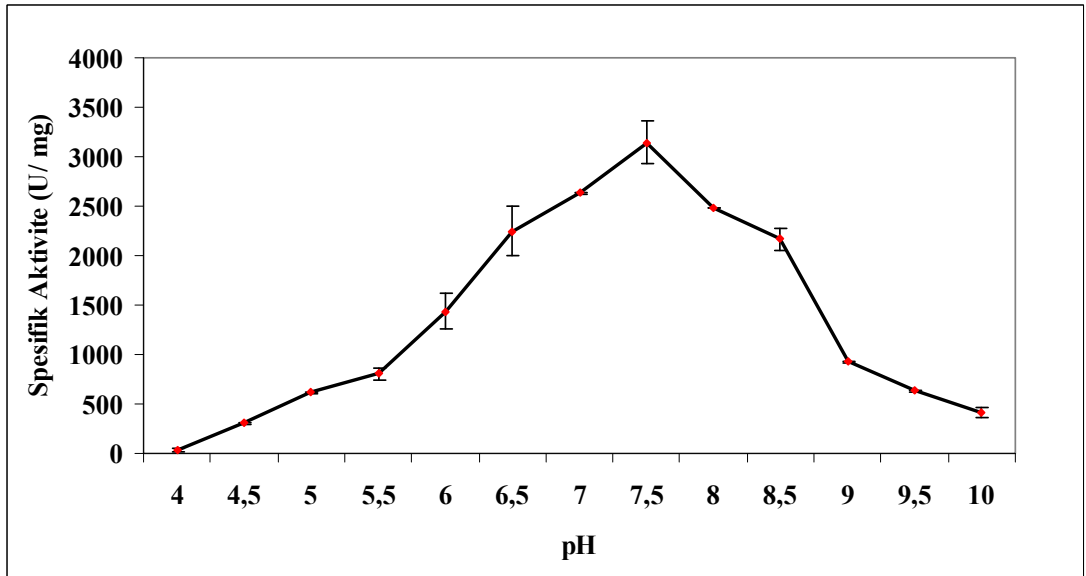
Şekil 4.7. α -Amilaz üretimine ekstraksiyon ortamının etkisi



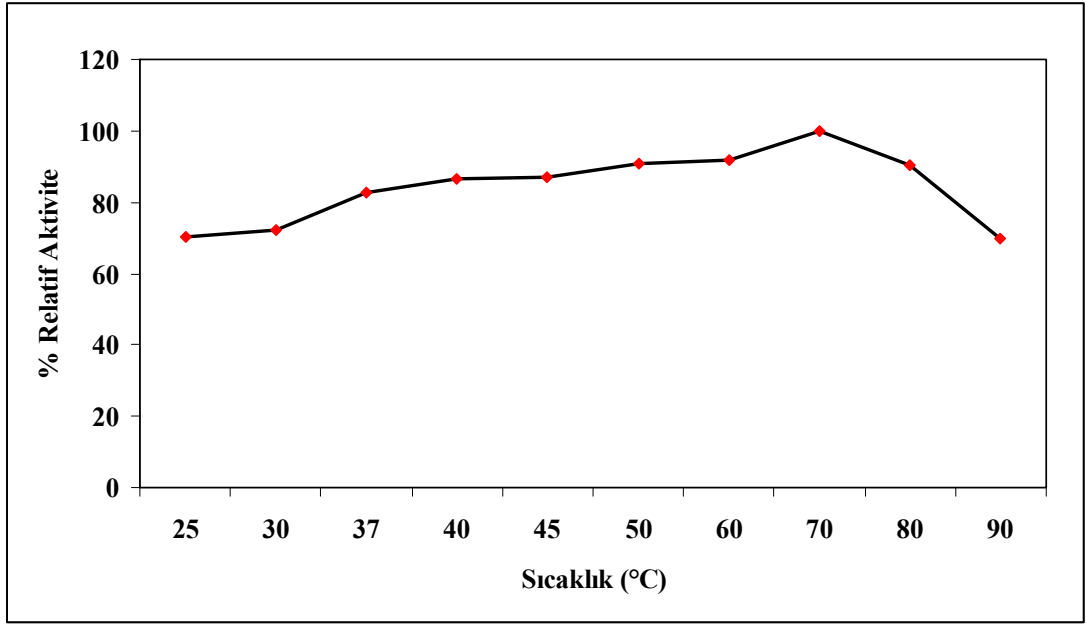
Şekil 4.8. β -Galaktozidaz üretimine ekstraksiyon ortamının etkisi



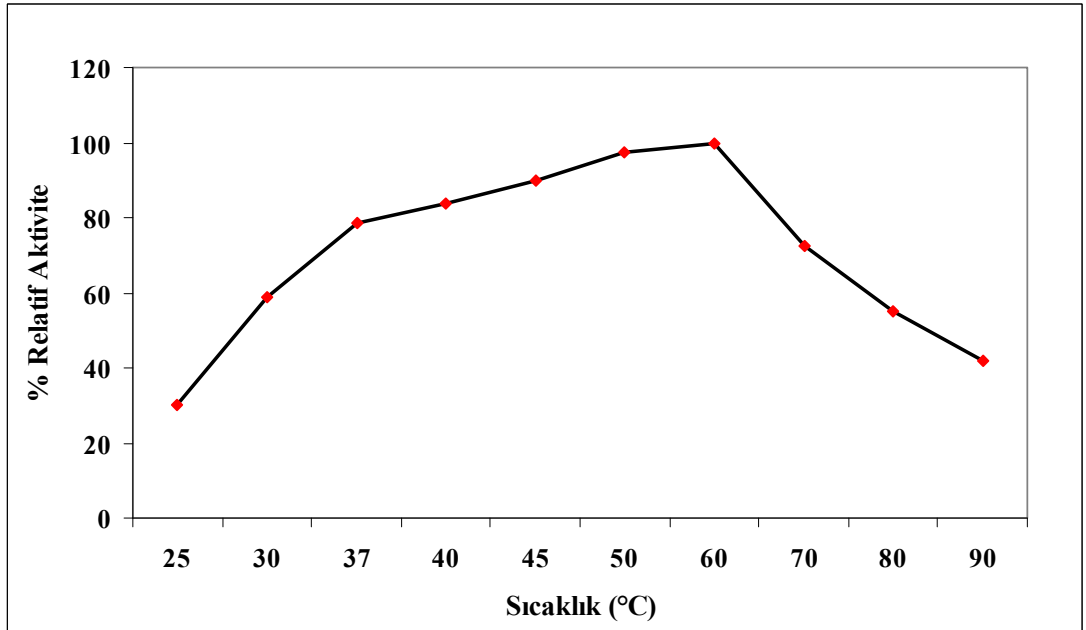
Şekil 4.9. α -Amilaz üretimine başlangıç pH'nın etkisi



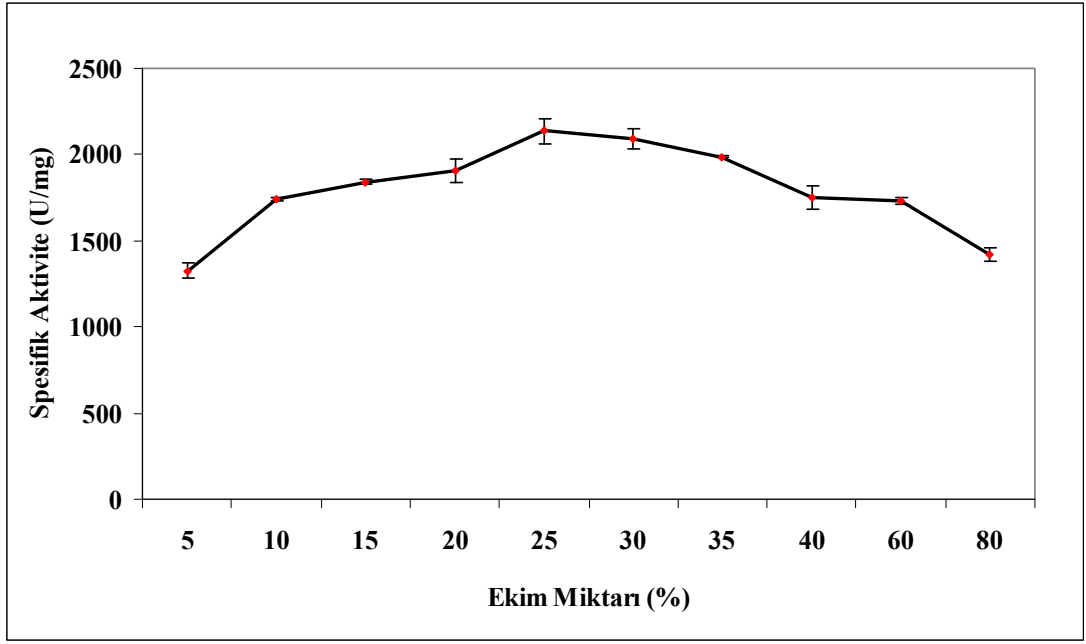
Şekil 4.10. β -Galaktozidaz üretimine başlangıç pH'nın etkisi



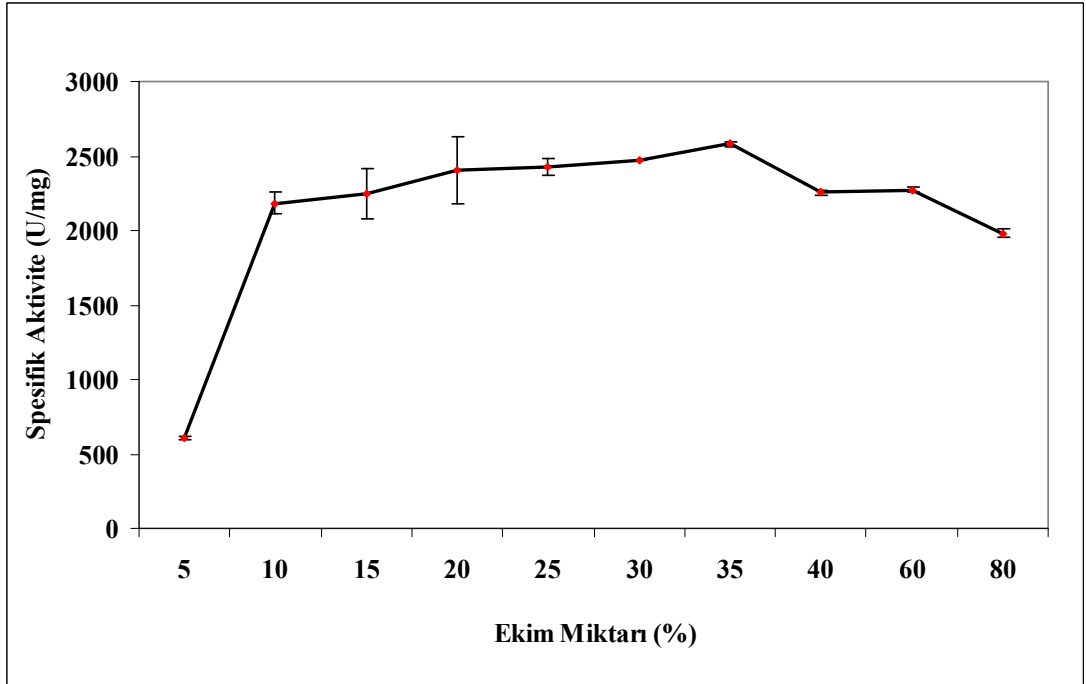
Şekil 4.11. α -Amilaz için optimum aktivite sıcaklığı



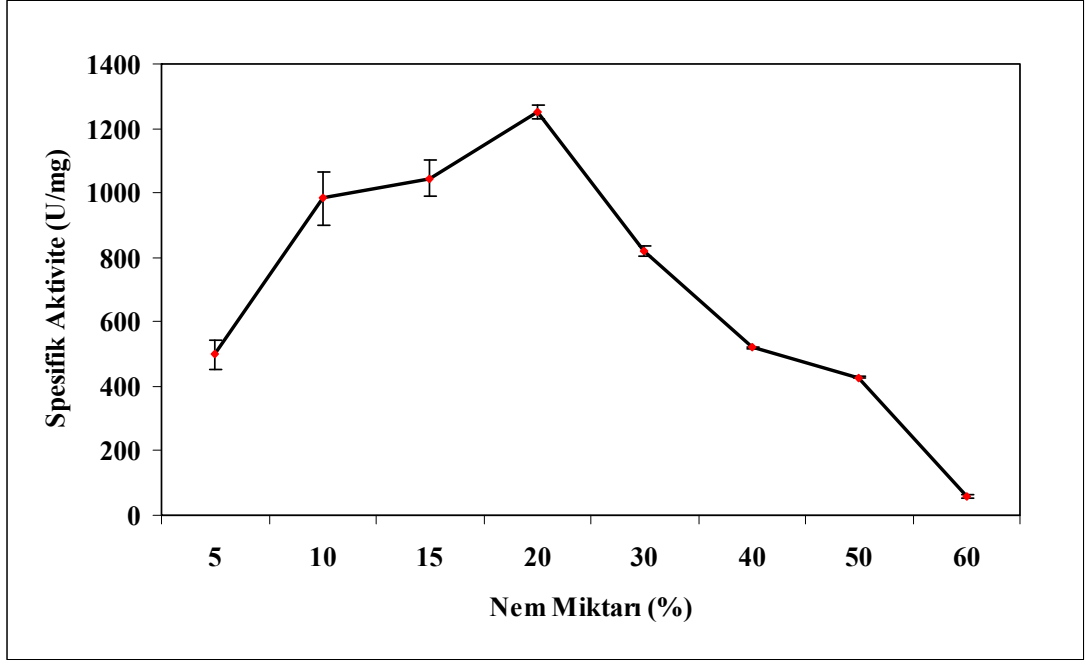
Şekil 4.12. β -Galaktosidaz için optimum aktivite sıcaklığı



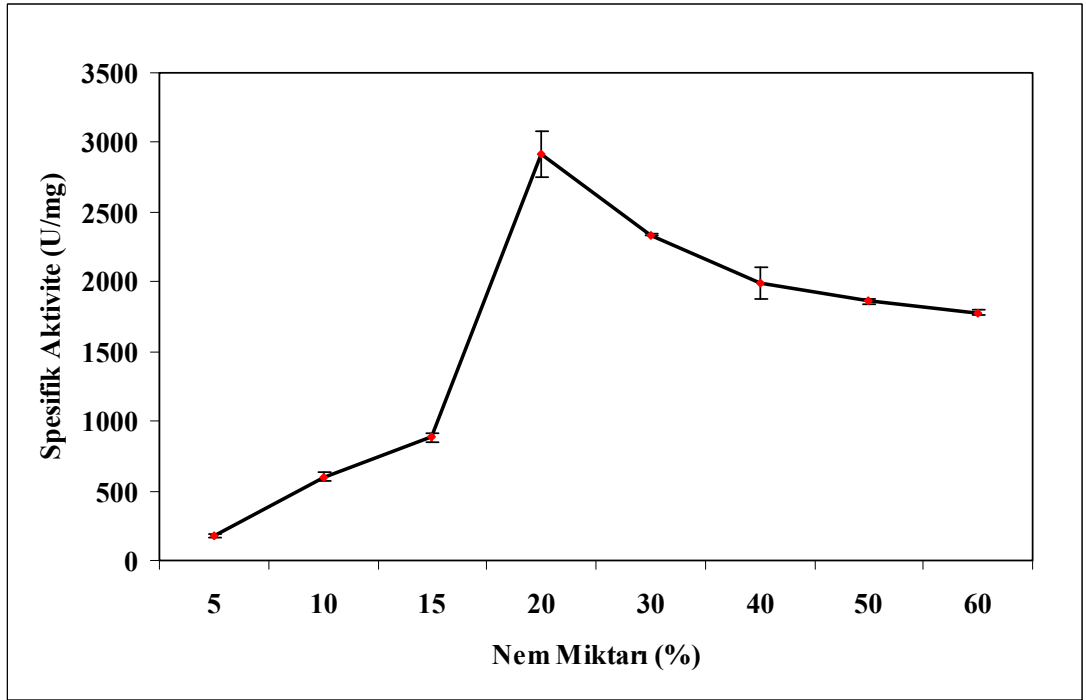
Şekil 4.13. α -Amilaz üretimine ekim miktarının etkisi



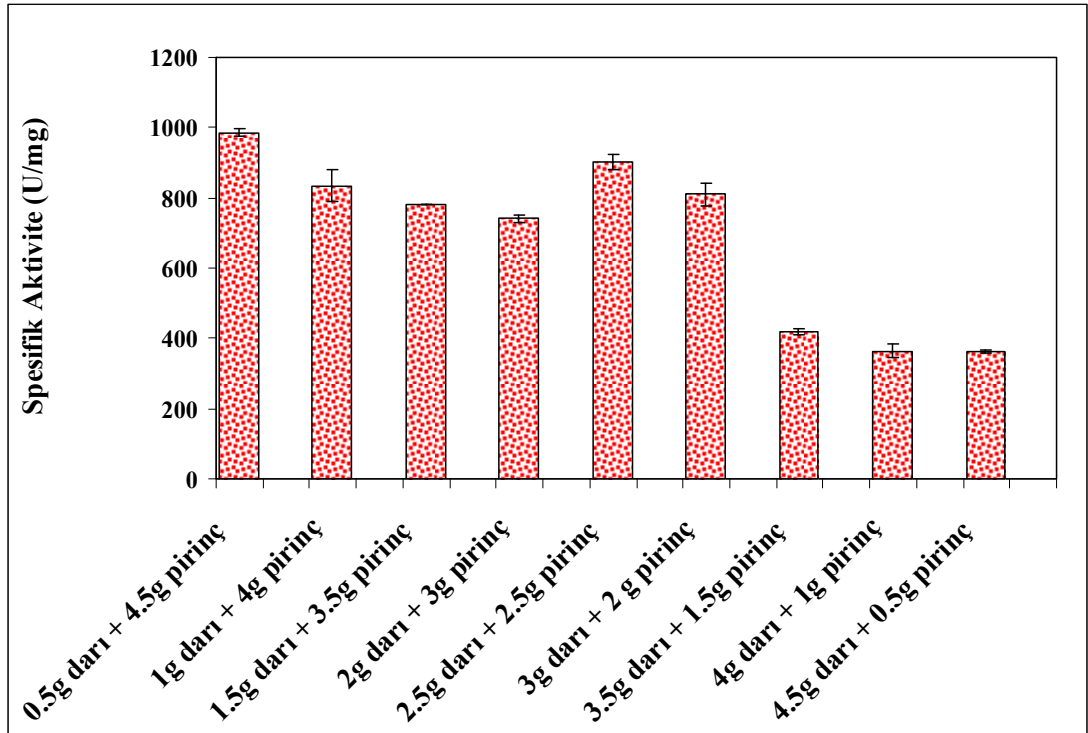
Şekil 4.14. β -Galaktozidaz üretimine ekim miktarının etkisi



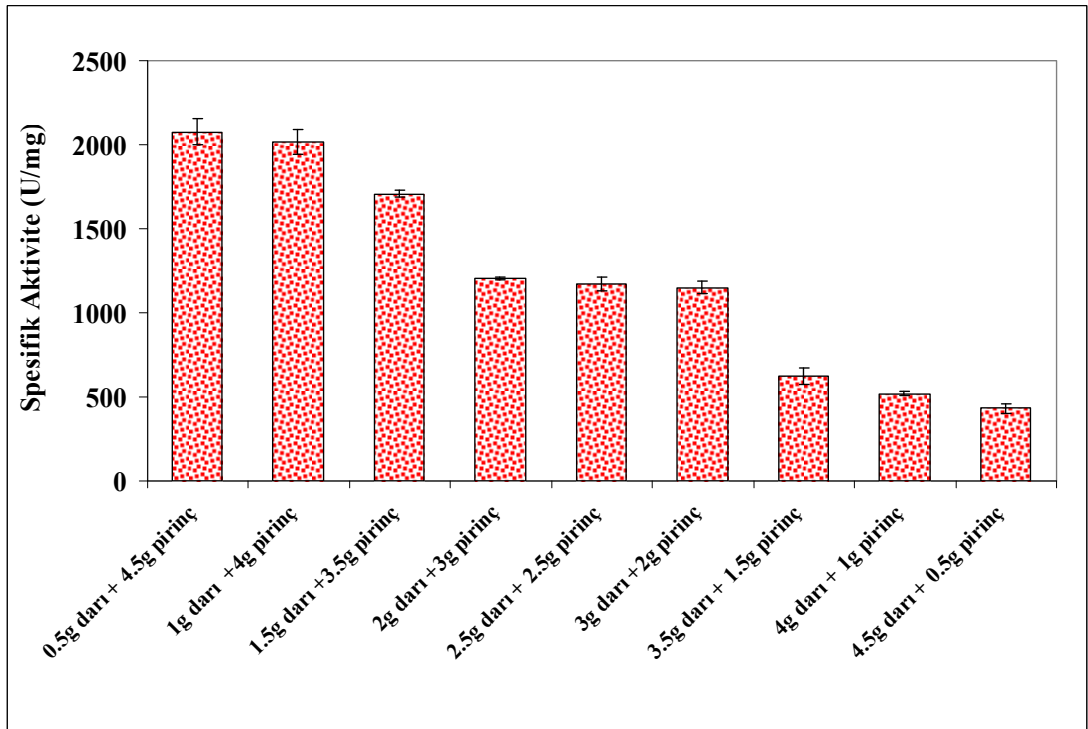
Şekil 4.15. α -Amilaz üretimine nem miktarının etkisi



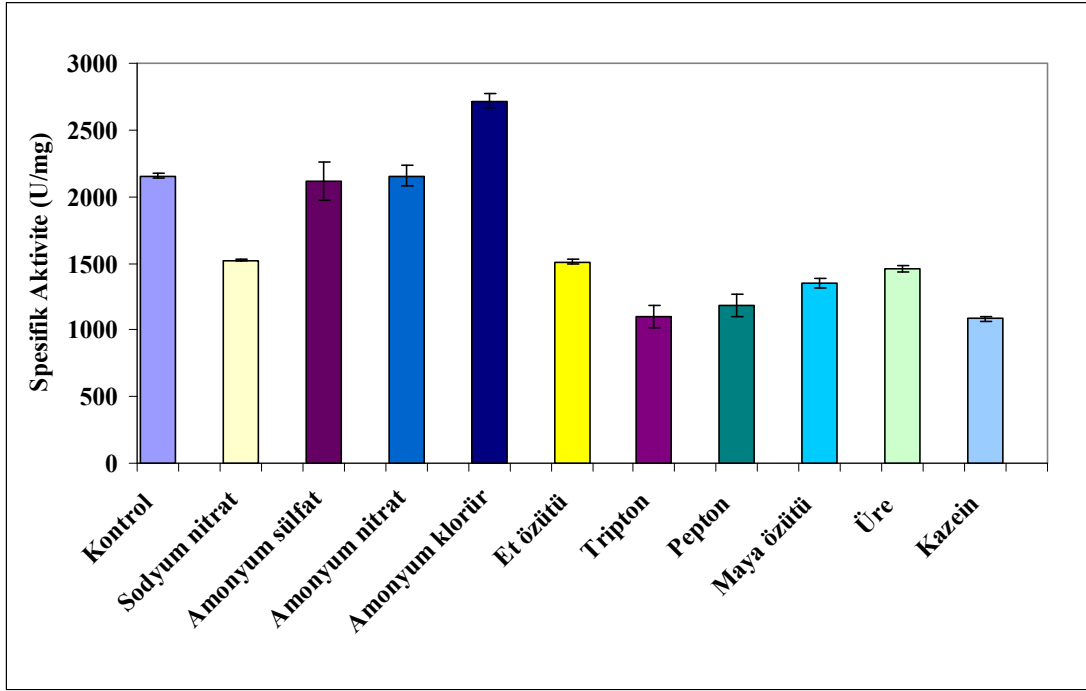
Şekil 4.16. β -Galaktozidaz üretimine nem miktarının etkisi



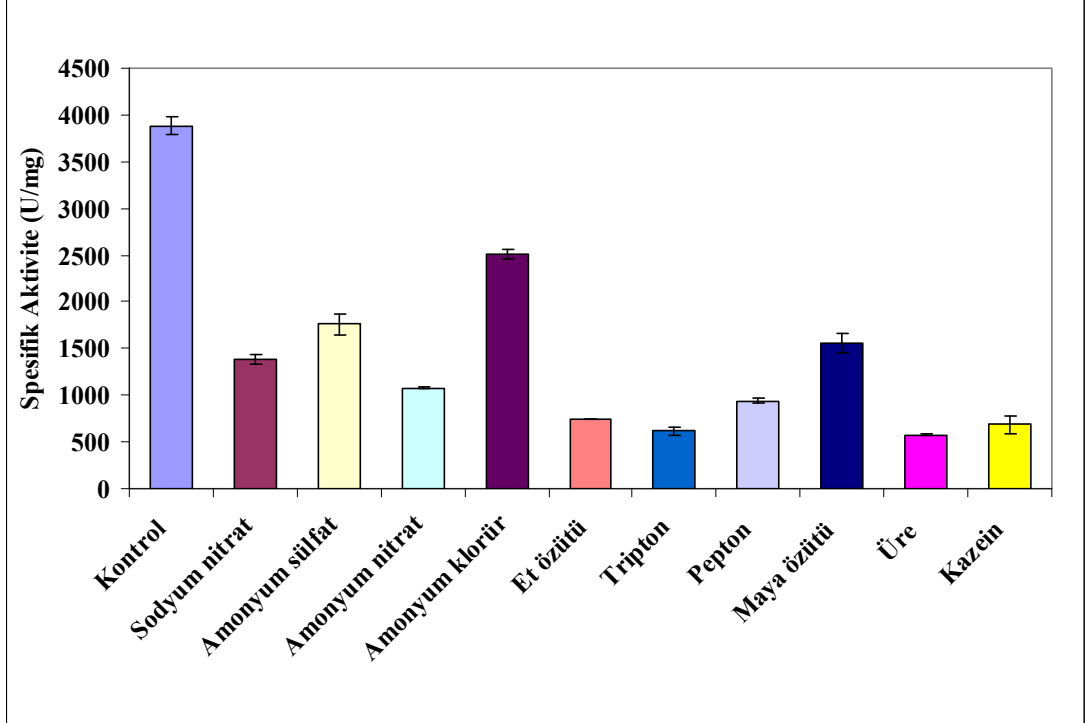
Şekil4.17. α -Amilaz üretimine en iyi aktivite veren substrat karışımlarının etkisi



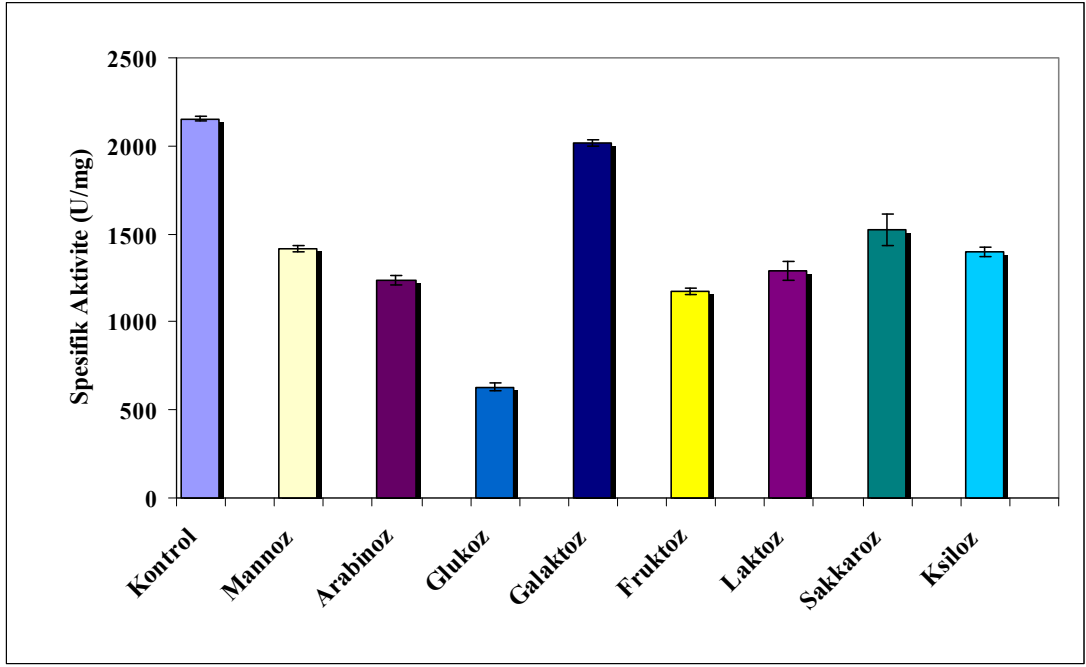
Şekil 4.18. β -Galaktozidaz üretimine en iyi aktivite veren substrat karışımlarının etkisi



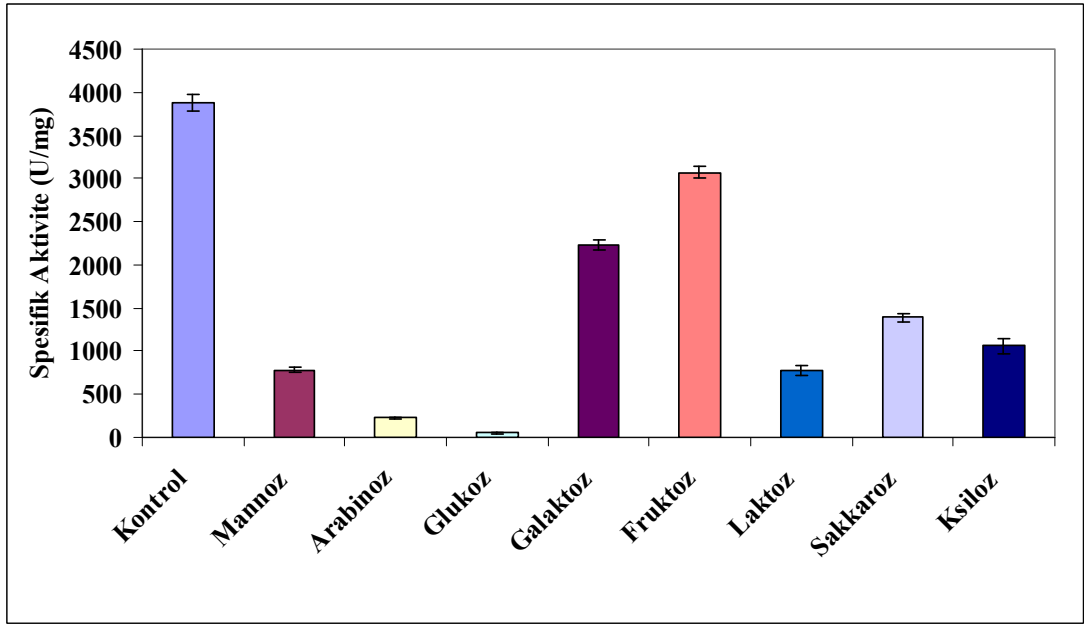
Şekil 4.19. α -Amilaz üretimine %1 azot kaynaklarının etkisi



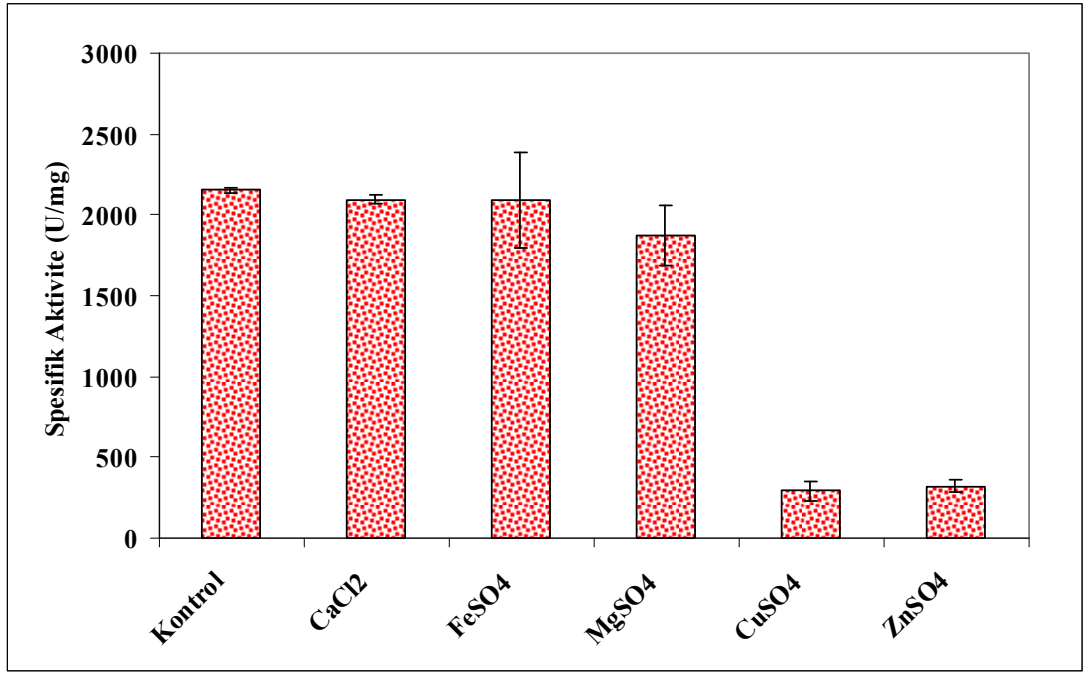
Şekil 4.20. β -Galaktozidaz üretimine %1 azot kaynaklarının etkisi



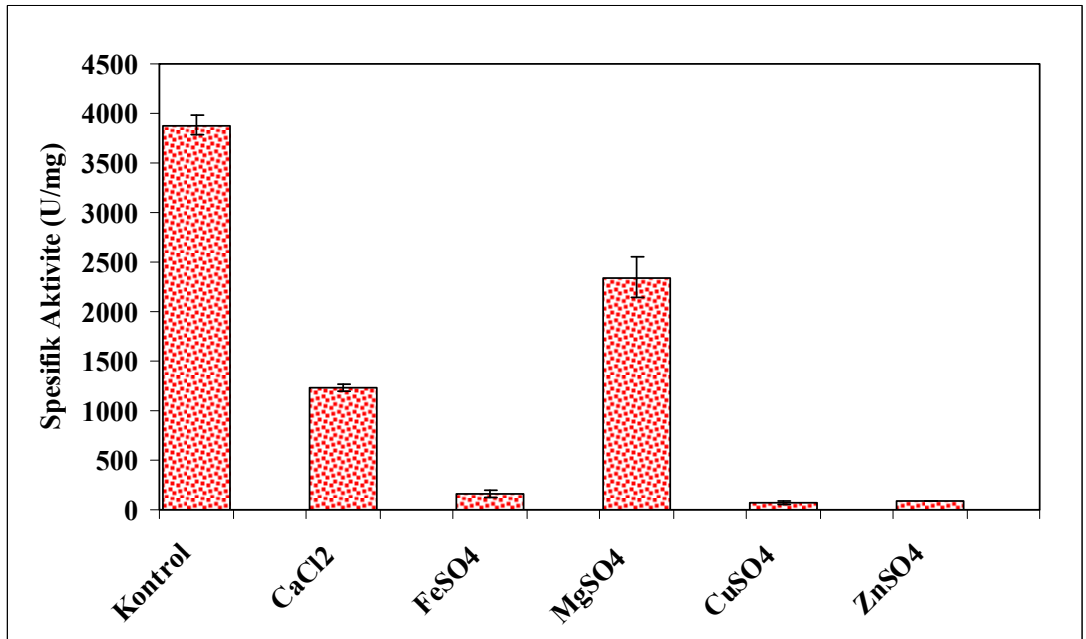
Şekil 4.21. α - Amilaz üretimine %1 karbon kaynaklarının etkisi



Şekil 4.22. β -Galaktozidaz üretimine %1 karbon kaynaklarının etkisi



Şekil 4.23. α -Amilaz üretimine %0.1 metal iyonlarının etkisi



Şekil 4.24. β -Galaktozidaz üretimine %0.1 metal iyonlarının etkisi

KAYNAKLAR

1. Kunamneni, A. ; Permaul, K. ; Singh, S. *Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 100, 168-171
2. Tanyıldızı, M.Ş. ; Özer, D. ; Elibol, M. *Production of bacterial α -amylase by B.amyloliquefaciens under solid state fermentation*, *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 37, 294-297
3. Rahardjo, Y.S.P. ; Weber, F.J. ; Haemers, S. ; Tramper J. ; Rinzema, A. *Aerial mycelia of Aspergillus oryzae accelerate α -amylase production in a model solid state-fermentation system*, *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 900-902
4. Balkan, B. ; Ertan, F. *Food Technol. Biotechnol. Production of α -amylase from Penicillium chrysogenum under Solid State Fermentation by using some agricultural by products*, **2007**, 45 (4) ,439-442
5. Baysal, Z. ; Uyar, F. ; Aytekin, Ç. *Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant Bacillus subtilis from hot spring water*, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1665-1668
6. Mukherjee, A.K. ; Borah, M. ; Rai, S.K. *To study the influence of different componenets of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by Bacillus subtilis DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations*, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 43, 149-156

7. Nizamuddin, S. ; Sridevi, A. ; Narasimha, G. *Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation, African Journal of Biotechnology*, **2008**, 7 (8), 1096-1100
8. Gangadharan, D. ; Sivaramakrishnan, S. ; Nampoothiri, K.M. ; Sukumaran, R.K. ; Pandey, A. *Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*, Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4597-4602
9. Asgher, M. ; Asad, M.J. ; Rahman, S.U. ; Legge, R.L. *A thermostable α -amylase from moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing, Journal of Food Engineering*, **2007**, 79, 950-955
10. Rajagopalan, G. ; Krishnan, C. *Optimization of medium and process parameters for a constitutive α -amylase production from a catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103, Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2008**, 83, 654-661
11. Sodhi, H.K. ; Sharma, K. ; Gupta, J.K. ; Soni, S.K. *Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, Process Biochemistry*, **2005**, 40, 525-534
12. Najafi, M.F. ; Deobagkar, D. ; Deobagkar, D. *Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20, Protein Expression and Purification*, **2005**, 41, 349-354
13. Hsu, C.A. ; Yu, R.C. ; Chou, C.C. *Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions, International Journal of Food Microbiology*, **2005**, 104, 197-206

14. Vetere, A. ; Paoletti, S. *Seperation and characterization of three β -galactosidases from Bacillus circulans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, 1380, 223-231
15. Shaikh, S.A. ; Khire, J.M. ; Khan, M.I. *Production of β -galactosidase from thermophilic fungus Rhizomucor sp*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **1997**, 19, 239-245
16. Ray, R.C. ; Kar, S. ; Nayak, S. ; Swain, M.R. *Extracellular α -amylase production by Bacillus brevis MTCC7521*, *Food Biotechnology*, **2008**, 22, 234-246

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

SSF, son yıllarda biyolojik aktif sekonder metabolitlerin üretiminde potansiyel uygulama alanı bulması, bunun yanı sıra kimya endüstrisi, ilaç endüstrisi, yakıt, gıda gibi alanlardaki uygulamaları ve SmF'e alternatif olmasıyla biyoteknolojik alanda güvenilirlik kazanmıştır. Özellikle de tarımsal sanayi atıklarının SSF'te substrat olarak kullanılması SSF yönteminin değerini arttırmıştır. SSF tekniği ekonomik zorluklar içinde olan ve globalleşen dünya ekonomisinin tarıma izin vermediği gelişmekte olan ülkelerde, biyoteknolojik evrimin tarıma eşlik etmesine fırsat sağlar¹.

Mikrobiyal kaynaklı enzimler, insanoğlunun birtakım gereksinimlerini karşıladığı en önemli ürünler arasındadır. Enzimlerin endüstriyel, çevresel, gıda biyoteknolojisi ve bunun gibi birçok alanda oldukça geniş kullanım alanı bulunmaktadır. Biyoteknolojideki son gelişmeler enzimlerin üretimi için yeni uygulama alanları oluşturmaya yöneliktir. SSF, enzim üretimi için zengin potansiyel bir kaynaktır. Bu oldukça özel teknikle ham fermente ürünler enzim kaynağı olarak kullanılabilir. Bu görüş çeşitli endüstriyel enzimlerin SSF yöntemiyle üretimi üzerine odaklanmıştır².

Ray ve ark.³ nın belirttiğine göre optimum enzim üretimi için uygun kültür şartlarını geliştirmek zorunludur. Bu çalışmada α -amilaz ve β -galaktozidaz üretimi için en uygun kültür şartları tespit edilmeye çalışılmıştır.

1. Çalışmamızda pamuk küspesi, mısır küspesi, elma, muz, portakal kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve darı katı substrat olarak kullanılmıştır. En iyi aktivite hem α -amilaz hem de β -galaktozidaz için pirinç kabuğunda elde edilmiştir.

2. Çalışmamızda en iyi inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı her iki enzim için sırasıyla 48. saat ve 37°C olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin uzun olmaması, SSF tekniğinin zaman almaması açısından olumlu bir sonuçtur.

3. En iyi ekstraksiyon ortamı hem α -amilaz hem de β -galaktozidaz için çeşme suyunda elde edilmiştir. Bu durum SSF tekniğinin oldukça ekonomik bir teknik olduğunun göstergesidir.

4. Başlangıç pH tespiti amacıyla yapılan çalışmada en iyi enzim üretimi her iki enzim için pH 7.5 olarak tespit edilmiştir.

5. 25-90°C sıcaklık aralıklarında yapılan optimum sıcaklık aktivitesi tayin sonuçlarına göre α -amilaz için 70°C, β -galaktozidaz için ise 60°C olarak elde edilmiştir.

6. Uygun ekim miktarı ve nem miktarının tespiti amacıyla yapılan çalışmada α -amilaz için uygun ekim miktarı %25, β -galaktozidaz için %35; uygun nem miktarı her iki enzim için %20 olarak tespit edilmiştir.

7. Enzimlerin üretimi üzerine, en iyi aktiviteyi veren substrat karışımlarının etkisini incelemek amacıyla pirinç kabuğu ve darı kullanıldı. Her iki enzim için en iyi aktivite pirinç kabuğunun yoğunlukta olduğu SSF ortamında elde edilmiştir.

8. %1 oranındaki farklı azot ve karbon kaynaklarının enzimlerin üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada α -amilaz için en iyi azot kaynağı amonyum klorür ve amonyum nitrat iken β -galaktozidaz için azot kaynaklarının enzim üretimini arttırıcı bir etkisinin olmadığı belirlendi. %1 oranındaki karbon kaynaklarının ise her iki enzimin de üretimini arttırmadığı tespit edilmiştir.

9. %0.1 oranındaki metal iyonlarının enzimlerin üretimine etkisi incelendiğinde metal iyonlarının enzimlerin üretimini arttırmadığı görülmüştür.

10. Yapılan bu çalışmada SSF tekniğiyle katı substrat olarak pirinç kabuğu kullanıldığında *Bacillus circulans* 'tan kısa sürede ve basit ekipmanlarla endüstriyel alanda çok önemli olan α -amilaz ve β -galaktozidaz elde edilebileceği tespit edilmiştir. Tarımsal sanayi atıklarının enzim üretiminde değerlendirilmesi gerek ekonomik yönden gerekse ekolojik yönden bilime katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Graminha, E.B.N.; Gonçalves, A.Z.L.; Pirota, R.D.P.B.; Balsalobre, M.A.A.; Da Silva, R.; Gomes, E. *Enzyme production by solid state fermentation: application to animal nutrition, Animal Feed Science and Technology*, **2008**, 144, 1-22
2. Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. *Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, Current Science*, **1999**, 77, 149-162
3. Ray, R.C. ; Kar, S. ; Nayak, S. ; Swain, M.R. *Extracellular α -amylase production by Bacillus brevis MTCC7521, Food Biotechnology*, **2008**, 22, 234-246

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : **BESİ SERİN**

Doğum Yeri : **DİYARBAKIR**

Doğum Tarihi : **17.12.1978**

Medeni Hali : **BEKAR**

Yabancı Dili : **İNGİLİZCE**

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : **D.Ü.T.F. SAĞLIK MESLEK LİSESİ - 1996**

Lisans : **DİCLE ÜNİVERSİTESİ EĞİTİM FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ ÖĞRETMENLİĞİ - 2001**

Yüksek Lisans : **DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ - 2009**

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

DİYARBAKIR - ÇÜNGÜŞ MERKEZ SAĞLIK OCAĞI - 2001

DİYARBAKIR DEVLET HASTANESİ – 2002

DİYARBAKIR – MERKEZ 450 EVLER SAĞLIK OCAĞI – 2002 - 2009

**DİYARBAKIR KADIN DOĞUM ve ÇOCUK HASTALIKLARI
HASTANESİ-2009**