

150655

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Citrullus lanatus* L. (KARPUZ) ve *Cucumis melo* L.  
(KAVUN) KABUĞU KULLANILARAK KATI-FAZ  
FERMENTASYON TEKNİĞİ (SSF) İLE TOPRAKTAN  
İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp.'DEN ALKALİN SERİN  
PROTEAZ ELDESİ

Veysi OKUMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)

150655

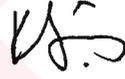
DİYARBAKIR

KASIM-2004

T.C  
DİCLE UNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

Veysi OKUMUŞ tarafından yapılan bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji  
Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	
Başkan: Doç. Dr.	Kemal GÜVEN	
Üye : Yrd. Doç. Dr.	Sema AGÜLOĞLU FİNCAN (Danışman)	
Üye : Yrd. Doç. Dr.	Zübeyde BAYSAL	

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

03/12/2004

  
Prof. Dr. Çetin AYTEKİN



## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalıőmalarım için bana gerekli koőulları sağlayan Sayın Hocam Yrd.Doç.Dr. Sema AGÜLOğLU FİNCAN' a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Deneysel çalıőmalarım sırasında ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Fikret UYAR ve Kimya Bölümünden Yrd.Doç.Dr. Zübeyde BAYSAL' a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarımda daima desteğini gördüğüm Yrd.Doç.Dr. Veysel TOLAN'a teőekkürü borç bilirim.

Bana laboratuvar imkanı sağlayan Dicle üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanlığına ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne teőekkürlerimi sunarım.



## Amaç

Proteolitik enzimler deterjan, gıda, ilaç, yem ve tekstil endüstrileri ile diğer birçok biyoteknolojik alanda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada endüstriyel öneme sahip olan alkalın serin proteazın ucuz ve yüksek verimde üretimi hedeflendi. Bu amaca uygun mikroorganizma topraktan izole edildi. *Bacillus* cinsi bakteriler kolay saklanabilirliği, hızlı üremesi ve bol miktarda ekstrasellular enzim salgılaması nedeniyle *Bacillus* sp. uygun mikroorganizma olarak tercih edildi. Katı-faz fermentasyon (SSF) yöntemi ekstrasellular enzimlerin düşük masrafla, hızlı bir şekilde, bol miktarda ve çevreye zarar vermeden üretilebildiği bir yöntem olduğu için kullanıldı.

Bölgemizde bol miktarda bulunan, ekonomik önemi olmayan ve birikerek çevre kirliliğine yol açan karpuz ve kavun kabuğu katı substrat olarak kullanılarak SSF yöntemi ile yüksek miktarda alkalın serin proteaz eldesi amaçlandı.

## Özet

Bu çalışmada *Bacillus* sp.'den SSF tekniğıyle alkalın serin proteaz üretimi araştırıldı. *Bacillus* sp.'nin hangi substratta daha iyi proteaz ürettiğini tespit etmek amacıyla karpuz kabuğı, kavun kabuğı, mercimek kabuğı, pirinç kabuğı ve darı kullanıldı.

En yüksek enzim üretimi kavun kabuğunda 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda görüldü. Enzim üretimi üzerine bazı karbon ve azot kaynaklarının etkisi çalışıldı. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, deterjan, ve ağır metallerin etkisi incelendi. Yapılan inhibisyon çalışmasında PMSF ile inhibe olan enzimin Alkalın Serin Proteaz olduğu tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** *Bacillus* sp.; SSF; alkalın serin proteaz



## Summary

In this study production of serin protease has been researched with the SSF technique from *Bacillus* sp. Melon waste, watermelon waste, lentil husk, rice husk and millet were used to determine in which substrate *Bacillus* sp. produces better protease.

The highest enzyme production was seen in the watermelon waste at the end of 72 hour incubation time. Then some carbon and nitrogen sources were studied to the production of enzyme. Besides, effect of pH, temperature, detergent, and heavy metals were studied to the enzyme activity. In this inhibition study it was determined that the enzyme which is inhibited with PMSF was Alkaline Serin Protease.

**Keywords:** *Bacillus* sp. ,SSF, Alkaline Serin Protease



TEŞEKKÜR.....	I
AMAÇ.....	II
ÖZET.....	III
SUMMARY.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SSF (Solid State Fermentation).....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. SSF' in SmF' e Göre Avantajları.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. SSF' in Kullanım Alanları.....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. SSF' te Dikkat Edilecek Hususlar.....</b>	<b>4</b>
1.4.1 Mikroorganizma Seçimi.....	4
1.4.2 Substrat Seçimi.....	4
1.4.3 Substratın Parça Büyüklüğü.....	5
1.4.4 Nem Miktarı.....	5
1.4.5 İnkübasyon Süresi.....	5
1.4.6 Sıcaklık ve pH Etkisi.....	6
1.4.7 Ekim Miktarı.....	6
1.4.8 Substratın Otoklavlanma Süresi.....	6
1.4.9 Fermentörün Çalkalama-Karıştırılma ve Havalandırılması.....	7
1.4.10 Karbon ve Azot Kaynakları.....	7
<b>1.5. Proteazlar.....</b>	<b>8</b>
1.5.1 Proteaz Çeşitleri.....	8
1.5.2 Proteazların Başlıca Kullanım Alanları.....	9
1.5.2.1 İpekçilik.....	9
1.5.2.2 Deterjan Sanayi.....	10
1.5.2.3 Gıda Endüstrisi.....	10
1.5.2.4 Hayvan Yemi Endüstrisi.....	10
1.5.2.5 Dericilik.....	10
1.5.2.6 Röntgen Filmlerinden Gümüşün Geri Kazanılması.....	11
<b>1.6 Baciller.....</b>	<b>12</b>
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>14</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Kimyasal Maddeler.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Cihazlar.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Biyolojik Materyal.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Besiyerleri.....</b>	<b>20</b>
3.4.1 SSF Besiyeri.....	20
3.4.2 Sıvı Besiyeri.....	20
3.4.3 Katı Besiyeri.....	20
<b>3.5 Çözeltiler.....</b>	<b>20</b>
3.5.1 Tampon Çözeltiler.....	20
3.5.2 Azokazein.....	20
3.5.3 Metal Çözeltileri.....	21
3.5.4 Deterjan Çözeltileri.....	21

3.6	Enzim Aktivite Tayini.....	21
3.7	<i>Bacillus</i> sp.'nin Üretimi .....	22
3.8	Farklı Parça Büyüklüğündeki Substratların Elde Edilmesi.....	22
3.9	İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	22
3.10	Enzim Aktivitesinde Kullanılan Üst Sıvının Eldesi.....	22
3.11	İnhibisyon Çalışması.....	22
3.12	Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	22
3.13	pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	23
3.14	Enzim Aktivitesi Üzerine Azot ve Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	23
3.14.1	Azot Kaynakları.....	23
3.14.2	Karbon Kaynakları.....	23
4.	BULGULAR.....	24
4.1	<i>Bacillus</i> sp.'nin NB besiyerinde Üreme Eğrisi.....	24
4.2	Farklı Substratlarda Enzim Aktivitesinin Tespiti.....	25
4.3	Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	26
4.4	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	27
4.5	İnhibisyon Çalışması.....	28
4.6	Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	29
4.7	Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi.....	30
4.8	Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	31
4.9	Farklı Metallerin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	32
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
6.	KAYNAKLAR.....	36
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	43

# 1.GİRİŞ

## 1.1 SSF (Solid State Fermentation)

SSF mikroorganizmaların susuz veya suyun az bulunduğu katı ortamlarda fermentasyon yapmasıdır. Bununla beraber substrat mikroorganizmaların metabolizma ve büyümesi için yeterli neme sahip olmalıdır. Bu yöntemde özellikle ekonomik önemi olmayan tarımsal sanayi atıkları substrat olarak kullanılarak ekonomik önemi yüksek olan yem, besin, ilaç ve tarıma dayalı endüstriyel ürünlerin üretilmesi düşük maliyetle ve hızlı bir şekilde sağlanır (1,2).

Fermentasyon tekniğinin tarihine kısaca bir göz atacak olursak, değişik zamanlarda bazı bileşiklere olan gereksinimin son derece artması, bazı bileşiklerin biyosentez yolu ile üretilmesine olanak sağlamıştır. Özellikle II. Dünya savaşı sırasında çok sayıda yaralının enfeksiyondan ölmesi sebebiyle A. FLEMING' in 1928' de keşfettiği penisilinin geniş çapta üretimini zorlamış ve savaş sırasında sakin bir şehir olan Peorial'daki ( US ) zirai araştırma laboratuvarında toplanan bazı bilimadamlarının büyük gayretleri ile penisilin, *P.chrysogenum* denilen fungus kullanılarak geniş çapta üretilmeye başlanmıştır. Penisilin üretimi SmF(Submerged fermentation) yöntemiyle geliştirildiği için ve dünya savaşı süresince penisilinin çok önemli olmasından dolayı SmF fermentasyonla bileşik oluşturmada model teknoloji oldu. Araştırmacılar zamanlarını ve dikkatlerini SmF üzerine yoğunlaştırdıkları için muhtemelen bilinmeyen SSF ihmal edildi. Yine de 1950-1960 yıllarında SSF sistemleri üzerine küçük çapta araştırmalar devam etti. Mantar kültürleri kullanılarak steroid dönüşümü açıklandığında yavaşta olsa SSF'e eğilim artarak devam etti. SSF için bir diğer kilometre taşı 1960-1970 yıllarında bu yöntemle mikotoksinlerin üretimi oldu. Tarımsal sanayi atıklarından proteince zenginleştirilmiş büyükbaş hayvan yemi üretimi sonraki ve daha büyük bir faaliyet olarak açıklandı. Böylece düşük maliyetli atıkların değerlendirilmesi için SSF tek yol olarak önerildiğinden birçok araştırmacı bu yöntem ile ilgilenmeye başladı (1,3).

Son 15-20 yılda SSF ile ilgili çalışmalar yeniden hız kazanmıştır. Nişastalı maddelerden protein bakımından zenginleştirilmiş hayvan yemi üretimi, orman ve tarımsal atıklardan tek hücre proteini üretimi, manyok kökü ve şekerpancarından etanol üretimi bu çalışmalara örnek olarak verilebilir (4).

## 1.2 SSF'in SmF'e Göre Avantajları

SSF tekniği SmF tekniđine göre birçok avantaja sahiptir. Bunlar:

- Kompleks makinalar, ekipmanlar ve kontrol sistemleri gerektirmemesi
- Elde edilen ürün düşük hacim içerisinde dağılmış olduğundan saflaştırılmasının daha kolay ve masrafsız olması
- Fermentasyon ortamının az suya ihtiyaç duyması
- Fermentasyon ortamının kolay havalandırılması
- Bakteriyel kontaminasyon riskinin düşük olması
- Fermentasyon için az alan gerektirmesi
- Fermentasyon ortamının kolay hazırlanması
- Düşük maliyetle yinelenebilir olması
- Doğrudan sporların kullanılabilmesi
- Az miktarda atık su oluşumu
- Çok miktarda ürün eldesi
- Düşük enerji ihtiyacı olarak sıralanabilir (1,5,6).

SSF'te katabolit represyonu minimize edildiğinden, SmF'te çok önemli olan katabolit represyon SSF'te pek önem taşımamaktadır. Mantarlarda ksilanaz üretimi katabolit represyonu tarafından düzenlenir. SmF tekniğinde ksiloz, glukoz gibi indirgenmiş şekerlerin fermentasyon ortamında birikmesinin ksilanaz üretimi üzerinde olumsuz etki yaptığı belirtilmiştir. Bu nedenle SSF yöntemiyle, ksilanaz enziminde içinde bulunduğu farklı hidrolitik enzimlerin bazı mikroorganizmalar tarafından yüksek miktarlarda üretildiği tanımlanmıştır (7).

SSF tekniği enzim üretiminde harika bir potansiyele sahiptir. Bu teknikte özellikle ilgi çeken nokta ham substratların doğrudan enzim kaynağı olarak kullanılabilmesidir. SmF tekniğiyle enzim üretiminin maliyeti yüksek olduğundan SSF tekniği çok daha cazip bir metod olarak düşünülür (8).

## 1.3 SSF'in Kullanım Alanları

SSF günümüzde eğilimlerin bu yöntem üzerine odaklanmasından dolayı birçok alanda kullanılmaktadır. Tarımsal sanayi atıklarının biyolojik olarak detoksifikasyonu, ekin

veya ekin artıklarının besinsel olarak zenginleştirilmesinin biyodönüşümü, biyoyileştiricilerin üretimi, bakteriler tarafından ayrıştırılabilen zehirli bileşiklerin ortadan kaldırılması, antibiyotikler, alkaloidler, bitki büyüme faktörleri, enzimler, organik asitler, biyopestisitler ve aroma bileşiklerinin üretilmesi gibi işlemlerin SSF ile yapılması bu yöntemin gelişmesine olanak vermiştir (1).

SSF sadece etanol, tek hücre proteini, mantarlar, aminoasitler gibi ürünlerin üretilmesinde tarımsal sanayi atıklarının alternatif substratlar olarak kullanılmasında değil aynı zamanda çevre kirliliğini önlemek için iyi bir yardımcıdır (9).

SSF yöntemi ile elde edilen bazı mikrobiyal ürünler ve kullanılan mikroorganizmalar tablo 1' de verilmiştir(10).

Tablo 1 SSF yöntemi ile elde edilen bazı mikrobiyal ürünler

Ürün	Mikroorganizma	Substrat	İşlev
Aflatoxin	<i>A.oryzae, A.panasitus</i>	Buğday,yulaf,pirinç,mısır	Mycotoxin
Bakteriyal endotoksin	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Hindistan cevizi artığı	İnsektisit
Giberellin	<i>Giberella fujikwori</i>	Buğday kepeği,manyok mısır koçanı	Bitki büyüme hormonu
Penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Şekerkamışı artığı	Antibiyotik
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Soya fasülyesi artığı	Antibiyotik
Klavulanik asit	<i>S.clavulingerus</i>	Ayçiçeği artığı	$\beta$ -Laktamaz inhibitörü
Proteaz	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Rhizobus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Trichoderma sp.</i>	Buğday kepeği Ayçiçeği artığı Kahve kabuk ve yaprağı Mısır,pirinç,patates artıkları	
Amilaz	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Rhizobus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Saccharomyces sp.</i>	Buğday kepeği, mısır, pirinç Hindistan cevizi artığı Çay artığı	
İnülinaz	<i>Staphlococcus sp.</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Hindiba kökü	
Esteraz	<i>Penicillium pinophilum</i>	Buğday samanı	
Glutaminaz	<i>Vibrio costicola</i>	Buğday kepeği, mısır koçanı, talaş	

## 1.4 SSF'te Dikkat Edilecek Hususlar

SSF yönteminde dikkat edilmesi gereken birkaç önemli nokta vardır. Bunlar; uygun mikroorganizmanın ve substratın seçimi, yöntem için bazı parametrelerin optimizasyonu, ürünün izolasyonu ve saflaştırılmasıdır. Yöntem için uygun parametrelerin seçimi ve optimizasyonu önemli bir noktadır. Bunlar; substratın parçacık büyüklüğü, ortamın ilk nem miktarı, pH, substratın ön işleme, nispi nem, inkübasyon sıcaklığı, çalkalama ve havalandırma, ekim miktarı ve zamanı, N ve P gibi eser elementlerin ve karbon kaynaklarının eklenmesi olarak sıralanabilir (1,11).

### 1.4.1 Mikroorganizma Seçimi

Katı substratlar üzerinde iyi gelişen çok sayıda mantar türü olduğu bilinmektedir. Mantarların katı substratlar üzerinde iyi geliştiği bilinirken çoğu bakteri türü bu ortamlarda büyüyemez. Bunun sonucu olarak çoğunlukla SSF'in mantarlarla çalışılması gerektiği düşünülmüştür. Bununla beraber enzim üretiminde bakteri irklarının(*Bacillus* irkları) başarıyla kullanıldığını belirten çok sayıda rapor vardır(12).

Maksimum ürün elde etmek için mikroorganizmaların çevresel koşullarını bilmek çok önemlidir. Mikroorganizmalar büyüme ve metabolik aktiviteleri için çeşitli substratlardan besin kaynağı olarak yararlanır. SSF'te mikroorganizmalar ortamdaki mevcut substratları besin maddesi olarak kullanabilmek için gerekli enzimleri salgılar(5,13).

### 1.4.2 Substrat seçimi

SSF'te katı substrat sadece mikrobiyal büyüme için besin kaynağı değil aynı zamanda hücreler için bir tutunma yüzeyini oluşturur(10).

Mikrobiyal ürün elde etmek için iyi bir substrattan beklenenler şunlardır; substratın ekonomik değeri çok düşük olmalıdır veya hiç olmamalıdır, üretim hacmi yüksek olmalı ve devamlılık göstermelidir, kolay elde edilebilmelidir, taşınma ve saklanması kolay yollardan olmalıdır, kullanılacak mikroorganizmaların gereksinimlerine uygun olmalıdır, elde edilecek ürün kolay ve masrafsız saflaştırılabilmelidir (3).

### 1.4.3 Substratın Parça Büyüklüğü

SSF'te substratın parçacık büyüklüğü kritik bir faktördür. Küçük parçacıklar büyüme için daha fazla yüzey alanı sağlar fakat parçacıklar arası boşluk ve gözenekler azdır. Büyük parçacıklarda gözenekler fazladır ancak büyüme için doymuş yüzey alanı daha azdır. Birbirine zıt bu iki faktör; yüzey alanının azalması-porların artması karşılıklı olarak optimum büyüme ve enzim üretimini saptar (14).

Küçük parçacıklar mikrobiyal solunumu engellediği için büyüme yavaş olur. Parçacıkların büyük olması durumunda mikroorganizmaların substrat yüzeyine bağlanmaları sınırlı olur (10).

### 1.4.4 Nem miktarı

SSF'te nem içeriği başarı için çok önemli bir faktördür. Ortamın nem miktarı katı substratın fiziksel niteliklerini yüksek oranda etkilemektedir. Fazla nem substratın por açıklığını azaltır, düşük oksijen transferine sebep olur ve parça büyüklüğünü değiştirir (6).

Düşük nem katı substratın çözünürlüğünü azaltır ve şişmesini engeller (15).

Fermentasyon ortamına minimum oranda suyun eklenmesi sterilizasyon için gereklidir. Fazla oranda su eklenmesi ortamdaki ürünün hidrolizine sebep olur. Ancak yeni hücre meydana gelebilmesi için başlangıçtaki nem oranı önemli bir faktördür (15,17).

Ortamdaki nem miktarı % 12'nin altına düştüğünde bütün biyolojik aktiviteler durur. Bu nedenle SSF'in devam edebilmesi için ortamın nem miktarının bu seviyenin altına inmemesi gerekir. Mantarların düşük su ihtiyacı göstermesi nedeniyle bu yöntemde genellikle mantarlar kullanılır. SSF'de mantarlar kullanıldığında düşük nem içeriği bakteriyel kontaminasyonu minimum düzeye indirir. Bakterilerin yüksek oranda suya ihtiyaç duyması nedeniyle bakterilerin bu yöntem için uygun olmadığı düşünülür (18,19).

### 1.4.5 İnkübasyon Süresi

İnkübasyon süresi kullanılan kültürün özelliğine ve enzim üretme modeline göre değişir. Enzim aktivitesinin maksimum olarak tespit edildiği noktadan sonra aktivite zamana bağlı olarak gittikçe düşmektedir. Bunun sebebi enzimin fermentasyon ortamındaki diğer bileşiklerle etkileşimi sonucu denatürasyonu veya ayrışması olabilir.

Özellikle proteolitik aktivite gösteren enzimlerin ortama salgılanması bu sonucu doğurabilir. Substratın yapısının zamanla değişmesi de inkübasyon süresi üzerinde etkilidir (14,20).

#### **1.4.6. Sıcaklık ve pH Etkisi**

Mikroorganizmaların üremesi ve son ürünün kararlılığı ancak belirli pH ve sıcaklık derecelerinde mümkün olmaktadır. Bu nedenle ortam pH ve sıcaklığının mikroorganizmanın en iyi üreyebildiği noktalarda bulunacak şekilde ayarlanması gerekir(11).

SSF’te fermentasyon süresince çok miktarda ısı oluşturulur. Oluşan ısı mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri ile doğrudan orantılıdır. Katı substrat ısı iletkenliği bakımından zayıf olduğundan sıcaklığın yer değiştirmesi oldukça yavaş olur. Bazen fermentasyon ortamında yüksek ısı birikimi ürünün denatürasyonuna sebep olur. Fermentör içindeki ısı, havalandırma ile fermentör içinde dağıtılabilir veya dışarı atılabilir(1).

#### **1.4.7 Ekim Miktarı**

Ekim miktarının hacminin belirli bir seviyeye kadar artırılması genellikle organizmanın büyüme ve büyüme ile ilgili aktivitelerinin iyiye gitmesini sağlar. Ancak belirli bir seviyenin üstündeki ekim miktarı ortamdaki besin maddelerinin sınırlı olmasından dolayı mikrobiyal aktivitenin düşmesine sebep olur. Düşük hacimdeki ekim ise fermentasyon ortamındaki hücre sayısının az olmasına neden olur, bu da mikroorganizmaların büyüme, substrattan yararlanmak için optimum sayıya ulaşma ve dolayısıyla ürün eldesi için daha uzun zamana gereksinim göstermesine neden olur (21).

#### **1.4.8 Substratın otoklavlanma Süresi**

Uzun süreli otoklavlama substratın fiziksel ve kimyasal yapısını bozduğundan ürün veriminin düşmesine neden olur.

Yüksek oranda nişasta içeren muz atığı(sap)  $\alpha$ -amilaz üretmek için katı substrat olarak kullanılmadan önce işlem gerektirir. Katı substratın 120 °C’de 60 dakikadan

fazla otoklavlanması enzim üretimini düşürür. Uzun süreli otoklavlanma nişasta granüllerinin bozunmalarına, viskozitelerinin artmasına sonuç olarak büyümenin yavaşlamasına ve enzim üretiminin azalmasına neden olur (14).

#### **1.4.9 Fermentörün Çalkalama-Karıştırılma ve Havalandırılması**

SSF'te steril olarak ekim yapıldıktan sonra besiyeri ortamının yeterli derecede karıştırılması işlemi önemli bir faktördür. Karıştırma işlemi mikrobiyal hücre ve sporların kümeleşmesini önleyerek homojenizasyonu sağlar. Ayrıca ısı ve gaz transferi sağlanır. Yeterli çalkalama biyomas konsantrasyonunun fermentörün bütün noktalarına yayılmasını sağlayarak fermentasyonun zamanla bazı bölgelerde durmamasını garanti eder. Mantarlarda yüksek hızla çalkalama işlemi sıklıkla SSF'te ürün verimini veya sporlaşmayı azaltır. Hızlı çalkalama substrat parçacıklarının dağılmasına ve buna bağlı olarak oluşan misellerin erken fazda dağılarak zarar görmesine sebep olur (22).

Fujian ve Honzhang çalkalama ve karıştırmanın mantar misellerine ve substrat porlarına verdiği zararı ortadan kaldırmak için çalkalama yerine durağan bir fermentörde periyodik olarak hava değişimini sağlayan bir sistem geliştirmişlerdir. Bu sistemin sadece fermentöre yeterli oksijen sağlaması dışında aynı zamanda mantarların üremesi için uygun ortam oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu yolla sıcaklığın fermentörün her tarafına eşit şekilde dağılmasını sağlamışlardır (23).

#### **1.4.10 Katı Besiyerine Eklenen Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi**

SSF yönteminde katı substratı desteklemek için ortama eklenen azot ve karbon kaynakları ürün eldesinde önemli bir noktayı oluşturur. Bu yöntemde kullanılacak azot ve karbon kaynakları mikroorganizmanın faydalanabileceği formda olmalıdır (17).

Malathi ve Chakraborty bu yöntemle farklı azot ve karbon kaynakları kullanarak alkalın proteaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada (kontrol:6.6 U/ml) organik azot kaynakları kullandıklarında en yüksek aktiviteyi mısır özütü (10.47 U/ml) ve en düşük aktiviteyi jelatini (2.98 U/ml) buğday kepeğine eklediklerinde tespit etmişlerdir. Karbon kaynaklarını kullandıklarında ise (kontrol:6.54 U/ml) en yüksek aktiviteyi laktozda (7.03 U/ml), en düşük aktiviteyi maltozda (3.19 U/ml) tespit etmişlerdir (24).

Gombert ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ortama eklenen nişastanın proteaz ve glucoamilaz üretimini arttırdığını ancak lipaz üretimini azalttığını belirtmişlerdir(25).

## 1.5 Proteazlar

Proteolitik enzimler bilinen en eski hidrolitik enzimlerdir. Bu enzimler proteinleri önce büyük parçalara daha sonra da amino asitlere kadar parçalarlar çoğu enzimin tersine belirli bir substrata spesifik olmayıp peptid zincirinin belirli yapı biçimlerine spesifiktirler (27).

Proteazlar endüstriyel enzimlerin en önemli grubunu oluşturup gıda, ilaç, deri, ipek endüstrisi, atık arıtımı, peptit sentezi ve kullanılmış röntgen filmlerinden gümüşün geri kazanımında kullanılırlar. Proteolitik enzimler endüstriyel enzim talebinin yaklaşık % 60'ını karşılar. Proteazlar bakteri, küf ve mayalarında içinde bulunduğu pek çok mikroorganizma tarafından ayrıca memeli dokularından üretilir. Proteaz çeşitlerinden alkalın serin proteazların büyük bir kısmının *Bacillus* ırkları tarafından üretilmesine karşın bu iş için mantarların da kullanılabileceği anlaşılmıştır (18,26).

Mikrobiyal proteazlar arasında en çok payı alkali pH(8-12) ve yüksek sıcaklık aralığında (50-70°C) aktif ve stabil kalabilen alkalın proteazlar alır. Alkalın proteazlar özellikle önemlidir çünkü yüksek sıcaklık-pH derecelerinde ve oksitleyici ajanların etkilerine karşı dayanıklıdır.

### 1.5.1 Proteaz Çeşitleri

Proteazlar, Hartley tarafından etki mekanizmaları göz önüne alınarak başlıca dört grup altında toplanmıştır . Serin proteazlar , tiyol proteazlar , metalo proteazlar ve asit proteazlar(28). Bu mikrobiyal proteazların bir kısmı Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2 Mikrobiyal proteazların sınıflandırılması

		Enzim Kaynağı
SERİN PROTEAZLAR	1. Tripsin benzeri serin proteaz	<i>Streptomyces</i>
	2. Alkalın serin proteaz	<i>Bacillus, Streptomyces</i>
	3. Myxobacter-lytic proteaz	<i>Sorangium</i>
	4. Stafilokokkal proteaz	<i>St. aureus</i>
	5. Nötral serin proteaz	<i>B. Pumilus</i>
	6. Diğer serin proteazlar	<i>Escherichia</i> <i>Saccharomyces</i>
NÖTRAL PROTEAZLAR	1. Nötral metaloproteaz	<i>Bacillus</i>
	2. Alkalın metaloproteaz	<i>Pseudomonas</i> <i>Serration proteus</i>
ASİT PROTEAZLAR	1. Pepsin benzeri asit proteaz	<i>Aspergillus, Mucor</i>
	2. Rennet benzeri asit proteaz	<i>Bacillus, Mucor,</i> <i>Endothia</i>
TİOL PROTEAZLAR	1. Clostripain	<i>Clostridium</i>
	2. Streptokokkal proteaz	Grup A streptokoklar

## 1.5.2 Proteazların Başlıca Kullanım Alanları

### 1.5.2.1 İpekçilik

Ham ipek sericin adı verilen mumsu ve mat bir protein kılıfı ile sarıdır. İpek parlaklığının ve yumuşaklığının ortaya çıkabilmesi için sericinin ağartma adı verilen işlemle çözünmesi gerekmektedir. Bu operasyon geleneksel olarak ipek çilelerini sabunlu ve sodalı suda kaynatılarak yapılmaktadır ve kayıplara neden olmaktadır. Alkalın proteaz enzimi non-iyonik bir ıslatıcı ile pH:8 civarında 50-55°C'de

kullanılarak 1-2 saatte ekonomik bir şekilde ağartma yapılabilir. Enzim kullanımı ile ipek kalitesi yükseldiği gibi kayıplarda asgariye inmektedir(29).

### **1.5.2.2 Deterjan Sanayisi**

Deterjan endüstrisi alkali pH'da çalışan hidrolitik enzimlerin en önemli tüketicisi olup global enzim üretiminin çeyreğinden fazlasını kullanır. Pepsin çamaşır deterjanlarında 1913 yılından beri kullanılırken son zamanlarda alkalın proteaz kullanımı önemli bir şekilde artmıştır. Proteazların deterjan katkı maddesi olarak 1960'lı yıllarda kullanılması ticari olarak gelişimini canlandırmış ve araştırmalar esas olarak bu enzimler üzerine yapılmıştır. Yüksek sıcaklık ve pH derecelerinde stabil kalabilen alkalın proteazlar; protein içeren çim, kan, ter, süt ve yumurta lekelerini kumaşın lifleri arasından parçalayıp söker atar (18,26).

Diğer proteolitik enzimler birçok allerjik reaksiyona sebep olduğundan deterjan endüstrisinde en uygun proteolitik enzim alkalın serin proteazdır.

### **1.5.2.3 Gıda Endüstrisi**

Proteazlar peynir yapımında, etlerin yumuşatılmasında, proteinlerin hidrolizinde ve ekmek yapımında kullanılır (18).

### **1.5.2.4 Hayvan Yemi Endüstrisi**

Hayvan yemleri çoğunlukla bitkisel olup tahıl ve sebze proteinleri içerirler, bu proteinler tek mideli hayvanlar tarafından tamamiyle sindirilemez. Ancak doğrudan hayvan yeminin içine eklenecek olan proteazlar yardımıyla besinlerin kullanılabilirliği ve sindirimi daha kolay olur.

### **1.5.2.5 Dericilik**

**Islatma İşlemi;**

Tabakhaneye kurutulmuş veya tuzlanmış halde gelen derilerin önce su ile ıslatılarak yumuşatılması gerekmektedir. Geleneksel yöntemlerle 15-20 saat süren bu

işlem alkalın veya nötr proteazlar kullanılarak birkaç saat içinde ve daha iyi sonuçlar alınarak yapılabilmektedir. Islatma enzimlerinin kollajene dokunmadan diğer proteinleri ve peptidoglikanları çözmesi gerekmektedir. Deterjanlar için geliştirilen alkalın lipaz bu basamakta proteaz ile beraber kullanıldığında mükemmel yağ giderici etki yapmaktadır (29).

#### Kireçlik-Kıl Dökme İşlemi;

Islatılarak şişirilen deriler sönmüş kireç ve sodyum sülfür bulamacı ile kaplanarak kılların dökülmesi sağlanır. Burada alkalın proteaz kullanılması işlemi üç-dört kat çabuklaştırdığı gibi, sodyum sülfür ihtiyacını da yarıyarıya düşürdüğünden çevre kirlenmesinde nispeten azaltmaktadır. Enzim kullanımı gibi alternatif çözümler maliyetinin yüksek olmasından dolayı dericiler tarafından desteklenmemektedir. SSF ile proteaz üretimi daha ucuza malolduğundan dericilikte enzim kullanımı daha çekici hale gelecektir (24,29,30).

#### Sama İşlemi;

Eskiden beri enzim kullanılan sama işlemi sırasında kireç kalıntıları giderilmekte ve kollajen dışında diğer proteinlerin hidrolizi daha ileri safhalara ulaşmaktadır. Kollajen ise kontrollü ve kısıtlı bir şekilde etkilenecek fiber demetlerinin, dolayısıyla deri yapısının açılması sağlanmaktadır. Önceleri tamamen tripsin kullanılan sama işlemi günümüzde çoğunlukla alkalın proteaz enzimleriyle yapılmaktadır (29).

#### 1.5.2.6 Kullanılmış Röntgen Filmlerinden Gümüşün Geri Kazanılması

Kullanılmış röntgen filmleri çok sayıda küçük gümüş partikülleri içermektedir. Bu miktar toplam ağırlığın % 1.5-2 'sini oluşturur. Bu nedenle kullanılmış röntgen filmleri atılmadan önce depolanır ve üzerindeki gümüş kullanılmak üzere yeniden elde edilir. Geleneksel olarak gümüşün geri kazanımı yakma metodu ile gerçekleştirilir. Bu yöntemde gümüş içeren jelatin tabakaları fırınlarda yakılır ve gümüş küllerden ayrıştırılarak elde edilir. Yakma yöntemiyle polyesterden yapılmış filmlerden gümüş geri kazanılamaz. Ayrıca çok pahalı ve fazlasıyla çevre kirliliğine

yol açan bir yöntemdir. Son zamanlarda bu iş için daha ucuz ve etkili bir yöntem bulundu. Bu yöntemde alkalofilik *Bacillus* sp.'den elde edilen alkalın proteaz kullanılarak jelatin tabakaları üzerindeki gümüş partikülleri serbest bırakılarak geri kazanımı sağlanmıştır (31).

### 1.6 *Basiller*

*Basil*' ler özellikle gram pozitif, endospor yapan, doğada çok yaygın olan, toz, toprak, gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan çomakçık şeklindeki bakterilerdir. Bu bakteriler ekstrem koşullara sahip doğal ekosistemlerden izole edilip, kültüre alınabilir ve protein mühendisliği uygulamaları ile ürün arttırmaya yönelik işlemlerde kullanılır (32).

*Basil*' ler hücre dışı proteaz üretiminin spesifik üreticisidirler. *Basil*'lerde hidrolitik enzimlerin üretimi eksponensiyel fazda çok düşüktür fakat bu fazın bitiminde yüksek oranda enzim üretilir. Maksimum enzim üretimi stasyoner fazda meydana gelir. Yani proteaz üretimi biyomas oluşumuyla doğrudan ilişkilidir (33). *Basil*' lerden elde edilen proteazların bir kısmı Tablo 3' te yer almaktadır (27).

Tablo 3 *Bacillus*'ların proteazları

Enzim	Tür	Yorum
Alkalofilik proteaz	Alkalofilik <i>Bacillus</i> spp.	Alkalofilik türlerden yüksek optimum pH'lı serin enzimi
Aminopeptidaz	<i>B.subtilis</i> <i>B.licheniformis</i>	
Esteraz	<i>B.subtilis</i>	Yüksek esterolitik ve düşük proteolitik aktiviteye sahip serin enzimi
Halofilik proteaz	<i>B.subtilis</i>	Optimal olarak 1.0 M NaCl içeren ortamda oluşturulur
Metal proteaz	<i>B.amyloliquefaciens</i> <i>B.cereus</i> <i>B.licheniformis</i> <i>B.megaterium</i> <i>B.polymyxa</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis var. amylosacchariticus</i> <i>B.thermoproteolyticus</i> <i>B.thrungiensis</i>	Ca <sup>2+</sup> , 'u stabilite, Zn <sup>2+</sup> , 'yi aktivite için gerektiren enzimler, optimum pH nötr veya nötre yakın
Serin proteaz	<i>B.amyloliquefaciens</i> <i>B.licheniformis</i> <i>B.pumilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis var. amylosacchariticus</i>	Subtilizinler, alkali optimum pH, serin artığı aktif bölgede veya yakınında
Serin metal proteaz	<i>B.licheniformis</i> <i>B.pumilis</i>	Serin ve metal proteazların özelliklerini taşıyan hibrid enzim

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

**Agrawal ve arkadaşları** katı substrat olarak buğday kepeği kullanarak SSF yöntemiyle *Penicillium* sp.'den alkalın proteaz üretimi üzerine bir dizi çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar fermentasyon ortamına eklenen 25 mg/g soya proteininin proteaz aktivitesini % 50 oranında arttırdığını ayrıca ortama eklenen  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  gibi ağır metallerin enzim aktivitesini inhibe ettiğini,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  gibi metallerin enzim aktivitesini kısmen arttırdığını belirtmişlerdir(34).

**Fujiwara ve Yamamoto** topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp.'den elde ettikleri alkalın serin proteazın aktivitesinde optimum sıcaklığın 60 °C ve optimum pH: 11.5 olarak açıklamışlardır(36).

**Germano ve arkadaşları** SSF yöntemiyle *Penicillium* sp.'den elde edilen proteazın  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ile aktivite kaybına uğradığını,  $Ca^{2+}$  ve  $Na^+$  ile enzim aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Enzim inhibisyon çalışmasında, enzimin 3mM'lık PMSF ile % 93, 5 mM EDTA ile %23 oranında inhibe olduğunu açıklamışlardır(18).

**Malathi ve Chakraborty** deri endüstrisinde kullanılmak üzere SSF yöntemi ile alkalın proteaz üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada laboratuvarında yeni izole ettikleri *Aspergillus flavus*'u ve substrat olarak buğday kepeği kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada enzim üretiminde optimum sıcaklığı 32 °C, substrattaki en uygun nem oranını % 63, en uygun karbon kaynağını laktoz ve en uygun azot kaynağını mısır özütü olarak rapor etmişlerdir(24).

**Uyar ve Baysal** topraktan izole edilen *Bacillus* sp. kullanarak SSF yöntemi ile alkalın proteaz üretimini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada buğday kepeği ve mercimek kabuğu substrat olarak kullanılmış ve buğday kepeğinde enzim üretiminin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca optimum inkübasyon süresini 24 saat, nem miktarını % 30-40 ve ekim miktarını da % 20-25 (v/w) olarak açıklamışlardır(13).

**Puri ve arkadaşları** *Bacillus sp.*'den proteaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada fermentasyon ortamına eklenen en uygun karbon kaynağının % 1 oranında nişasta ve en uygun azot kaynağında % 0.5 oranında pepton olduğunu belirtmişlerdir(51).

**Johnvesly ve Naik** *Bacillus sp.* JB-99 'dan elde ettikleri alkalın proteazın aktivite için optimum pH: 11 , optimum sıcaklığı 70 °C, olarak rapor etmişlerdir(35).

**Joo ve arkadaşları** *Bacillus sp.*'den elde ettikleri proteazın % 1'lik SDS ile muamele edildiğinde aktivitesini % 90' dan fazla koruduğunu bildirmişlerdir(16).

**Yang ve arkadaşları** deproteinizasyon işleminde enzim yerine geleneksel olarak kullanılan kuvvetli asit ve bazların, kitinin kısmen deasetilasyonuna ve polimerin hidroliz olmasına sebep olduğundan *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri proteazı, kabuklu deniz canlılarının atıklarından kitin eldesi için kullanmışlardır(52).

**Agrawal ve arkadaşları** SSF yöntemiyle buğday kepeğini substrat olarak kullanarak *Beauveria felina* ve *Aspergillus oryzae* NCIM 649'dan optimum koşullarda proteaz eldesini karşılaştırmışlar ve *Beauveria felina*'nın iki kat daha fazla proteaz ürettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar elde edilen alkalın proteazın ticari olarak soya proteininin hidrolizinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir(37).

**Tunga ve arkadaşları** SSF ile proteaz üretimi üzerine bazı optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Topraktan izole edilen *Rhizopus oryzae* kullanan araştırmacılar proteaz ekstraksiyonunda farklı solventler (gliserol, etanol, metanol, aseton) kullanmışlar ve en uygun solventlerin % 10'luk etanol ile % 3'lük gliserol olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca optimum solvent hacminin 50 ml solvent/10 g buğday kepeği olduğunu ve optimum sıcaklığın 30 °C olduğunu belirtmişlerdir(53).

**Durham ve arkadaşları** topraktan izole ettikleri alkalofilik *Bacillus sp.* GX6638'den iki farklı proteaz elde etmişlerdir(AS:Alkaline-stable, HS: Heat-stable).Yaptıkları çalışmada HS'nin 60 °C 'de kararlı olduğunu ve Ca<sup>2+</sup> varlığında pH: 9.5'in üzerinde hızla aktivite kaybına uğradığını, AS'nin ise Ca<sup>2+</sup> varlığında pH: 9.5'in üzerinde kararlı olduğunu belirtmişlerdir(38).

**Aikat ve Bhattacharyya** SSF yöntemiyle buğday kepeğini substrat olarak kullanarak *Rhizopus oryzae*'den proteaz eldesi çalışmalarında, fermentasyon ortamında kullanılacak saf suyun 5 ml/gram buğday kepeği olduğunu belirtmişlerdir(2).

**George ve arkadaşları** *Bacillus amyloliquefaciens*'i proteaz enzimi üretimi için kullanmışlardır. Katı substrat olarak SSF'te buğday kepeğini, SmF'te ise soya fasüyesini kullanarak iki yöntemi karşılaştırmalı çalışmışlardır. Sonuç olarak optimum koşullarda 1 gram buğday kepeğinde SSF tekniği ile 250.000 U, 1 gram soya fasüyesinde SmF tekniğiyle 800.000 U enzim üretimi tespit etmişlerdir. Ancak SmF ile elde edilen enzimin 100 ml'lik hacim içerisine dağılmış halde olduğundan aktivite kaybına uğramaması için bazı stabilizörlerin eklenmesi gerektiğini ve enzimin 100 ml hacimden saflaştırılmasının zor olacağını belirtmişlerdir. Diğer taraftan SSF ile elde edilen enzimin 1 g buğday kepeğinde bulunduğunu ve fermentasyon sonrası buğday kepeğinin doğrudan enzim kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar SSF'in SmF'e karşı alternatif olarak kullanılabilceğini açıklamışlardır(39).

**Ashter ve arkadaşları** *Aspergillus niger* I1472 kullanarak feruloyl esteraz üretiminde SSF ve SmF yöntemlerini karşılaştırmalı olarak çalışmışlar ve SSF yöntemiyle esteraz üretiminin çok daha ucuz olduğunu rapor etmişlerdir(40).

**Couri ve arkadaşları** bazı hidrolitik enzimlerin (poligalakturonaz, ksilanaz, proteaz) SSF ile *Aspergillus niger* 3T5B8 tarafından üretimini incelemişlerdir. Substrat olarak buğday kepeği kullandıklarında en fazla poligalakturonaz enzimi, substrat olarak mango(hintkirazı) kabuğu kullandıklarında da en fazla ksilanaz enzimi üretildiğini rapor etmişlerdir(5).

**Crishna ve Chandrasekaran** SSF ile *Bacillus subtilis*(CBTK 106) tarafından  $\alpha$ -amilaz üretimini araştırmışlardır. Aynı koşullarda muz atıkları ve buğday kepeği kullandıklarında, muz atıklarından daha iyi sonuç alındığını rapor etmişlerdir. Enzim üretiminde optimum sıcaklığı 35 °C, pH:7, inkübasyon süresini 24 saat, parçacık büyüklüğünü 400µm, substratın nem miktarını % 70 ve optimum ekim miktarını % 10 olarak açıklamışlardır(14).

**Mulimani ve Ramalinga** SSF yöntemi ile  $\alpha$ -amilaz eldesi için substrat olarak buğday kepeği, pirinç samanı, kırmızı nohut kabuğu ve buğday kepeğini kullanmışlar ve en uygun substratın buğday kepeği olduğunu belirtmişlerdir. Fermentasyon ortamına karbon kaynağı olarak laktoz ve azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eklendiğinde enzim üretiminin yüksek oranda arttığını açıklamışlardır(41).

**Baysal ve arkadaşları** Diyarbakır-Çermik kaplıcalarından izole edilen *Bacillus subtilis*'i kullanarak SSF yöntemi ile  $\alpha$ -amilaz üretimini incelemişlerdir. Substrat olarak buğday kepeği ve pirinç kabuğu kullanıldığında, enzim üretiminin buğday kepeğinde daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir(50).

**Ramesh ve Lonsane** *Bacillus licheniformis* M27 kullanarak  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine SmF ve SSF'teki katabolit represyonun etkisini incelemişlerdir. SmF'te fermentasyon ortamında % 1 oranında glukoz bulunması halinde katabolit represyonundan dolayı  $\alpha$ -amilaz üretiminin inhibe olduğunu, buna karşılık SSF'te substrat olarak buğday kabuğu kullanıldığında fermentasyon ortamında % 15 oranında glukoz bulunması durumunda bile yüksek miktarda  $\alpha$ -amilaz üretimi olduğunu belirtmişlerdir(42).

**Ramesh ve Lonsane** SSF yöntemiyle *Bacillus megaterium* 16M kullanarak buğday kepeğinden  $\alpha$ -amilaz üretimini incelemişlerdir. Enzim üretiminde optimum koşulların 24 saat inkübasyon süresi, pH:7 ve 35 °C inkübasyon sıcaklığı olduğunu açıklamışlardır(43).

**Babu ve Satyanarayana** SSF yöntemiyle termofilik *Bacillus coagulans*'ı kullanarak  $\alpha$ -amilaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada en uygun katı substratın buğday kepeği olduğunu ve bu yöntemde katabolit represyonun etkili olmadığını belirtmişlerdir. SSF'te % 20 oranında glukoz bulunan ortamda enzim aktivite kaybının % 5 civarında olduğu halde, SmF'te glukoz oranı % 2'nin üzerine çıktığında katabolit represyonun meydana geldiğini ve enzim üretiminin durduğunu açıklamışlardır. Ayrıca durağan, çalkalamalı ve sabit havalandırmalı fermentörlerle yaptıkları çalışmada en iyi ürün veriminin havalandırmalı fermentörde olduğunu saptamışlardır(20).

**Selvakumar ve Pandey** SSF yöntemiyle inülinaz üretiminde bir maya (*Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466) ve bir bakteri türünü (*Staphylococcus* sp.RRL-1) karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Katı substrat olarak buğday kepeği, pirinç kepeği, hindistan cevizi atıkları ve mısır unu kullanan araştırmacılar her iki canlı çeşidinde de en uygun substratın buğday kepeği olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca maya kültürünün bakteriye oranla daha yüksek miktarda enzim ürettiğini, ancak bakteri kültürünün maksimum ürün verimine daha kısa sürede ulaştığını belirtmişlerdir(44).

**Kadar ve arkadaşları** lignosellülozik atıkları(mukavva ve kağıt atıkları) kullanarak SSF yöntemiyle mayalar tarafından etanol üretimi üzerine çalışma yapmışlardır(45).

**Krishna Bacillus subtilis** CBTk106 ve muz atıklarını kullanarak yaptığı çalışmada SSF'teki sellüloz üretiminin SmF'ten çok daha yüksek olduğunu belirtmiştir(46).

**Miura ve arkadaşları** mısır koçanını katı substrat olarak kullanarak SSF yöntemiyle *Rhizopus* sp. ve *Acremonium thermophilus*'tan laktik asit üretimi üzerine bir dizi çalışma yapmışlardır(47).

**Kang ve arkadaşları** SSF yöntemiyle pirinç ve buğday kepeğini katı substrat olarak kullanıp sellüloz ve hemisellülazın *Aspergillus niger* KK2 tarafından üretimini araştırmışlardır(48).

**Topakas ve arkadaşları** SSF yöntemiyle feruloyl esterazın *Sporotichum thermophile* tarafından üretilmesi üzerine yaptıkları çalışmada enzim üretimi için en uygun katı substratın buğday samanı olduğunu belirtmişlerdir(49).

### 3 . GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Kimyasal Maddeler

NaOH, HCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, TCA (trikloroasetikasit), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Tris-Hidroksimetilaminometan, CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CHAPS [(3(3cholamidopropyl)dimethylammoniopropanesülfonate], Merck Dermstad'dan. EDTA(etilendiamintetraasetikasit), PMSF (fenilmetilsülfoniklorid), Sigma'dan temin edildi.

Organik Madde olarak, Nutrient-Broth, Oxoid'den, Agar, Sigma'dan, Galaktoz, Mannoz, Fruktoz, Ksiloz, Arabinoz, Pepton, Casamino Acid , Bacto-Liver, Sukroz, Methionin, Difco'dan temin edildi.

#### 3.2 Cihazlar

Spektrofotometre	(UNICAM, 8625, UV, VIS)
Soğutmalı Santifüj	(Sigma Christ 2K 15)
Su Banyosu	(GRANT 6G,-20/ +100 °C)
Çalkalamalı Su Banyosu	(Clifton)
Etüv	(Heraeus)
Sterilizatör	(Heraeus)
pH metre	(Denway 3010, PCP 501 elektrod)
İnkübatör	(Sanyo MIR 552, MIR 5520)
Elektronik terazi	(GEC AVERY 0,0001 gr)
Vortex	(Stuart)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
Deep- freeze	(Harris, -95 °C)
Steril Kabin	(Telstar , AV- 100)
Blendir	(WARING COMMERCIAL Laboratuar Blender)
Otoklav	

### 3.3 Biyolojik Materyal

Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Kampüs alanındaki topraktan izole edilen *Bacillus* sp. kullanıldı.

### 3.4. Besiyerleri

#### 3.4.1. SSF Besiyeri

Karpuz kabuğu, kavun kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve darı kurutularak blendırdan geçirildi. Farklı gözenek büyüklüğüne sahip elekler yardımıyla 500 µm, 1000 µm, 1500 µm, 2000 µm olmak üzere dört farklı parça büyüklüğü elde edildi. 50 ml'lik erlenlere erlen hacminin %3'ü olacak şekilde 1,5 gr 1500 µm parça büyüklüğündeki substrattan tartılarak erlenlere aktarıldı. Üzerine 5 ml 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8) eklenerek otoklavlandı.

#### 3.4.2 Sıvı Besiyeri

8 gr NB (Nutrient Broth) 1 litre saf suda çözünerek , 100ml'lik erlenler içerisine 50 ml konarak otoklavlanarak hazırlandı.

#### 3.4.3. Katı Besiyeri

8 gr NB, 16 gr Agar 1 litre saf suda çözünerek otoklavlandı.

### 3.5 Çözeltiler

#### 3.5.1 Tampon Çözeltiler

pH: 7, 8 0.1 M Tris-HCl

pH: 9, 10, 11 0.1 M Karbonat-Bikarbonat Tamponu

#### 3.5.2 Azokazein

100 ml 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8) içinde 0.5 gram azokazein çözünerek hazırlandı.

### 3.5.3 Metal ve Ağır Metal Çözeltileri

0.1 M derişimde hazırlanan stok metal çözeltilerinden 22.5 µl (toplam reaksiyon hacmindeki derişim 3 mM) alınarak 250 µl enzim çözeltilisine ayrı ayrı ilave edilerek 15 dk önkübasyona bırakıldı. Daha sonra aktivite tayini yapıldı.

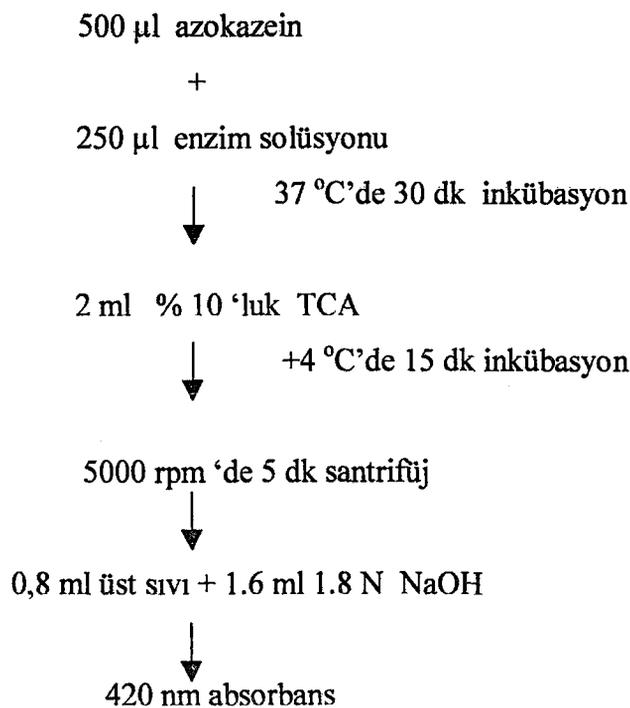
### 3.5.4 Deterjan Çözeltileri

CHAPS, SDS, Omomatik % 2 oranında 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8) kullanılarak hazırlandı. deterjan çözeltilerinden 75'er µl (toplam reaksiyon hacminin % 0.2'si) alınarak 250 µl enzim çözeltilisine ilave edilerek 15 dk önkübasyona bırakıldı. Daha sonra aktivite tayini yapıldı.

### 3.6 Enzim Aktivite Tayini

Aktivite tayini Leighton'nun yöntemi modifiye edilerek yapıldı.

0,1 M Tris-HCl (pH: 8) tamponu içinde % 0,5 'lik ticari azokazein çözeltilisi hazırlandı. 500 µl azokazein çözeltilisi ile 250 µl enzim solüsyonu reaksiyon tüpünde karıştırıldıktan sonra 37 °C de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 2 ml % 10 'luk TCA çözeltilisi ilavesiyle reaksiyon durduruldu. 15 dk +4 °C da inkübasyona bırakılan örnekler inkübasyon süresi sonunda 5000 rpm 'de 5 dk santrifüjlendi. 0,8 ml üst sıvı alınarak üzerine 1.6 ml 1.8 N NaOH ilave edildikten sonra ve 420 nm 'de absorbans ölçüldü. 1 ünite enzim, çözeltilinin 1 ml'si için 1 saat, 37 °C'de hidrolizlenen azokazein miktarı olarak tanımlanır (54).



### 3.7 *Bacillus* sp.nin Üretimi

NB sıvı besiyerine ekim yapıldıktan sonra 2'şer saat arayla alınan bakteri örneklerinin 460 nm'de absorbansları okunarak bakteri popülasyonunun üreme grafiği çıkarıldı.

### 3.8 Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

NB sıvı besiyerinde 24 saat , 37 °C 'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılan bakterilerden , 6 adet SSF besiyerine 1000 µl ekim yapıldı. Her 24 saatte bir (24-48-72-96-120-144) örnek alınarak enzim aktivitesi kontrol edilerek uygun inkübasyon süresi belirlendi.

### 3.9 Enzim Aktivitesinde Kullanılan Üst Sıvının Eldesi

72 saat inkübasyona bırakılan SSF besiyerine 10 ml 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8) eklenerek erlen çalkalandı . Elde edilen karışım gazlı bez yardımıyla bir behere süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne aktarılarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendikten sonra üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.

### 3.10 İnhibisyon Çalışması

0,1 M konsantrasyonda hazırlanan EDTA ve PMSF'den ayrı ayrı 37.5 µl alınıp reaksiyon tüplerindeki 250 µl enzime aktarıldı ve 15 dk öninkübasyona bırakıldı. Daha sonra aktivite tayini yapıldı.

### 3.11 Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi

Örnekler sırasıyla 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C 'da 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite tayini yapıldı.

### 3.12 pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi

0.1 M Tris-HCl pH: 7 ; 0.1 M Tris – HCl pH: 8; 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH: 9,10,11 olarak hazırlanan beş tampon çözeltisi kullanılarak derişimleri % 0.5'lik azokazein çözeltileri hazırlandı ve sabit miktarda enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayini yapıldıktan sonra optimum pH değeri belirlendi.

### 3.13 Enzim Üretimi Üzerine Bazı Azot ve Karbon Kaynaklarının Etkisi

#### 3.13.1 Azot Kaynakları

SSF katı besiyeri hazırlandıktan sonra azot içeren farklı organik ve inorganik maddelerden substratın % 10'u oranında erlenlere aktarılıp besiyeri otoklanmak üzere hazırlandı. Otoklavdan alınan besiyerlerine 1000 µl bakteri ekildi ve 72 saatlik inkübasyondan sonra örneklenip her birine aktivite tayini yapıldı.

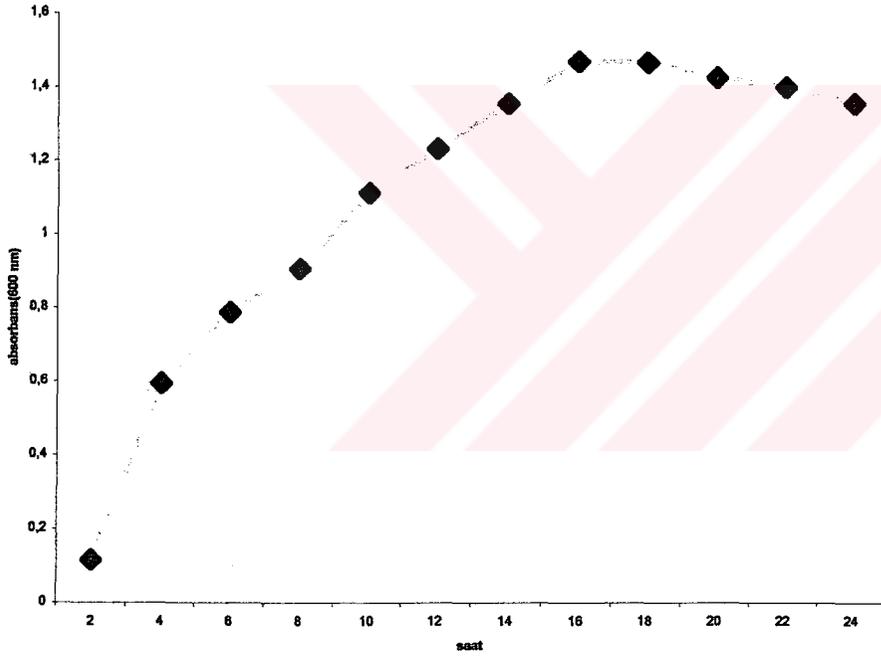
#### 3.13.2 Karbon Kaynakları

SSF katı besiyerine 2 ml eksik tampon bırakılarak otoklavlandı. 2 ml tampon içerisinde substratın % 0,3 'ü miktarında çözdürülen farklı karbon kaynakları otoklavlanmış olan besiyerlerine ekim yapılmadan önce ilave edildi . Daha sonra örneklere ekim yapılarak 72 saat inkübasyona bırakıldı . Yapılan aktivite tayinleri sonucu karbon kaynaklarının etkisi incelendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 *Bacillus* sp.'nin NB Besiyerindeki Üreme Eğrisi

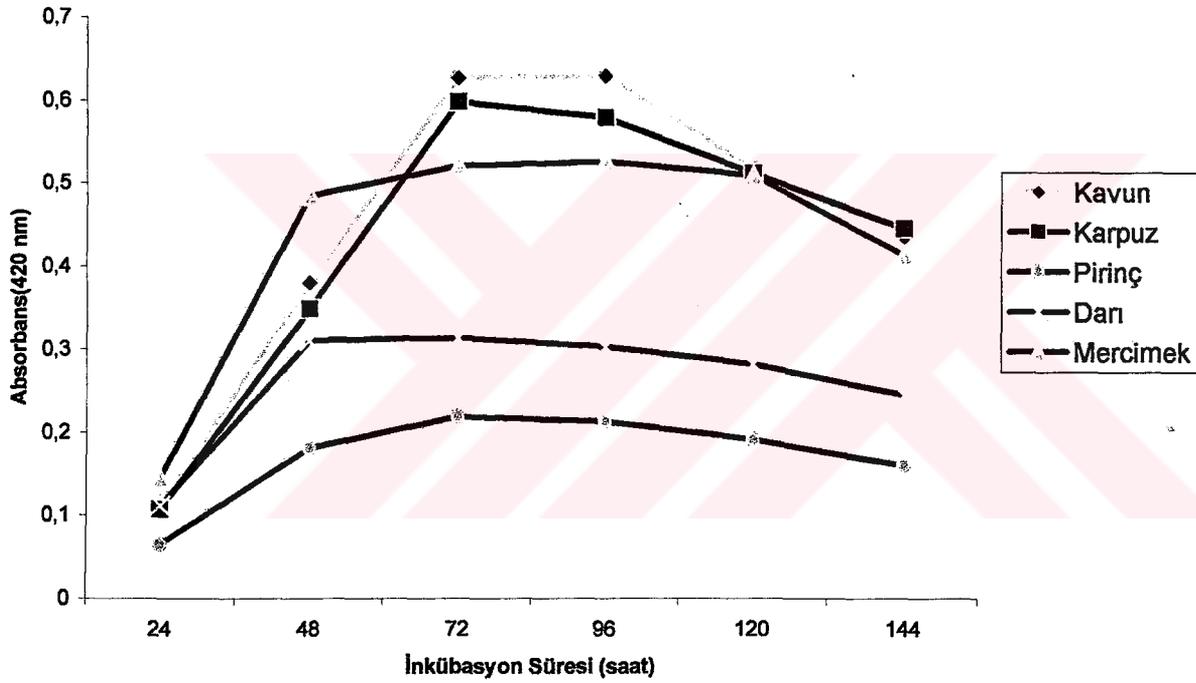
*Bacillus* sp. 16. saate kadar hızlı bir çoğalma göstermekte, bu saatten sonra çoğalma hızı azalmaktadır. Şekil 1'de *Bacillus* sp'nin üreme eğrisi görülmektedir.



Şekil 1 *Bacillus* sp.nin NB besiyerindeki üreme eğrisi

#### 4.2 Farklı Substratlarda İnkübasyon Süresinin Tespiti

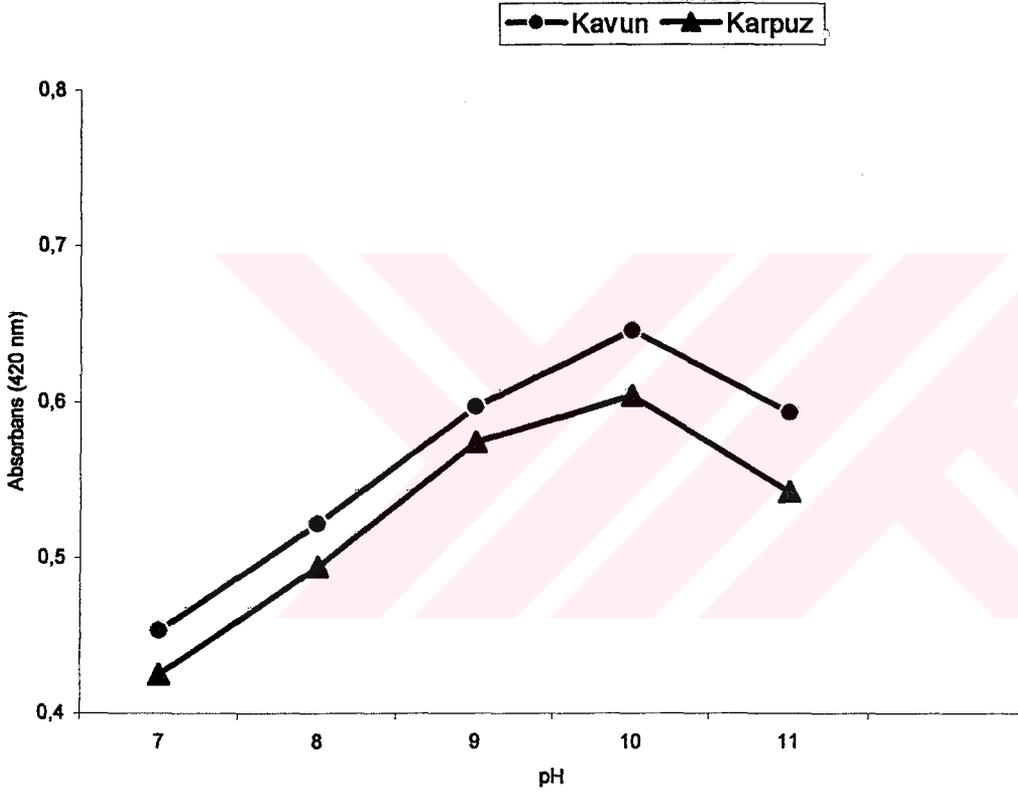
Karpuz kabuğu, kavun kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve darı katı substrat olarak kullanılarak bakteri ekimi yapıldıktan sonra çalkalamalı su banyosunda 37 °C' de 24,48,72,96,120 ve144. saatlerde enzim aktivite tayini incelendiğinde en iyi aktivitenin darıda 48. saatte; karpuz kabuğu, kavun kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğunda 72. saate olduğu görülmektedir. En yüksek enzim eldesi kavun kabuğu ve karpuz kabuğunda tespit edilmiştir(Şekil 2).



Şekil 2 Alkalin proteaz için farklı substratlarda uygun inkübasyon süresinin tespiti

### 4.3 Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

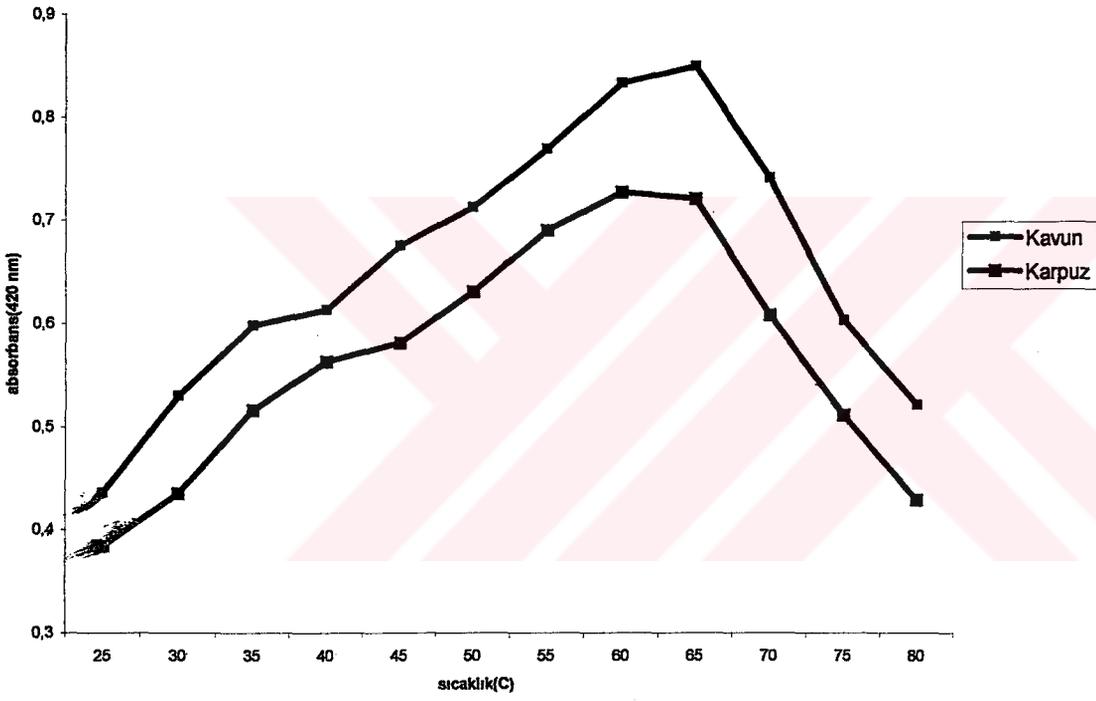
pH :7 (0.1 M Tris – HCl) ,pH : 8 , (0.1 M Tris – HCl) pH : 9, 10, 11 (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaHCO<sub>3</sub>) tamponları ile % 0.5 oranında hazırlanan azokazein çözeltileri ile yapılan enzim aktivite tayini sonucunda en yüksek aktivite pH :10'da görüldü(Şekil 3).



Şekil 3 Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

#### 4.4 Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

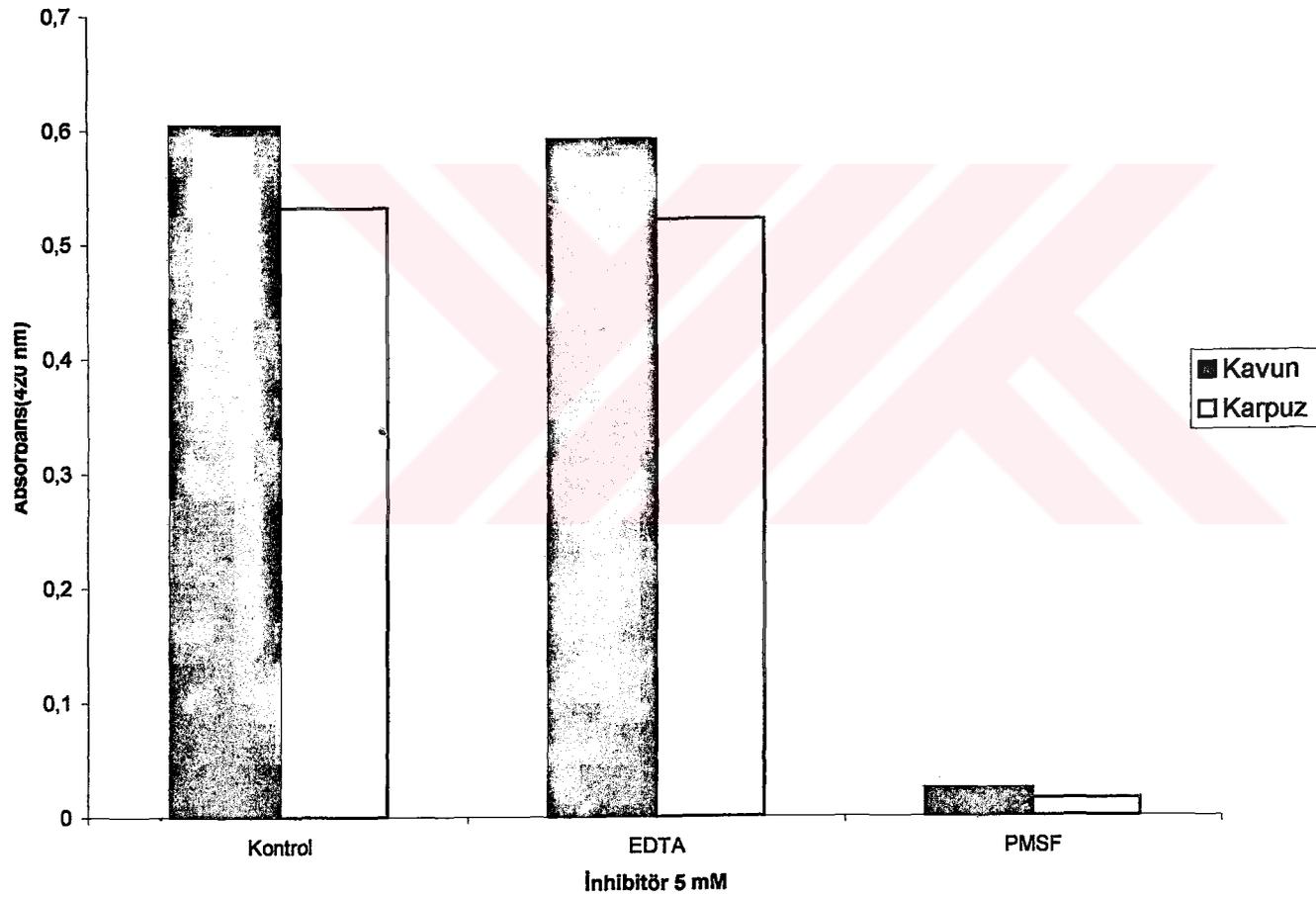
25 - 80 °C' de yapılan enzim aktivite tayininde optimum sıcaklığın 65°C olduğu tespit edildi(Şekil 4).



Şekil 4 Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

#### 4.5 İnhibisyon Çalışması

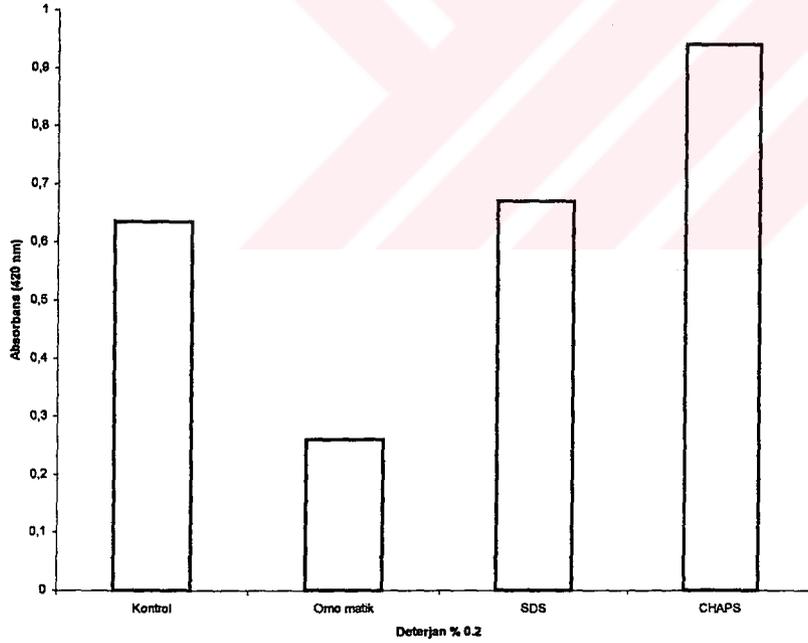
EDTA ve PMSF ile yapılan çalışmada , PMSF ile inhibe olan enzimin Alkalin Serin Proteaz olduğu tespit edildi(Şekil 5).



Şekil 5 Enzim üzerine inhibitör etkisinin belirlenmesi

#### 4.6 Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

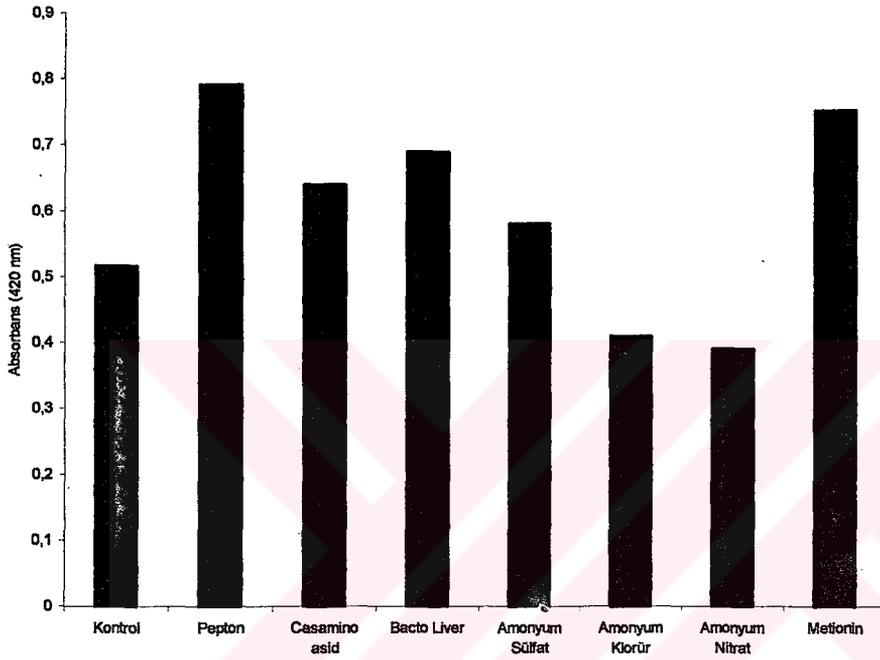
Reaksiyon hacminin % 0.2'si oranında hazırlanan SDS, CHAPS ve OMOMATİK deterjanlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde CHAPS'in enzim aktivitesini arttırdığı, SDS' nin enzim aktivitesini çok düşük oranda arttırdığı, OMOMATİK' in ise enzim aktivitesini azalttığı tespit edildi. Şekil 6'da deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkileri görülmektedir.



Şekil 6 Deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.7 Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

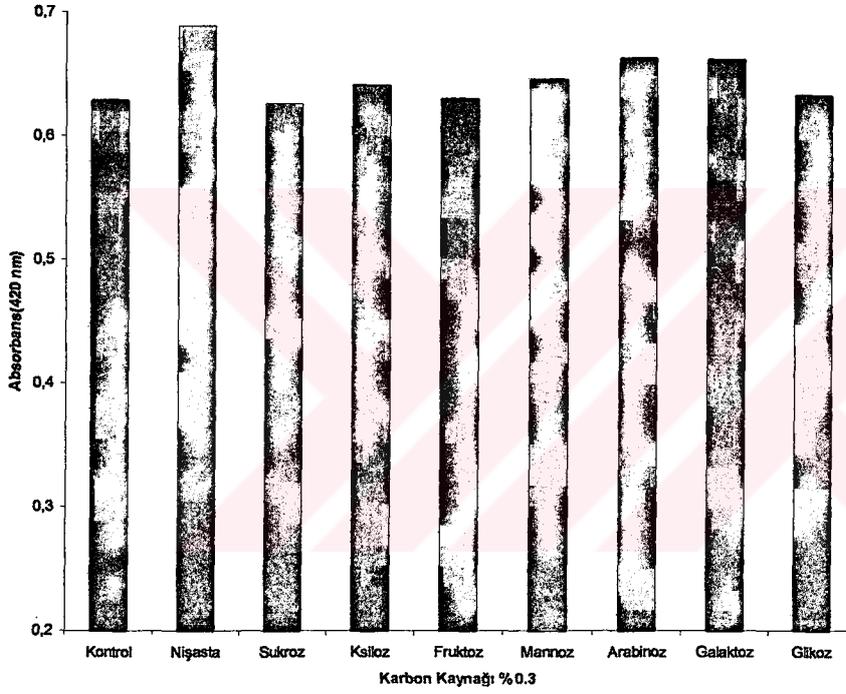
SSF besiyerine % 10 oranında eklenen azot kaynaklarından pepton, bacto-liver, methionin, casamino-acids ve amonyum sülfatın enzim üretimini arttırdığı, amonyum klorür ve amonyum nitratın enzim üretimini azalttığı tespit edildi(Şekil 7).



Şekil 7 Azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi

#### 4.8 Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

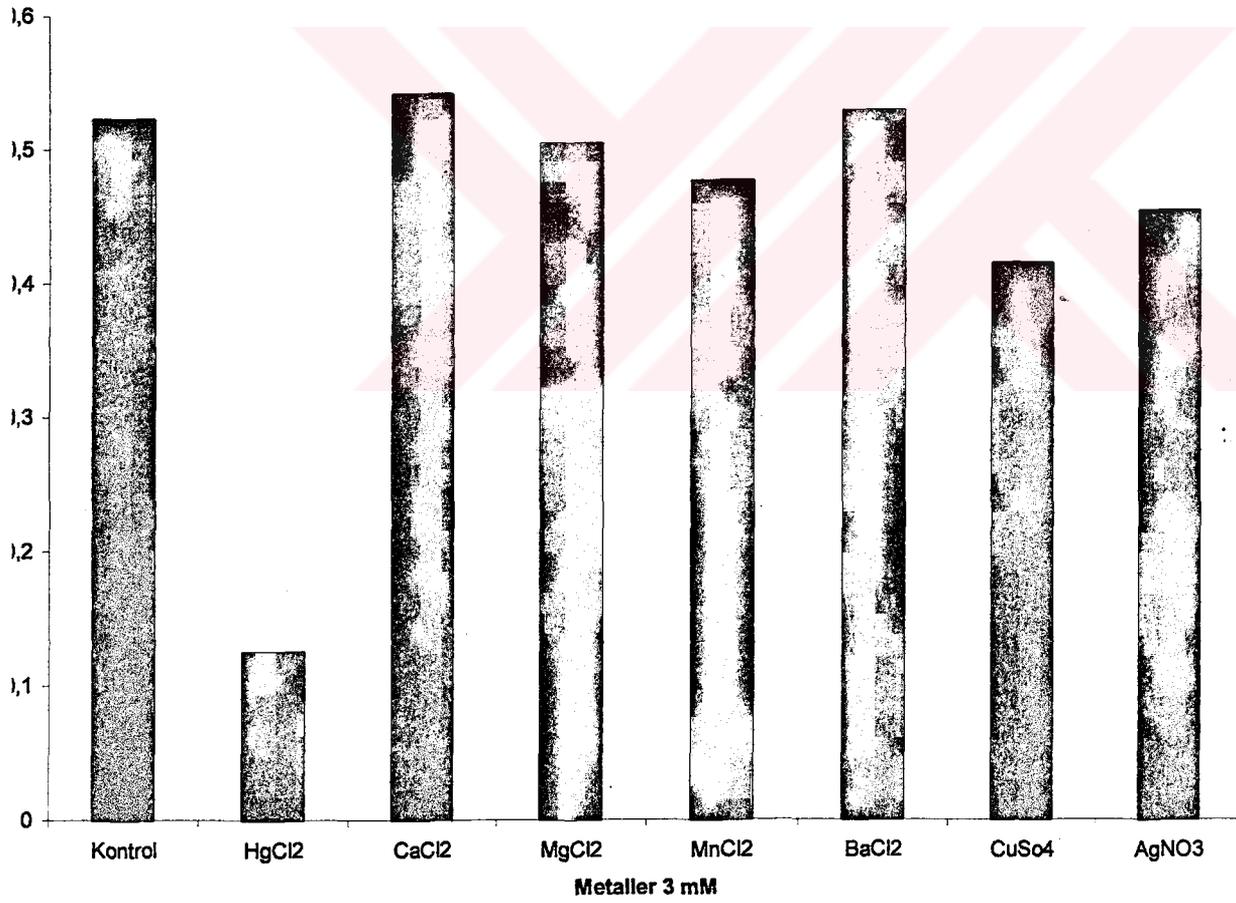
SSf besiyerine % 0.3 oranında eklenen karbon kaynaklarından nişastanın enzim üretimini arttırdığı, diğer karbon kaynaklarının enzim üretiminde dikkate değer bir değişikliğe neden olmadığı tespit edildi. Şekil 8’de karbon kaynaklarının etkisi görülmektedir.



Şekil 8 Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi

#### 4.9 Farklı Metallerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Enzim aktivitesine bazı metallerin etkisi incelendiğinde 3 mM konsantrasyonda hazırlanan metallerden  $\text{HgCl}_2$ 'nin enzim aktivitesini kuvvetle inhibe ettiği,  $\text{CuSO}_4$  tarafından kısmen inhibisyon meydana geldiği görüldü.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$  ile enzim aktivitesinin kısmen arttığı, diğer metallerde ise önemli bir değişiklik olmadığı tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9 Enzim aktivitesine bazı metallerin etkisi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kullanılan beş substrat çeşidi içerisinde (karpuz kabuğu, kavun kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu ve darı) en yüksek aktivitenin kavun kabuğu, ikinci olarak karpuz kabuğunda görülmesi sebebiyle sonraki deneyler bu iki substratla yürütüldü.

Karpuz ve kavun kabuğunun katı substrat olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen inkübasyon tespit çalışmasında optimum inkübasyon süresinin 72 saat olduğu tespit edildi. Uyar ve Baysal topraktan izole edilen *Bacillus* sp. kullanarak SSF yöntemiyle alkalın proteaz üretimini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada buğday kepeği ve mercimek kabuğu substrat olarak kullanıldığında optimum inkübasyon süresini 24 saat olarak tespit etmişlerdir. 72. saatten sonra enzim üretiminin zamanla azalması, substratın başlangıçtaki yapısının zamanla bozulması ve enzimin fermantasyon ortamındaki diğer bileşiklerle etkileşimi sonucu denatürasyonu veya ayrışması olabilir. Özellikle proteolitik aktivite gösteren enzimlerin ortama salgılanması enzim üretiminin zamanla azalmasına sebep olabilir(13,14).

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde,enzimin pH : 7-11 arasında kararlı olduğu ve optimum pH'nın 10 olduğu görüldü.Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi incelendiğinde, maksimum aktivitenin 65 °C olduğu tespit edildi. Johnvesly ve Naik *Bacillus sp*'den elde ettikleri alkalın proteazın aktivite için optimum pH: 11 ve optimum sıcaklığı da 70 °C olarak belirtmişlerdir. Fujiwara ve Yamamoto topraktan izole ettikleri *Bacillus sp*'den elde ettikleri alkalın serin proteazın aktivitesinde optimum sıcaklığın 60 °C ve optimum pH: 11.5 olarak açıklamışlardır. Sonuçlarımız bu bulguları desteklemektedir(35,36).

Enzim aktivitesine deterjanların etkisi incelendiğinde, CHAPS ve SDS'nin enzim aktivitesini kısmen arttırdığı tespit edilmiştir.Omomatik'in ise enzim aktivitesini azaltığı görülmektedir. Joo ve arkadaşları ise *Bacillus sp*'den elde ettikleri proteazın % 1'lik SDS ile muamele edildiğinde enzimin aktvitesini % 90'dan fazla koruduğunu bildirmişlerdir(16).

Enzim üretimi üzerinde azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde; pepton, bacto-liver, methionin ve casamino-acids'in enzim üretimini indüklediği, amonyum sülfat, amonyum klorür ve amonyum nitratın enzim üretimini repress ettiği tespit edildi. Azot kaynaklarının çoğunun varlığında enzim üretiminin artması, bakterinin besiyerindeki azotu kullanarak proteine dönüştürdüğünü göstermektedir. Enzim üretimi üzerinde karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde, nişastanın enzim aktivitesini düşük oranda indüklediği, diğer karbon kaynaklarının enzim üretimini etkilemediği görüldü. Puri ve arkadaşları *Bacillus sp*'den proteaz üretimi üzerine C ve N kaynaklarının etkisi konulu çalışmalarında fermantasyon ortamına eklenen en uygun karbon kaynağının % 1 oranında nişasta ve en uygun azot kaynağının % 0,5 oranında pepton olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışma sonucu enzim üretiminde en uygun karbon kaynağının nişasta ve en uygun azot kaynağında pepton olması, elde edilen sonucun Puri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı desteklediğini göstermektedir(51).

Metal ve ağır metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde  $Hg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiği ve  $Ca^{2+}$  ve  $Ba^{2+}$ 'nin enzim aktivitesini az miktarda arttırdığı tespit edildi. Agrawal ve arkadaşları da SSF yöntemi ile *Penicillium sp*'den elde ettikleri Alkalın serin proteazın  $Hg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  gibi ağır metallerle inhibe olduğunu ve  $Ca^{2+}$  varlığında kısmen aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir. Bu bulgular Agrawal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir(34).

Yapılan inhibisyon çalışmasında, enzimin EDTA varlığında aktivitesini kaybetmemesi ancak PMSF ile inhibe olması enzimin aktif bölgesinde serin artığı bulunduğunu ve elde edilen enzimin **Alkalın Serin Proteaz** olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Germano ve arkadaşları SSF yöntemiyle *Penicillium sp*'den elde edilen alkali proteazın 3 mM'lık PMSF ile % 93, 5 mM EDTA ile % 23 oranında inhibe olduğunu açıklamışlardır(18).

Sonuç olarak yapılan çalışmada SSF yöntemi ile kavun ve karpuz kabuklarının enzim üretiminde alternatif substratlar olarak kullanılacakları tespit edilmiştir. Bu atık maddelerin enzim eldesinde kullanımı hem ekonomik yönden hem de çevre kirliliğini önlemede büyük yararlar sağlayabilir.

Yaptığımız çalışmada *Bacillus* sp.'den elde edilen proteazın geniş pH ve sıcaklık değerlerinde aktivitesini koruması, enzimin endüstriyel amaçlı olarak özellikle deterjan sanayinde kullanılabileceğini göstermektedir.



## KAYNAKLAR

1. **Pandey, A.** Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13 (2003) 81-84
2. **Aikat, K., Bhattacharya, B.C.** 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 Biochemistry 35 (2000) 907-914
3. **Beyath, Yavuz.** Biyoteknoloji ve Biyoprotein Üretimi. KÜKEM Yayınları (1996) Ankara
4. **Tunga, R., Banerjee, R., Bhattacharyya, B.C.** Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. Bioprocess Engineering 19(1998) 187-190
5. **Couri, S., Terzi, S.C., Pinto, S.G.A., Freitas, S.P., Augusto da Costa, A.C.** Hydrolytic enzyme production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8 Process Biochemistry 36 (2000) 255 – 261
6. **Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K.** Critical importance of moisture content of the medium in alpha – amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid – state fermentation system. Appl. Microbial Biotechnol 33 (1990) 501 – 505
7. **De Souza, D.F., D., De Souza, C.G.M., Peralta, R.M.** Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaraii* in solid- state fermentation. Process Biochemistry 36 (2001) 835 – 838
8. **Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu, B.** Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus species*. Process Biochemistry 38(2002) 615-620
9. **Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S.** Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal 13(2003) 205-218

10. **Pandey, A., Soccol, R.S., Mitchell, D.** New developments in solid state fermentation : I – bioprocesses and products. Process Biochemistry 35(2000) 1153-1169
11. **Elibol, M. and Antonio, R.M.** Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. Process Biochemistry(2004) Article in press
12. **Gessesse, A., Mamo, G.** High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus sp.* by using solid – state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 25 (1999) 68 – 72
13. **Uyar, F. and Baysal, Z.** Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus sp.* under solid state fermentation. Process Biochemistry 39(2004)1893-1898
14. **Krishna, C., Chandrasekaran, M.** Banana waste as substrate for  $\alpha$  - amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid – state fermentation. Appl Microbial Biotechnol (1996) 46: 106 – 111
15. **Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., Gokhale, D.V.** Production of acidik lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochemistry 38 (2002) 715-721
16. **Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G., Paik, S.R., Chang, C.S.** Bleach resistant alkaline protease produced by *Bacillus sp.* isolated from the Korean *polychaete Periserrula leucophryna*. Process Biochemistry 39 (2004) 1441-1447
17. **Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R.** Microbial production of extra-cellular phytase using polystrene inert solid support. Bioresource Technology 83 (2002) 229-233
18. **Germano,S., Pandey, A., Osaku, C.A., Rocha, S.N., Soccol, C.R.** Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid state fermentation. Microbial Technology 32 (2003) 246 – 251

19. **Babu, K.R. and Satyanarayana, T.** Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. Journal of Scientific&Industrial Research 55(1996) 464-467
20. **Babu, K.R. and Satyanarayana, T.**  $\alpha$  - Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. Process Biochemistry vol 30 (1995) 305 – 309
21. **Kashyap, P., Sabu, A., Pandey.** Extra-cellular glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. Process Biochemistry 38(2002) 307-312
22. **Van de Lagemaat, J., Pyle, D.L.,** Solid state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. Chemical Engineering Journal 84(2001) 115-123
23. **Fujian, X., Honzhang, C., Zuohu, L.** Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 30(2002) 45-48
24. **Malathi, S. and Chakraborty, R.** Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as depilation agent. Applied and Environmental Microbiology 57(1991) 712-716
25. **Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G.** Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. Process Biochemistry 35 (1999) 85-90
26. **Tunga, R., Shrivastava, B., Banerjee, R.** Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. Process Biochemistry 10(2003) 1-6
27. **Müderriszade, A.** Toprakta izole edilen *Bacillus* MB.1'in çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin saptanarak bakteriden saflaştırılan subtilizin enziminin özelliklerinin belirlenmesi. 1996 ( Doktora Tezi)

28. **Kaya, Zübeyde.** Subtilizin kinetiği ve etilmetan sülfonatin sporlaşma üzerine etkisi. 1996 ( Doktora Tezi)
29. **Batum, M.** Industrial Application of Enzymes, "Enzymes as Industrial Tools",Ege Üniv. Biotek Merkezi (1993) 229-271
30. **George, S., Raju, V., Krishnan, M.R.V.,Subramanian, T.V., Jayaraman, K.** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Process Biochemistry 30 (1995) 457-462
31. **Ishikawa, H., Ishimi, K., Sugiura, M., Sowa, A., Fujiwara, N.** Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-Ray film and release of silver particles. Journal of Fermentation and Bioengineering. 76 (1993) 300-305
32. **Agüloğlu, Sema.** Değişik aminoasit ve antibiyotiklerin *Bacillus subtilis*  $\alpha$  – Amilazının membrandaki sentezi ve salgılanması üzerine etkileri ve tripsinin Amilazüzerine olan proteolitik etkisinin incelenmesi.(1996) Doktora Tezi
33. **Chauhan, B. and Gupta, R.** Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp.RGR-14. Process Biochemistry 39 (2004) 2115-2122
34. **Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., Patil, S.** Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. Process Biochemistry 39 (2004) 977-981
35. **Johnvesly, B. and Naik, G.R.** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp.JB-99 in a chemically defined medium. Process Biochemistry 37 (2001) 139-144

36. **Fujiwara, N., Yamamoto, K.** Production of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. Ferment. Technol.65 (1987) 345-348
37. **Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., Patil, S.** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. Process Biochemistry (2004) Article in press
38. **Durham, D.R., Stewart, D.B., Stellwag, E.J.** Novel-alkaline and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp.strain GX6638. Journal of Bacteriology 169 (1987) 2762-2768
39. **George, S., Raju, V., Subramanian, T.V., Jayaraman, K.** Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. Bioprocess Engineering 16 (1997) 381 – 382
40. **Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Lesagemessen, L., Labat, M. and Asther, M.** Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* comparison of the production in solid state and submerged fermentation. Process Biochemistry 38 (2002) 685-691
41. **Mulimani, V.H., Ramalingam, G.N.P.**  $\alpha$  - Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. Biochemical Education 28(2000) 161-163
42. **Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K.** Ability of a solid -state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of  $\alpha$ - amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 Appl. Microbiol Biotechnol 35 (1991) 591 – 593
43. **Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K.** Solid state fermentation for production of  $\alpha$  - amylase by *Bacillus megaterium* 16M Biotechnology Letters 9 (1987) 323 – 328

44. **Selvakumar, P. and Pandey, A.** Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry 34 (1999) 851-855
45. **Kadar, S., Szengyel, Z., Reczey, K.** Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Industrial Crops and Products 20 (2004) 103-110
46. **Krishna, C.** Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. Bioresource Technology 69 (1999) 231-239
47. **Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J.B., Bin. C.H., Okabe, M.** Production of lactic acid from corn cob. Journal of Bioscience and Bioengineering 97 (2004) 153-157
48. **Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W.,** Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 91(2004) 153-156
49. **Topakas, E., Kalegoris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P.** Production and partial characterisation of feruloyl esterase by *Sporotichum thermophile* in solid state fermentation. Process Biochemistry 38 (2003) 1539-1543
50. **Baysal, Z., Uyar, F., Aytakin, Ç.** Solid state fermentation for production of  $\alpha$ - amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. Process Biochemistry 38 (2003) 1665-1668
51. **Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R.** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. Curren Microbiology 44 (2002) 286 – 290
52. **Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S.** Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and Microbial Technology 26 (2000) 406-413

53. Tunga, R., Banerjee, R., Bhattacharyya, B.C. Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. Bioprocess Engineering 20 (1999) 485 – 489
54. Leighton, T.J., Doi, R.H., Warren, R.A.J., Kelln, R.A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 22 (1973) 76-103



## 7. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlköğrenimimi Diyarbakır Yeni İlk Okulunda;orta öğrenimimi İmam-Hatip Lisesi Ortaokulu kısmında;liseyi İstanbul Bakırköy Yahya Kemal BEYATLI Lisesinde tamamladım. 1997 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne ÖSYM'ce yerleştirildim.1998'de yatay geçiş ile Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne kayıt yaptım. Bu bölümden 2001 yılında mezun oldum.2002 eylül ayında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı yüksek lisans programına başladım. Halen Diyarbakır merkez Alparslan Lisesinde Biyoloji öğretmenliği yapmaktayım.

