

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

**BAZI BİTKİ ATIKLARINDAN KATI FAZ
FERMANTASYON (SSF) TEKNİĞİ İLE
EKSTRASELÜLER ENZİM ÜRETİMİ**

Hakan KARATAŞ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
KASIM 2008**

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmaları ve laboratuvar çalışmalarında, ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi ve imkân konusunda desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Fikret UYAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarında ve tez yazım aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her konuda destek veren Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Veysel TOLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşaması sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Doktor Sadin ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

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

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini esirgemeyen eşim Ebru KARATAŞ ve kızım Dila KARATAŞ'a sonsuz teşekkürler.

İçindekiler

TEŞEKKÜR	i
İçindekiler.....	i
AMAÇ.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimler	1
1.2 Biyoteknoloji.....	2
1.3 Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı	4
1.4 Ekstraselüler Enzimler.....	6
1.5 Amilaz	7
1.5.1 α -Amilaz	8
1.5.1.1 α -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları	10
1.5.1.2 α -Amilazların Ekmek Pişirme Endüstrisi ve Raf ömrünü Uzatma Sürecinde Kullanımı	11
1.5.1.3 α -Amilazların Nişastayı Sıvılaştırmada ve Şekerlemede Kullanımı	12
1.5.1.4 α -Amilazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı.....	12
1.5.1.5 α -Amilazların Kâğıt Endüstrisinde Kullanımı.....	13
1.5.1.6 α -Amilazların Deterjan Uygulamalarında Kullanımı	13
1.5.1.7 α -Amilazların Tıbbi Ve Klinik Kimyada Kullanımı.....	14
1.5.1.8 α -Amilazların Etki Mekanizması	14
1.5.2 Bakteriyel Amilazlar.....	15
1.6 Proteazlar.....	17
1.6.1 Proteazların Biyoteknolojide Kullanım Alanları	20
1.6.1.1 Süt Endüstrisinde Proteazların Kullanımı	20
1.6.1.2 Ekmekçilikte Proteaz Kullanımı.....	21
1.6.1.3 Tekstil Sanayinde Proteaz Kullanımı.....	21
1.6.1.4 Deterjan Sanayinde Proteaz Kullanımı.....	21
1.6.1.5 Deri Sektöründe Proteaz Kullanımı.....	22
1.7 Bacillus licheniformis.....	22

1.8	Katı Faz Fermantasyonu (SSF, Solid-State Fermentation).....	23
2.	Önceki Çalışmalar.....	32
3.	MATERYAL ve METOD.....	45
3.1	MATERYAL.....	45
3.1.1	Mikroorganizma seçimi.....	45
3.1.2	Substrat seçimi.....	45
3.1.3	Substrat parça büyüklüğü.....	45
3.1.4	Kullanılan kimyasal maddeler.....	45
3.1.5	Azot kaynakları:.....	46
3.1.6	Karbon kaynakları:.....	46
3.1.7	Besi Yeri Maddeleri:.....	46
3.1.8	Kullanılan Besiyerleri.....	46
3.2	METOD.....	49
3.2.1	Mikroorganizmaların Üretilmesi.....	49
3.2.2	Çözeltilerin Hazırlanması:.....	49
3.2.3	Enzim Üretimi Üzerine Farklı SSF Kaynakları Etkisi.....	49
3.3	Enzim Ekstraksiyonu:.....	50
3.3.1	α -Amilaz Aktivite Tayini.....	50
3.3.1.1	Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması:.....	50
3.3.1.2	Maltoz Standart Eğrisinin Hazırlanması.....	51
3.3.2	Proteaz Enzim Aktivite Tayini.....	51
3.3.3	Azokazein Standart Eğrisinin Hazırlanması.....	51
3.3.4	Protein Miktar Tayini.....	51
3.3.5	Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi.....	52
3.3.6	Enzim Üretimi Üzerine Üreme Sıcaklığının Etkisi.....	52
3.3.7	Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacmi Etkisi.....	53
3.3.8	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	53
3.3.9	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'sının Etkisi.....	53
3.3.10	Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Ortamının Etkisi.....	53
3.3.11	Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi.....	54
3.3.12	Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynakları Etkisi.....	54
3.3.13	Uygun Kepek Miktarının Belirlenmesi.....	54

3.3.14	Kepek Karışım Miktarlarının Belirlenmesi	55
4.	BULGULAR	56
4.1	Mikroorganizma özellikleri	56
4.2	Enzim Üretimi Üzerine Farklı SSF Kaynaklarının Etkisi	56
4.3	Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi	58
4.4	Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	60
4.5	Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi	61
4.6	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	63
4.7	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	64
4.8	Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Ortamının Etkisi	66
4.9	Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	68
4.10	Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	70
4.11	Enzim Üretimi Üzerine Kepek Miktarının Etkisi	71
4.12	Enzim Üretimi Üzerine Kepek Karışımlarının Etkisi	73
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	76
6	KAYNAKLAR	84

AMAÇ

Son yıllarda diğer tekniklere oranla daha fazla ürün elde edilmesinden ötürü Katı Faz Fermantasyon Tekniği (SSF), biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda gittikçe artan bir önem kazanmıştır.

Bu teknikte, ticari önemi olmayan veya az olan ve çevre kirliliğine yol açan bazı bitkisel atıkların substrat olarak kullanılmasıyla, ekonomik ve ekolojik açıdan değeriendirilebilirliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla enzim üretim kaynağı olarak uygun mikroorganizmalar kullanılacak olup bunlara uygun substrat ve enzim üretim şartları belirlenecektir.

SSF tekniği kullanılarak ekonomik değeri olmayan bitkisel atıklar ile yapılan çalışmalardan elde edilecek enzimlerin yüksek seviyede üretilebilmesi ve bu tekniğinin bir takım özellikleri incelenmeye çalışılacaktır.

ÖZET

SSF (Katı Faz Fermantasyonu) son yıllarda enzim üretiminde sıkça kullanılan bir tekniktir. Biyoteknolojide enzimlerin kullanım alanları gittikçe artmaktadır. Bu enzimlerin en önemlilerinden olan amilaz ve proteaz enzimleri deterjan, gıda, tekstil, kâğıt endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Van Gölü kıyısından izole edilen *Bacillus licheniformis* bakterisinin amilaz ve proteaz enzim üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi incelendi.

Pirinç kabuğu, buğday kepeği, mercimek kabuğu, elma kabuğu, muz kabuğu, küspelik mısır, darı ve pamuk parçaları katı substrat olarak kullanılarak amilaz ve proteaz üretimi ve aktivitelere bakıldı.

Çalışmamızda amilaz ve proteaz enzimi için en uygun substrat olarak pirinç kabuğu seçildi. SSF tekniği ile *Bacillus licheniformis* pirinç kabuğunu substrat olarak kullanarak değişik inkübasyon sürelerinde amilaz ve proteaz aktiviteleri ölçüldü. Amilaz için optimum inkübasyon süresi 24. saat, proteaz için ise 48. saat olarak belirlendi. Optimum aktivite pH'sı amilaz için 6,0, proteaz için 8,5 olarak belirlendi. Aktivite sıcaklığı amilaz için 40°C, proteaz için 45°C olarak belirlendi. İnokülüm hacminin enzim aktivitesine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada amilaz için 2 ml, proteaz için 3 ml olarak belirlendi. Ekstraksiyon ortamının etkisini araştırmak için yapılan çalışmada bütün sonuçlar kontrolden daha düşük tespit edildi. Enzim aktivitesi üzerine azot ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmak için yapılan çalışmada, amilaz için %1 amonyum sülfat ve %2 nişastalı ortamda, proteaz için %1

bacto casamino asit ve %1 maltoz bulunan ortamda maksimum aktivite elde edilmiştir. Kepek miktarı ve kepek karışım oranlarının etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada, amilaz için %30 kepek (%20 pirinç kabuğu+%10 buğday kepeği), proteaz için %30 kepek (%15 pirinç kabuğu+%15 buğday kepeği) bulunan ortamda yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

SUMMARY

Recently, SSF (Solid-State Fermentation) have usually been used for enzymes production by using various agricultural waste. The usages of enzymes in biotechnology have become important. Among of these enzymes amylase and protease are used in industry such as detergent, food, textil and paper.

Bacillus licheniformis which was isolated from near the Van Lake used to investigate the effect of various parameters on enzyme produciton. Different substrates such as rice husk, wheat bran, lentil husk, apple waste, banana waste, corn, maize, cotton waste were used in SSF for α -amylase and protease production.

Rice husk is the most convenient to production of amylase and protease. α -amylase and protease activity has been determinated at different incubation time by using *Bacillus licheniformis* as microorganisms and rice husk as substrate *in* SSF process. The appropriate incubation time has been found as 24. hours for amylase and 48. hours for protease. Optimum pH was found to be 6.0 for amylase and 8.5 for protease. Optimum temperature was found to be 40°C for amylase and 45°C for protease. The effect of inoculum volume was used 2 ml for amylase and 3 ml for protease. The effect of extraction medium was found to be lower than control on amylase and protease. The effect of carbon and nitrogen sources on amylase activity were observed the highest with %1 Ammonium sulfat, %2 starch and for protease with %1 bacto casamino acid, %1 maltose. The effect amount of solid substrate and mixed solid substrate on highest amylase and protease activity was investigated. The highest amylase activity was observed at %30 mixed substrate (%20 rice husk and %10 wheat brean) and for protease %30 (%15 rice husk and %15 wheat brean).

1 GİRİŞ

Endüstriyel enzimlerin kullanımının artmasıyla birlikte biyoteknolojik olarak enzim çalışmaları da artmaya başlamıştır. Bu enzimler bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilebilir, fakat endüstriyel açıdan kullanılan enzimler, katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları vb. gibi sebeplerden dolayı mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerdir.

Ticari önemi olmayan bazı tarımsal atıkların hem ekolojik, hem de ekonomik olarak değerlendirilmesinde uygun mikroorganizmaları kullanıp enzim, özellikle ticari önemi olan enzimlerin üretimi mümkündür. Endüstriyel açıdan önemli enzimlerden ikisi proteaz ve amilaz'dır.

1.1 Enzimler

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları düzenleyen biyolojik katalizörlerdir. Aktivite göstermek için hücre içinde olmaları gerekmez. Enzimler oldukça özel yapı kazanmış ve genellikle büyük protein molekülleridir. Enzimde bulunan aminoasitlerin özel dizilişi enzimin belli bir konformasyonu ve kuaterner yapıyı kazanmasında en önemli rolü oynamaktadır (**Gözükara 1989**).

Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ilaç olarak yararlanmışlardır. Hücre dışı bir aktivitenin olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmacanın mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek kanıtlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchoff, buğday nişastasının zamanla şekere

dönüştüğünü saptamıştır (**Gupta 2003**). 1825 yılında Berzelliuss buğdaygillerden elde edilen enzim karışımının nişastayı sülfirik asitten daha hızlı parçaladığını saptamıştır (**Gözükara 1989**). 1830 yıllarında amigdalinin acı badem tarafından hidroliz edildiği gösterilmiş ve 1833 yılında diastaz bulunmuştur. Diastaz amilaz hazırlanmasında kullanılmaktadır. 1834 yılında Scwan pepsini oldukça saf elde etmeyi başarmıştır. Enzimler için katalizör sözcüğü ise 1878 yılında Kühne tarafından kullanılmıştır (**Telefoncu 1997**). Çağdaş enzim kimyası çalışmaları enzimatik reaksiyonlarla ilgili Michelis-Menten varsayımı ve Sumner tarafından 1926 yılında saf olarak kristal üreaz enziminin izolasyonu ile başlamıştır (**Follmer 2008**). Proteinlerin saflaştırılması ve yapılarının aydınlatılması ile ilgili yeni kimyasal ve fiziksel teknikler geliştirildikten sonra F. Sanger 1953 yılında 51 amino asitten oluşan insülinin amino asit dizisini saptamıştır. Bundan beş yıl sonra 124 amino asitten oluşan ribonükleazın amino asit dizisi aydınlatılmıştır. Merrifield ve çalışma arkadaşları 1969 yılında kimyasal sentez yoluyla biyolojik aktivite gösteren ribonükleaz enzimini elde etmeyi başarmıştır. Bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe daha da yoğunlaşmakta olup yeni enzimler izole edilip saflaştırılmaktadır. Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasına paralel olarak enzim katalizli reaksiyonların kinetik ve termodinamik açıdan incelenmesi çalışmaları da hızla ilerlemiştir. Enzimlerin katalitik güçleri gerçekten şaşırtıcıdır. Enzimler, molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar (**Telefoncu 1997**).

1.2 Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, modern tekniklerle bitki, hayvan ve mikroorganizmalar kullanılarak kültür ortamında onlardan ürün elde etmektir. Özellikle sağlık, gıda,

çevre, kozmetik ve temizlik sanayinde sıkça kullanılmakta olup ekonomik açıdan oldukça yarar sağlamaktadır (**Horikoshi 1996**).

Genel olarak mikroorganizmalar metabolizmaları sonucu bazı bileşikleri salgırlar. Mikroorganizmaların besi ortamına uygun substratlar eklenerek sekonder metabolitler elde edilir. Bu ortamların hazırlanmasında, maliyetin ucuz olması için organizmaların en çok gereksinim duyduğu karbon kaynağını ekonomik değeri düşük maddelerden sağlanması gerekir. Nitekim sekonder metabolit olan organik asitler, aminoasitler, nükleik asitler ve onlarla ilişkili bileşikler; vitaminler, enzimler, steroid hormonlar ve antibiyotiklerin çok çeşitli alanlarda kullanıldıkları bilinen bir gerçektir (**Francis ve ark. 2003**).

Biyoteknolojik uygulamalar genellikle çevreye zarar vermeyen teknikleri kullanırlar. Bu tekniklerin enerji ihtiyacı azdır, yüksek basınç gerektirmez, oda sıcaklığında veya daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Çevreyi kirleten atıkların değerlendirilmesi ve mikroorganizmalar yardımı ile parçalanması da mümkündür (**Telefoncu, 1996**). Biyoteknolojide fermantasyon için kullanılacak organizmaların insanlarda herhangi bir hastalığa neden olmaması, verim gücünün yüksek olması, sahip oldukları özellikleri kaybetmemesi ve üretim ortamında hızlı çoğalması gerekir. Ayrıca organizmanın bulunduğu ortama konacak ve üreteceği ürünün esas ham maddesini oluşturacak organik maddenin, kolayca, bol miktarda, ucuza bulunabilen ve atık madde niteliği taşıyan madde olması gerekir (**Heck ve ark. 2006**).

1.3 Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği (Tablo 1.1) ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeni ile biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan temin edilmektedirler. Bunlardan en önemlileri bakteri kaynaklı enzimler olup, ilaç üretimi, mayalama, yiyeceklerin saklanması gibi biyoteknolojik alanlarında kullanımı gittikçe artmaktadır. **(Kapucu 2003)**.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, toksik ve patojen olmamalarına göre de seçilirler. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin üretiminde, mikroorganizma kullanımı artmıştır **(Kıran ve ark.2006)**

Tablo 1.1. Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanım Alanları*

ENZİM	UYGULAMA ALANI
Lipazlar	Yağların parçalanması-interesterifikasyon Yağ esaslı kirlerin ve lekelerin giderilmesi
Alfa Amilaz	Nişasta hidrolizi, Ekmekçilik Silaj üretimi Çamaşır ve bulaşık makinesi deterjanları Haşıl sökme Alkol Fermantasyonu Peynir ve bira gibi gıda sektörü
Proteazlar	Sindirime yardımcı olma Dericilik Süt çöktürme Ekmek yapımı Kek yapımı Et yumuşatma Silaj üretimi Kumaş ağartma İpek kalitesinin yükseltilmesi Deterjan
Papain	Etin yumuşatılması
Papain, fisin, bromelain	Biranın soğuğa dayanıklılığının artırılması
Tripsin, papain, fisin, pepsin	Balık pres suyu viskozitesinin düşürülmesi
İnvertaz	Sakaroz inversiyonu
Nükleazlar	Lezzet kontrolü
Oksidazlar	Oksidasyonun önlenmesi ve besin maddelerinde renk kontrolü
Rennin, pepsin	Peynir üretimi
Beta amilaz	Maltoz şurup
Glukoamilaz	Glukoz şurup
Selülaz	Tekstilde pamukçuk giderme ve taş yıkama Deterjan
Pektinesteraz Arabinaz	Meyve suyu berraklaştırma
Xylanaz	Nişasta gluten ayrımı Ekmek Hacmi

* (Telefoncu, 1996;Dağaşan, 1997)

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığında alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, rennin %10, tripsin %3, lipaz %3 ve diğer karbonhidratları parçalayan enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır. Bu enzimlerin parasal olarak yüz milyonlarca dolar şeklinde tanımlanan ekonomik değeri vardır. Doğada var olan enzim sayısının 25000 olduğu tahmin edilmektedir. Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar, ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak elde edilmektedir (**Adlercreutz ve ark. 1994; Schrierier 1997**). Günümüzde bunlardan sadece 4000 tanesi tanımlanmıştır (**Heck ve ark. 2006**). Hidrolazlar endüstriyel biyotransformasyonlarda en çok kullanılan enzimlerdir (**Kapucu 2003**). Deterjan ve gıda endüstrilerinde ise yaklaşık olarak 50 enzim kullanılmaktadır. Hidrolazlar endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %80'ini oluşturmaktadır (**Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003**). 1985 yılında yapılan bir değerlendirmede, dünyadaki enzim satışının 450 milyon doları bulduğu belirtilmektedir. 1993 yılında 1 milyar dolar olan dünya enzim pazar değeri, 2001 yılında 1.63 milyar dolara yükselmiştir (**Schrierier 1997**).

1.4 Ekstraselüler Enzimler

Ekstraselüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantılı halinde olan enzimler olarak tanımlanırlar. Bakteri kaynaklı ekstraselüler enzimlerin ilaç üretimi, mayalama, yiyeceklerin saklanması gibi biyoteknoloji alanlarında kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (**Kapucu 2003**).

Bir bakterinin özgül özellikleri, belirli bir enzim ya da enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olmasına bağlıdır. Bir bakteri türünü diğer bir türden farklı kılan

karakterlerden biri, belirli enzimleri sentezleme yeteneklerindeki farktan da kaynaklanır. Birçok bakterinin, ürediği ortama salgıladıkları enzimlerin temel fonksiyonları; kendileri için kullanılabilir besin sağlamaktır (Uyar 1993). Ticari olarak kullanılan enzimlerden en önemlileri amilaz ve proteazdır.

1.5 Amilaz

Amilaz nişastayı glukoza parçalayan, hidrolaz sınıfına ait enzimlerdendir (Teresita ve ark.1996). Amilazlar nişasta moleküllerini hidrolizleyip çeşitli dekstrin ve glukoz üniteleri içeren yapılara parçalarlar (Windish 1965). α -Amilazlar düz amiloz molekülü ve dallanmış amilopektin molekülündeki α -1,4 glikozidik bağlarını parçalayan ekstraselüler enzimlerdir (Fogarty ve Kelly 1990; Kandra 2003; Vishnu ve ark. 2006) . α -Amilazlar nişastayı glukoz ve maltoz veya spesifik malto-oligosakkaritlere veya karışık oligosakkaritlere hidrolizlerler (Dey 2001; Messaod ve ark. 2004; Hashim ve ark.2005).

Amilazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmesine rağmen ticari ihtiyaçları karşılamada genellikle mikrobiyal enzimler kullanılır. Günümüzde mikrobiyal amilazların büyük bir kısmı ticari olarak üretilmekte ve hemen hemen tamamı nişastanın kimyasal hidrolizinde önemli role sahiptirler. Amilazların tarihi, ilk olarak 1811 yılında Kirchof tarafından enzimin keşfi ile başlamıştır. Bunu takiben malt amilazları ve sindirim amilazları ile ilgili birkaç rapor yayınlanmıştır. Daha sonraları 1930'da Ohlsson nişastayı parçalayan sindirim enzimlerini α ve β -amilaz olarak sınıflandırmıştır (Gupta 2003). Amilazlar endoamilaz ve ekzoamilaz diye iki kategoride sınıflandırılırlar. Endoamilazlar nişasta molekülü içinde gelişigüzel hareket ederek hidrolizi katalizlerler. Bu hareket

sonucunda doğrusal ve dallanmış olarak farklı uzunluklarda oligosakkaritler oluşur. Ekzoamilazlar indirgenmemiş uçtan başlayarak başarılı bir şekilde kısa parçalar üretirler. Mikroorganizmaların enzim üretiminde kullanılmasının ve mikrobiyal ürünün önemli ölçüde yararları vardır. Ekonomik olarak saf maddelerin üretim kapasitesinin yüksek olması ve mikroorganizmaların karakteristik enzimler üretmesi en büyük avantajlardandır (**Lonsane ve Ramesh 1990**).

Amilazlar endüstride çok farklı amaçlarla kullanılırlar. Nişasta, deterjan, yiyecek ve tekstil endüstrisinde önemli role sahip olup, dünya enzim ticaretinin % 25-33'ünü oluşturmaktadır (**Nguyen ve ark. 2002**). Endüstriyel enzimler, tarımsal ürünler substrat olarak kullanılarak daha düşük maliyetle üretilebilirler. *Bacillus sp.* nişastalı ortamda α -amilaz üreten iyi bilinen bir bakteridir. *Bacillus sp.* buğday kepeği, pirinç kabuğu gibi bazı tarımsal atıkların bulunduğu ortamda SSF (Solid State Fermentation=Katı Faz fermantasyonu) ile α -amilaz üretimi ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır (**Babu ve Satyanarayana 1995; Baysal ve ark. 2003; Sodhi. ve ark. 2005**).

1.5.1 α -Amilaz

α -Amilazlar (endo-1,4- α -D-glucan glucanohydrolase E 3.2.1.1) maltoz ve maltotrioz moleküllerinin glukoz üniteleri arasındaki 1,4- α glikozidik bağlarını parçalayan ekstraselüler bir enzimdir. α -Amilazlar genellikle çözünür nişasta veya modifiye edilmiş nişasta moleküllerini substrat olarak kullanarak nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını hidrolizler, glukoz, dekstrin ve limit dekstrinler üretirler. α -Amilaz enzim aktivitesini tayin etmek için çeşitli yöntemler kullanılabilir.

Bunlardan bazıları iyotla boyanan nişasta molekülündeki azalışa ve indirgen şekerin artışına bakılarak tayin edilebilir **(Priest 1977)** .

α -Amilaz Ca^{2+} iyonları içeren ve 50–60 kDa molekül ağırlığına sahip bir metalo enzimdir. Amilazların ticari olarak geniş bir kullanım alanı vardır **(Gupta ve ark. 2003)**. Bu enzimler günümüz biyoteknolojisinde yiyecekte kâğıt endüstrisi, tekstil ve mayalanmaya kadar birçok alanda kullanılırlar **(Pandey ve ark.2000)**. α -Amilazlar ayrıca klinik, medikal ve analitik kimya gibi birçok uygulamada da kullanılırlar. **(Hagihara ve ark. 2001)**.

1950'lerden beri fungal amilazlar şeker karışımı içeren şurup hazırlanmasında kullanılmaktadır. α -Amilazlar yaygın olarak yiyecek endüstrisinde kullanılırlar. Kek yapımı, bira, hazır gıda, meyve suları, içecek, nişasta şurubu gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, unlu mamuller ve pişirme sanayinde nişastayı daha küçük karbonhidrat parçalarına hidrolizlemede α -amilaz sıklıkla kullanılırlar. Bu işlem sayesinde hamurun viskozitesini azaltır ve şeker seviyesini artırır. Ayrıca bira fabrikalarında ve içecek endüstrisinde kullanılabilirler **(Shalenberger 1990; Yeshajahu 1991)**. α -Amilazlar ayrıca konserve yapımında kullanılır. α -Amilazlar şekerleme ve tatlandırıcı sanayinde kullanılan farklı şekerlerin oranlarını kontrol etmede kullanılırlar **(Alvin ve ark.2002)**.

α -Amilazların üretimi genellikle SmF (Submerged Fermentation) tekniği kullanılarak yapılır. Fakat SSF'le α -amilaz üretimi son yıllarda giderek daha popüler hale gelmektedir. Geleneksel olarak α -amilaz SmF ile üretilmektedir **(Bose ve Das 1996; Egas ve ark. 1998; Aguilar ve ark. 2000)**. α -Amilazlar için farklı substratlar bulunur. Bunlar arasında, başta doğada bol miktarda bulunan patates, buğday, mısır,

pirinç gibi bitkilerden elde edilen, ham nişasta yer alır. Enzim substratını kullanarak önce dekstrine, son ürün olarak da glukoz, maltoz ve maltoz üniteleri içeren karbonhidratlara dönüştürür (**Somers ve ark. 1995**). Enzimin aktivite göstermesi için kofaktör gereklidir. Enzimlerin aktivite göstermesi için gerekli olan ve protein yapısında olmayan, genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş yan gruplara kofaktör denir. α -Amilaz aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadır (**Gözükara 1989**).

1.5.1.1 α -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları

α -Amilazlar nişastaya bağlı endüstrilerde en önemli hidrolitik enzimlerdir. Ticari amilazlar en eski enzimler olup ilk olarak 1984 yılında ilaç ve sindirim kaynaklı olarak kullanılmıştır. Günümüzde yiyecek, deterjan, tekstil ve kâğıt endüstrisinde nişastanın hidrolizinde kullanılırlar. Bu özelliklerden dolayı mikrobiyal amilazlar nişasta işleme sürecinde kimyasal hidroliz işlemlerinde kullanılır. Potansiyel kullanım alanı olarak ilaç ve kimya endüstrisinde daha yaygın olarak kullanılabilirler. Bugün amilazlar dünya enzim ticaretinde en büyük paya sahiptirler (**Aehle ve Missel 1999**).

Nişastanın α -amilaz tarafından hidrolizi sonucu oluşan maltooligosakkaritler gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde önemli özelliklerinden dolayı kullanım alanı bulmuşlardır. Bunlar çocuklar ve yaşlılar için yüksek oranda besleyici gıdalar olup, iyi çözünerek berrak solüsyonlar oluşturmaktadır veya kalori eksikliği çeken kişilerde besin olarak kullanılmaktadır. Maltotetroz, besindeki nemin korunmasında, yapısının iyileştirilmesinde ve besin katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (**Kandra, 2003**).

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

Pişirme endüstrisinde enzimler, yüzlerce yıldır kullanılarak yüksek kalitede çeşitli ürünler elde etmede kullanılmışlardır (**Hammer 1995; Si 1999**) Bu enzimlerin ekmek yapımında kullanılarak, daha yüksek hacim, daha iyi renk ve daha yumuşak parçalar elde edilmiştir. Malt hazırlamada ticari olarak birçok enzim kullanılır. Günümüzde amilaz dışında proteaz, lipaz, glukoz oksidaz, ksilanaz, pullulanaz, pentozanaz, lipoksijenaz vb. gibi enzimler de ekmek imalat endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılırlar (**Kulp 1993; Prietto ve ark.1995; Si 1999**).

Unlu mamul yapımında kullanılan α -amilazlar arpa maltından, mantar ve bakterilerden elde edilen mikrobiyal enzimlerdir (**Hebeda ve ark. 1990–1991**). Fungal α -amilazların ekmek yapılacak hamura ilavesi 1955'ten beri ABD'de ve 1963'ten beri İngiltere'de kullanılmaktadır. Fungal α -amilazlar çoğunlukla unlu mamul ihtiyacının karşılanmasında yaygın bir biçimde pişirme sürecinde kullanılmışlardır (**Pritchard 1992**).

α -Amilazların unlara katılmasıyla sadece fermantasyon sürecinin hızlanması, akışkanlık oranının azaltılması ve daha geniş hacimli ekmek üretimi sağlanmaz, aynı zamanda tat, renk ve daha kaliteli kızarmış ekmek üretimi de sağlanmış olur (**Van DAM ve Hille 1992**).

α -Amilazların endüstride yeni kullanım alanlarından biri de bayatlamayı geciktirmede ve ekmeğin raf ömrünü uzatmada kullanımındır. Yaygın olarak ekmek yapım endüstrisinde çeşitli katkıların kullanılmasıyla, lezzetli ve daha iyi görümlü pişirme elde edilmiştir. Kimyasalların, küçük şekerlerin, enzim ve

kombinasyonlarının, süt tozunun, emülsiyon sağlayıcıların, mono-digliseritlerin, Şeker esterlerinin, antioksidanların, Şeker- tuz vb. maddeleri ilave edilerek süreç iŐlenebilir. Son zamanlarda hamur üretmede enzimlerin raf ömrünü uzatmadaki önemi gittikçe artmaktadır. Bunlar α -amilazlar, maltogenik amilazlar, β -amilazlar, amiloglukozidazlardır. Pullulanaz ve α -amilazların beraber kullanımı bayatlamayı geciktirmede daha etkilidir (**Carroll ve ark. 1987**). Bununla beraber α -amilazların az miktarda bile aşırı kullanımı istenmeyen ekmek yapıŐmalarına yol açabilir (**Olesen 1991**). Dolayısıyla son süreçte orta düzeyde ısıya stabil (ITS) α -amilazların kullanım eğilimi vardır (**Kulp 1993; Hebeda ve ark.1990–1991; Ahuja ve ark. 1998**). α -Amilazların yaygın olarak mikrobiyal α -amilaz olarak bilinmesine rağmen ITS olarak bilinenlerin sadece birkaç mikroorganizmadan üretildiği rapor edilmiştir (**Kraus ve ark. 1993**).

1.5.1.3 α -Amilazların Nişastayı Sıvılaştırmada ve Şekerlemede Kullanımı

Piyasada bulunan birçok ürün için kullanılan α -amilazlar nişastayı hidroliz ederek glukoz ve fruktoza dönüŐtürülmesini sağlarlar. Nişasta yüksek oranda tahıl fruktozu içeren Őuruplara dönüŐtürülür. Yüksek tatlandırıcı özelliklerinden dolayı büyük oranda içecek endüstrisinde kullanılırlar Nişastayı sıvılaştırmada yüksek oranda termostabil α -amilazlar kullanılırlar (**Gupta ve ark.2003**).

1.5.1.4 α -Amilazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Tekstil rnlerinin iŐlenme sürecinde dokumanın sertleştirilmesi ve gerilmesi önemli bir etkidir. Nişasta ucuzluğundan ve dünyanın birçok bölgesinde kolay bulunabilmesinden dolayı tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekstilde nişasta molekül boyunun iyi bir Şekilde ayarlanması α -amilazların uygulanması ile

başarılabilir. α -Amilazlar sıklıkla çözünür suda, nişasta içindeki dekstrin moleküllerini temizleyerek, nişastanın fazlasının uzaklaştırılması işlemini sağlayabilir. α -Amilazların kullanılmasıyla tekstil ürünlerindeki dokumanın eğriliği düzeltilebilir (**Hendriksen ve ark.1999**).

1.5.1.5 α -Amilazların Kâğıt Endüstrisinde Kullanımı

Yüksek moleküler ağırlıktaki nişastanın kâğıt endüstrisinde kullanımını, düşük viskozite sağlamasından dolayı α -amilazlar sayesinde başarmıştır (**Bruinenberg ve ark. 1996**). α -Amilazların kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde kullanımını nişastanın kâğıdı kaplamasını ve modifiye edilmesini sağlar. Tekstilde olduğu gibi kâğıt boyutu ve mekanik hasara karşı performansı koruma işleminde de α -amilazlar uygulanır. Kâğıtta sertlik ve genişlik boyutunun artırılması önemlidir. Kâğıdın temizlenebilmesini ve iyi kaplanmasını sağlar. Nişasta kâğıt işleme sürecinin bitmesini ve cilalanmasını sağlayan iyi bir moleküldür. Nişastanın kâğıda eklenmesiyle, kâğıdın sertleştirilmesi ve toplanması için nişastanın bulamaç haline getirilmesi ve transfer edilmesi gibi iki etkiyle olur. Bu işlemin sıcaklık aralığı 45–60 °C aralığındadır. Nişastanın akışkanlığının sabitliği bu durumdaki sonuçların tekrarlanabilmesi için gereklidir. Nişastanın doğal akışkanlığı, devam eden süreçte veya grup halindeki amilazın kâğıt boyunu ayarlaması ve kısmen küçültülmesi için gereğinden daha fazladır. Bu koşullar nişasta kaynaklarına ve α -amilazların kullanılmasına bağlıdır (**Tolan 1996**).

1.5.1.6 α -Amilazların Deterjan Uygulamalarında Kullanımı

Yeni deterjanlar genellikle enzimleri içerirler. Enzimlerin deterjan sanayinde uygulanmasının temel avantajı daha yumuşak bir ortam oluşturmasıdır. Daha

önceleri otomatik bulaşık makineleri deterjanları oldukça sert bir yapıya sahiptiler ve narin porselenlerin ve tabakların hasar görmelerine yol açıyordu. Bu etkiden dolayı deterjan endüstrisinde daha yumuşak ve etkili karışımlar aranmaya başlandı (**Van Ee ve ark. 1992**). Enzimler yıkama sıcaklığını düşürmeye yararlar. α -Amilazlar 1975'ten beri çamaşır deterjanlarının bileşiminde kullanılırlar. Günümüzde sıvı deterjanların % 90'ı α -amilaz içerirler (**Kotwitz ve ark. 1994**) ve otomatik bulaşık makinesi deterjanlarının α -amilaz oranı gittikçe artmaktadır. Deterjanlarda kullanılan α -amilazların sınırlamalarından biri enzimim kalsiyum hassasiyeti göstermesi ve düşük kalsiyum içeren ortamda stabiliteilerinin güçlüğüdür. Son zamanlarda iki büyük deterjan sağlayıcı Novozymes ve General International'daki deterjan araştırmalarında çalışan bilim adamları α -amilazların beyazlatıcı özelliğini geliştirmişlerdir (**Tierny ve ark. 1995; Bisgard-Frantzen ve ark.1995**).

1.5.1.7 α -Amilazların Tıbbi Ve Klinik Kimyada Kullanımı

Biyoteknolojik alanda amilaz uygulamalarının oldukça yaygındır. Bunlardan bazıları klinik, tıbbi ve analitik kimyadır. Amilazlarla ilgili olarak tıbbi ve klinik birkaç işlemsel süreç bulunmaktadır. Sıvı sabit ayıraçların uygulamalarının α -amilaza bağlı olduğunu Ciba Corning Express klinik kimya sistemleri tanımlamıştır (**Becks ve ark. 1995**). Daha yüksek oligosakkaritleri belirleme işleminde amilaz uygulamaları geliştirilmiştir (**Giri ve ark. 1990**). Bu metodun gümüş nitrat testinden daha etkili olduğu iddia edilmektedir (**Menzel ve ark. 1998**).

1.5.1.8 α -Amilazların Etki Mekanizması

1963 yılına kadar, α -amilazların nişastayı rastgele hidrolizleyip, glukoz moleküllerine dönüştürdüğü düşünülüyordu. *B. subtilis* α -amilazlarının, nişasta

üzerine etkisinin incelenmesi sonucu, ortamda maltotrioz ve maltoheksoz'un baskın olduğu bir karışım oluşunca α -amilazların nişasta üzerindeki etkisinin rastgele olmadığı ortaya çıkmıştır. Buna göre; α -amilaz üzerinde 9 glukoz kalıntısının bağlanabileceği bağlanma merkezleri bulunmaktadır. α -(1→4) bağımlı hidrolizleyen aktif merkezin, 3–4 nolu glukoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri üzerinde kaldığı düşünülmektedir. Buna göre hidroliz işleminden sonra soldaki grup enzim üzerinden ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezine nişasta zinciri kendiliğinden hareket ederek maltoheksoz oluşur. Hidrolizinden sonra, zincirin sağ tarafı ayrılırsa, nişasta zinciri boşalan bağlanma merkezini doldurmak için sağa doğru kayar ve maltotrioz oluşur. Amilopektin molekülünden ise maltoz, maltodiyoz, maltotrioz ve maltoheksoz meydana gelir (**Robyt 1989**).

1.5.2 Bakteriyel Amilazlar

Karbohidrazların en önemli kaynağını *Bacillus* türü mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bir karbohidraz olan α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. Nişasta, çok sayıda glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler. Fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel α -amilazlardan daha az stabil olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel; özellikle de *Bacillus* amilazları oluşturmaktadır. Bu cinsin özellikle 8 tanesinin sentezlediği α -amilaz enzimi çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. caldolyticus*, *B.*

coagulans, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*'dur (**Kıran ve Çömlekçioğlu, 2006**).

Bakteriyel amilazlar, substratları olan nişastayı hidrolizleme durumuna göre endo ve ekso amilazlar olmak üzere 2 gruba ayrılır: Bir endo amilaz olan α -amilaz (EC 3.2.1.1.), hidrolazlar sınıfının en önemli üyelerinden biridir, nişastadaki glikozidik bağlarını rastgele yerlerden hidrolizler. Bir ekso amilaz olan β -amilaz (EC 3.2.1.2.) ise, nişastanın indirgen olmayan ucundan başlayarak glikozidik bağlarını hidrolizler. Ayrıca bir glukoamilaz olan γ -amilaz (EC 3.2.1.3.) vardır ki bu, amilopektinin dallanma noktalarındaki glikozidik bağları kırar (**Sinnot, 1990**).

Besiyeri ortamında, bakterilerin protein, peptid ve pepton gibi organik maddelerin varlığında bunları kullanarak ekzoenzim sentezini arttırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte organik ve kompleks organik azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına nazaran amilaz üretimini arttırdığı belirlenmiştir (**Babu ve Satyanarayana, 1993; Pederson ve Nielsen, 2000**). Yine besiyeri ortamında, farklı karbon kaynakları kullanılarak üretilen bakterilerde nişasta ve glukozun diğer şekerlere oranla α -amilaz üretimini arttırdığı belirlenmiştir (**Krishna ve Chandrasekanan, 1996; Ramachandra, 2004**).

Bacillus endüstriyel enzimlerin en önemli kaynaklarından biri olarak bilinir ve *B. amyloliquefaciens* en yaygın α -amilaz üreticisi olarak bilinir (**Abate ve ark. 1999**).

1.6 Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin hidrolizini katalize eden hidrolitik enzimlerdir. Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır. Proteazlar enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücrel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkalın proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır (**Kumar ve ark. 2005**). Bakteriye proteazlar, hayvan ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir. Bu nedenle ticari ilgiden dolayı endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroplar çok çeşitli habitatlardan araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (**Banerjee ve ark., 1999**).

Alkalın proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır. Çünkü çok çeşitli ortamlardan izolasyonu nispeten kolaydır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik ortamda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik

Bacillus tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanmaktadır. Ayrıca *Bacillus* türleri post-ekspansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (**Fogarty ve Kelly, 1990**).

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanım alanı bulan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi küçük katkı maddesinden, anahtar bileşenlere değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında stabilitesini koruyamamaktadır. Bu nedenle, enzim tabanlı deterjanların daha iyi stabiliteye sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır. Klasik olarak deterjanlar yüksek yıkama sıcaklıklarında kullanılmaktadır. Şimdilerde alkalik proteazların tanımlanmasında geniş sıcaklık aralıklarında etkili olması oldukça ilgi çekmektedir. Diğer taraftan günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni alkalik proteazlar üzerinde durmaktadır. Proteazların diğer ilginç bir kullanım alanı ise deniz *Crustacea* atıklarının deproteinizasyonudur. Kimyasal işlemlerin üstesinden gelmek için mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin kullanılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır (**Yang ve ark., 1996**).

Mikroorganizmalar genetik manipölasyonlara hassasiyetinden ve biyokimyasal çeşitliliklerinden dolayı mükemmel bir proteaz kaynaklarıdır. Mikrobiyal enzimler dünya enzim ticaretinin yaklaşık %40'ını karşılarlar (**Rao ve ark. 1998**).

Proteazlar protein molekülündeki peptid bağlarını hidrolizleyebilen enzimlerdir. Endüstriyel enzim gruplarından en geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir. Özellikle endüstriyel, biyoteknolojik, tıbbi ve temel araştırma alanlarındaki kullanımı artış göstermektedir (**Wiesman 1993; Rao ve ark. 1998**). Proteazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunurlar. Proteaz biyosentezinin; *Aspergillus* (**Fan-Ching ve ark. 1998**), *Rhizopus* (**Rao ve ark. 1998**) ve *Penicillium* (**Farley ve ark. 1992**) gibi funguslar tarafından yapılabildiği belirtilmektedir.

Proteazlar asidik, nötral ve alkalın olmak üzere üç grupta sınıflandırılırlar. Nötral proteazlar, özellikle yiyecek endüstrisinde kullanılırlar. Çünkü hidrofobik aminoasit bağlarını nötral pH'da spesifik olarak hidrolizlerler. Nötral proteazlar pirinç nişastası izolasyonunda etkilidirler (**Wang 2001**). Alkalın proteazlar geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Özellikle endüstriyel proteazlar deterjan, yiyecek, kimya endüstrisi, klinik formölasyonlar ve X-ray filmlerinden gümüşün geri alınması gibi alanlarda yaygın olarak kullanılırlar (**Kumar ve ark. 1999**). *Bacillus*, *Streptomyces* ve *Aspergillus* türleriyle proteaz çalışmaları yaygındır. *Beauveria*'dan elde edilen alkalın proteazın belirgin bir etkisi olmasına rağmen (**Bidockha ve ark. 1987–1990; Urtz 2000**), ticari uygulamalar için alkalın proteaz çalışmaları bu cinste keşfedilmemiştir. Dolayısıyla *Beauveria*'dan alkalın proteaz üretiminin çoğu SmF ile

yapılmaktadır. Alkalın proteaz genellikle SSF ortamında mantarlardan elde edilir **(Aikat ve ark.2000-2001; Germano ve ark.2003)**.

Alkalın proteazlar kuvvetli enzimler olup önemli ölçüde deterjan, deri, gümüş, ilaç, yiyecek, tohum ve kimya sanayinde kullanılırlar. Bu enzimler yüksek kaliteli sindirimde kullanılırlar **(Kumar ve ark. 1999)**. Proteazlar çok sayıda mikrobiyal kaynaklardan elde edilmesine rağmen sadece birkaçı ticari olarak tanımlanmıştır. Proteazlar SmF ve SSF ile üretilmektedir. Her organizma veya ırk kendi maksimum enzim özelliklerine sahiptir.

1.6.1 Proteazların Biyoteknolojide Kullanım Alanları

1.6.1.1 Süt Endüstrisinde Proteazların Kullanımı

Proteaz enzimi süt işleme sürecinde kullanılan en önemli enzimlerdendir. Peynirin olgunlaşmasına yardımcı olurlar. Peynir yapımı sırasında süt proteinlerinin çöktürülmesi için chymosin (renin) adı verilen bir proteaz enzim kullanılmaktadır. Bu enzim süt danalarının midesinin 4. bölümünde bulunmaktadır. Renin süt danalarından tuzlu su ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Yetişkin hayvanların midesinde renin'e ilaveten pepsin adı verilen enzim de bulunur, ancak pepsin peynir yapımı sırasında istenmeyen aromalara sebep olduğu için kullanılması istenmemektedir. Özellikle süt danalarından elde edilen renin, miktar yetersizliği ve ekstraksiyon zorlukları nedeniyle sıkıntı yaratan bir enzimdir. Bu yönde yapılan araştırmalar sayesinde bakteriyel kökenli renin elde edilmiş ve 1985 yılından itibaren tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır **(Dağışan 1997)**.

1.6.1.2 Ekmekçilikte Proteaz Kullanımı

Yüksek miktarda buğday proteini (gluten) içeren hamurların işlenmesi mekanik olarak daha zordur ve bu hamurlardan istenen düzeyde yüksek hacimlerin elde edilmesi oldukça zordur. Bu amaçla proteaz tipi enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Özellikle bisküvi ve kraker yapımında düşük gluten içeren unlar tercih edilmekte, ancak bunun yeterli olmadığı durumlarda proteaz tipi enzimlerle bu ihtiyaç giderilebilmektedir. Proteaz tipi enzimler ekmeğin besin değerini etkilemeden, unun yapısında bulunan gluteni hidroliz etmekte ve hamurun kolay işlenebilirliğini sağlamaktadır (Dağışan 1997).

1.6.1.3 Tekstil Sanayinde Proteaz Kullanımı

Ham ipek, sericin adı verilen mumsu ve mat bir protein kılıfı ile sarıdır. Tipik ipek parlaklığının ve yumuşaklığının ortaya çıkabilmesi için sericinin ağartma adı verilen işlemlerle çözülmesi gerekmektedir. Bu operasyon geleneksel olarak ipek çilelerini sabunlu ve sodalı suda kaynatılarak yapılmaktadır ve kayıplara neden olmaktadır. Alkalın proteaz enzimi non-iyonik bir ıslatıcıyla pH 8.0 civarında 50–55 derecede kullanılarak 1–2 saatte ekonomik bir şekilde ağartma işlemi yapılabilir. Böylece ipek kalitesi yükseldiği gibi kayıplar da asgariye indirilebilir (Dağışan 1997).

1.6.1.4 Deterjan Sanayinde Proteaz Kullanımı

İlk olarak 1913 yılında pankreas ekstresi ve sodyum karbonat karışımı şeklinde patenti alınan ‘biyo-ıslatma’ ürününden sonra pek önemsenmeyen bu sektör, 1960 yıllarında *Bacillus subtilis* alkalın proteazının nispeten bol ve ucuz üretimi ile tekrar gündeme gelmiş ve devamlı gelişmiştir. Değişmeyen özelliği serin proteaz

olmasına karşın, zamanla *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus alcalophilus* gibi suşların seçimi ile pH optimum değerleri alkaline kayan proteazlar üretilmiştir. Son zamanlarda ise, protein mühendisliği sayesinde, deterjanlarda ağartıcı madde olarak kullanılan perborata dayanıklı alkalın proteazlar kullanılmaktadır. Özet olarak, günümüzde deterjanın alkalinite derecesine ve içeriğine göre en uygun proteaz enzimi seçilerek formülasyon yapılabilmektedir (**Dağaşan 1997**).

1.6.1.5 Deri Sektöründe Proteaz Kullanımı

En eski sanayi kollarından birisi olan dericilikte proteaz enzimleri, farkında olunmadan yüzlerce belki binlerce yıldır kullanılmıştır. 20. yüzyılın başlarında Otto Röhm tarafından pankreatik tripsin ile sama uygulaması patenti alınana kadar köpek pislikleri proteaz ve bunları üreten bakterilerin kaynağı olarak kullanılmaktaydı. Günümüzde bakteriyel alkalın ve nötr proteazlar büyük ölçüde tripsinin yerine geçmişlerdir. Hayvan derileri epidermis denilen ve kıl kökleri ile yağ ve ter bezlerini içeren dış deri, korium denilen ve kollajen fiberleri ile elastin ve diğer proteinleri içeren esas deri ve nihayet deriyi besleyen damarları da içeren bağ dokusundan oluşmaktadır. Günümüzde ekonomik nedenlerden dolayı bakteri kökenli proteaz enzimleri büyük ölçüde tripsinin yerine geçmiş bulunmaktadır. Bu enzimlerle, tabaklama işlemleri sırasında ıslatma, kireçlik-kıl dökme ve sama işlemi gibi üç ayrı uygulama yapılmaktadır (**Dağaşan 1997**).

1.7 Bacillus licheniformis

Bacillus licheniformis doğada yaygın olarak bulunan saprofit bir bakteridir. Fermantasyon endüstrisinde, biyoteknolojik öneme sahip amilaz, proteaz,

antibiyotikler, çevre ve insan sağlığı açısından çok az risk oluşturan özel kimyasalların üretimi için yaygın olarak kullanılır.

Tıp ve Veterinerlikte yaygın olarak kullanılan ‘Bacitracin’ adı verilen ilk antibiyotik peptidi *Bacillus licheniformis* kültüründen elde edilmiştir (He ve ark.2006).

Glikoz şuruplarının fruktoza izomerizasyonunda sıvılaştırma aşamasında *Bacillus licheniformis* α -amilazları tercih edilmektedir. Çünkü α -amilazlar (özellikle *B. subtilis* kaynaklı olanlar) kalsiyum-metallo enzimleridir. Buna karşın, *B. licheniformis* α -amilazları daha az kalsiyuma gereksinim duyarlar ve bu maddenin ortamda çok düşük miktarda olması durumunda (1 ppm'nin altında) magnezyum iyonlarının vasıtasıyla, izomerizasyon aşamasında rol oynayan glikoz izomeraz üzerindeki inhibitör etkisi baskılanmaktadır. Bu nedenle, *B. licheniformis* α -amilazları daha az kalsiyum gereksinim duyması ve sıcaklığa daha dayanıklı olması özelliğinden ötürü, sıvılaştırma aşamasında tercih edilmektedir.

Bacillus licheniformis'ten elde edilen diğer enzimler ve bazı metabolitler aşağıda verilmiştir:

Gümüş nano-kristalleri (Kalimunthu ve ark. 2008), β -lactamase BS3 (Beck ve ark. 2008), ksilanaz (Liu ve Liu 2008), endoglukanaz (Bischoff ve ark. 2007), elastaz (Qihe ve ark. 2007), laktik asit (Sakai ve Yamanami 2006).

1.8 Katı Faz Fermantasyonu (SSF, Solid-State Fermentation)

SSF SmF'e alternatif bir sistem olarak son yıllarda geliştirilmiş bir yöntemdir. SSF katı substratlar içeren, suyun olmadığı veya az olduğu ortamda fermantasyon

olarak adlandırılır. SSF ortamı suyun olmadığı veya az olduğu çözünmeyen katı substratların bulunduğu ortamda mikroorganizmaların doğal ortamlarına benzer büyüme göstermelerini sağlar (Mitchell ve ark. 2002; Pandey ve ark. 2003). SSF tekniği ile yiyecekler, enzimler, organik asit ve tatlandırıcı içeren diğer ekstraselüler metabolitler elde edilmektedir (Pandey ve ark. 2000a).

SSF eski zamanlardan beri bilinen ve mantarlar kullanılarak yiyecek üretiminde uygulanan bir işlemdir. 5000 yıl önce mantarlar kullanılarak SSF ile yiyecek elde edilmiştir. Belki de en eski bilinen fermantasyon *Aspergillus oryzae* kullanarak pirinçten koji elde etmedir. 4000 yıl önce peynir üretiminde *Penicillium* kullanarak farklı aromalar elde edilmiştir. 3000 yıl önce Çin ve Mısırdaki soya sosu ve ekmek yapımında SSF kullanılmıştır (Pandey 2000). SSF'in biyoteknolojik kullanımı yaygındır (Raimbault ve ark. 1998). SSF'in biyoteknolojide kullanımı ile ilgili olarak son yıllarda önemli çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sekonder metabolitler (Balakrishnan ve Pandey 1996; Robinson ve ark. 2001), alfatoksinler (Barrios-Gonzales ve Tomasini 1996) teknik enzimler (Pandey ve ark. 1999) bakteriyel enzimler (Babu ve Satyanarayana 1996), nişastayı şekerleyen enzimler (Selvakumar ve ark. 1998), selüloz (Cen ve Xia 1999), selülitik enzimler (Nigam ve Singh 1996b), Çin yiyecekleri (Han ve ark. 2001), lignoselülozun biyolojik dönüşümü (Tendery ve Szackas 2003), mantar yetiştirme ve doğal tatlandırma (Nigam ve Singh 1996a) ürünlerinin elde edildiği bildirilmiştir.

Çin'de yaygın olarak şarap, soya sosu ve asidik içecekler üretiminde SSF tekniği kullanılmıştır (Chen,1992). Japonya'da ticari enzim üretiminde SSF tekniği

yaygın olarak kullanılmaktadır (**Suryanarayan 2003**). Yine 1982'den beri Brezilya'da tropik tarımsal atıklar SSF'te kullanılarak çok değerli araştırmalar yapılmıştır (**Soccol Vandenberghe, 2003**). Böylece etanol, küçük hücresel proteinler, mantarlar, enzimler, organik asitler, aminoasitler ve biyolojik aktiviteye sahip sekonder metabolitler elde edilmiştir (**Pandey ve ark. 2000b; Vandenberghe, ve ark. 2000; Hlker ve ark. 2004**).

Mantarlar, morfolojileri koloni kurmalarına ve katı substratların içine nüfuz etmelerine olanak tanıdığı için SSF'te uygun mikroorganizmalardır (**Sandhya ve ark. 2005**). SSF'in genellikle mantarların bulunduğu ortamda daha iyi sonuçlar verdiği bilinmektedir. Bakterilerin ise daha yüksek su aktivitesi gereksinimlerinden dolayı SSF için uygun olmadığı dşnlmekteydi. Bundan dolayı bakteriler genellikle SmF ortamında kullanılırlar. Fakat birçok doğal fermantasyon ortamında SSF tekniği ile bakteriler kullanılarak başarılı büyüme sonuçları ve α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir (**Babu ve Satyanarayana 1995; Baysal ve ark. 2003; Kashyap ve ark. 2003**).

SSF teknolojisi pirinç, buğday, soya, tropikal bitkiler gibi düşük nem içeren katı substratlarla kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda glukoamilaz (**Ishida ve ark. 2000**) ve biyokontrol mantar sporlarının (**de Vrije ve ark. 2001**) sadece SSF koşulları ile üretildiği iddia edilmektedir. SSF'te amilaz ve proteaz gibi enzimler SmF'e oranla daha yüksek ürün vermektedir (**Lambert 1983; Lekha ve ark. 1994**).

SSF yüzyıllardır yiyecek üretim sürecinde başarıyla uygulandığı bilinen bir metoddur. Son yıllarda mikrobiyal enzimlerin üretimi bazı ekonomik avantajlarından dolayı yaygın olarak SmF ile üretilmektedir. SSF ile ilgili son zamanlarda bazı temel

kimyasal ürünler (**Vanderberghe ve ark. 2000; Roukas 1999; Nagampoothiri ve ark. 1996**), enzimler (**Adreas ve ark. 1999; Selvekumar ve Pandey 1999; Surash ve ark. 1999**), antibiyotikler (**Kota ve ark. 1999**), vb. ürünlerin elde edildiği ile ilgili çeşitli raporlar bulunmaktadır.

Mikrobiyal büyüme için substrat parça büyüklüğü, partikül seviyesi ve su aktivitesi oldukça önemlidir (**Barrios ve ark. 1993; Liu ve Tzeng, 1999**). Genellikle küçük substrat partikülleri mikrobiyal büyüme için geniş bir yüzey alanı sağlar. Ama eğer partikül büyüklüğü çok küçükse substratın topaklanmasına sebep olacağından büyümeyi sınırlar. Buna karşın; daha büyük partiküller daha iyi havalandırma ortamı sağlamalarına karşın mikrobiyal büyümeyi yavaşlatırlar. Dolayısıyla uygun partiküllerin seçimi SSF için çok önemlidir (**Pandey ve ark. 1999**).

Mikroorganizmaların katı substrat içine yayılması daha yavaştır. Mikroorganizmalar yiyecek ve alkol endüstrisinde büyük bir öneme sahiptirler. Buna ek olarak yiyeceklere tat verme, koruma, renklendirme ve antioksidan gibi ürünlerin endüstrisinde de mikrobiyal fermantasyon ürünleri kullanılır. Mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünler kimyasal olarak üretilen sentetik ürünlerden daha kullanışlıdır (**Hesseltine, 1977; Soccol ve ark. 1994; Pandey, ve ark. 1999a**).

Son yıllarda enzim, tatlandırıcı renklendirici ve diğer yiyecek endüstrisi ihtiyaçlarından dolayı SSF çok daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. SSF, daha yüksek ürün verimi daha karakteristik ürün elde edilmesinden dolayı SmF e oranla tercih edilmektedir (**Acuna ve ark. 1995**).

SSF tarımsal atıkların mikrobiyolojik süreçte tekrar kullanımını sağlar. Ülkelerde çok büyük ölçüde tarımsal atıkların SSF'te kullanılması daha ucuz

hammadde ve daha az atık ürün oluşmasını sağlayabilir. Bu süreçte katı substratlar sadece besin kaynağı olarak değil, aynı zamanda mikrobiyal hücrelerin tutunma kaynağı olarakta iş yaparlar. SSF sürecinde oldukça ucuz hammadde kullanımı esastır. Dolayısıyla SSF’te kesinlikle doğal zengin katı atık içeren besinlerin kullanımı gereklidir. Yüksek karbonhidrat ve diğer besin içeren tarımsal atıkların substrat olarak kullanılmasıyla enzimler ve yüksek kaliteli kimyasal ürünler elde edilir.

Son yıllarda yapılan yayınlarda SSF ile SmF’in kıyaslanması yapılmış ve avantaj-dezavantaj karşılaştırılması yapılmıştır. SSF, SmF’e oranla daha yüksek üretim kapasitesi, daha az katabolik atık, daha iyi aktivite, basit teknik, düşük sermaye, daha az enerji gereksinimi, daha az su gereksinimi, daha iyi ürün elde etme ve dolayısıyla daha az steril ortam isteğinden dolayı daha çok tercih edilmektedir. SSF’in en büyük avantajı ise tarımsal ve yiyecek endüstrisinde kullanılan kolay elde edilebilir substratlara sahip olmasıdır (**Stredansky ve ark. 1999**).

SSF ve SmF kıyaslandığında SSF çok fazla avantaja sahiptir. Örneğin daha kolay olması, daha yüksek aktivite, daha düşük maliyet, daha az enerji ve daha az atık su vb. özellikler SSF’i daha avantajlı kılmaktadır (**Carrizales ve Jaffe 1986**). Aşırı enzim üretim potansiyelinin oluşmasıyla SSF son yıllarda çeşitli tarımsal kaynaklardan atılan atıklar kullanılarak yapılmaya başlanmıştır (**Sangeetha 2004**). SSF sürecinde optimum ortam koşullarının oluşturulması çok önemlidir.

Fiyat ve ulaşılabilirlik önemli ölçütlerdir ve dolayısıyla SSF sürecinde önemli rol oynarlar. SSF genellikle daha basit süreç gerektirir ve SmF’ten daha az

enerji ihtiyacı vardır. SSF'in avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılması Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1.2. SSF'in avantajları ve dezavantajları

<u>SSF'in avantajları</u>	<u>SSF'in dezavantajları</u>
Düşük maliyet	pH, sıcaklık, nem, besin miktarı gibi parametrelerin kontrol güçlüğü
Daha yüksek üretim kapasitesi	Reaksiyon dengelenmesinin güçlüğü
Daha iyi oksijen sirkülasyonu	Etkin karışım düşüklüğü
Daha düşük efor harcanması	Sıcaklık artış problemi
Enerji ve maliyetin azaltılması	Daha yüksek saf olmayan kirli maddelerin üretimi
Basit teknoloji	
DeneySEL problemlerin az olması	
Doğal yaşam ortamı olması	

SSF genellikle katı substratların bulunduğu farklı miktarda su bulunan ortamda büyümeleridir. Katı substratlar karbon, azot, mineral ve büyüme için gerekli maddeleri içerirler. Aynı zamanda mikrobiyal büyüme için suyu emme yeteneğine sahiptirler. SSF ortamında üretilen mikroorganizmalar kendi doğal habitatlarındakine

benzer büyüme gösterirler ve SmF'ten daha etkili metabolitler ve mikroorganizmalar üretebilirler (**Han B. Ve ark. 1999; Pandey A. 2003; Goes ve Sheppard 1999**).

Ucuz tarımsal ve endüstriyel kaynaklar SSF'te substrat olarak kullanılarak dünyamızda daha zengin kaynakların bulunmasına olanak sağlayabilir. Bu katı substratlar doğadaki en iyi karbon kaynaklarıdır (**Francis ve ark. 2003**). SSF'teki katı substratlar yalnızca kültür ortamı değil aynı zamanda mikrobiyal büyüme için hücrelerin tutunma alanıdır (**Baysal ve ark. 2003**).

SSF'te karışım ve konsantrasyon oranları mikroorganizmalardan elde edilen ekstraselüler enzim üretimi ve büyümeyi önemli ölçüde arttırmalar. Maliyet ve ulaşılabilirlik önemli ölçütlerdir ve dolayısıyla SSF'in etkisinin gelişmesinde önemli rol oynarlar (**Elibol ve Moreira 2005**).

SSF'in amacı çözünmeyen katı substratların bulunduğu ortamda fermentasyonu yüksek oranda başarmaktır. SmF'e kıyasla birçok ekonomik ve ekolojik önemi bulunmaktadır. Buna rağmen SSF'in bazı küçük dezavantajları bulunmaktadır. Ne yazık ki SSF daha yavaş işleyen bir süreçtir Suyun az olduğu ortamda kültür ortamının nemini ayarlamak, sıcaklık ve pH gibi etkenlerin ayarlanma zorluğu, oksijen konsantrasyonu gibi etmenler SSF'i sınırlandıran güçlüklerdir. SSF'in avantajlarını, sonucunu ve bu problemlerin çözümü Tablo 1.3'te verilmiştir.

Tablo 1.3. SSF'in SmF'e göre Biyoteknolojik avantajları, Sonuç ve Problemin çözümü*

<u>Avantajları</u>	<u>Sonucu</u>	<u>Problemin çözümü</u>
Düşük su isteği	Daha az su kullanımı	Nem miktarının düzenlenmesi
Üretim sonunda yüksek konsantrasyon	Daha düşük maliyet	
Yıkım ürünlerinin baskılanmasını önemli ölçüde azaltma	Glukoz varlığında mayalanma	
Katı ürünlerden faydalanma	Yüksek oranda substrat büyümesi	Substrat miktarının düzenlenmesi
Daha düşük sterilizasyon isteği		pH miktarının düzenlenmesi
Mikroorganizmalar için katı destek	Mikroorganizmalar için karışık kültür ortamı	
Doğal çevreye benzerlik	Mikroorganizmaların daha iyi performans göstermesi	
Çözünmez katı substratlarda fermantasyon olanağı	Metabolik performansın artması	
Mikroorganizmalar için karma ortam		
Yüksek oranda üretim	Daha az mikroorganizma gereksinimi	
Sıcaklık için daha az enerji isteği		Sıcaklık miktarının düzenlenmesi
Kolay havalanma		Oksijen miktarının düzenlenmesi
Kullanılmayan diğer karbon kaynaklarından yararlanma	Daha ucuz ve bol karbon kaynakları	

***(Hölker ve ark. 2004)**

SSF sürecinde yaygın olarak kullanılan katı substratlar, ürünler ve mikroorganizmalarla ilgili bazı bilgiler Tablo 1,4'te verilmiştir.

Tablo 1.4. SSF’te kullanılan substratlar, mikroorganizmalar ve üretilen ürünler

Substrat	Üretim	Mikroorganizma	Referans
Badem unu	Lipaz	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Ul-Haq ve ark. (2002)
Elma püresi	Boya ayrışımı	Beyaz mantar	Robinson ve ark.(2002)
Pirinç kabuğu	Lignolitik enzimler	<i>Pleurotus</i> sp.	Reddy ve ark. (2003)
Piliç maddesi	Biyokontrol ajanı	<i>Bacillus thuringient</i>	Adams ve ark.(2002)
Kakao jeli	galaktorunaz	<i>Peacilomyces</i> sp.	Souza ve ark. (2003)
Soya fasulyesi	Aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>	Christen ve ark. (2000)
Hindistan cevizi	Lipaz	<i>Candida rugosa</i>	Benjamin ve ark. (1997)
Kahve atığı	Yenilen mantar	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fan ve ark. (2000)
Mısır koçanı	Selülitik enzim	<i>Fusarium oxysporum</i>	Panagiotu ve ark. (2003)
Okaliptus	Ksilanaz	<i>Streptomyces</i> sp.	Beg ve ark. (2000)
Sert nohut	Tempeh	<i>Aspergillus</i> sp.	Reyes ve ark.(2000)
Portakal küspesi	Pektinaz	<i>Thermoascus</i> sp.	Martins ve ark.(2002)
Ananas	Sitrik asit	<i>Aspergillus niger</i>	Kumar ve ark. (2003)
Kauçuk	Geri dönüşüm	<i>Gordonia</i> sp.	Arenskötter (2003)
Soya atığı	Proteaz	<i>Penicillum</i> sp.	Germano ve ark. (2003)

SSF ortamında bakteriler kullanılarak proteaz üretimi ile ilgili çok az literatür bulunmaktadır. Endüstriyel kullanımda alkalın proteaz daha çok SmF ile üretilir (**Kumar ve ark. 1999**). SSF ile alkalın proteaz üretimi daha az su isteği ve katı substratların kullanılarak maliyetin azaltılmasından dolayı SmF’e kıyasla daha ekonomik ve daha ekolojiktir (**Dayanandan ve ark.2003; Pandey ve ark. 2000a**).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Krishna ve ark. (1996), SSF yöntemiyle pirinç sapını substrat olarak kullanarak *Bacillus subtilis* CBTK 106'dan α -amilaz üretmişlerdir. Yaptıkları çalışmada substrat parça büyüklüğünün, SSF ortamının pH'sını, başlangıç nem oranının, inkübasyon sıcaklığının, ortama eklenen karbon ve azot kaynaklarının α -amilaz enzim üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. En uygun parçacık büyüklüğü olarak 400 μ m, en uygun başlangıç nem seviyesini %70, en uygun inkübasyon sıcaklığı olarak 35°C, uygun pH olarak 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Azot kaynağı olarak %1'lik amonyum nitrat ve amonyum sülfat ve %0.5'lik et özütü veya peptonun enzim sentezini uyardığını belirlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak %0.1'lik nişasta, maltoz, glukoz ve sükrozun enzim sentezini uyardığını belirlemişlerdir. Ayrıca %1'lik NaCl ve KCl'nin enzim sentezini arttırdığını belirlemişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 24. saatte elde etmişlerdir.

Hamilton ve ark. (1999), *Bacillus sp.* IMD 435'de α -amilaz üretimini çalışmışlardır. Maksimum amilaz üretimini karbon kaynağı olarak %4'lük laktoz ve azot kaynağı olarak da %2'lik yeast ekstrakt ihtiva eden besiyerinde elde etmişlerdir. Laktozlu ortamda amilaz üretimi fazla olmasına rağmen bakteri üretiminin az olduğu görülmüştür. Glukoz ve fruktoz ihtiva eden besiyerinde amilaz aktivitesinin görülmediğini rapor etmişlerdir.

Mulimani ve ark. (2000), SSF yöntemiyle değişik substratlar kullanarak *Gibberella fujikuroi*'den α -amilaz üretmişlerdir. En yüksek α -amilaz aktivitesini buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı ortamda elde etmişlerdir. Ayrıca pirinç sapı ve pirinç kabuğu kullanarak oluşturulan ortamda da α -amilaz elde etmişlerdir.

Bunların karışımlarından elde edilen enzim aktivitesinin tek tek elde edilen aktiviteden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. %1'lik karbon kaynakları ilavesinde en yüksek aktiviteyi laktozlu ortamda elde etmişlerdir. %2.5'lük azot kaynakları ilavesinde en yüksek aktiviteyi amonyum sülfatlı ortamda elde etmişlerdir.

Sookheo ve ark. (2000), *Bacillus stearothermophilus* tarafından üretilen üç ekstraselüler proteaz enziminin optimum aktivite sıcaklıklarını 70°C, 85°C ve 90°C olarak belirlemişlerdir. Optimum pH 7.0 olarak belirlenmiş olup enzim aktivitesini 5 mM CaCl₂'nin arttırdığını ve EDTA'nın ise inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Cordeiro ve ark. (2002), termofilik *Bacillus* sp.'den α -amilaz üretimini 48. saatte ve enzim aktivitesinin optimum sıcaklığını 70°C olarak tespit etmişlerdir. Optimum pH 7.5 olarak tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisini araştırarak Cu²⁺, Co²⁺ ve Ba²⁺'nin inhibisyonun Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ni²⁺ ve Mn²⁺'den daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Hawumba ve Broze (2002), Kuzey Uganda'da sıcak su kaynaklarından *Geobacillus* cinsi bakterileri izole ederek proteaz üreten üretilmediklerini araştırmışlardır. Bakterilerin optimum üreme koşullarının 60–62 °C ve pH'nın ise 7.5–8.5 olduğunu belirlemişlerdir.

Elliah ve ark. (2002), SSF yoluyla, mısır kepeği, mısır unu, arpa unu, soya unu, yeşil nohut kepeği ve pirinç kabuğu gibi değişik katı substratlar kullanıldığında; *Aspergillus* sp.'den glukoamilaz aktivitesinin en yüksek buğday kepeğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ul-Haq ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada; *Bacillus licheniformis* tarafından α -amilazın üretimi için yeni ortamların seçilmesine yönelik araştırmalar yapmışlardır. Araştırmacılar, α -amilazın üretimi için buğday kepeği, ayçiçeği unu, pamuk tohumu, soya unu, pirinç kabuğu gibi farklı tarımsal yan ürünleri test etmişlerdir. Test edilen tarımsal yan ürünler arasında buğday kepeğinin α -amilazın optimum üretimi için en iyi temel ve standardize edilmiş ortam olduğunu bulmuşlardır. Çözünür nişasta yerine, %1 oranında darı nişastası kullanıldığında ve nutrient broth konsantrasyonunun %1'den %0.5'e düşürüldüğünde üretimin iki kat arttığını tespit etmişlerdir. Bu yeni seçtikleri fermantasyon ortamının içeriğini 100 ml fosfat tamponu içerisinde %1.25 buğday kepeği, %0.5 nutrient broth, %1.0 darı nişastası, %0.5 laktoz, %0.5 NaCl ve 0.2 CaCl₂ olarak tanımlamışlardır.

Beg ve Gupta (2003), *Bacillus mojavensis* tarafından üretilen serin alkalın proteaz enzim aktivitesinin optimum sıcaklığını 60°C optimum pH'nın 8 olduğunu belirlemişlerdir. Cu²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının varlığında ise aktivitenin %36 oranında arttığını PMSF varlığında ise enzimin inhibe olduğunu belirlemişlerdir.

Soni ve ark. (2003), SSF yöntemiyle buğday kepeği kullanarak *Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp.'den α -amilaz aktivitesine bakmışlardır. Enzim aktivitesinin optimum 50°C'de ve pH 6'da olduğunu tespit etmişlerdir.

Kıran ve ark. (2003), Su ve topraktan 65 *Bacillus* suşu izole ederek bunların α -amilaz üretme yeteneklerini araştırmış ve en iyi aktivite gösteren suşun pH 9.5 ve 42°C'de optimize edildiğini belirtmiştir.

Baysal ve ark. (2003), buğday kepeği ve pirinç kabuğu üzerinde termotoleran *Bacillus subtilis*'i kullanarak SSF yoluyla α -amilaz üretimini

göstermişlerdir. Buğday kepeğinde, pirinç kabuğuna nazaran daha yüksek bir aktivite gözlemlenmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 24. saatte elde etmişlerdir.

Ghorbel ve ark. (2003) *Bacillus* tarafından üretilen proteazın optimum aktivite sıcaklığının 60°C, optimum pH'nın 8 olduğunu belirlemişlerdir. Ca²⁺ iyonlarının aktiviteyi arttırdığı Mg²⁺, Zn²⁺ iyonlarının inhibitör etki yaptığı, EDTA bulunan ortamda ise aktivitesini tamamen yitirdiğini belirlemişlerdir.

Ramachandra ve ark. (2004), COC (Coconut oil cake) substrat olarak kullanılarak *Aspergillus oryzae* tarafından α -amilaz üretimini rapor etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesini 30°C 'de 72. saatte yakalamışlardır. Yine bu çalışmada, ortama %2 oranında karbon kaynakları eklenmiş, nişasta ve glukozda kontrol grubuna göre daha yüksek çıktığı görülmüştür. Bununla birlikte maltozda enzim aktivitesinde düşme olduğu görülmüş ve sukrozun enzim aktivitesinde hiçbir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Eklenen %1'lik konsantrasyondaki azot kaynaklarından en yüksek artış peptonda görülmüş, en düşük enzim aktivitesi sodyum nitratta gözlemlenmiştir.

Apar ve Özbek (2004), yaptıkları çalışmada mısır, pirinç ve buğday nişastasının enzimatik hidrolizi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Bu nişastaların hidrolizi için *Bacillus* sp., *Aspergillus oryzae* ve *Bacillus licheniformis*'den sağlanan üç ticari α -amilazı kullanmışlardır. Her bir nişasta hidroliz işlemi için çalkalamalı yatak reaktöründe zamana bağlı olarak 50 ve 60°C'de kalan nişasta konsantrasyonu ve α -amilaz aktivitesini belirlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda kullanılan her bir enzim için hidroliz esnasında enzim stabilitesi ve

sıcaklık arasındaki ilişkinin anlaşılması için bazı inaktivasyon modellerini de test etmişlerdir.

Bahçeci (2004) Tuz Gölü'nden izole edilen bakterilerin endüstriyel öneme sahip ksilanaz, selüloz, α -amilaz ve proteaz enzimlerini üretilip üretilmediğini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Elde edilen izolatların birinin *Bacillus pumilis*, iki izolatın *Bacillus subtilis* ve geriye kalanların *Bacillus licheniformis* olduğunu tespit etmişlerdir. Bu izolatların önemli ölçüde amilaz ve proteaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Enzimlerin optimum aktivite sıcaklıkları 60–80°C ve optimum pH 7.0–8.0 olarak belirlenmiştir. Amilaz enziminin 80°C ve pH 9'a kadar stabilite gösterdiği diğer bütün izolatların önemli ölçüde proteaz enzimi ürettikleri görülmüştür. Proteaz enziminin optimum aktivite sıcaklıkları 50–60°C ve optimum pH 7.0–7.4 olarak belirlenmiştir. Proteaz enziminin 80°C ve pH 9'a kadar stabilite gösterdiği belirlenmiştir.

Uyar ve ark. (2004) *Bacillus* sp. kullanarak SSF tekniği ile mercimek kabuğu ve buğday kepeği bulunan ortamda alkalın proteaz aktivitesi incelemiştir. Buğday kepeğinin substrat kullanıldığı SSF'li besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi belirlenmiştir. Maksimum ürün olarak 429.041 ve 168.640 U/g olarak buğday kepeğinin ve mercimek kabuğunun substrat olarak kullanıldığı ortamlarda pH; 10'da ve %40' luk kepek miktarı 24. saatte belirlenmiştir. İnokülüm hacmi %20 olarak rapor edilmiştir.

Agrawal ve ark. (2005) Topraktan izole edilen *Beauveria feline*'da soya proteinini hidrolizleyen alkalın proteaz aktivitesini, alkalın proteaz üreticisi olarak bilinen *Aspergillus oryzae* NCIM 649 ile karşılaştırmışlardır. SSF ortamında alkalın

proteaza etki eden parametreleri inceleyerek, *Beauveria feline*'da buğday unu kullanarak 7 gün boyunca inkübasyona bırakılan ortamda maksimum enzim aktivitesi olarak 20.000 U/g olarak tespit edilmiştir. Başlangıç nem oranı olarak %120 ve Optimum pH olarak 7.0 tespit edilmiştir. *Aspergillus oryzae* NCIM 649, *Beauveria feline*'ya oranla iki kat daha fazla alkalın proteaz ürettiği tespit edilmiştir.

Aijun ve ark., (2005), *B.pumilus* AS 1.1625 tarafından alkalın proteaz üretimi için hava basıncı titreşimini uygulamışlardır. Hava basıncı titreşiminin genişliği 0.10 MPa olduğunda hava basıncı titreşiminin periyodu %65'lik nem seviyesi ile 1 saat'lik bir süreçte ve APPSSF (Air pressure pulsation SSF) tarafından elde edilen enzim ürünü 860 U/ml, 4300 U/g buğday kepeği olarak bulmuşlardır. Bu değer statik SSF ile elde edilen değerlerden iki kat daha fazla olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar hava basınç titreşiminin aynı zamanda statik SSF'deki yüksek nem seviyesi ve artmış yatak derinliğinden kaynaklanan problemlerin de üstesinden geldiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlarda hava basınç titreşiminin SSF esnasındaki sıcaklık ve kütle transferini arttırmak için etkin ve geniş çapta uygulanabilir olduğunu tespit etmişlerdir.

Elibol ve Moreira (2005), SSF koşulları altında *Teredinobacter turnirae* ekstra sellüler alkalın proteaz üretimini optimize etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada soyaı karbon ve/veya azot kaynağı olarak kullanmışlardır. Maksimum proteaz üretimi (1950 U/ml) soyanın 2 mm'lik iri boyut, w/v %1'lik soya konsantrasyonunda, pH 7.34'de ekim oranı v/v % 2.5 ve 120 rpm çalkalama oranda gerçekleştirilmiştir. Bu işlem parametrelerinin optimizasyonundan sonra %60 daha fazla üretimin gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Kıran ve ark. (2005) *Bacillus* sp K-12'nin amilaz üretimi üzerine çeşitli kimyasallar ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Toprakta izole edilen *Bacillus* sp K-12 suşu kullanılarak 20–55 °C sıcaklıkları arasında optimum sıcaklık olarak 42°C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini araştırmak için 4.5 ile 10.5 arasında değişen enzim aktiviteleri bulmuşlardır. Karbon kaynağı olarak %1 nişasta içeren ortamda maksimum amilaz üretimi elde edilmiştir. EDTA, MgSO₄ ve ZnSO₄ kullanımında amilaz enzim üretiminin inhibe edildiğini bulmuşlardır.

Rahardjo ve ark. (2005), Katı substrat fermantasyonunda fungal yapıdaki oksijen transferinin temel bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Misel tabakası içerisinde oksijen geçişinin difüzyon sınırlamasıyla engellendiği belirtmişlerdir. *A. oryzae* gibi aerobik funguslar için oksijenin tükenmesi gelişmeyi ve metabolit üretimini sınırlayan bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada oksijen konsantrasyonunun bireysel hif seviyesinde, koloni seviyesinde, bir sonraki kültür seviyesinde ve bu kültür seviyesindeki α -amilaz üretimi ile gelişim üzerine düşük oksijen konsantrasyonlarının etkilerini tanımlamışlardır. Araştırmacılar patates dekstroz agar (PDA) ortamında hif gelişimi oranı, hifin dallanma sıklığı ve *A. oryzae* kolonilerinin radyal genişleme oranı üzerine düşük oksijen konsantrasyonlarının etkilerini çalışmışlardır. (v/v) %0.25 oksijen koşulları altında α -amilaz'ın spesifik üretiminin azaldığını bulmuşlardır.

Hashim ve ark., (2005), Kenya'daki Bogoria Gölünden izole ettikleri *Bacillus halodurans* LBK 34'ün bir maltozhekos oluşturan α -amilaz Amy 34 kodlayan geni klonlayarak sekans analizini yapmışlardır. Olgun peptidin teorik

olarak 107.2 kDalton moleküler ağırlığa ve 4.41 pI değerine sahip 958 amino asitten oluştuğunu bulmuşlardır. Geni *E.coli*'de klonlayarak oluşan rekombinant enzimi metal şelat affinitesi ve boyut farkı kromatografisinin bir kombinasyonunu kullanarak saflaştırmışlardır. Saf enzimin optimum aktivitesinin 60°C de ve pH 10.5 ile 11.5 arasında olduğunu göstermişlerdir. Enzimi 4 saat boyunca 55°C'de inkübe ettikten sonra aktiviteyi %60'ın üzerinde tekrar elde edebilmişlerdir. pH 9'da oldukça stabil olduğunu görmüşlerdir. Enzim bütünüyle inhibisyonunun 5 mM Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺ ve 5 mM EDTA varlığında gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Araştırmacılar enzimin (w/v) %1 SDS varlığında orijinal aktivitesini %80'ini gösterdiğini ve 5 mM DDT konsantrasyonu varlığına kadar stabilitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Maltoheksos (G6) nişasta hidrolizinin temel birincil ürünü olduğunu ve diğer ürünlerin ise G4>G2>G5>G3 ve G1 sırasına göre oluştuğunu görmüşlerdir. Amiloz üzerine enzim aktivitesinin temel son ürün olan amilopektin ve maltodekstrinin maltotetroz olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar maltotetraozun enzim ile hidrolize edilebilen en küçük α (1-4) ile bağlı maltooligosakkarikkarit olduğunu göstermişlerdir.

Kunamneni ve ark. (2005) SSF ortamında termofilik fungus olan *Thermomyces lanuginosus* kullanarak ekstra selüler amilaz üretimi çalışmışlardır. Katı substrat olarak buğday kepeği, melas kepeği, pirinç kabuğu, mısır yemi, darı, buğday, arpa, ezilmiş mısır, ezilmiş buğday kullanılmıştır. En yüksek amilaz aktivitesi buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı ortamdan elde edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 120. saatte, 50°C'de, pH 6.0'da %10'luk inokülüm hacmi, tuz konsantrasyonu 1.5:10 ve %90 nem oranında 534 U/g olarak

belirlenmiştir. Ayrıca substrat ağırlık hacim oranı 1:100 ve çözünen nişasta %1'lik olarak belirlenmiştir.

Sandhya ve ark. (2005) Tarımsal endüstriyel atıklar kullanarak nötral proteaz üretiminin SmF ile karşılaştırılmasını yapmışlardır. *Aspergillus oryzae*'nin 3 ırkı, *Penicillium*'un 4 ırkı olan *P. sp.*, *P. funiculosum*, *P. pirophillum*, *P. aculeatum* kullanarak proteaz üretimleri karşılaştırılmıştır. Buğday kepeği, pirinç kabuğu, Hindistan cevizi küspesi, susam yağı küspesi, bira yapımında ortaya çıkan atıklar ve palmye küspesi gibi tarımsal ve endüstriyel atıklar kullanılarak SSF ortamı hazırlanmış ve üretilen enzim SmF'te üretilen enzimle karşılaştırılmıştır. Bu sistemde en iyi substrat kaynağı olarak buğday kepeği belirlenmiştir. SSF'te başlangıç nem seviyesi olarak optimum %43.6, en iyi aktivite sıcaklığı 30°C, optimum pH 7.5, süre olarak'ta 72. saat olarak belirlenmiştir. SmF'te optimum pH 7.5 ve %2 buğday kepeği ve 3 ml spor süspansiyonu kullanarak 30°C'de 180 rpm' de 72. saatte maksimum enzim verimi 8.7 U/gds olarak belirlenmiştir. Bu iki fermantasyon sisteminin karşılaştırılması göstermiştir ki SSF yöntemiyle 3.5 kat daha fazla enzim üretilmiştir.

Ertan ve ark. (2006) SSF tekniği ile *Penicillium graveofolium* kullanılarak α -amilaz elde etmişlerdir. α -Amilaz üretiminde pH'nın etkisi substrat konsantrasyonu, işlemsel ve dayanıklılık kabiliyeti gibi faktörlere bakılarak nişastanın hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. Optimum pH olarak 5.5 ve optimum sıcaklık olarak 40°C olarak belirlenmiştir. İmmobilize edilen enzimin verimlilik oranı olarak %87.6'lık bir oran bulunmuştur. Hidroliz kabiliyeti serbest enzimin %99.3, immobilize edilen enzimin ise %97.9 olarak belirlenmiştir.

Asgher ve ark. (2007) *Bacillus subtilis*'ten nişasta sürecinde kullanılmak üzere termostabil amilaz elde etmişlerdir. Maksimum enzim üretimi 48. saatte, pH 7.0'da ve 50 °C'de 72 U/ml olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesini Ca²⁺ iyonlarının arttırdığını, Co²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ iyonlarını enzim aktivitesinin tamamen inhibe ettiklerini bulmuşlardır. Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının enzim aktivitesini kısmen inhibe ettikleri görülmüştür.

Ertan ve ark. (2007) SSF ortamında ile *Aspergillus sclerotiorum* kullanılarak α-amilaz elde etmişlerdir. Enzim immobilizasyonu üzerine CaCl₂ konsantrasyonu, yüklenen enzim miktarı, tanecik boyu, tanecik miktarı, alginat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Optimum alginat ve CaCl₂ konsantrasyonu olarak %3'lük konsantrasyon oranı bulunmuştur. Yüklenen enzim konsantrasyonu 140 Uml⁻¹ ve tanecik miktarı 0.5 g olarak belirlenmiştir.

Öztürk (2007) yaptığı çalışmada Van Gölü'nden izole edilen *B. licheniformis* BA17'den alkalın proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu araştırmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 19.7 kDa, Ca²⁺ iyonu varlığında ve yokluğunda optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunmuştur.

Arulmani ve ark. (2007) *Bacillus laterosporus*'dan serin proteaz enziminin kısmi saflaştırmasını ve karakterizasyonu üzerine çalışmalar yaparak enzimin optimum 75°C ve pH 9'da aktivite gösterdiğini, PMSF ile inhibe olduğunu Mg²⁺, Ca²⁺ iyonlarının varlığında ise aktivitenin arttığını belirlemişlerdir.

Merheb ve ark. (2007) Termofilik fungus olan *Thermoascus aurantiacus* kullanılarak SSF yöntemiyle yeni proteaz üretimi çalışmışlardır. Enzim optimal

olarak pH 5,5'te ve 60°C'de en iyi aktiviteyi vermiştir. Enzim 1 saat boyunca 60°C'de ve pH aralığı 3.0-9.5 aralığında stabilitesini korumuştur.

Tanyıldızı ve ark. (2007) *B. amyloliquefaciens* kullanarak çalkalamalı kültür ortamında α -amilaz üretmişlerdir. Maksimum α -amilaz aktivitesi mısır gluten unu bulunan ortamda 30 g/l, yeast extract 10 g/l, çökeltme oranı 150 rpm ve fermantasyon sıcaklığı olarak 33 °C olarak belirlenmiştir. Bu bulgulara göre fermantasyon sıcaklığının α -amilaz üretiminde önemli faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Mısır gluten unu bulunan kültür ortamı nişasta ve diğer karışımları içeren ortamlara göre 5 kat daha fazla α -amilaz ürettiği belirlenmiştir

Baysal ve ark. (2008) *Bacillus* sp. kullanarak SSF tekniği ile mercimek kabuğu ve buğday kepeği bulunan ortamda amilaz aktivitesini incelemişlerdir. Mercimek kabuklarının kullanıldığı SSF'li besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi belirlenmiştir. Maksimum ürün olarak 216,000 ve 172,800 U/g olarak mercimek ve buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı ortamlarda pH; 10'da ve %30' luk kepek miktarı 24. saatte belirlenmiştir. İnokülüm hacmi %20 olarak rapor edilmiştir.

Xu ve ark. (2008) bira sanayiinde kullanılan arpa atık ürünleri ile SSF'te *Aspergillus oryzae* AS 3951 tarafından alfa amilaz üretimi için ucuz bir substrat ve katı destek kullanılarak aynı zamanda Placket-Burman Dizaynı (PBD) ve Box-Behnken Dizaynı (BBD) temel alınarak yüzey yanıt metodolojisi (RSM) kullanılarak besin seviyelerinin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İlk optimizasyon aşamasında ilişkili faktörlerin etkilerini ortaya koymak için bir PBD kullanmışlardır. Demlenmiş mısır likörü CaCl₂, ve MgSO₄ SBG substratına en uygun katı maddeleri olduklarını ve α -amilaz aktivitesi pozitif bir etkide bulduklarını tespit etmişlerdir.

Optimizasyonun ikinci basamağında bu üç besinin konsantrasyonlarının bir BBD kullanarak optimize etmişlerdir. RSM ile optimize edilen ortamlar son konsantrasyonlar (g/g kuru substrat) %1.8 demlenmiş mısır likörü, % 0.22 CaCl₂ ve % 0.2 MgSO₄.7H₂O katı substrat olarak kullanılmıştır. Ortalama α-amilaz aktivitesinin 96 saat sonra 30°C'de optimize edilen koşullar altında 6186 U_g⁻¹'e ulaştığını belirlemişlerdir. SSF'in optimize edilen koşulları altında enzim üretiminde yaklaşık %17.5'lik bir artışı tespit etmişlerdir.

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

Narayana ve ark. (2008) topraktan ve kültür ortamından izole edilen *Streptomyces albidoflavus*'tan SmF yöntemiyle α -amilaz elde etmişlerdir. Optimum amilaz üretim süresi olarak 84. saate ve pH 6.5 olarak tespit edilmiştir. Optimum aktivite sıcaklığı olarak 30 °C olarak belirlenmiştir. Karbon kaynakları olarak maltoz ve trehaloz en iyi aktivite veren kaynaklar olarak belirlenmiştir. Azot kaynakları olarak yeast ekstrakt, tryptone, sodyum nitrat, pepton ve soya kullanılmıştır. Maksimum α -amilaz üretimi %1.5 nişasta ve %0.2 yeast içeren ortamlarda elde edildiği belirlenmiştir.

Rajagopalan ve Khrisnan (2008) *B. subtilis* KCC 103 kullanarak şeker kamışı posası kültür ortamında α -amilaz elde etmişlerdir. Şeker kamışı hidrolizatı eklenmesiyle besi ortamında α -amilaz üretimi 67.4 Uml⁻¹ olarak belirlenmiştir. Şeker kamışı hidrolizatının HPLC analizinde glukoz, ksiloz ve arabinoz oranları 0.9:1.0:0.16 olarak belirlenmiştir.

Egwim ve Oloyede (2008) *Digiteria exilis*'ten palmiye, hindistan cevizi ve pamuk lifleri kullanarak 96 saate kadar inkübasyon yapılmış α -amilaz elde etmişlerdir. Palmiye küspesi kullanılarak elde edilen enzim aktivitesinin 25. saatte ve 7.10⁻² mg glukoz ml min⁻¹ yoğunluğundaki ortamda enzim aktivitesini muhafaza ettiğini belirlemişlerdir. Hindistan cevizi ve pamuk liflerinin bulunduğu ortamda enzim aktivitesini 12. saatte yitirdiğini tespit etmişlerdir.

3 MATERYAL ve METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Mikroorganizma seçimi

Çalışmalarımızda Doç.Dr. Zübeyde BAYSAL tarafından Van Gölü kıyısından izole edilen ve ODTÜ Ref-Gen Teknokent'te teşhis edilen *Bacillus licheniformis* bakterisi kullanılmıştır.

3.1.2 Substrat seçimi

Çalışmamızda substrat olarak çevremizde sıklıkla kullanılan tarımsal ürün atıklarından buğday kepeği, pirinç kabuğu, küspelik mısır, muz kabuğu, pamuk sapı, darı, mercimek kepeği, portakal kabuğu, pirinç kabuğu ve elma kabuğu kullanılmıştır.

3.1.3 Substrat parça büyüklüğü

Çalışmamızda kurutulmuş bitkisel atıklar olan; buğday kepeği, pirinç kabuğu, küspelik mısır, muz kabuğu, pamuk sapı, darı, mercimek kepeği, portakal kabuğu, pirinç kabuğu ve elma kabuğu öğütüldükten sonra 4 farklı elek (500 µm, 1000 µm, 1500 µm, 2000 µm çaplı) yardımıyla elendi. Elde edilen farklı substratlardan 1000 µm çapındaki parçalar kullanılıp enzim üretimi sağlandı.

3.1.4 Kullanılan kimyasal maddeler

K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaOH, Trikloroasetikasit, Tris-Base[Tris(hydroxymetyl), Asetik asit, Amonyum Sülfat, Sodyum sitrat, $MgSO_4$,

Glukoz, nutrient broth, yeast-extract, NaCl, SDS, nişasta, Merck' ten, p-nitrofenilpalmitat, tris-hidroksimetilaminometan, Triton-X 100 Sigma' dan, HCl Riedel-de Hean' dan, tryptone, agar Difco' dan elde edilmiştir.

3.1.5 Azot kaynakları:

Bacto kasamino asit ve bacto liver Difco'dan; amonyum sülfat, üre, NH₄Cl, NH₄NO₃ ve Methionin Merck Darmstag'dan temin edilmiştir.

3.1.6 Karbon kaynakları:

Nişasta, mannoz, glukoz, galaktoz, arabinoz ve sukroz Merck Darmstag'dan temin edilmiştir

3.1.7 Besi Yeri Maddeleri:

Nutrient Broth (NB) OXOİD'den, Yeast extract Merck'ten ve agar ATABAY'dan temin edilmiştir.

3.1.8 Kullanılan Besiyerleri

a) Sıvı Besiyeri:

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

NB: 25 g NB. alınıp 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

Spizizen: 14 g K₂ HPO₄

6 g KH₂PO₄

2 g Amonyum Sülfat

1 g Sodyum Sitrat

0,2 g $MgSO_4$ 1 litre saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

Otoklavlandıktan sonra % 1 Glikoz eklendi.

b) Katı Besiyeri:

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

c) SSF Besiyeri:

Kurutulmuş bitkisel atıklar, besiyeri ortamında %30 (w/v) olacak şekilde 3 g 1000 μm parça büyüklüğünde substratlardan kullanılarak 100 ml' lik erlenlere bırakıldı. Üzerlerine çeşme suyu eklenerek otoklavlandı.

Kullanılan Aletler:

İnkübatör (Sanyo)

Steril Kabin (Telstar AV-100)

Spektrofotometre (Varian Carry U.V. Visible)

Çalkalayıcı (Julobo)

Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K15)

Vorteks (Stuart)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Deep-Freeze (Haris, -70°C)

Etüv (Heraus)

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

Otoklav

Su Banyosu (Grant 6G, -20, +100°C)

pH metre (Jenvay 3010, PCP J01 elektrod)

Sterilizatör (Heraus)

Blender (Waring)

Mikropipet (Gilson)

3.2 METOD

3.2.1 Mikroorganizmaların Üretilmesi

Van Gölü kıyısından izole edilen ODTÜ Ref-Gen Teknokent'te teşhis edilen *Bacillus licheniformis* bakterisi saklanma koşullarından (- 20°C) çıkarılıp 37°C'de 24 saat boyunca NB, LB ve SP besiyerlerinde üretildi. α -Amilaz ve proteaz üretimleri için NB, LB ve SP sıvı besiyerleri kullanıldı. Bu besiyerleri 121°C'de 15 dak. otoklavlanarak steril edildi.

100 ml' lik erlenlerde 20 ml farklı sıvı besiyeri içeren ortamlara 100 μ l örnek eklenerek 0.6 absorbansa gelecek şekilde 37°C'de 24 saat süreyle üretildi. Buradan alınan 100 μ l örnek taze NB, LB ve SP besiyerlerine ekilerek 37°C'de 150 rpm'de 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Alınan örnekler +4°C'de 5000 rpm'de 5 dak. santrifüjlenerek hücre sporlardan arındırıldı. Enzim aktivitesi ve optimizasyon çalışmaları için üst sıvı kullanıldı.

3.2.2 Çözeltilerin Hazırlanması:

pH: 4; 5; 6: 50 mM Asetat tamponu

pH: 7; 8 : 50 mM Tris- HCl Tamponu

pH: 9; 9,5 50 mM Fosfat tamponu

3.2.3 Enzim Üretimi Üzerine Farklı SSF Kaynakları Etkisi

1000 μ m boyunda olan buğday kepeği, pirinç kabuğu, küspelik mısır, pamuk sapı (büyük ve küçük parçalar halinde), darı, mercimek kepeği, portakal kabuğu, muz

kabuğu ve elma kabuğu 3 g tartılıp her biri farklı 100 ml'lik erlanmayer içerisine konuldu. Üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er ml bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 24, 48 ve 72. saat 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

3.3 Enzim Ekstraksiyonu:

Bakteriyel kültür ortamında bulunan enzimi ekstrakte etmek için SSF besi yeri ortamına 10 ml çeşme suyu kullanılarak 30 dakika çalkalandı. Küçük substrat partikülleri, hücre ve sporlarından uzaklaştırmak için +4°C'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant üzerinden α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.3.1 α -Amilaz Aktivite Tayini

α -Amilaz enzim aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı (**Bernfeld 1955**). 150 μ l enzim çözeltisi ve 200 μ l % 0,5'lik nişasta çözeltisi (0,1 M Tris-HCl tamponu pH: 7) 37°C'de 30 dak. inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400 μ l DNS (3,5 dinitro salisilik asit) çözeltisi ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına geldiğinde 8 ml saf su ilave edilerek seyreltme yapılarak ve örneklerin absorbans değerleri 489 nm' de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

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

3.3.1.1 Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması:

Bernfeld Reaktifinin hazırlanması Eklerde verilmiştir. (Ek-1).

3.3.1.2 Maltoz Standart Eğrisinin Hazırlanması

Standart olarak maltoz kullanıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen maltozdan bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Enzim aktivite tayinindeki yöntem uygulandı. Okunan absorbans değerlerine karşılık standart eğri çizilerek numunelerin maltoz miktarları eğriden hesaplandı.

3.3.2 Proteaz Enzim Aktivite Tayini

Proteaz aktivite tayini için 150 µl enzim çözeltilisine 250 µl % 0.5 azokazein (0.1 M Fosfat tamponu; pH 8,5) ilave edildi. 37°C' de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda ortama 1ml TCA katılarak reaksiyon durduruldu. 15 dakika +4°C'de bekletildikten sonra 5 dakika santrifüj edildi. 1 ml üst sıvı üzerine 500 µl NaOH ilave edilerek 420 nm'de okundu (Leighton 1973).

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

3.3.3 Azokazein Standart Eğrisinin Hazırlanması

Standart olarak azokazein kullanıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen azokazeinden bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Enzim aktivite tayinindeki yöntem uygulandı. Okunan absorbans değerlerine karşılık standart eğri çizilerek numunelerin maltoz miktarları eğriden hesaplandı.

3.3.4 Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini standart olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry 1951).

Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (5 mg.ml^{-1}) Bovin serum albumin'den bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Bütün tüpler saf su ile $500 \mu\text{L}$ 'ye tamamlandı. Daha sonra tüplere 5 ml alkalın çözeltisi katılarak, 15 dakika 40°C su banyosuna bırakıldı. Sonra üzerine folin reaktifinden (1:1) $500 \mu\text{L}$ katılarak 30 dakika sonra 660 nm 'de absorbans değerleri okundu. Okunan değerlere karşılık standart eğri çizildi. Numunelerin protein içerikleri bu eğriden hesaplandı.

3.3.5 Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

$1000 \mu\text{m}$ boyunda olan pirinç kabukları alındı. 3 g tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu eklenip eklenip 100 ml 'lik erlenmayer içerisine eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er ml bakteri ekimi yapılarak. 37°C 'de 200 rpm 'de inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir beş gün süreyle (12; 24; 48; 72; 96; 120 saat) örnek alınarak enzim aktivitesi kontrol edilerek uygun inkübasyon süresi belirlendi.

3.3.6 Enzim Üretimi Üzerine Üreme Sıcaklığının Etkisi

Katı substrat olarak $1000 \mu\text{m}$ boyunda olan pirinç kabukları alındı. 3 g tartılarak üzerine 10 ml çeşme suyun konularak otoklavlandı. Daha sonra ortama sıvı besiyerinden alınan 3 ml bakteri ekilerek $35, 37, 40, 45, 50$ ve 55°C 'de besiyerleri inkübasyona bırakıldı. Amilaz için 24, proteaz için 48. saatler sonunda üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edilerek α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.3.7 Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacmi Etkisi

Uygun inokülüm hacminin belirlenmesi için sıvı besiyerinden SSF'li ortama 0,5 ml'den başlayıp 3,5 ml'ye kadar arttırılarak alınan bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 200 rpm'de çalkalandı. Amilaz için 24, proteaz için 48. saatler sonunda üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edilerek α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.3.8 Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

α -Amilaz ve proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için enzim içeren üst sıvılar sıcak su banyosunda 30 dakika boyunca 35°C'den başlayarak 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75°C'ye kadar bekletildikten sonra α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.3.9 Enzim Aktivitesi Üzerine pH'sının Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH etkisini incelemek için 50 mM konsantrasyonlarda asetat tamponu (pH: 4,0-6,5) ;Tris-HCl tamponu (pH: 7,0-8,0) ve fosfat tamponu (pH: 8,5-9,5) kullanılarak substratlar hazırlandı.

3.3.10 Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Ortamının Etkisi

Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek için SSF'li ortama 10 ml Çeşme suyu (kontrol) , Tampon (amilaz için pH 6.0, proteaz için pH 8.5 tamponu) Saf su, %2 SDS ve 50 mM NaCl eklenerek otoklavlandı. Çalkalayıcıda 37°C'de 200 rpm'de çalkalandı. 24 ve 48.saatlik süreler sonunda üzerlerine 10 ml

çeşme suyu(kontrol) , tampon, saf su, SDS ve 50 mM NaCl ayrı ayrı eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Amilaz için 24. saatte, Proteaz için 48. saatte elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılarak α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.3.11 Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynakları Etkisi

SSF katı besiyeri hazırlandıktan sonra %1, %2 ve %3 oranlarında hazırlanan karbon kaynaklarından nişasta, maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz ve sukroz steril edildikten sonra besiyerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra α -amilaz için 24 saat, proteaz için 48 saat inkübasyona bırakılan örneklerin her birine inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

3.3.12 Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynakları Etkisi

SSF katı besiyeri hazırlandıktan sonra %1, %2 oranında hazırlanan azot kaynaklarından bacto kasamino asit, bacto liver, amonyum sülfat, üre, NH_4Cl ve methionin besiyerine eklendi. Ekim yapıldıktan sonra amilaz için 24 saat, proteaz için 48 saat inkübasyona bırakılan örneklerin her birine, inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

3.3.13 Uygun Kepek Miktarının Belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine kepek miktarının oranını belirlemek için 1000 μm boyunda olan pirinç kabukları alındı. % 20'den başlayarak %30, %40, %50 ve %60'a kadar kepek tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu eklenip 100 ml'lik erlenmayer

içerisine bırakılarak otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er ml bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 200 rpm'de çalkalandı. 24 ve 48. saatlik süreler sonunda üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edilerek α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.3.14 Kepek Karışım Miktarlarının Belirlenmesi

Enzim Üretimi üzerine kepek karışım miktarını belirlemek için pirinçle birlikte en iyi aktivite veren buğday kepeği alınarak toplam kütleleri 3 g. Olacak şekilde 0.5 gramdan başlanarak (0.5 g+2.5 g; 1 g +2 g; 1.5g+1.5 g; 2 g+1 g; 2.5 g+0.5 g) farklı karışım oranları elde edildi. 3 g tartılıp her biri farklı 100 ml'lik erlenmayer içerisine konuldu. Üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (LB) her birine 3'er ml bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 200 rpm'de çalkalandı. 24 ve 48. saatlik süreler sonunda üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edilerek α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı.

4 BULGULAR

4.1 Mikroorganizma özellikleri

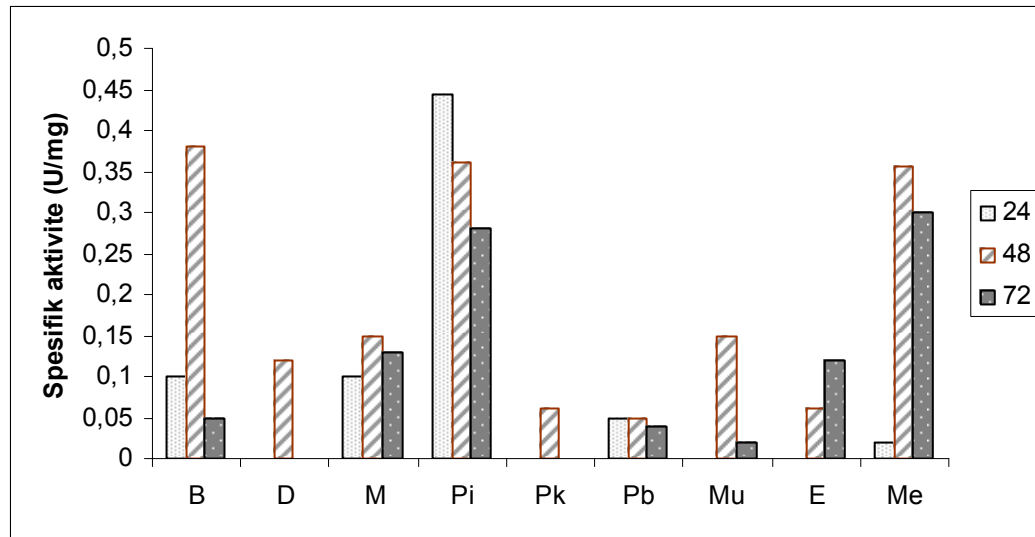
Çalışmamızda kullandığımız *Bacillus licheniformis* bakterisinin üreme zamanı ve bazı özellikleri şunlardır.

Minimum üreme sıcaklığı: 15°C; Maksimum üreme sıcaklığı: 50°C,
Optimum üreme sıcaklığı 37°C

Salgıladığı bazı enzimler: Amilaz, proteaz, lipaz, katalaz

4.2 Enzim Üretimi Üzerine Farklı SSF Kaynaklarının Etkisi

Buğday kepeği, pirinç kabuğu, küspelik mısır, pamuk sapı, darı, mercimek kepeği, portakal kabuğu, muz kabuğu ve elma kabuğunun amilaz ve proteaz aktivite tayinleri yapıp elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

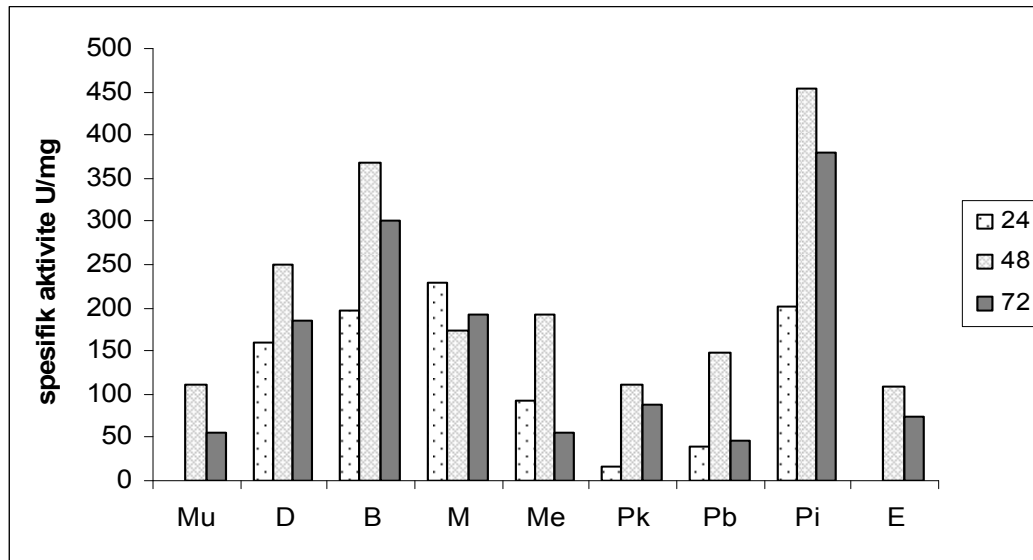


Şekil 4.1. Farklı substratların amilaz üretimi üzerine etkisi

E: elma; **Mu:** muz; **Pi:** pirinç; **B:** buğday; **D:** darı; **M:** mısır;

Pb: pamuk büyük parç.; **Pk:** pamuk küçük parç., **Me:**mercimek

Bacillus licheniformis bakterisinin farklı bitki atıklarının bulunduğu ortamda üretilmesiyle ilgili sonuçlara göre en iyi α -amilaz üretimi 24. saatte 0,443 U/mg olarak pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda elde edilmiştir. Buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 48. saatte α -amilaz üretimi pirinç kabukları bulunan ortama yakın olarak bulunmuştur. Elma, pamuğun büyük parçaları ve küçük parçalarını bulunduğu ortamda α -amilaz üretimi düşük oranda bulunmuştur. Mısır atıklarının bulunduğu ortamda 24, 48 ve 72. saatte de birbirine yakın düşük sonuçlar elde edilmiştir. Mercimek kabuğunun katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 48 ve 72. saatlerde α -amilaz üretimi pirinç ve buğdaydan elde edilen aktiviteye yakın olarak belirlenmiştir. Darının katı substrat olarak kullanıldığı ortamda α -amilaz üretimi sadece 48. saatte bulunmuştur. Muz kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 24. saatte α -amilaz aktivitesi olmadığı, 48. saatte düşük α -amilaz üretimi olduğu ve 72. saatte üretimin daha da düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı substratların proteaz üretimi üzerine etkisi

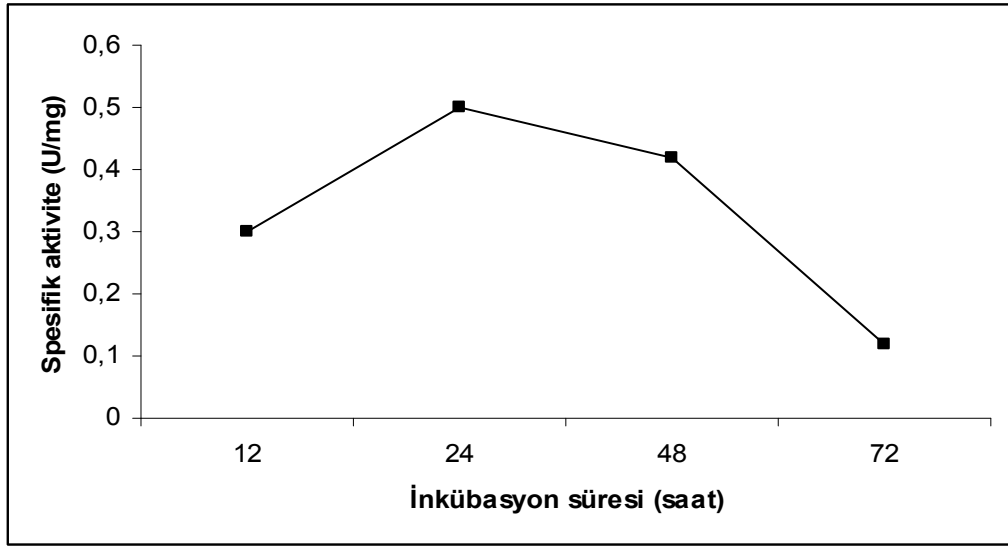
E: elma; **Mu:** muz; **Pi:** pirinç; **B:** buğday; **D:** darı; **M:** mısır;

Pb: pamuk büyük parç.; **Pk:** pamuk küçük parç.; **Me:** mercimek

Bacillus licheniformis bakterisinin farklı bitki atıklarının bulunduğu ortamda üretilmesiyle ilgili sonuçlar göre en iyi proteaz üretimi 48. saatte 469 U/mg olarak pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda elde edilmiştir. Buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 48. saatte proteaz üretimi pirinç kabukları bulunan ortama yakın olarak bulunmuştur. Elma, muz kabuğu pamuğun büyük parçaları ve küçük parçalarının substrat olarak bulunduğu ortamda proteaz üretimi pirinç ve buğday kepeklerinin bulunduğu ortama göre daha düşük olarak bulunmuştur. Mısır ve darı atıklarının bulunduğu ortamda 24, 48 ve 72. saatte de birbirine yakın sonuçlar elde edilmiş olup her ikisinde de 48. saatte en iyi proteaz üretimi bulunmuştur. Mercimek kabuğunun katı substrat olarak kullanıldığı ortamda 72. saatlerde proteaz üretimi mısırdan elde edilen aktiviteye yakın olarak belirlenmiştir.

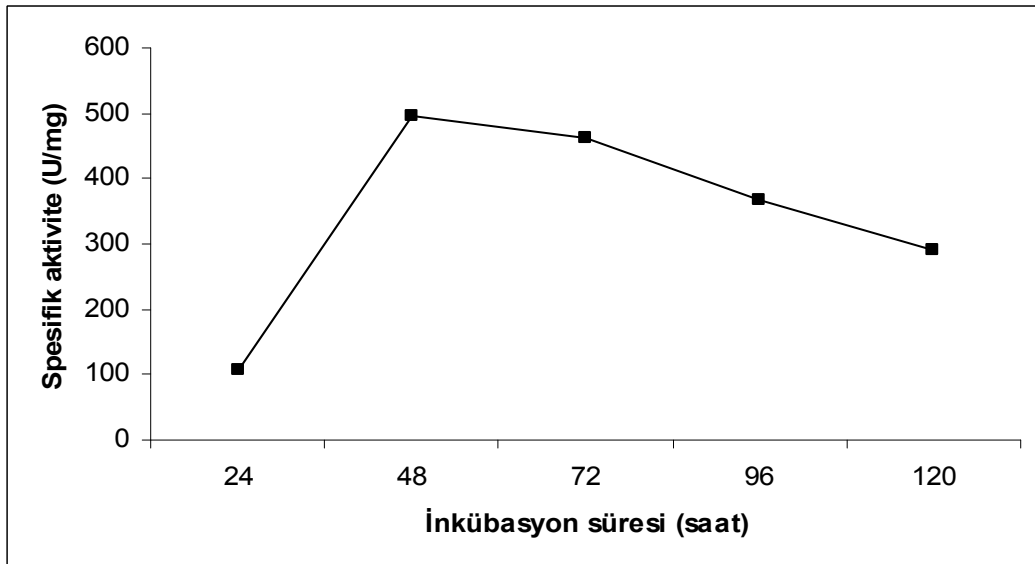
4.3 Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

SSF ortamına 12. saatten 120. saate kadar her 24 saatlik süre sonunda α -amilaz ve proteaz aktivite tayini yapıldı. Bulunan değerler Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. İnkübasyon süresinin amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamında en yüksek α -amilaz üretimi 24. saatte 0,5 U/mg olarak tespit edilmiştir. α -Amilaz aktivitesinin 24. saatten sonra 48 ve 72. saatlerde düştüğü belirlenmiştir.

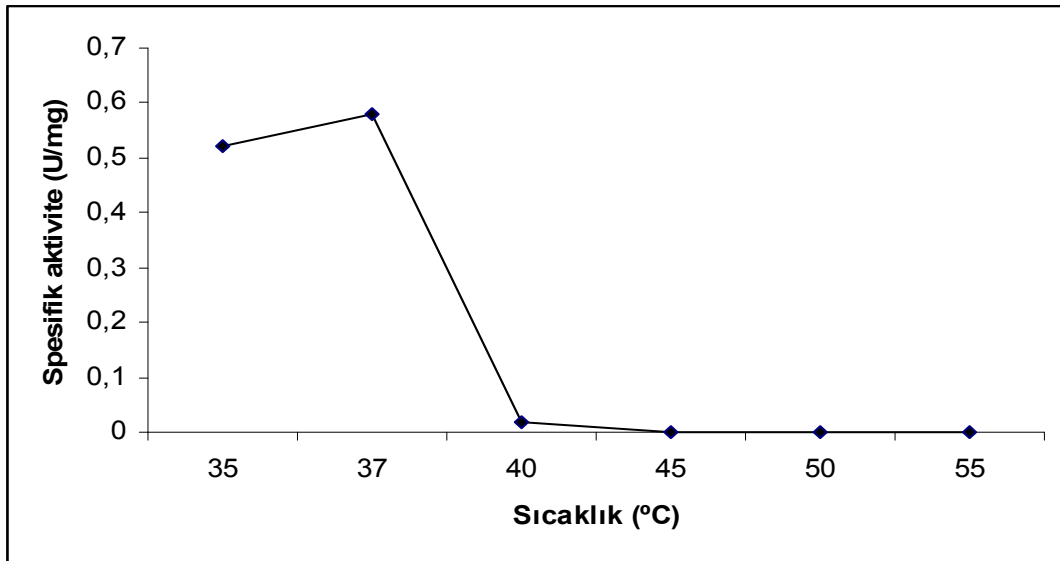


Şekil 4.4. İnkübasyon süresinin Proteaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamında en yüksek proteaz üretimi 48. saatte 496 U/mg olarak tespit edilmiştir. Proteaz aktivitesinin 48 ve 72. saatlerde birbirine yakın olduğu 48. saatten sonra 72, 96 ve 120. saatlerde düştüğü belirlenmiştir.

4.4 Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

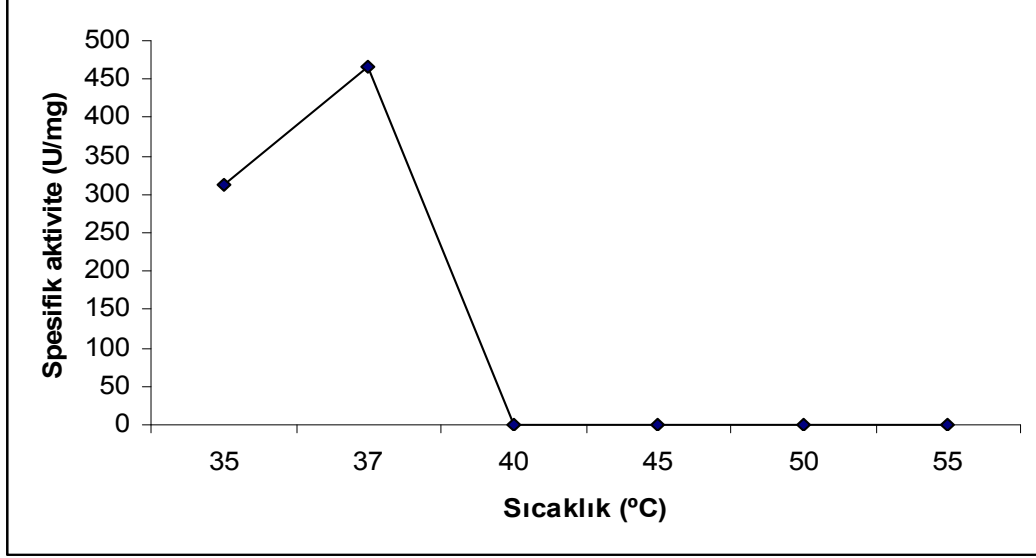
Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için SSF’li besiyeri 35, 37, 40, 45, 50 ve 55°C’de inkübasyona bırakıldı. Amilaz için 24. Saatte, proteaz için 48. saatte enzim aktivitelere bakıldı. Bulunan değerler Şekil 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamında α -amilaz aktivitesi için bakteri üretim sıcaklığı olarak 37°C olarak tespit edilmiştir. Sıcaklık 40°C’nin üzerine çıktığında çok düşük üretim

gösterdiği tespit edilmiştir. 45°C ve daha yüksek sıcaklıklarda üretilen bakterilerde α -amilaz üretimine rastlanılmamıştır.

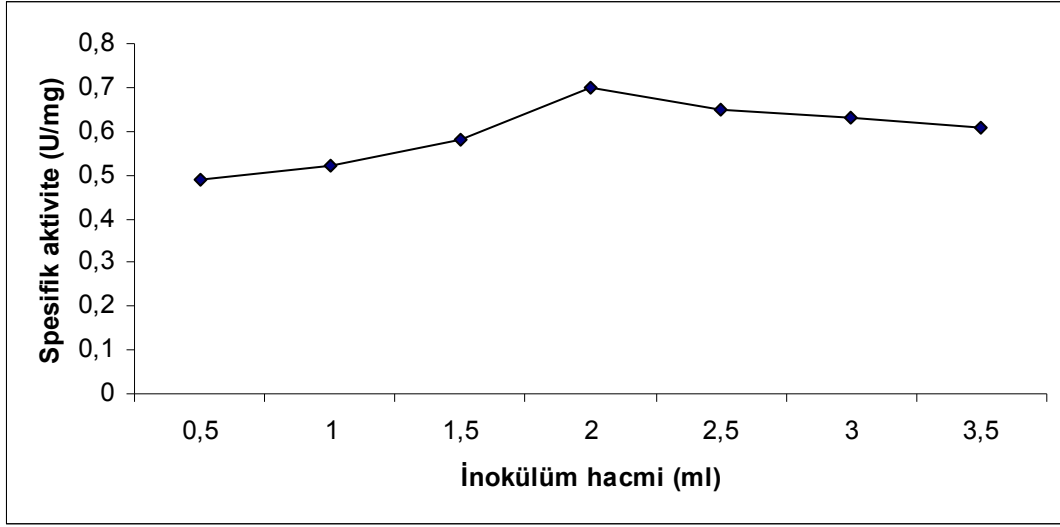


Şekil 4.6. Proteaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında en iyi proteaz aktivitesi, bakterilerin 37°C'de üretildiği 48. saatte tespit edilmiştir. 40°C ve daha yüksek sıcaklıklarda üretilen bakterilerde proteaz üretimine rastlanmamıştır.

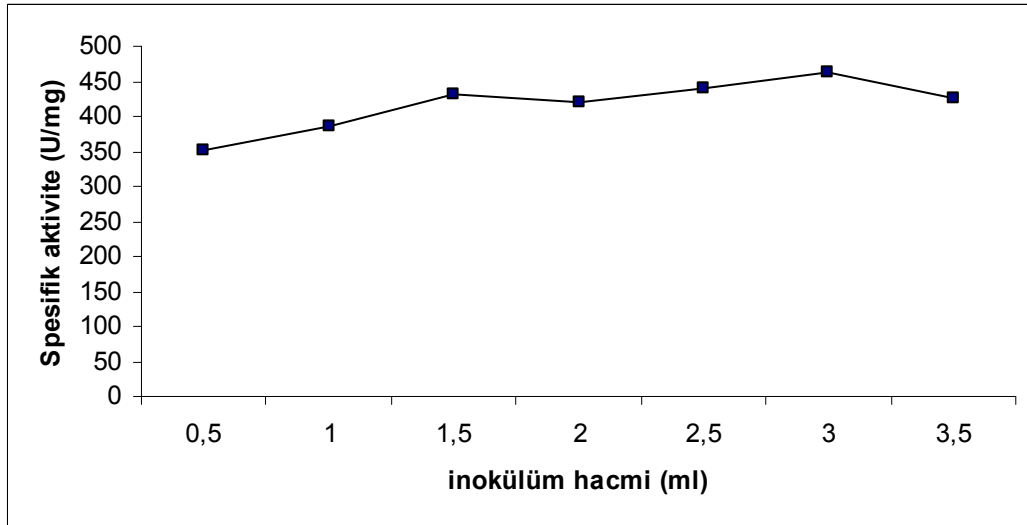
4.5 Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi

Uygun inokülüm hacminin belirlenmesi için yapılan deneylerde amilaz için 24. saatte, proteaz için 48. saatte enzim aktivitelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. İnokülüm hacminin amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamında α -amilaz aktivitesi için sıvı besiyerinden SSF’li ortama aktarılan inokülüm hacmi 2 ml olarak belirlenmiştir. İnokülüm hacminin 0,5 ml’den başlayıp 2 ml’ye kadar artırılmasıyla α -amilaz üretiminin arttığı 2 ml’den sonra ise az da olsa düştüğü tespit edilmiştir.

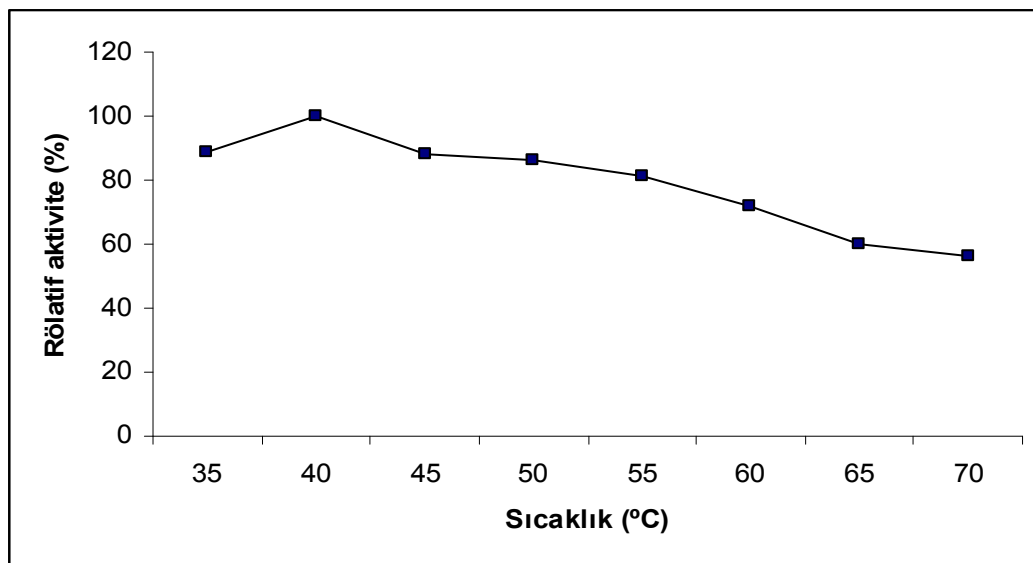


Şekil 4.8. İnokülüm hacminin proteaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında proteaz üretimi için sıvı besiyerinden SSF'li ortama aktarılan en iyi inokülüm hacmi 3 ml olarak belirlenmiştir. İnokülüm hacminin 05, ml'den başlayıp 3 ml'ye kadar artırılmasıyla proteaz üretiminin arttığı 2,5–3,5 ml arasında ise çok fazla düşmeden stabil olarak kaldığı tespit edilmiştir.

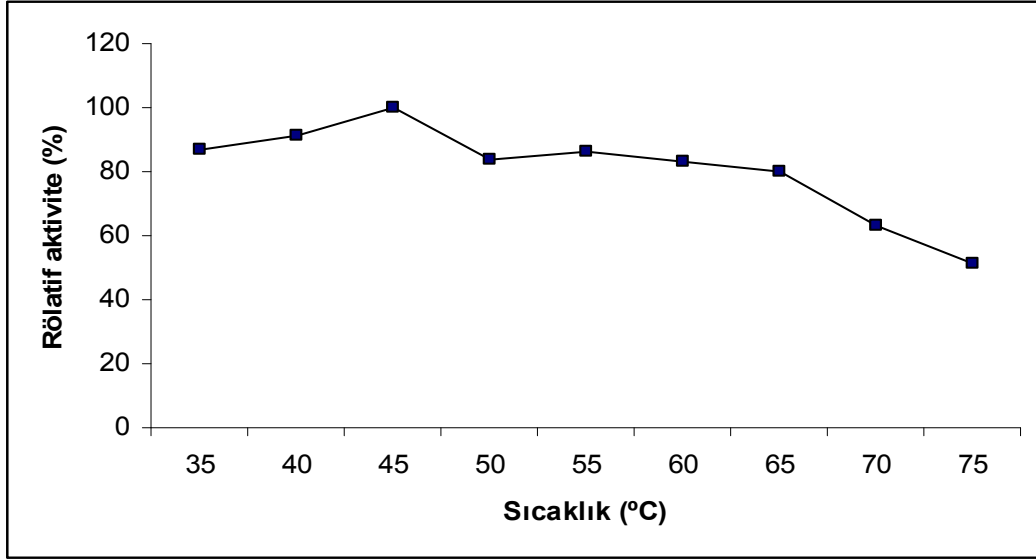
4.6 Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Amilaz ve proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için 35°C-75°C aralıklarında çalışıldı. Amilaz için 24. saatte, proteaz için 48. saatte enzim aktivitelere bakıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında amilaz aktivitesi için alınan enzim içeren üst sıvıların 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda bekletildikten sonra enzim aktivitesinin 40°C'de bekletildiğinde en yüksek aktiviteyi verdiği belirlenmiştir.

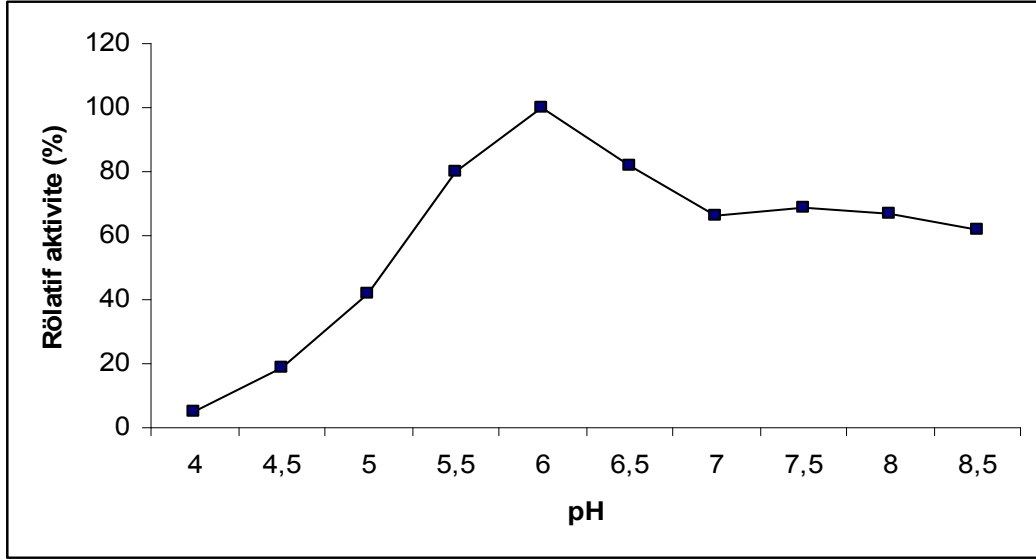


Şekil 4.10. Proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında proteaz aktivitesi için alınan enzim içeren üst sıvıların 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda bekletildikten sonra enzim aktivitesinin 45°C'de bekletildikten sonra en iyi aktiviteyi verdiği belirlenmiştir.

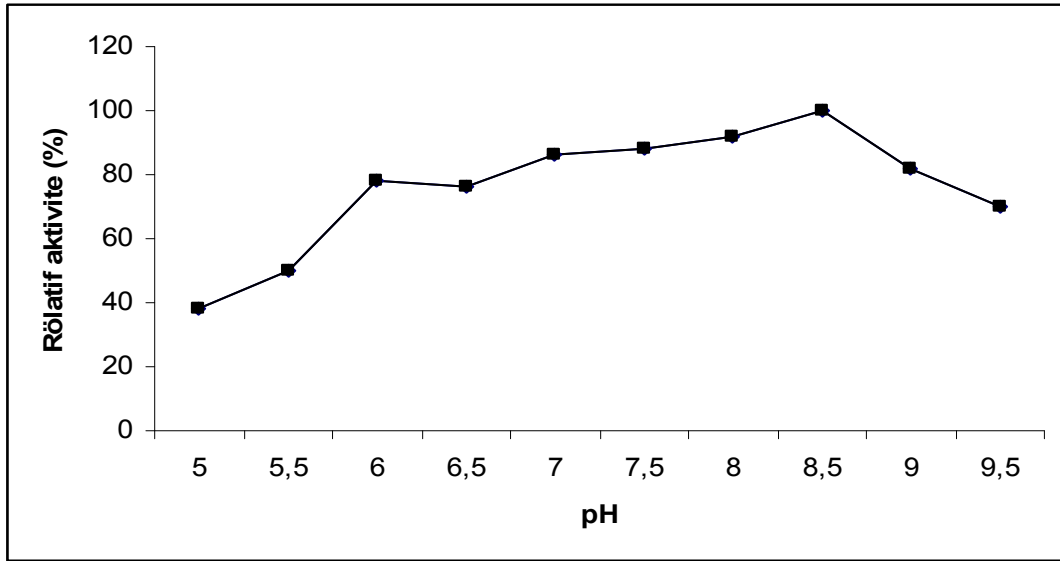
4.7 Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için 50 mM konsantrasyonlarda; asetat tamponu (pH;4-5-6), Tris-HCl tamponu (pH;7-8) ve fosfat tamponu (pH;8,5-9,5) kullanıldı. En yüksek aktivitenin amilaz için pH 6,0, proteaz için pH 8,5 olduğu saptandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın Etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında amilaz aktivitesi için en uygun pH miktarı olarak pH; 6 olarak belirlenmiştir. pH; 4 ve 4,5 civarlarında aktivitenin çok düşük olduğu ve pH; 5'ten sonra pH; 6'ya kadar aktivitenin giderek arttığı belirlenmiştir. pH; 6'dan sonra ise aktivitenin azaldığı gözlenmiştir.

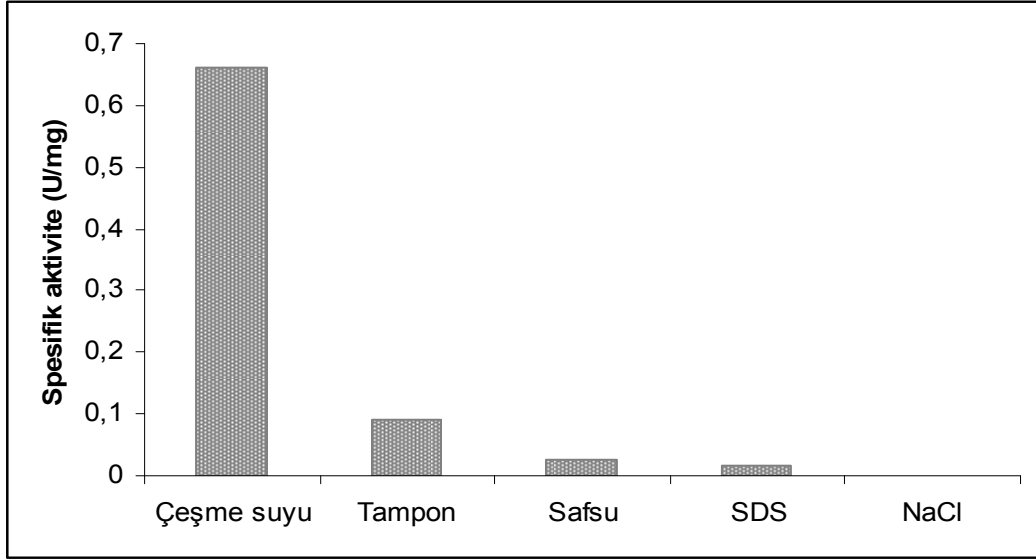


Şekil 4.12. Proteaz aktivitesi üzerine pH'nın Etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında proteaz aktivitesi için en uygun pH miktarı olarak pH; 8,5 olarak belirlenmiştir. pH; 5'te aktivitenin çok düşük olduğu ve pH; 5'ten sonra pH; 8,5'e kadar aktivitenin giderek arttığı belirlenmiştir. pH; 8,5'den sonra ise aktivitenin azaldığı gözlenmiştir.

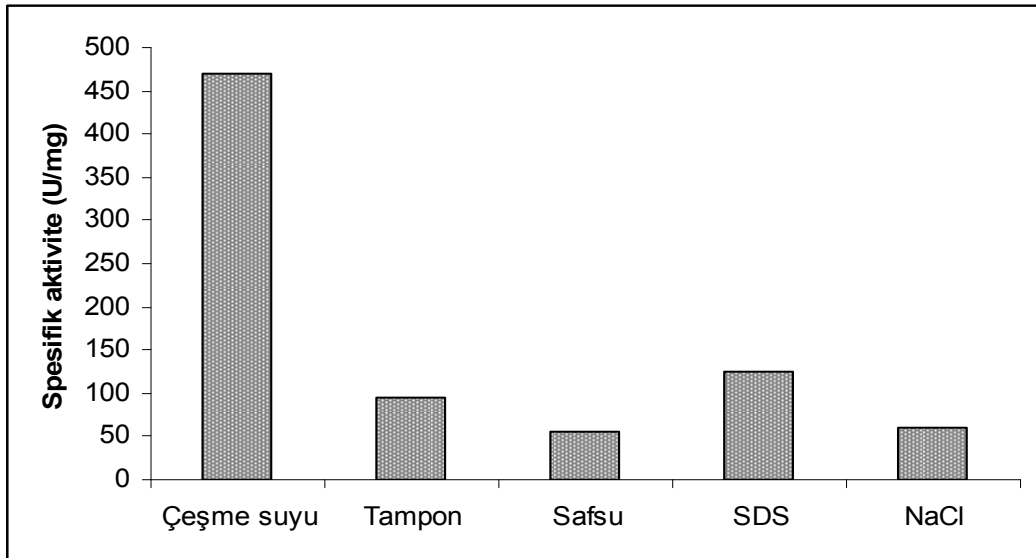
4.8 Enzim Üretimi Üzerine Ekstraksiyon Ortamının Etkisi

Enzim üretimi üzerine Ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek için, katı substrat olarak pirinç kabuklarının bulunduğu SSF'li ortama çeşme suyu (kontrol), tampon (amilaz için pH:6 tamponu, proteaz için pH:8,5 tamponu), saf su, SDS ve 50 mm NaCl eklenerek elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanıldı. Amilaz ve proteaz için aktivitelere bakıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Ekstraksiyon ortamının amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamına eklenen çeşme suyunun tampon, saf su SDS ve NaCl’ye oranla oldukça yüksek oranda amilaz üretimi (0,66 U/mg) gösterdiği belirlenmiştir. NaCl kullanılan ortamda enzim üretimine rastlanılmamıştır.

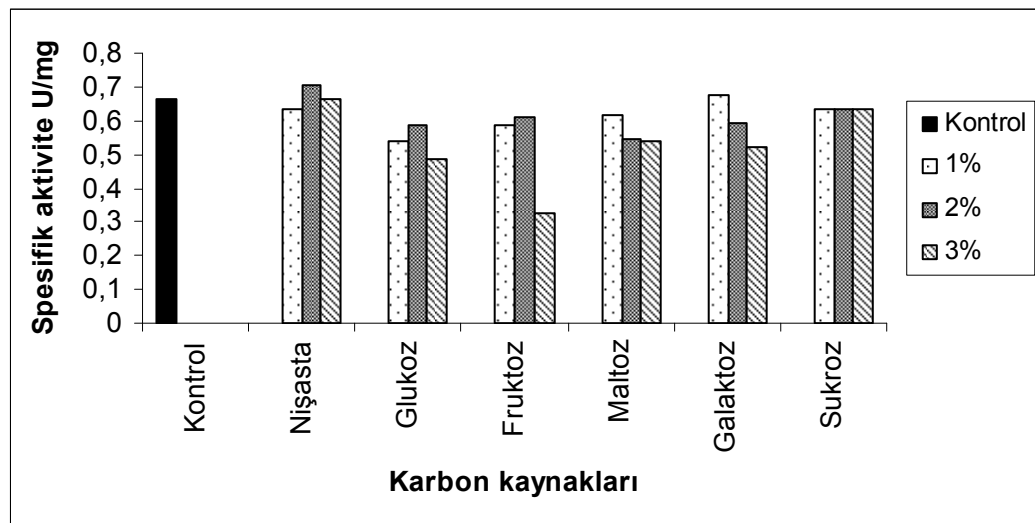


Şekil 4.14. Ekstraksiyon ortamının proteaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamına eklenen çeşme suyunun tampon, saf su SDS ve NaCl'ye oranla oldukça yüksek oranda proteaz üretimi (470U/mg) gösterdiği belirlenmiştir.

4.9 Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

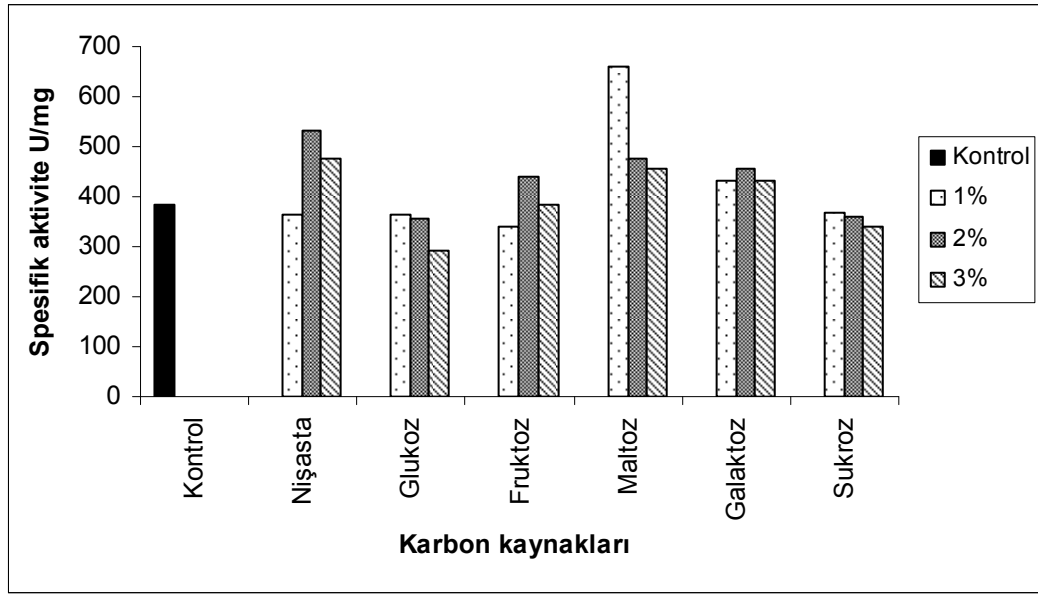
SSF ortamına nişasta, maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz ve sukroz kuru ağırlığa göre %1, %2 ve %3 oranında ilave edildi. Elde edilen üst sıvılardan amilaz ve proteaz aktiviteleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Karbon kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamına eklenen karbon kaynakları bakımından nişastanın %2'lik kullanıldığı ortamda (0,736 U/mg) ve galaktozun %1'lik kullanıldığı ortamda (0,721 U/mg) amilaz üretimi kontrolden daha yüksek ölçülmüştür. Glukoz ve

fruktozun her üç konsantrasyonda da kontrole göre daha az amilaz üretimi verdiği belirlenmiştir. Sükroz ve maltoz içeren ortamlarda amilaz aktivitesi nispeten glikoz ve fruktoz içeren ortamın amilaz üretiminden daha iyi, kontrolden ise daha az amilaz aktivite verdikleri belirlenmiştir.

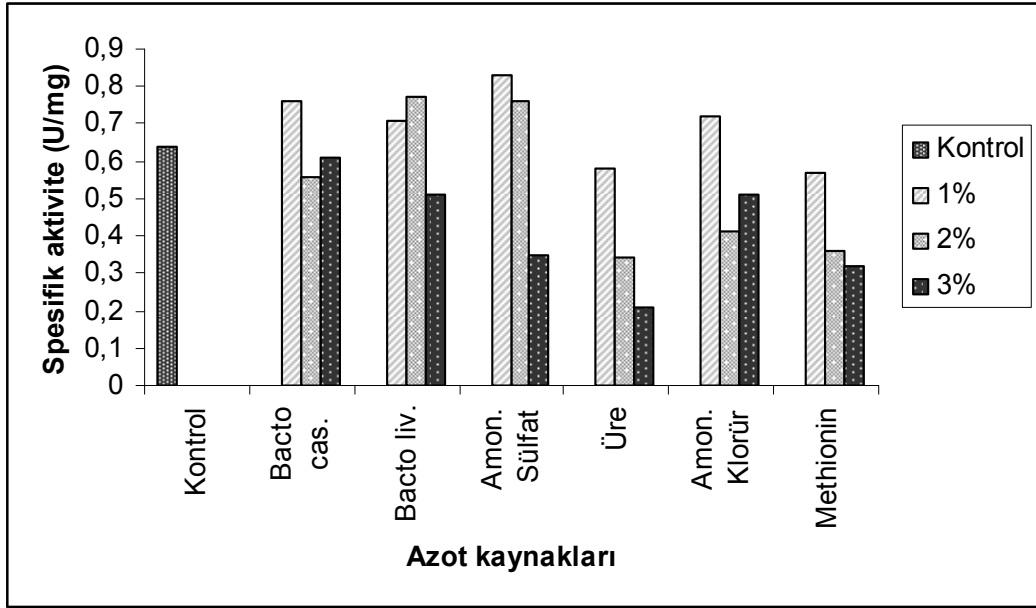


Şekil 4.16. Karbon kaynaklarının proteaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin piriñç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamına eklenen karbon kaynakları bakımından en yüksek proteaz üretimi maltozun %1'lik konsantrasyonundan 696 U/mg olarak belirlenmiştir. Nişasta, fruktoz ve maltozun %1 olarak eklendiği ortamlardan elde edilen proteaz üretimi kontrolden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Glikoz ve sükrozun her üç konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda proteaz üretimi kontrolden daha düşük olarak belirlenmiştir.

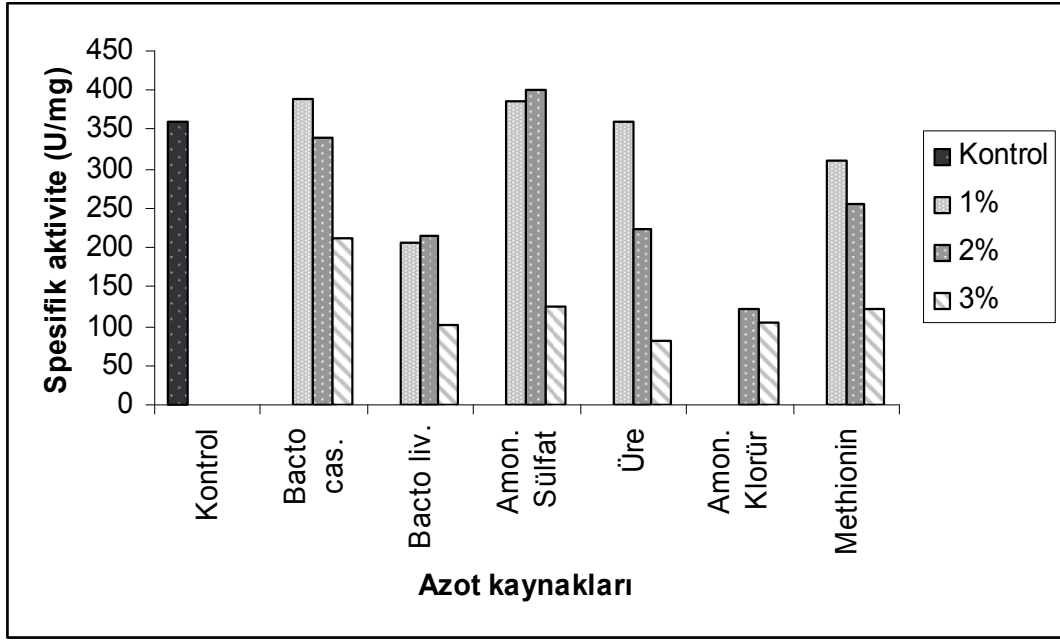
4.10 Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

SSF ortamına %1, %2 ve %3 oranında bacto kasamino asit, bacto liver, amonyum sülfat, üre, NH₄Cl ve methionin ilave edildi. Elde edilen üst sıvıdan amilaz ve proteaz için enzim aktivitelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamına eklenen azot kaynakları bakımından %1’lik amonyum sülfat (0,77 U/mg) ve Bacto casamino asit (0,76 U/mg) en iyi amilaz aktivitesi vermişlerdir. %2’lik Bacto liver ve %1’lik Amonyum klorür kontrole yakın amilaz aktivitesi vermişlerdir. Üre ve Methionin eklenen ortamın aktivitesi kontrolden az çıkmasına rağmen değerler birbirlerine yakın olarak bulundu.



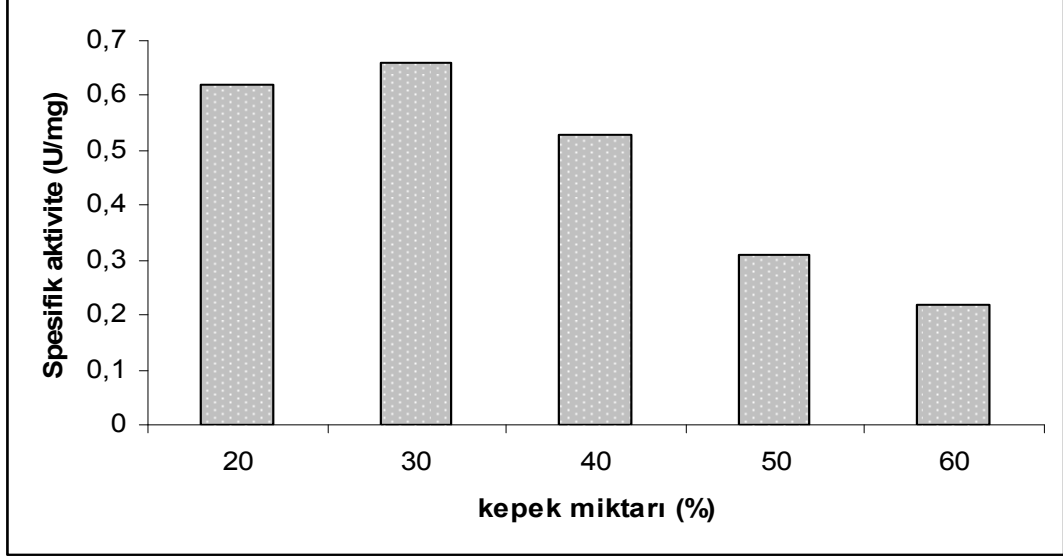
Şekil 4.18. Azot kaynaklarının proteaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamına eklenen azot kaynakları bakımından en yüksek enzim üretimi %2'lik amonyum sülfat (402 U/mg), bulunan ortamda elde edilmiştir. %1'lik Bacto casamino asit ve %1'lik üre kontrole daha yüksek proteaz aktivitesi göstermişlerdir. %2'lik Bacto casamino asid ve %1'lik methioninden elde edilen proteaz aktivitesi kontrole çok yakındır. Bacto liver'in her üç konsantrasyon oranı da kontrolün altında proteaz aktivitesi vermişlerdir. %1'lik amonyum klorür eklenen ortamda ise proteaz aktivitesine rastlanmamıştır.

4.11 Enzim Üretimi Üzerine Kepek Miktarının Etkisi

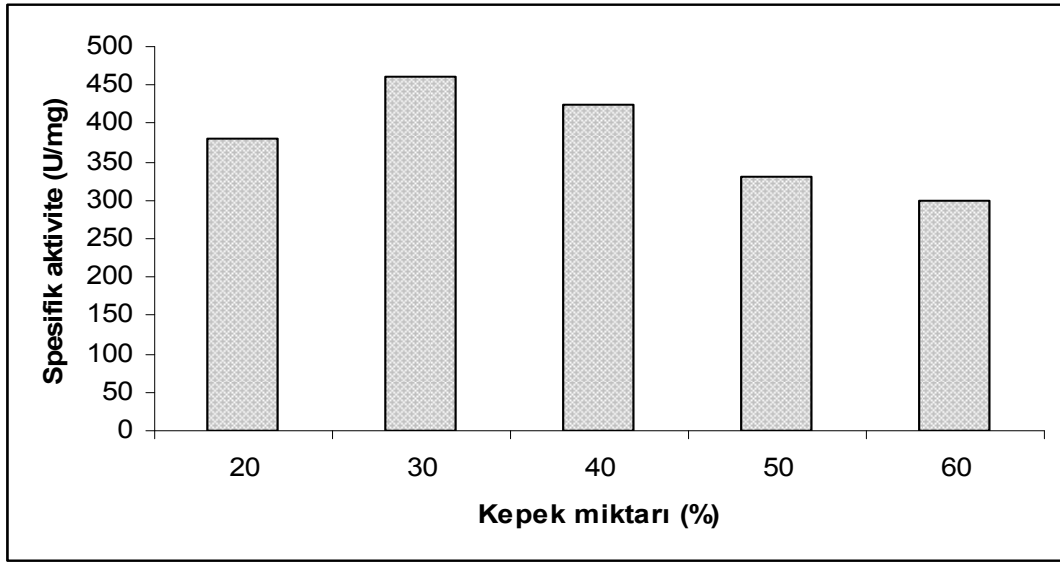
Enzim aktivitesi üzerine kepek miktarının oranını belirlemek için 1000 µm boyunda olan pirinç kabukları alındı. % 20'den başlayarak % 60'a kadar kepek

miktarı arttırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Farklı kepek miktarlarının amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF’li ortamında amilaz üretimi için en uygun kepek miktarı olarak %30’luk (3 g) kepek miktarının kullanıldığı ortamda 0,66 U/mg olarak belirlenmiştir. Kepek miktarı arttırıldığında amilaz enzim aktivitesinin düştüğü görülmüştür.

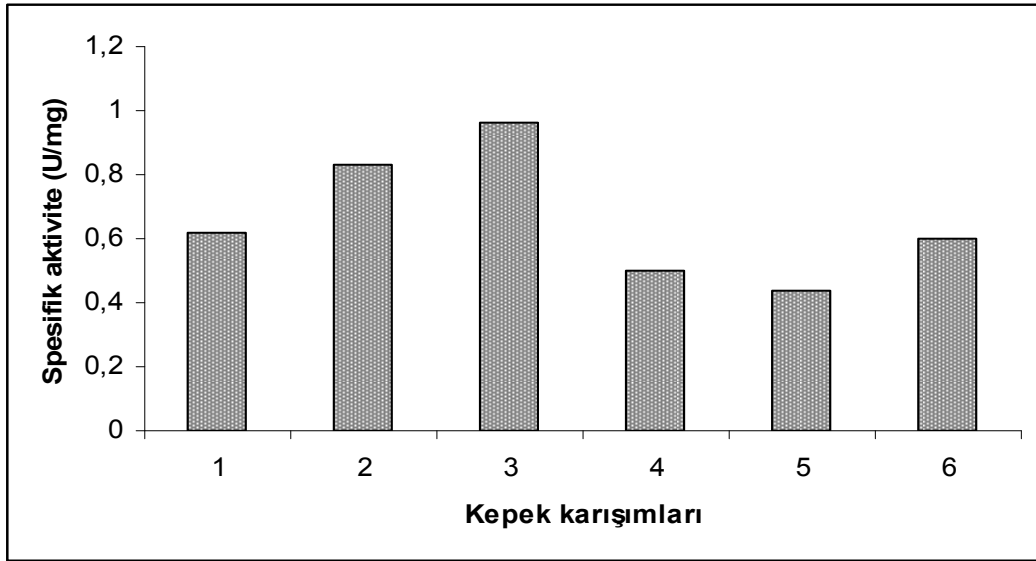


Şekil 4.20. Farklı kepek miktarlarının proteaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabuklarının katı substrat olarak kullanıldığı SSF'li ortamında proteaz aktivitesi için en uygun kepek miktarı olarak %30'luk (3 g) kepek miktarının kullanıldığı ortamda 462 U/mg olarak belirlenmiştir. %30'luk ve %40'luk kepek miktarlarının proteaz aktivite değerleri birbirlerine yakın olarak belirlenmiştir. Kepek miktarı arttırıldığında proteaz enzim aktivitesinin düştüğü görülmüştür.

4.12 Enzim Üretimi Üzerine Kepek Karışımlarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine kepek karışım miktarını belirlemek için pirinçle birlikte en iyi aktivite veren buğday kepeği alınarak farklı oranlarda karıştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'da gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Kepek karışım oranlarının amilaz üretimi üzerine etkisi

1:%30 Pirinç

4: %15 Pirinç+%15 buğday

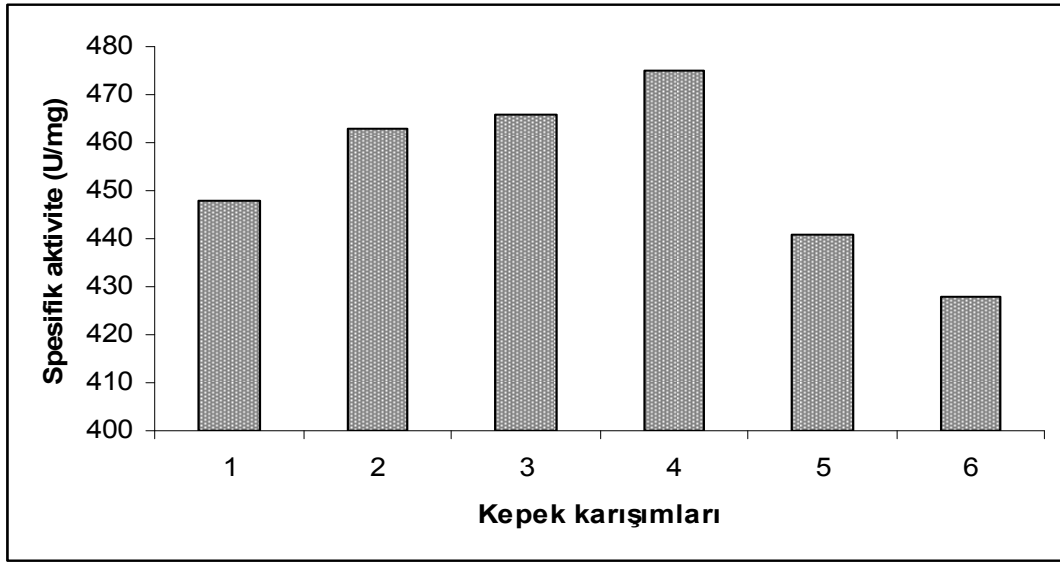
2:%25 Pirinç+%5 Buğday

5: %10 Pirinç+%20 Buğday

3:%20 Pirinç+%10 Buğday

6:%5 Pirinç+%25 Buğday

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabukları ve buğday kepeğinin en iyi aktivite veren substratlar olarak belirlendiği ortamda optimum enzim aktivitesi % 20 pirinç kabuğu ve % 10 buğday kepeği karışımının bulunduğu ortamda 0,96 U/mg olarak belirlenmiştir. Karışımdaki pirinç miktarı azalıp buğday miktarı arttıkça aktivitenin giderek arttığı, pirinç miktarı % 20'nin altına indikten sonrada aktivitenin düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Kepek karışım oranlarının proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

1: %30 Pirinç

4: %15 Pirinç+%15 buğday

2: %25 Pirinç+%5 Buğday

5: %10 Pirinç+%20 Buğday

3: %20 Pirinç+%10 Buğday

6: %5 Pirinç+%25 Buğday

Bacillus licheniformis bakterisinin pirinç kabukları ve buğday kepeğinin en iyi aktivite veren substratlar olarak belirlendiği ortamda optimum enzim aktivitesi % 15 pirinç kabuğu ve % 15 buğday kepeği karışımının bulunduğu ortamda 475 U/mg olarak belirlenmiştir. Karışımdaki başta pirinç miktarı azalıp buğday miktarı arttıkça aktivitenin giderek arttığı, pirinç miktarı % 15'in altına indikten sonrada aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. Buğdaya oranla Pirinç miktarının fazlalığının aktiviteyi daha da arttırdığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda gelişen biyoteknolojik tekniklerin kullanımı sayesinde mikroorganizmalardan çok sayıda ürün elde edilmeye başlanmıştır. Bu ürünlerin en önemlilerinden biri de enzimlerdir. Enzimler gıda, tekstil, kâğıt, deterjan, medikal vb. gibi birçok alanda oldukça önemli bir kullanım alanına sahiptirler (**Dağışan 1997**).

Mikroorganizmalar kullanılarak enzim üretim çalışmaları oldukça eski ve yaygındır. Mikroorganizma kökenli enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda üretilebilir olmaları bu enzimlerin önemli özellikleri ve tercih edilme nedenleridir (**Kıran ve ark 2006**).

Bu çalışmada yöremizde bulunan tarımsal atıkların değerlendirilebilmesinde, SSF tekniği kullanarak amilaz ve proteaz üretimi incelenmiştir. Mikroorganizma olarak Van Gölü kıyısından izole edilen *Bacillus licheniformis* bakterisi kullanılmıştır. Bu bakterinin tercih edilmesinin sebebi; alkalik pH'da olan Van Gölü'nde yaşayan bir bakterinin enzim üretme potansiyelinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızda, SSF yöntemiyle katı substrat olarak pirinç kabuğu, buğday kepeği, küspelik mısır, mercimek kabuğu, darı, elma kabuğu, muz kabuğu ve pamuk atık parçaları gibi tarımsal atıklar kullanılarak α -amilaz ve proteaz enzim aktivitesi incelenmiştir. En uygun amilaz ve proteaz enzim üretimi için katı substrat olarak, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, pirinç kabuğu ve buğday kepeği belirlenmiştir. SSF'te pirinç kabuğu ve buğday kepeğinin kullanımı daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi oldukça yaygındır (**Krishna ve ark. 1996; Elliah ve ark. 2002**). Pirinç kabuğu ve buğday kepeğinde zengin içerikli vitamin ve

minerallerin bulunması mikroorganizmaların üremesini kolaylaştırmış ve enzim üretme kapasitelerini arttırmış olabilir.

SSF' de kullanılan başlıca substratlar daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi genellikle pirinç, buğday, darı, mısır, soya fasulyesi gibi yöresel farklı kullanım gösteren sanayi ve tarımsal atıklardır. Bu çalışma ile pirinç ve buğday kepeklerinin katı substrat olarak kullanılması büyük ölçüde endüstriyel enzimlerin üretilmesini ve ayrıca çevre sorunlarına yol açan bu atıkların, hem ekonomik hem de güvenli şekilde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada pirinç kabuğunun katı substrat olarak kullanıldığı ortamda en yüksek amilaz üretimi 24. saatte 0,5 U/mg; en yüksek proteaz üretimi ise 48. saatte 496 U/mg ölçülmüş olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir. Amilaz üretiminin 24. saatten sonra azaldığı belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda inkübasyon süresi olarak 24. saatler ile 120. saatler arasında en yüksek amilaz üretimi rapor edilmiştir. Fakat yaygın olarak amilaz genellikle 24. saatlerde en yüksek üretimi vermektedir (**Krishna ve ark. 1996;Baysal ve ark. 2003; Uyar ve ark. 2004**). Bu sonuç daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir. 24. saatten sonra amilaz üretiminin düşmüş olmasının sebebi, ortamda 48. saatten itibaren artmaya başlayan proteaz enziminin varlığına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Proteaz enzimi için ise 24. saatte üretim az olup 48. saatte maksimum seviyeye çıkmış ve bu süreden sonra üretim düşmeye başlamıştır. Daha önceki çalışmalarda da proteaz enziminin 24. saatten sonra üretiminin artmaya başladığı görülmektedir. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalara paralellik göstermektedir (**Sandhya 2004**).

Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için yaptığımız çalışmada, Şekil 4.5. ve 4.6.'da da görüldüğü gibi, amilaz ve proteaz için maksimum enzim üretimi 37°C'lik inkübasyon ortamından elde edilmiştir. 40°C'den daha yüksek sıcaklıklarda enzim üretiminin olmadığı görülmüştür. Van gölü kıyısından izole edilen *Bacillus licheniformis*'in optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Bu mikroorganizmanın minimum üreme sıcaklığı 15°C, maksimum üreme sıcaklığı ise 55°C olarak bulunmuş olup kültür ortamının da bu sıcaklığa benzer koşullarda olması enzim üretme yeteneklerini arttırmış olabilir.

Enzim üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, Şekil 4.7. ve 4.8.'de de gösterildiği gibi, en yüksek enzim üretimi amilaz için 2 ml, proteaz için 3 ml eklenen ortamlarda sırasıyla 0,7 U/mg ve 464 U/mg olarak tespit edilmiştir. Amilaz üretiminde inokülüm hacmi 2 ml'nin üstüne çıktığında enzim üretiminin azalmaya başladığı gözlenmiştir. Proteaz üretiminde ise inokülüm hacminin 1,5–3,5 ml arasındaki değişimlerinde enzim üretiminin pek değişmediği gözlenmiştir. Ortamda bulunan bakteri miktarının azlığı üremenin yavaş olmasına neden olacaktır. İnokülüm hacmi arttıkça, ortamda bulunan bakteri yoğunluğu da artacak ve doğal olarak sentezlediği metabolitler de artacaktır. Bu metabolitlerin artışı proteaz üretimini indüklemiş ve dolayısıyla proteaz miktarını arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda amilaz için optimum aktivite sıcaklığı 40°C, proteaz için ise 45°C olarak belirlenmiştir. Amilaz enzimi 70°C'de aktivitesini yaklaşık olarak %60 olarak muhafaza ettiği Şekil 4.9.'da gösterilmektedir. Özellikle kâğıt endüstrisinde kullanılan amilazlarda optimum sıcaklık olarak 45–60°C'lik sıcaklık aralığı

istenmektedir. Kâğıt endüstrisinde nişastanın kâğıda eklenmesiyle kâğıdın sertleştirilmesi-toplanması için nişastanın bulamaç haline getirilmesi ve transfer edilmesi gereklidir. Bu işlemin sıcaklık aralığı 45–60°C aralığındadır (**Tolan 1996**). Çalışmamızda elde ettiğimiz amilaz enzimi kâğıt endüstrisinde kullanılabilir özellikler taşımaktadır.

Şekil 4.10'de görüldüğü gibi proteaz enziminin optimum sıcaklığı 45°C'dir. Enzim 70°C'de aktivitesini halen %62 olarak korumaktadır. Özellikle deterjan ve deri işleme sanayii sıcaklığa bağlı süreçler olduğundan belirli sıcaklıklara karşı bu enziminin kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Çalışmamızda enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini araştırmak için kullanılan tampon çözeltilerde amilaz için en yüksek aktivite pH 6,0 ve proteaz için pH 8,5 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11 ve 4.12). Daha önceki çalışmalarda amilaz için optimum aktivite pH'sı genellikle 5-6,5 arasında değişmektedir (**Kunamneni ve ark. 2005 Ertan ve ark. 2006**). Elde ettiğimiz bulgular daha önceki çalışmalara paralellik göstermektedir (**Narayana ve ark. 2008**). Proteaz enziminde özellikle alkalın olanlar için Ph genellikle 8,0 ve üzeri olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda optimum pH 8,5 olarak tespit edilmiştir. Serin proteazların (E.C. 3.4.21) bir alt tipi olan "alkalin proteazlar" yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olmalarından dolayı başta deterjan endüstrisi olmak üzere deri, gıda, ipek ve kâğıt endüstrilerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. (**Battal 2004**). Amilaz ve proteaz enzim aktiviteleri yüksek pH'larda dahi aktivitesini yaklaşık olarak %60 civarlarında korumuştur. Son zamanlarda ise, protein mühendisliği sayesinde, deterjanlarda ağartıcı madde olarak kullanılan perborata dayanıklı alkalın proteazlar kullanılmakta

olup günümüzde deterjanın alkalinite derecesine ve içeriğine göre en uygun proteaz enzimi seçilerek formulasyon yapılabilmektedir (**Dağışan 1997**). Çalışmamızda, elde ettiğimiz proteaz enziminin özellikle deterjan, kâğıt, gıda ve ipek sanayinde istenilen özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda çeşme suyu, tampon çözelti (pH 6,0 ve pH 8,5), %2'lik SDS ve 50mM NaCl kullanılmıştır. Şekil 4.13. ve 4.14.'de görüldüğü gibi, amilaz ve proteaz için en yüksek enzim üretimi çeşme suyunun bulunduğu ortamlarda 0,66 U/mg ve 470 U/mg olarak tespit edilmiştir. Saf su ve tampon bulunan ortamlarda ise enzim üretiminin oldukça düşük olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. NaCl kullanılan ortamda ise amilaz üretimi gerçekleşmemiştir. Çeşme suyunun mineral madde bakımından zengin olması mikroorganizmanın enzim üretme yeteneğini-stabilitesini arttırmış olabilir.

Bu çalışmada amilaz ve proteaz enzim aktivitesi üzerine karbon kaynaklarının etkisini araştırmak için glukoz, sukroz, maltoz, nişasta, galaktoz ve fruktoz kullanılmıştır. Nişasta ve galaktoz eklenen ortamdaki amilaz üretimleri kontrolden daha yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15. 4.16). Nişastanın %2'lik kullanıldığı ortamda ve galaktozun %1'lik kullanıldığı ortamda amilaz üretimi kontrolden daha yüksek ölçülmüştür. Glikoz ve fruktozun her üç konsantrasyonda da kontrole göre daha az amilaz üretimi verdiği belirlenmiştir. Sükroz ve maltoz içeren ortamlarda amilaz üretimi nispeten glikoz ve fruktoz içeren ortamın amilaz üretiminden daha iyi, kontrolden ise daha az amilaz üretimi verdikleri belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda genellikle çok çeşitli karbon kaynaklarının kullanıldığı görülmektedir. Karbon kaynağı olarak %1 ve %2'lik karbon kaynakları sıklıkla kullanılmıştır.

Nişasta içeren ortamların yüksek amilaz üretimi gösterdikleri daha önceki çalışmalarda belirtilmiş olup, çalışmamıza paralellik göstermektedir (**Kıran ve ark. 2005; Ramachandra 2004**). Ortama eklenen karbon kaynakları mikroorganizmaların beslenebilmeleri, üremeleri ve enerji üretebilmeleri için gereksinim duydukları en büyük besin kaynağıdır. Bu ortamlardan nişasta doğada bilinen en yaygın glikoz kaynağı olduğundan mikroorganizmanın üremesini ve enzim üretmesini uyarmış olabilir.

Proteaz retimi için SSF'li ortamına eklenen karbon kaynakları bakımından en yüksek proteaz aktivitesi maltoz ve nişasta içeren ortamlardan elde edilmiştir. Nişastanın %2'lik konsantrasyonu ve maltozun %1'lik konsantrasyonu en iyi proteaz aktivitesi veren karbon kaynakları olarak belirlenmiştir. Galaktozun %2 olarak eklendiği ortamdaki elde edilen proteaz aktivitesi kontrolden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Nişastanın %1, fruktozun %2 ve maltozun %2 olarak eklendiği ortamlardan elde edilen proteaz aktivitesi kontrolden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Glikoz ve sükrozun her üç konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda proteaz aktivitesi kontrolden daha düşük olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada enzim aktivitesi üzerine azot kaynaklarının etkisini incelemek için %1, %2 ve %3 oranında bacto kasamino asit, bacto liver, amonyum sülfat, re, NH₄Cl ve methionin kullanılmıştır. SSF'li ortamına eklenen azot kaynakları bakımından amonyum sülfat (0,77 U/mg) ve Bacto kasamino asit (0,76 U/mg) kontrole göre daha iyi amilaz aktivitesi vermişlerdir (şekil 4.17.). Elde edilen amilaz aktivitesi kontrole çok yakındır. Bacto liver ve NH₄Cl kontrole yakın amilaz

aktivitesi vermişlerdir. Üre ve methionin eklenen ortamın aktivitesi kontrolden az çıkmasına rağmen değerler birbirlerine yakın olarak bulunmuştur.

Proteaz üretimi için SSF'li ortamına eklenen azot kaynakları bakımından amonyum sülfat ilave edilen ortamda 402 U/mg olarak en yüksek değer bulunmuştur. Bacto casamino asit (389 U/mg) kontrole yakın (362 U/mg) proteaz üretimi göstermişlerdir. Bacto liver, üre ve methionin kontrolün altında proteaz üretimi göstermişlerdir. NH_4Cl eklenen ortamda ise proteaz aktivitesine rastlanmamıştır (Şekil 4.18).

SSF'li ortama katı substrat olarak eklenen pirinç miktarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada amilaz ve proteaz için %30'luk (3 g) kepek miktarının bulunduğu ortamlarda en yüksek enzim üretimi (0,66 U/mg ve 462 U/mg) gözlenmiştir (Şekil 4.19 ve 4.20.). Kepek miktarı azlığında ortamda substrat az olacağından üreme ve enzim üretimide yavaş olacaktır. Substrat miktarı belli bir miktarın üzerine çıktığında ise mikroorganizmalar için havalandırmanın güçlüğü, su oranının düşmesi gibi nedenlerden dolayı enzim üretimi de azalmış olabilir.

SSF'li ortama eklenen kepek karışım oranlarının etkisini belirlemek için yapılan çalışmada pirinç kabuğu ile beraber en iyi aktivite gösteren buğday kepeği kullanılmıştır. Pirinç kabukları ve buğday kepekleri 3 g olacak şekilde farklı oranlarda karıştırılmış olup amilaz için en yüksek üretim değeri %20 pirinç ve %10 buğday kepeği kullanılan ortamda 0,96 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21). Proteaz için, Şekil 4.22'de gösterildiği gibi %15 pirinç ve %15 buğday kepeğinin kullanıldığı ortamda en yüksek üretim 475 U/mg olarak belirlenmiştir. Her iki enzim

için de pirinç kabuğu oranlarının düşmesi enzim üretimlerinin azalmasına yol açmaktadır. Pirinç kabuğunda bulunan besin maddeleri bakterinin bu enzimleri salgılamasını uyarmış olabilir.

Bu çalışmada Van Gölü kıyısından izole edilen *Bacillus licheniformis* bakterisinin SSF tekniği kullanılarak yöremize özgü olarak üretilen pirinç kabuklarının bulunduğu ortamda amilaz ve proteaz enzimi üretebildiği gösterilmiştir. Elde edilen amilaz ve proteaz enziminin sıcaklık ve pH özelliklerinden dolayı kâğıt, deterjan, gıda ve tekstil gibi alanlarda kullanılabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak, mikroorganizmalar kullanılarak SSF’li ortamda enzim üretme çalışmaları son yıllarda giderek artmaya ve SmF’e alternatif bir teknik haline gelmeye başlamıştır. Dünya genelinde artan tarımsal atıkların tekrar kullanılmalari ekolojik ve ekonomik olarak oldukça önemlidir. Birçok tarımsal atığın hayvan yemi vb. alanlarda kullanılabildiği bilinen bir gerçektir. Fakat SSF tekniği kullanılarak bu atıklardan daha ekonomik yarar sağlamak mümkündür.

6 KAYNAKLAR

ABATE M.A., CASTRO G.R., Sineriz F., Callieri D.A.S., 1999 Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*, Biotechnol Lett 21 249–252.

ACUNA-ARGUELLES, M. E., GUTIERREZ-ROJAS, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G., & FAVELA-TORRES, E. 1995 Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Applied and Microbiology Biotechnology, 43, 808–814.

ADAMS T.T., EITEMAN M.A., HANEL B.M. 2002 Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. Bioresour Technol vol.82, p. 33–41

ADLERCREUTZ P., IBORA L. J., SCHMIDT E. PEDERSON S., 1994 Application in: applied biocatalysis. Eds: J. M. S. Cabral, D. Best, L. Borross and J. Trampe, Hoowood Academic Publishers GmbH, Switzerland, 109-156

ADREAS K.G, ANNETTE I, PINTO L.R.C, DENISE M.G.F. 1999 Lipase production by *Penicillium resticum* in solid state fermentation using babassu oil cake as substrate. Process Biochem vol.35:85–90.

AEHLE W, MISSET O. 1999 Enzymes for industrial applications. In: Rehm HJ, Reed G, editors. Biotechnology, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH,:189-216.

AGRAWAL D., PATIDAR P., BANERJEE T., PATIL S. 2005 Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis Process Biochemistry 40 1131–1136

AGUILAR G, MORLON-GUYOT J, TREJO-AGUILAR B AND GUYOT JP., 2000 Purification and Characterization of an extra cellular alphaamylaseproduced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG18 010T, an amyolytic lactic acid bacterium. Enzyme MicrobTechnol vol. 27, p. 406–413

AHUJA A, GUPTA R, SAXENA RK, GIGRAS P. 1998 An antistaling enzyme from microbes for baked products. In: Crowther JS, Marthi B, editors. Proceedings of the microbiological safety of processed foods. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, :127.

AIJUN ZHANG, CHEN HONGZHANG., LI ZUOHU. 2005 Air pressure pulsation solid state production of alkaline protease by *Bacillus pumilus* 1.1625 Process Biochemistry vol.40, p.1547–1551

AIKAT K, BHATTACHARYYA B.C. 2000 Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. Process Biochem; vol.35:907–14.

AIKAT K, BHATTACHARYYA B.C. 2001 Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. Process Biochem; vol.36:1059–68.

ALVIN S.A. KARTHIK L. XIAO-XING. 2002 Textural and sensory properties of α -amylase treated poi. Stored at 4. Food Process. Preseve vol. 26, p. 31-61.

APAR K D., ÖZBEK B. 2004 α -Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis Process Biochemistry, vol.39, p. 1137-1144

ARENSKÖTTER M, BAUMEISTER D, BRÖKER D, HÖLKER U, IBRAHIM EMA, LENZ J, KARSTEN K, STEINBÜCHEL A. 2003 Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur stofflichen Wiederverwertung kautschukhaltiger Rest- und Abfallstoffe. In: Heiden S, Erb R (eds) Transkript Sonderheft, Nachhaltige Biokatalyse. DBU, Osnabruck, pp 28–32

ARULMANI M., APARANJINI K., VASANTHI K., ARUMUGAM P., ARIVUCHELVI M., and KALAICHELVAN P.T. 2007 Purification and Partial Characterization of Serine Protease From Thermostable Alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AKI. World Journal of Microbiology Biothechnology. Vol. 23, p. 475-481

ASGHER A.M., ASAD J.A.M., RAHMAN B. S.U., LEGGE R.L. 2007 A Thermostable α -amylase from a Modarately Thermophilic *Bacillus Subtilis* Strain for Starch Processing. Journal of Food Engineering. Vol. 79, p. 950-955

BABU K.R., SATRANARAYANA T. 1993 Parametric optimization for extracellular alpha amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* B49; Folia Microbiol., vol. 38 (1) p. 77-80,

BABU KR, SATYANARAYANA T. A. 1995 amylase production by the thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. Process Biochem; vol.30:305–309.

BABU KR, SATYANARAYANA T. A. 1996 Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. J Sci Ind Res 55:464–467

BAHÇECİ, H. 2004 Tuz Gölü Bakteri İzolatlarının Yağ Asidi Metil Ester Analizi ve Hücre Dışı Enzimlerinin Karakterizasyonu. Master Tezi. ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

BALAKRISHNAN K., PANDEY A. 1996 Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. J Sci Ind Res vol. 55, p. 365–372

BANERJEE, U.C., SANI, R.K., AZMI, W., SONI, R.. 1999 Thermostable Alkaline protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive Process Biochemistry. vol. 35, p. 213-219

BARRIOS-GONZALEZ, J., GONZALEZ, H., & MEJIA, A. 1993 Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. Biotechnology Advances, vol. 11, p. 539–547.

BARRIOS-GONZALEZ J, TOMASINI A. 1996 Production of aflatoxines in solid state fermentation. J Sci Ind Res vol. 55, p. 424–430

BATTAL M. 2004 Alkalinnı Proteaz Üreticisi Yerel *Bacillus* Soylarının İzolasyonu, Nitelendirilmesi ve Enzim Üretimini Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi Gebze Yük. Tek. Enst

BAYSAL, Z., UYAR, F., AYTEKİN, C. 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. Process Biochem. vol.38, p. 1665–1668

BAYSAL Z., UYAR F., DOĞRU M., ALKAN H. 2008 Production of Extracellular Alkaline α -Amylase by Solid State Fermentation with a Newly Isolated *Bacillus* sp. Preparative Biochemistry & Biotechnology vol. 38, p. 191-197

BECK J., SAUVAGE E., CHARLIER P., MARCHAND-BRYNAERT J.
2008 2-Aminopropane-1,2,3-tricarboxylic acid: Synthesis and co-crystallization
with the class A β -lactamase BS3 of *Bacillus licheniformis* Bioorganic & Medicinal
Chemistry Letters 18 3764–3768

BECKS S, BIELAWASKI C, HENTON D, PADALA R, BURROWS K,
SLABY R. 1995 Application of a liquid stable amylase reagent on the Ciba Corning
Express clinical chemistry system. Clin Chem vol.41, p. 186.

BEG QK, BHUSHAN B, KAPOOR M, HOONDAL G.S. 2000 Enhanced
production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11–3 and its
application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. Enzyme Microb Technol
vol.27, p. 459–466

BEG Q.R., GUPTA R. 2003 Purification and Characterization of an
Oxidation-Stable, Thiol- Dependent serine Alkaline Protease from *Bacillus
mojavensis*. Enzyme and Microbial thecnology. vol. 32, p. 294-304

BENJAMIN S, PANDEY A 1997 Coconut cake—a potent substrate for the
production of Lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. Acta Biotechnol
vol.17, p. 241–251

BERNFELD P. 1955 Enzymes carbohydrate metabolism, In Methots In
Enzymology Academic Press, vol.17 p.149-158,

BIDOCKHA M.J, KHACHATOURIANS, GEORGE G. 1990 Identification
of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity

toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. J Invertebr Pathol;56:362–70.

BIDOCKHA M.J. 1987 Purification and properties of an extracellular protease by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl Environ Microbiol;53:1679–84.

BISCHOFF K.M., LIU S., HUGHES SR. 2007 Cloning and characterization of a recombinant family endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361 Process Biochemistry vol.42, p.1150–1154

BISGAARD-FRANTZEN H, BORCHERT T, SVENDSEN A, THELLERSEN MH, VAN DER ZEE P. PCT 1995 Patent Application. WO 95/10603,

BOSE K AND DAS D. 1996 Thermostable alpha-amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRLB 14 368. Indian Journal of Experiment Biology vol.34, p. 1279–1282

BRUINENBERG PM, HULST AC, FABER A, VOOGD RH. 1996 A process for surface sizing or coating of paper. European Patent Application EP 0,690,170 A1.

CARRIZALES V AND JAFFE W. 1986 Solid-state fermentation: an appropriate biotechnology for developing countries. Interscience vol.11, p.9–15

CARROLL JO, BOYCE COL, WONG TM, STARACE CA. 1987 Bread antistaling method.. Patent Application US4654216.

CEN P, XIA L. 1999 Production of cellulase by solid-state fermentation. Adv Biochem Eng vol. 65, p. 69–92

CHEN, H. Z. 1992 Advances in solid-state fermentation. Research and Application of Microbiology (China), vol.3, p. 7–10.

CHRISTEN P, BRAMORSKI A, REVAH S, SOCCOL C.R. 2000 Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. Bioresour Technol vol.71, p.211–215

COLE MS. 1982 Antistaling baking composition.. Patent Application US4320151.

CORDEIRO C.A.M., MARTINS M.L.L., LUCIANO A.B. 2002 Production and Properties of α -amylase from Thermophilic *Bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 33, p. 57-61

DAĞAŞAN L. 1997 Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U)Enzimlerin Gıda ve Hayvan Yemi Üretimindeki Uygulamaları-Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 14-15,

DAYANANDAN A, KANAGARAJ J, SOUNDERRAJ L, GOVINDARAJU R, SUSEELA RAJKUMAR G. 2003 Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. J Cleaner Prod vol.11:533–6.

DE VRIJE T, ANTOINE N, BUITELAAR R.M, BRUCKNER S, DISSEVELT M, DURAND A, et al. 2001 The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. Appl Microbiol Biotechnol vol.56, p.58–68.

DEY, G., MITRA, A., BANERJEE, R., MAITI, B.R. 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. Biochem. Eng. J. 7, 227–231.

EGAS MC, DA COSTA MS, COWAN DA AND PIRES E.M. 1998 Extracellular alpha-amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: rification and biochemical characterization. Extremophiles vol.2, p. 23–32

EGWIM E.C. and OLOYEDE O.B. 2008 Immobilization of -amylase from Acha (*Digiteria exilis*) on Diferent Cellulose Fibre materials Asian Journal of Biochemistry vol. 33, p. 57-61

ELIBOL M., MOREIRA A.R. 2005 Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation, Proc Biochem vol.40, p.1951–1956.

ELLIAIAH P., ADINARAYANA K., BHAVANI Y., PADJAMA P., SRINIVASULUB. 2002 Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly *Aspergillus* species ; Process Biochemistry, vol. 38 p. 615-620

ERTAN F, YAGAR H., AND BALKAN B. 2007 Optimization of á-Amylase Immobilization in CalciumAlginate Beads Preparative Biochemistry & Biotechnology, vol.37, p. 195–204

ERTAN F, YAGAR H., AND BALKAN B. 2006 Some Properties of Free and Immobilized a-Amylase from *Penicillium griseofulvum* by Solid State Fermentation Preparative Biochemistry & Biotechnology, vol.36, p. 81-91

FARLEY PC, IKASARI L. 1992 Regulation of secretion of *Rhizopus oligosporus* extra cellular carboxyl proteinases. J Gen Microbiol vol.138, p. 2539–44.

FAN-CHING Y, LIN IH. 1998 Production of acid protease using thin stillage from a rice spirit distillery by *Aspergillus niger*. Enzyme Microb Technol vol. 23, p.397–402.

FAN L, PANDEY A, MOHAN R, SOCCOL C.R. 2000 Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. Acta Biotechnol vol.20, p. 41–52

FRANCIS F., SABU A., NAMPOOTHIRI K.M., S. RAMACHANDRAN, S. GHOSH, G. SZAKACS,. PANDEY A. 2003 Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*, Bioch Eng J vol.15, p. 107–115.

FOGARTY, W.M KELLY, C.T. 1990 Microbial enzymes and biotechnology, Elsevier Science Publishers, London, pp. 71–132.

FOLLMER C. 2008 Insights into the role and structure of plant ureases. Phytochemistry vol. 69, Issue 1, , p.18-28

GERMANO S, PANDEY A, OSAKU CA, ROCHA SN, SOCCOL C.R. 2003 Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. Enzyme Microb Technol vol.32, p. 246–251

GHORBEL B., KAMOUN A.S., NASRI M., 2003 Stability Studies of Protease *Bacillus cereus* BG1. Enzyme and Microbial thecnology. Vol. 32, p. 513-518

GIRI NY, MOHAN AR, RAO LV, RAO CP. 1990 Immobilization of aamylase complex in detection of higher oligosaccharides on paper. Curr Science vol 59: p. 1339-1340.

GOES A.P., J.D. SHEPPARD. 1999 Effect of surfactants on α -amylase production in a solid substrate fermentation process, J Chem Technol Biotechnol vol.74 , p.709–712.

GÖZÜKARA E.M. 1989 Biokimya. Nobel Tıp Kitabevleri; s. 225, 577
ANKARA

GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATRA H., GOSWAMI V.K., CHAUHAN B. 2003 Microbial α -amylases: a biotechnological perspective ; Enzyme and Technology, vol. 38 p. 1599-1616

HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., HAVAKITAYAMA, K., OZAKI, K., KAWAI, S. HO, S. 2001 Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM 38. Appl. Environment Microbiology, vol. 67 (4) p. 1744–1750.

HAMER R.J. 1995 Enzymes in the baking industry. In: Tucker GA, Woods LFJ, editors. Enzymes in food processing. Galsgow: Blackie Academic and Professional, :190-222.

HAMILTON L.M., KELLY C.T., FOGARTY W.M. 1999 Production and properties of the starch-digesting α -amylase of *Bacillus sp.* *IMD 435*; Process Biochemistry, vol. 35 p. 27-31

HAN B-Z, ROMBOOTS F.M, NOUT M.J.R. 2001 A Chinese fermented soybean food. Int J Food Microbiol vol. 65, p.1–10

HAN B., KIERS J.L., NOUT R.M.J. 1999 Solid-substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus* spp.: Comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation, J Biosci and Bioeng vol.88 (2) p. 205–209.

HASHIM, S.O., DELGADO, O.D., MARTI'NEZ, M.A., KAUL, R.H., MULAA, F.J.,MATTIASSON, B. 2005. Alkaline active maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34. Enzyme Microb. Technol. vol .36, p. 139–146

HAWUMBA, J.F., THERON, J., BROZE, V.S. 2002 Thermophilic Protease Producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda. Current Microbiology. Vol. 45, p. 144-150

HE L., CHEN W., LIU Y. 2006 Production and partial characterization of bacteriocin- like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12 Microbiological Research vol.161, p. 321—326

HEBEDA R.E, BOWLES L.K, TEAGUE W.M. 1990 Developments in enzymes for retarding staling of baked goods. Cereal Foods World vol. 35, p. 453-457.

HEBEDA R.E, BOWLES L.K, TEAGUE W.M. 1991 Use of intermediate temperature stability enzymes for retarding staling in bakedm goods. Cereal Foods World vol. 36, p. 618-6 24.

HECK J.X., FLÔRES S.H., HERTZ P.F., AND AYUB M.A.C. 2006 Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. Bioresource Technology, vol. 97 p. 1902-1906

HENDRIKSEN HV, PEDERSEN S, BISGARD-FRANTZEN H. 1999 A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application WO 99/35325.

HESSELTINE, C. W. 1977 Solid-state fermentation. Part 1. Process Biochemistry, vol.12, p. 24–27.

HOLKER, U., HOFER, M., & LENZ, J. 2004 Biotechnology advantages of laboratory- scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 64, p. 175–186.

HORIKOSHI K. 1996 Alkaliphiles-from an industrial point of view ; FEMS Microbiology Reviews vol. 18 p. 259-270

ISHIDA H, HATA Y, KAWATO A, ABE Y, SUGINAMI K, IMAYASU S. 2000 Identification of functional elements that regulate the glucoamylase- encoding gene (glab) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Curr Gem vol.37, p.373–9.

KALİMUTHU K., BABU SR., VENKATARAMAN D., BİLAL M., GURUNATHAN S. 2008 Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces vol. 65, p. 150–153

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

KAPUCU, N. C. 2003 Lipaz enziminin katalizlediği bir ester üretiminin süperkritik karbondioksitte incelenmesi. Ankara Üniv. Fen-Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

KASHYAP DR, K SONI S, TEWARI R. 2003 Enhanced production of pectinase by *Bacillus sp.* DT7 using solid state fermentation. Bioresour Technol;88:251-4.

KIRAN, E. Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU, U. 2003 Zeytin İlıcısı'ndan Termofil Alkafilik Amilolitik *Bacillus sp* Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi; KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 6 (2), s. 41 -48

KIRAN, E. Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU, U., ARIKAN, B. 2005 Effects of Carbon Sources and Various Chemicals on The Production of a Novel Amylase from a Thermophilic *Bacillus sp* K-1229. Turkish Journal of Biology p. 99-103

KIRAN, E. Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU, DOSTBİL N. 2006 Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1),

KOTA KP, SRIDHAR P. 1999 Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for cephamycin C production. Process Biochem;34:325-8.

KOTTWITZ B, UPADEK H, CARRER G. 1994 Applications and benefits of enzymes in detergent. Chim Oggi;vol.12, p. 21-24.

KRAUS J.K, HEBEDA R.E. 1993 Method for retarding staling of baked goods.. US patent 5,209,938.

KRISHA C. CHANDRASEKARAN M., 1996 Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (*CBTK 106*) under solid-state fermentation ; Microbial Biotechnology., vol. 46 p. 106-111

KULP K. 1993 Enzymes as dough improvers. In: Kamel BS, Stauffer CE, editors. Advances in baking technology. New York: Blackie Academic and Professional, VCH Publishers, :152_ 78.

KUMAR CG, TAKAGI H. 1999 Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnol Adv. vol 17, p.561–94.

KUMAR D, JAIN VK, SHANKER G, SRIVASTAVA A 2003 Utilisation of fruit wastes for citric acid production by solid state fermentation. Process Biochem.vol.38,p.1725-1729

KUMAR, S., SHARMA, N. S., SAHARAN, M. R., SINGH, R. 2005 Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. Process Biochemistry, vol.40, p.1701–1705.

KUNAMNENI A, PERMAUL K AND SINGH S. 2005 Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Journal of Bioscience Bioengineering vol.100, p. 168–171

LAMBERT PW. 1983 Industrial enzyme production and recovery from filamentous fungi. In: Filamentous fungi IV. London: Edward Arnold Publisher Ltd..

LEIGHTON, T.J.; DOI, R.H.; WARREN,R.A.J; KELLN,R.A. 1973 The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. vol.76, p.103-122

LEKHA PK, LONSANE BK. 1994 Comparative titers, location and properties of tannin-acyl-hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. Proc Biochem vol.29, p.497–503.

LIU MQ., LIU FG.,2008 Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it Protein Expression and Purification vol.57, p. 01–107

LIU, B. L., & TZENG, Y. M. 1999 Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptide in solid state fermentation. Biotechnology Letters, vol. 21, p. 657–661.

LONSANE BK, RAMESH MV. 1990 Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. In: Advances in applied microbiology, San Diego: California Academic Press,: vol. 35. p.1- 56.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAR, A.L. 1951 Protein measurement with the Folin-phenol reagent. Biol. Chem.,vol.193, p.265-275

MAHANTA N., GUPTA A., S.K. KHARE 2008 Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate Bioresource Technology vol.99, p.1729–1735

MARTINS ES, SILVA D, DA SILVA R, GOMES E. 2002 Solid state production of thermostable pectinase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochem vol. 37, p.949–954

MENZEL C, LERCH T, SCHNEIDER K, WEIDEMANN R, TOLLNICK C, KRETYMER G, SCHEPER T, SCHUGERT K. 1998 Application of biosensors with an electrolyte isolator semiconductor capacitor (EIS-CAP) transducer for process monitoring. Process Biochem vol.33, p.175-180.

MERHEB CAROLINA W., HAMILTON CABRAL, ELENI GOMES, ROBERTO DA-SILVA 2007 Partial characterization of protease from a

thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein Food Chemistry vol.104, p. 127–131

MESSAOUD, E.B., ALI, M.B., ELLEUCH, N., MASMOUDI, N.F., BEJAR, S. 2004 Purification and properties of a maltoheptaose- and maltohexaoseforming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116. Enzyme and Microbial Technology vol.34, p. 662–666.

MITCHELL, D.A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. 2002 Overview of solid state bioprocessing. Biotechnol. Annual Rev. 8, 183–225.

MULIMANI V.H., RAMALINGAM GNP. 2000 α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses ; Biochemical Education, vol.28 p. 161-163,

NAGAMPOOTHIRI KM, PANDEY A. 1996 Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp. Bitechnol Lett;6:199– 204.

NARAYANA K.J.P., VIJAYALAKSHMI M. 2008 Production of Extracellular α -amylase by *Sreptomycess albidoflavus* Asian Journal of Biochemistry vol. 3 p. 194-197

NIGAM P, SINGH D 1996a Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for microbial protein production. J Sci Ind Res 55:373–380

NIGAM P, SINGH D 1996b Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for cellulolytic enzymes production. J Sci Ind.Res 55:457–463

NGUYEN, Q.D., REZESSY-SZABO, J.M., CLAEYSSSENS, M., STALS, I., HOSCHKE, A. 2002 Purification and characterization of amylolytic enzymes from

thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. Enzyme and Microbial Technology. vol. 31, p. 345–352.

OLESEN T. 1991 Antistaling process and agent.. Patent Application WO9104669.

ÖZTÜRK S. 2007 Ülkemizden İzole Edilen *Bacillus Licheniformis* Ba17'den Elde Edilen Alkalinnı Proteaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu Marmara Üniv. Fen Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi

PANAGIOTOU G, KEKOS D, MACRIS BJ, CHRISTAKOPOULOS P. 2003 Production of cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Ind Crops Prod vol. 18, p.37–45

PANDEY A. 2003 Solid-state fermentation, Biochem Eng J vol.13, p.81–84.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P.1999 Solid statefermentation for the production of industrial enzymes. Current Science vol. 77 (1), p. 149–162.

PANDEY A., SOCCOL C.R., MITCHELL D. 2000a New developments in solid state fermentation: I – Bioprocesses and products. Process Biochem **35**:1153–1169

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., BRAND, D., MOHAN, R., & ROUSSOS, S. 2000b. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemistry Engineering Journal, vol.6, p.153–162.

PEDERSON H., NIELSEN J. 2000 The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures ; Microbial Biotechnol, vol. 53 p. 278-281

PRIEST FG. 1977 Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* Bacteriol. Rev; vol.41:p. 711-753.

PRIETO JA, BORT BR, MARTINEZ J, RANDEZ-GIL F, BUESA C, SANZ P. 1995 Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae* . Biochem Cell Biolog, vol. 73:p. 41-49.

PRITCHARD PA. 1992 Studies on the bread improving mechanisms of fungal α -amylase. J Biol Educ; vol.26, p. 12-18.

QIHE C., GUOQING H., JINLING W. 2007 Journal Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 and its elastase Characterization evaluation of Food Engineering vol. 80, p. 490–496

RAIMBAULT M. 1998 General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic J Biotechnol vol.1, p.1–15

RAHARDJO YOVITA S.P. SUSANA SIE FRANS J. WEBER JOHANNES TRAMPER ARJEN RINZEMA 2005 Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems Biomolecular Engineering vol.21, p. 163–172

RAJAGOPALAN G., KRISHNAN C. 2008 α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate Bioresource Technology vol 99, p. 3044–3050

RAMACHANDRA S., PATEL K.A., NAMPOOTHIRI M.K., FRANCIS F., NAGY Y., SZAKACS G., PANDEY A. 2004 Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amylase ; Bioresource Technology, vol.39 p.169-174

RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESPANDE VV. 1998 Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev;62:597–635.

REYES-MORENO C, ROMERO-URÍAS C, MILÁN-CARRILLO J, VALDÉZ-TORRES B, ZÁRATE-MÁRQUEZ E. 2000 Optimization of the solid state fermentation process to obtain tempeh from hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Plant Foods Hum Nutr vol. 55, p.219–228

ROBINSON T, SINGH D, NIGAM P 2001 Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. Appl Microbiol Biotechnol vol.55, p.284–289

ROBINSON T, CHANDRAN B, NIGAM P 2002 Studies on desorption of individual textile dyes and a synthetic dye effluent from dye adsorbed agricultural residues using solvents. Bioresour Technol vol.84, p. 299–301

ROBYT J.F. 1989 Mechanism and Product Specificity of α -Amylases, Denpun Kagaku, vol.36 p.287-301

ROUKAS T. 1999 Citric acid production from pod by solid fermentation. Enzyme Microbiol Biotechnol vol.24:54–9.

SAKAI K. AND YAMANAMI T. 2006 Thermotolerant *Bacillus licheniformis* TY7 Produces Optically Active *L*-Lactic Acid from Kitchen Refuse under Open Condition Journal Of Bioscience And Bioengineering Vol. 102, p.132–134.

SANDHYA C., SUMANTHA A., SZAKACS G., PANDEY A. 2005 Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation Process Biochemistry vol. 40, p. 2689–2694.

SANGEETHA PT, RAMESH MN AND PRAPULLA SG. 2004 Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. Apply Microbiology Biotechnology vol.65, p. 530–537

SCHREIER, P. 1997 Enzymes and Flavour biotechnology. In: Advances in Biotechnological Engineering/Biotechnology, Vol. 55, Ed: T. Scheper, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 51-72

SELVAKUMAR P, ASHAKUMARY L, PANDEY A. 1998 Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of solid substrate. Bioresour Technol vol. 65, p. 83–85

SELVEKUMAR P, PANDEY A. 1999 Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochem vol.34:851–5.

SHALENBERGER R.S. 1990 Introduction to sweeteners chemistry. Cereal Foods world vol. 35, p. 377-381

SI JQ. 1999 Enzymes, baking, bread making. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation, vol. 2. Wiley, p.947-958.

SINNOTT M.L. 1990 Catalytic Mechanisms of Enzymic Glycosyl Transfer, chem. Rev. vol. 990 p.1171-1202

SOCCOL, C. R., ILOKI, I., MARIN, B., & RAIMBAULT, M. 1994. Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. Journal of Food Science and Technology, vol. 31, p. 320–323.

SOCCOL, R. S., & VANDENBERGHE, L. P. S. 2003 Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal, vol. 13, p. 205–218.

SODHI, H.K., SHARMA, K., GUPTA, J.K., SONI, S.K. 2005 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 Biochem. vol .40, p. 525–534.

SONI K.S., KAUR A., GUPTA J.K. 2003 A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for hydrolysis of wheat starch Process Biochemistry, vol. 39 p. 185-192

SOOKHEO B., SINCHAIKUL S.,PHUTRAKUL S.T.C. 2000 Purification and Characterization of Highly Thermostable Protease from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification. vol. 20, p. 142-151

SOUZA J.V.B, SILVA E.S, MAIA M.L.S, TEIXEIRA M.F.S. 2003 Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase

production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. Process Biochem vol. 39, p.455–458

STREDANSKY M., CONTI E., NAVARINI L., BERTOCCHI C. 1999 Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation, Proc Biochem vl.34, p.11–16.

SURESH PV, CHANDRASEKERAN M. 1999 Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochem vol.34:257–67.

SURYANARAYAN, S. 2003. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. Biochemical Engineering Journal, vol. 13, p.189– 195.

TANYILDIZI M.S., OZER D., ELIBOL M. 2007 Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation Biochemical Engineering Journal 37 294–297

TELEFONCU A. 1996 Biyoteknoloji, s. 1-4, Ege Üniversitesi Fen- Edb. Fak. Yayınları No:159 Izmir,

TELEFONCU A.1997 Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzimlerin Endüstriyel uygulamaları. Bölüm 10.

TENGERDY RP, SZAKACS G. 2003 Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. Biochem Eng J vol.13, p. 169–179

TERESSITA M.E., RICHARD D.T. ANDA FRANCISCO B.E. 1996 Microbial production of alfa amylase for food and other industrial applicattion. Ann. Rep. IC Biotechnol. vol. 19, p. 669-677

TIERNY L, DANKO S, DAUBERMAN J, VAHA-VAHE P, WINETZKY D. 1995 Performance advantages of novel α -amylases in automatic dishwashing. Am Oil Chem Soc 86th San Antonio Annual meeting

TOLAN J.S. 1996 Pulp and paper. In: Godfrey T, West S, editors. Industrial enzymology, 2nd ed. New York: Stockton Press,327-338.

UL-HAQ I, IDREES S, RAJOKA M.I. 2002 Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. Process Biochem vol. 37, p. 637–641.

URTZ BE, RICE WC. 2000 Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. Mycol Res;104:180–6.

UYAR. F., 1993 Prokaryotlarda proteolitik aktivite. Dicle Üniv. Fen-Bilimleri Enstitüsü Yayınları Yüksek Lisans Tezi.

UYAR F., BAYSAL Z. 2004 Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. Process Biochemistry; vol. 39, p.1893-1898

VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., & LEBEAULT, J. M. 2000. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, vol.74, p.175–178.

VAN DAM HW, HILLE JDR. 1992 Yeast and enzymes in bread making. Cereal Foods World, vol. 37, p.245-252.

VAN EE JH, VAN RIJSWIJK WC, BOLLIER M. 1992 Enzymatic automated dishwash detergents. Chim Oggi; vol.10, p. 21-24.

VISHNU C., NAVEENA B.J., ALTAF MD., VENKATESHWAR M., REDDY G., 2006 Amylopullulanase A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid, Enzyme Microb Technol vol. 38 (3–4) p.545–550.

WANG L, WANG YJ. 2001 Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation. Cereal Chem vol.78, p.690–2.

WINDISH W.W, MHATRE N.S. 1965 Microbial amylases. In: Wayne WU, editor. Advances in applied microbiology, vol. 7. New York: Academic Press,:273_ 304.

WISEMAN A. 1993 Designer enzyme and cell applications in industry and environmental monitoring. J Chem Tech Biotechnol vol.56, p. 3–13.

XU H., SUN L., ZHAO D. ZHANG B., SHI Y. And WU Y. 2008 Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric. vol.88, p. 529–535

YANG SS, SWEI WJ. 1996 Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation of corn-cob. World J Microbiol Biotechnol;12:43–6.

YESHAJAHU P. 1991 Functional Properties of Food Components. Academic Pres Inc. London pp.116-121

TABLÖLAR

Tablo–1.1. Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanım Alanları

Tablo 2.1. SSF'in avantajları ve dezavantajları

Tablo 2.2. SSF'in SmF'e göre Biyoteknolojik avantajları, Sonuç ve Problemin çözümü

Tablo 2.3. SSF'te kullanılan substratlar, mikroorganizmalar ve üretilen ürünler.

ŞEKİLLER

Şekil 4.1. Farklı Substratların Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.2. Farklı Substratların Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.3. İnkübasyon süresinin amilaz üretimi üzerine etkisi

Şekil 4.4. İnkübasyon süresinin Proteaz üretimi üzerine etkisi

Şekil 4.5. Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.6. Proteaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.7. İnokülüm Hacminin Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.8. İnokülüm Hacminin Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.9. Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.10. Proteaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.11. Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın Etkisi

Şekil 4.12. Proteaz aktivitesi üzerine pH'nın Etkisi

Şekil 4.13. Ekstraksiyon Medyumunun Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.14. Ekstraksiyon Medyumunun Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.15. Karbon Kaynaklarının Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.16. Karbon Kaynaklarının Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.17. Azot Kaynaklarının Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.18. Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.19. Farklı Kepek Miktarlarının Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.20. Farklı Kepek Miktarlarının Proteaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.21. Kepek Karışım Oranlarının Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.22. Kepek Karışım Oranlarının Proteaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

EKLER

4.12.1.1 Ek.1. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması:

20 g 3,5 dinitro salisilik asit 400 ml distile su içinde çözüldü. Başka bir beherde 32g/300 ml NaOH çözeltisi magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra yavaş yavaş 3,5 dinitro salisik asit üzerine eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Hacim saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında ŞanlıUrfa'nın Bozova ilçesinde doğdum. İlk ve ortaöğrenimi Adyaman'ın Kahta ilçesinde tamamladım. 1990 yılında Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 1994 yılında mezun oldum. Aynı yıl Diyarbakır ili Silvan İlçesinde Öğretmenliğe başladım. 1997 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans öğrenimine başladım. 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora öğrenimine başladım. 2002 yılından itibaren Diyarbakır R.K.Cumhuriyet Fen Lisesinde Biyoloji Öğretmenliği yapmaktayım..