

KATI-FAZ FERMENTASYON
(Solid State Fermentation)
TEKNİĞİYLE ALKALİN PROTEAZ
ELDESİ

Zeynep TOPRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)

150656

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Zeynep TOPRAK tarafından yapılan bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji
Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Kemal GÜVEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fikret UYAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

24.12./2004

Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR.....	II
AMAÇ.....	III
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ekstrasellüler Enzimler.....	2
1.2. Proteazlar.....	3
1.3. Mikrobiyal Ürün Üretiminde Kültürel Yöntemler.....	5
1.3.1. Derin Kültür Fermentasyonu (sulu fermentasyon (SmF))	5
1.3.2. Yüzey Kültür Fermentasyonu	6
1.4. Katı-Faz Fermentasyon (Solid – State fermentation (SSF))	8
1.4.1 SSF'in Genel Özellikleri	9
1.4.1.1.Mikroorganizma Seçimi	13
1.4.1.2.PH'nın etkisi.....	13
1.4.1.3.İnkübasyon Süresi	13
1.4.1.4.Ekim Miktarı	14
1.4.1.5.Nem Miktarı.....	14
1.4.1.6.Parça Büyüklüğü.....	14
1.4.1.7.Sıcaklığın Etkisi.....	15
1.4.1.8.Substratın Yapısı.....	15
1.4.2.SSF'in Uygulamaları.....	16
1.5. SSF'te Substrat Olarak Muz Kabuğu.....	17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	19
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Biyolojik Materyal.....	23
3.2. Kimyasal Maddeler.....	23
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	23
3.4. Besiyerleri.....	24
3.4.1. Katı Besiyeri.....	24
3.4.2. Sıvı Besiyeri	24
3.4.3. SSF Besiyeri.....	24
3.5. Enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler.....	24
3.5.1. Tampon Çözeltiler.....	24
3.5.2. Azokazein.....	25
3.6. Farklı Parça Büyüklüğündeki Substratların Elde Edilmesi.....	25
3.7. Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	25
3.8. Enzim üretiminde kullanılan üst sıvının eldesi.....	25
3.9. Azokazein İle Aktivite Tayini.....	26
3.10. İnhibitör Maddenin Belirlenmesi	26
3.11. Enzim Aktivitesi Üzerine PH'nın Etkisi.....	26
3.12. Enzim aktivitesi Üzerine Nem Miktarının Etkisi.....	26
3.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Ekim Miktarının (İnokülum) Etkisi.....	27
3.14. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	27
3.15. Enzim Üretimi Üzerine Bazı Azot ve Karbon Kaynaklarının Etkisi	27

3.15.1. Azot Kaynakları.....	27
3.15.2. Karbon Kaynakları	27
3.15.3. Azot ve Karbon Kaynağının Birlikte Kullanılması.	28
3.15.4. Farklı Konsantrasyonlardaki Azot Kaynaklarının Etkisi	28
3.16. Ca^{+2} iyonlarının Enzimin Termal Stabilitesine Etkisi	28
3.17. Enzim İçin K_m ve V_{max} Değerinin Hesaplanması.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Uygun substrat tespiti.....	29
4.2. Uygun pH'nın Tespiti	32
4.3. Uygun Nem Miktarının Tespiti.....	33
4.4. Uygun İnokulum Miktarının Tespiti	34
4.5. Optimum Sıcaklığın Tespiti.....	35
4.6. İnhibisyon Çalışması.....	36
4.7. Ca^{+2} İyonlarının Enzimin Termal Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	37
4.8. Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi.....	38
4.9. Azot ve Karbon Kaynağının Birlikte Kullanılması.....	40
4.10. Farklı Konsantrasyonlarda Azot Kaynağının Kullanılması.....	41
4.11. Enzim İçin K_m ve V_{max} Değerinin Hesaplanması	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
6. KAYNAKLAR.....	46
7. ÖZGEÇMİŞ.....	52

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında sağladığı olanakların yanı sıra, ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan, derin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fikret UYAR ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kimya Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr Zübeyde BAYSAL'a göstermiş olduğu yakın ilgi ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Kemal GÜVEN ile Yrd.Doç.Dr Sema AGÜLOĞLU ve Yrd.Doç.Dr Veysel TOLAN'a teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisansa başladığım andan itibaren bana yol gösteren, ilgi ve desteğini eksik etmeyen sayın Doç. Dr. Selçuk ERTEKİN 'e teşekkürlerimi belirtmek isterim.

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi bildiririm.

Ayrıca bu çalışmayı gerçekleştirme imkanı veren Dicle Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanlığı'na ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu tezi hazırlama sürecinde beni yalnız bırakmayan, her konuda destek olan eşim ve aileme de teşekkürlerimi bildiririm.

AMAÇ

21.yüzyılın ilk çeyreğiyle beraber dünya çapında bir sanayileşme hareketi başlamış, bu durumu takiben deterjan, ilaç, deri, mayalama, yiyecek saklama v.b. alanlarında bir çok sanayi dalı oluşturulmuştur. Bu sektörlerin temel çalışma materyali değişik tekniklerle üretilen proteolitik enzimlerdir.

Çalışma konusu olarak seçtiğimiz Katı-Faz Fermentasyon(Solid – State Fermentation (SSF)) tekniği , bu enzimlerin kolay , bol miktarda , ekonomik ve çevreye zarar vermeden üretilmelerini sağlayan bir yöntemdir.

Deney materyali olarak kullandığımız , muz kabuğu, darı ve pirinç kabuğu hiçbir ekonomik değerlerinin olmamasının yanı sıra , doğada birikerek çevre kirliliğine neden olmaktadır . Bu maddelerin, hem kolay üretilmesi hem de birçok ekzoenzim salgılaması nedeniyle *Bacillus* sp. tarafından kullanımı sağlanarak ALKALİN SERİN PROTEAZIN üretilmesi gerçekleştirilmiştir.

Bu enzim deterjan , deri ve tekstil sanayinde yoğun olarak kullanıldığından, ülkemiz ekonomisi için önemli bir yer tutmaktadır. SSF tekniği kullanılarak, muz kabuğu, darı ve pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalardan elde edilen bu enzimin maksimum seviyede üretilmesi için SSF tekniğinin bir takım fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri incelenmeye çalışılmıştır.

ÖZET

Katı-Faz Fermentasyon (SSF) tekniğıyle alkalın proteaz üretiminin incelendiğı bu çalışmada *Bacillus* sp. 'nin hangi substrat varlığında daha iyi alkalın proteaz ürettiğini tespit etmek için ; muz kabuğı , pirinç kabuğı ve darı bitkisi kullanıldı.

Yapılan deneyler sonucunda en yüksek enzim üretimi muz kabuğunda 72 saat inkübasyon süresi ve 1500 µm parçacık büyüklüğünde görüldü. Mikroorganizma için uygun substrat belirlendikten sonra katı-faz fermentasyon (SSF) sistemlerinde enzim üretimini etkileyen İnkübasyon süresi , pH , sıcaklık , ekim miktarı , azot ve karbon kaynağı ilavesi gibi bazı parametrelerin etkileri incelendi . Yapılan inhibisyon çalışmasında PMSF ile inhıbe olan enzimin Alkalın Serin Proteaz olduğı saptandı . Ca^{+2} iyonlarının enzimin termal stabilitesi üzerine etkisi belirlendi. Enzimin K_m değeri $3,8.10^{-2}$ olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp. , Katı faz fermentasyon , Alkalın serin proteaz , Muz kabuğı.

SUMMARY

In this research we investigated production of alkaline protease in SSF (Solid-State Fermentation) by *Bacillus* sp.

To understand which is the best for maximum enzyme production we used banana waste, rice husk, millet as substrate for the microorganism .

High yields of enzyme were achieved by employing banana waste as substrate, 72 hour incubation time and 1500 μm particle size.

Various parameters such as moisture level, inoculum concentration, pH, temperature, carbon and nitrogen sources influencing enzyme production in SSF were optimized.

With inhibition study, to characterize the protease, we found that enzyme was inhibited completely by PMSF, which is best known as a serin protease inhibitor. The effect of Ca^{+2} on enzyme thermal stability was examined. K_m value was found to be $3,8 \cdot 10^{-2}$ for alkaline serin protease.

Keywords: *Bacillus* sp., Solid state fermentation, Alkaline serin protease, Banana waste.

1. GİRİŞ

Mikroskop yardımıyla görülebilen çoğunlukla tek hücreli basit yapıdaki organizmalara mikroorganizma denir. Önemli mikroorganizma grupları bakteriler, funguslar , algler , protozonlar ve belirli şartlarda canlılık özelliği gösteren virüslerdir .

Mikroorganizmalar, insan sağlığı ve günlük hayatımızla doğrudan ilgili canlılardır. Bunların çoğu faydalı diğer bir kısmı zararlıdır (Özçelik, 1998).

Bugün hemen hemen dünyanın her yerinde mikroorganizmaların bazı faaliyetlerinden yararlanılmaktadır. Mikroorganizmalar çevrelerinden aldıkları besin maddelerini kendi bünyelerinde kullandıktan sonra değerlendiremedikleri bazı organik bileşikler dışarı atarlar ki bunlara son ürünler denir. Bazı organizmaların son ürün olarak dışarıya attıkları organik bileşikler bugün tıp ve besin endüstrisi gibi birçok alanlarda kullanılmaktadır. Nitekim mikrobiyal son ürün olan organik asitler, amino asitler , nükleik asitler ve onlarla ilişkili bileşikler , vitaminler , enzimler steroid hormonlar ve antibiyotiklerin çok çeşitli alanlarda kullanıldıkları bilinen bir gerçektir . Bu önemli bileşikler özel bazı mikroorganizmalar, özel bazı ortamlarda geliştirilerek elde edilirler. Bu ortamların hazırlanmasında maliyetin ucuz olması için organizmanın en çok gereksinim duyduğu karbon kaynağının ekonomik değeri düşük maddelerden sağlanması gerekir.

Bir mikrobiyal ürünün üretilmesi için;

1) Organizmaya 2) Organizmanın istediği ortamın hazırlanmasına gereksinim vardır.

Endüstriyel mikrobiyolojik işlemlerde, özellikle fermentasyonlarda kullanılacak organizmaların insanlarda herhangi bir hastalığa neden olmaması , verim gücünün yüksek olması, sahip oldukları özellikleri kaybetmemesi ve üretim ortamında hızlı büyümesi gerekir. Diğer taraftan organizmanın ortamına koyacağımız ve üreteceği ürünün esas ham maddesini oluşturacak organik maddenin, kolayca bol miktarda ve ucuza bulunabilen bir madde olması gerekir.

Endüstriyel mikrobiyolojide bazı ürünleri üretmek için daha ziyade funguslar ve bakterilerden yararlanılmaktadır (Yıldız, 2002).

1.1. Ekstraselüler Enzimler

Bakteri kaynaklı enzimler ilaç üretimi, mayalama , yiyeceklerin saklanması gibi biyoteknoloji alanlarında gittikçe önem kazanmaktadır (Kaya, 1996) .

Bir bakterinin özgül özellikleri (bir karbonhidratı kullanma , amino asitleri sentezleyebilme, v.b.) belirli bir enzim yada enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olmasına bağlıdır. Bir bakteri türünü diğer bir türden farklı kılan neden belirli enzimleri sentezleme yeteneklerindeki farktan kaynaklanır. Bir çok bakterinin ürettiği ortama salgıladıkları enzimlerin temel fonksiyonları; mikroorganizmaya kullanılabilir besin sağlamak ve enfeksiyon işlemlerinde saldırgan mekanizma olarak iş görmektir (Uyar, 1993).

Basiller, kolay üremeleri ve korunmalarının zor olmaması nedeniyle enzim üretiminde kullanılan en uygun bakteri türlerindendir (Kaya, 1996) .

Bir mikrobiyal ürünün üretilmesinde kullanılacak mikroorganizmalarda aranan özellikler Tablo 1.1 de belirtilmiştir (Yıldız, 2002)

Tablo 1.1. Mikrobiyal ürün üretiminde kullanılacak mikroorganizmalarda aranan özellikler

Teknik Bakımdan	Fizyolojik Bakımdan
- Kolay hazırlanabilen basit kültür. - Mikroorganizmanın geniş substrat özelliğine sahip olması, başka bir ifadeyle farklı karbon kaynaklarından kolayca faydalanabilmesi - Kontaminasyondan arı oluşu. - Üremenin süspansiyon şeklinde oluşu. - Fermentasyon ortamından kolay ayrılması - Atılabilir atıklar oluşturmaması - Enerji kaynaklarının etkili kullanımı - Genetik değişime yetenekli oluşu - Yüksek miktarda protein ve yağ içermesi - Yüksek karbon- biyomas dönüşümü sağlaması - İnorganik azot tuzlarını azot kaynağı olarak kullanılabilmesi ve bunları hızlı bir şekilde organik azota dönüştürülebilmesi - Derin kültür yöntemiyle üretiminin yapılabilmesi - Geniş PH aralığında üreyebilmesi	- Son ürünün toksik olmayışı - İyi lezzetli oluşu - Yüksek oranda sindirilebilmesi - Besin değerinin yüksek olması (amino asit ve yağ kompozisyonu iyi olan biyomas vermesi) - Protein ve yağ içeriğinin yüksek kalitede olması Bitki, hayvan ve insanlar üzerinde patojen etkisinin olmaması

Bu bakteri sınıfının psikrofilik , mezofilik , termofilik türleri yanında alkalofilik , nütrofilik ve asidofilik türlerinin özellikleri yapılan araştırmalarda çok iyi tanımlanmıştır. Bu bakterilerin bazıları tarafından salgılanan ama 110 °C sıcaklık ve belli basınç altında nişastayı hidrolizleyen amilaz ve PH: 12,0 de kararlı ve aktif olan proteazlar, enzim adaptasyonuna yönelik çalışmalarda önemli örnekler oluşturur (Kaya,1996).

1.2. Proteazlar

Proteazlar; sanayi alanında kullanılan en önemli enzim grubu olup, özellikle deterjan, yiyecek, farmatik deri, ve yün endüstrisi ile röntgen ışınlarından gümüş eldesinde kullanılmaktadır (Kumar ve ark. 1999, Gupta ve ark. 2002).

Proteazların endüstriyel alanlarda özellikle deterjan endüstrisinde kullanılması fikri, 1913'te Roehm'in pankreatik ekstraktı kullanmasına dayanır (Maurer, 2004). Proteazlar sulu ortamlarda peptid bağlarını hidroliz eder, çok az sulu ortamlarda da peptid bağlarını sentezlerler .

Proteazlar (deterjan endüstrisinde kullanılanlar) dünya enzim üretiminin %30'nu teşkil eder. Günümüzde deterjan endüstrisi ; alkalın pH'da çalışan hidrolitik enzimlerin en büyük tüketicilerinden biri olup , dünya çapındaki enzim üretiminin çeyreğinden fazlasına sahiptir. Dünya endüstriyel enzim piyasası 1994 yılında yaklaşık olarak 400 milyon \$ olarak hesaplanmış ve bunun 112 milyon \$'nın deterjan sektörüne ait olduğu belirtilmiştir. Aynı yıl sadece Japonya'daki enzim piyasası 15 000 yen (yaklaşık 116 milyon \$) olarak bildirilmiştir. Alkalın proteazlara duyulan ihtiyacın giderek artacağı ve 10 yıl sonra dünya enzim piyasasının 700 milyon \$'ın üstünde olacağı tahmin edilmektedir (Kumar, 1999). Alkalın proteazlar 50 – 60 °C gibi yüksek sıcaklıklar, geniş pH aralıkları, oksitleyici ajanların varlığı gibi zor koşullarda dahi aktif ve kararlı olduklarından oldukça önemlidir (Tunga ve ark. 2003).

Çoğu mikroorganizma grupları tarafından salgılanan proteazların birkaç farklı türü olup, bunlar araştırmalarda kullanılmak üzere ya ticari olarak temin edilmekte yada mantar, bakteri gibi bazı mikroorganizmalardan saflaştırılmaktadır. Bu proteazlar, Hartley tarafından etki mekanizmaları göz önüne alınarak başlıca dört grupta toplanmıştır. Serin proteazlar , tiyol proteazlar , metalo proteazlar ve asit proteazlar (Kaya, 1996).

Bazı mikrobiyal proteazlar ve bunları salgılayan mikroorganizma grupları Tablo 1.2. belirtilmiştir.

Tablo 1.2. Mikrobiyal proteazların sınıflandırılması

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

Bacillus subtilis 'in 168 suşunun sporlaşmış kültürlerinde en az üç farklı proteolitik enziminin bulunduğu belirtilmiştir (kaya, 1996). Bu enzimlerden biri alkalın proteaz sınıfına giren subtilizin olup, kazeini hidrolizler . İkinci enzim prostetik grup olarak çinko içeren nötral proteazdır ve bu enzimde kazeini hidrolizler. Üçüncü enzim ise yüksek esteraz aktivitesine sahip olup kazeini hidrolizleyememektedir. (Higerd ve ark. 1972) .

Metalo endopeptidaz grubunda olan metalo proteazlar nötral pH'da maksimum aktivite gösterirler, metal şelatlaştırıcı maddelere karşı duyarlıdır ve esteraz aktivitesi göstermezler.

Metalo proteazlar aktif merkezlerinde bir çinko atomu içerir. Molekül ağırlıkları 38000- 40000 Dalton olup Ca^{2+} varlığında oldukça kararlıdır. Bu enzimler Basillerin salgıladığı en kararsız proteazlardır . Bu nedenle nötral proteazların uygulama alanları oldukça sınırlıdır .

Üç proteaz türünden en az karakterize edilen enzim esterazdır. Molekül ağırlığı 36000 Dalton olan bu enzim fenilmetil sülfanil florür (PMSF) ile inaktive olur. Bu enzim en çok gıda endüstrisinde kullanılır (Kaya, 1996) .

Serin proteazlar aktif bölgesinde serin artığı bulunduran enzimlerdir. Bu enzimler PMSF ve diizopropil floro fosfat (DFP) ile inhibe olmaktadır. Serin proteazların doğal substratları proteinler veya protein fragmentleri olmasına rağmen bu enzimler için sentetik peptidler ve peptid amidleride substrat olarak kullanılmaktadır (Kumar ve ark. ,1999).

1.3. Mikrobiyal Ürün Üretiminde Kültürel Yöntemler

Enerjice zengin organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından enzimatik kimyasal yollarla enerjice fakir organik maddelere dönüşümlerine fermentasyon denir (Özçelik, 1998).

Mikrobiyal ürünlerin üretilmesi için değişik kültürel yöntemler geliştirilmiştir . Bunlar iki temele dayanır (Yıldız 2002).

1.3.1. Derin Kültür Fermentasyonu (sulu fermentasyon (SmF))

Derin kültür fermentasyonunda mikroorganizmaların gelişmesi besiyerinin içinde gerçekleştirilir. Gerekli hava fermentörün içine (besiyerine) verilir ve havanın homojen dağılımını sağlamak üzere karıştırma işlemi uygulanır.

Bu yöntemde besiyerinde % 5 – 10 oranında toplam kuru madde olacak şekilde substrat konsantrasyonu sağlandıktan sonra diğer besin elementleri ilave edilerek sterilize edilir . Hazırlanan besi ortamı fermentasyon tankına aktarılarak önceden hazırlanan kültür ile inokulasyon (aşılama , ekim) yapıldıktan sonra fermentasyon başlamış olur . İnokulasyon ile ortama verilen milyonlarca hücre ve sporun her biri

fermenterdeki besi ortamında üreme odakları oluşturarak hızla ürer ve besin elementlerini istenilen ürüne dönüştürürler.

1.3.2. *Yüzey Kültür Fermentasyonu*

Yüzey kültür fermentasyonunda mikroorganizmalar besiyerinin üzerinde geliştirilir. Besiyerinin sıvı, katı, yada yarı katı olması yöntemin uygulanmasında bir değişiklik gerektirmez. Ancak bu yöntem çoğunlukla katı substratlara uygulanır (Yıldız, 2002).

Yüzey kültür fermentasyonarından (SSF) in derin kültür fermentasyonuna (SmF) karşı biyoteknolojik avantajları Tablo 1.3 'te verilmiştir (Hölker ve ark.,2004).



Tablo 1.3. Yüzey kültür fermentasyonlarından (SSF) in derin kültür fermentasyonu(SmF) ile karşılaştırılması.

Avantajlar	Sonuçlar	Dezavantajlar
Biyolojik avantajlar		
Düşük miktarda su gerektirmesi	Daha az atık su oluşması	Nem oranının belirlenmesi
Yüksek miktarda ürün vermesi	Ürünün yüksek konsantrasyonda oluşması	
Katabolik represyonun nadiren görülmesi	Fermentasyon glukoz varlığında gerçekleşir	
Katı maddelerin kullanışlı hale getirilmesi	Substratın çok miktarda olması	Uygun substratın belirlenmesi
		pH değerinin belirlenmesi
Düşük kontaminasyon riski taşıması	Çok çeşitli mikroorganizmayla gerçekleşmesi	
Mikroorganizmaya fiziksel destek sağlaması		
Doğal seyrine paralel gerçekleşmesi	Mikroorganizmaların daha iyi performans göstermesi	
Suda çözünmeyen katı substratların kullanılabilmesi		
Uygulamadaki avantajları		
Yüksek miktarda verim elde edilmesi	Küçük hacimli fermentörlerin kullanılması	
Isı için düşük enerji gerektirmesi		Sıcaklık seviyesinin belirlenmesi
Kolay havalanabilmesi		Oksijen miktarının belirlenmesi
Kullanışsız karbon kaynaklarından faydalanılması	Bol miktarda ve ucuz karbon kaynağının olması	
Zararlı kimyasal atık oluşturmaması	Fermentasyon boyunca mikroorganizmanın korunması	

1.4. Katı-Faz Fermentasyon (Solid – State fermentation (SSF))

Katı-Faz Fermentasyonu (SSF), sudan yoksun katı ortamda veya çok az suyun bulunduğu katı ortamda fermentasyon olarak tanımlanır. Bununla birlikte katı parçacıklar genellikle, mikroorganizmaların metabolik faaliyet gösterebilmeleri için gerekli sıvıya sahiptir (Pandey, 2003).

SSF tekniği çok uzun zamandır bilinen ve kullanılan bir tekniktir. Eski Mısırlıların yaklaşık olarak M.Ö. 2600 yıllarında bu tekniği kullanarak ekmek yaptıkları belirtilmiştir (Ooijkaas ve ark.,2000).

SSF tarımsal sanayi atıklarının değerlendirilmesinde sayısız fırsatlar sunar (Pandey, 2003). SSF yöntemlerinin çok daha az atık su oluşturması , düşük maliyetli olması , yüksek verim sağlaması karmaşık yapıli makine ve kontrol sistemlerine gerek duyulmaması , küçük hacimli fermenterlerin kullanılması ve de çevre dostu olmaları gibi avantajlarından ötürü, tarımsal sanayi atıklarının değerlendirilmesi problemini büyük ölçüde çözecektir (Tunga ve ark. 1998, Pandey, 2003, Soccol ve ark., 2003).

Fermentasyon teknolojisinin yakın tarihine kısa bir göz atığımızda 1940 ‘tan sonra sulu fermentasyon tekniklerinin yaygın olmasından dolayı , SSF yöntemlerinin pek önemsenmediğini görüyoruz. II. Dünya savaşı süresince Penisiline verilen önem ve bu maddenin gelişiminin, submerged fermentation (SmF) yoluyla olması SmF’a fermentasyon yoluyla bileşik oluşturmada model bir teknoloji özelliği kazandırdı. Bu nedenle SSF dönemin araştırmacıları tarafından farkında olunmaksızın ihmal edildi .

1950 – 1960 yılları arasında mantar kültürleri kullanılarak steroid dönüşümü, 1960 - 1970 yılları arasında da SSF yöntemiyle mantar toksinlerinin üretiminin başarıldığı açıklandığında SSF bir dönüm noktasına ulaştı . Maddi önemi olmayan ve ciddi şekilde çevre kirliliğine yol açan bu tarımsal atıkların eşsiz bir teknikle protein bakımından zenginleştirilmiş sığır yemi olarak kullanılmasının sağlanması, dünya çapında araştırmacıların SSF ‘e yönelmesine neden olan bir sonraki büyük başarı oldu.

Geçen birkaç yıl boyunca SSF teknolojisinde çok büyük gelişmeler kaydedildi . SSF’in kinetik matematiksel modelleme , biyoreaktörlerin dizaynı ve SSF metotlarının kontrolü gibi biyokimya mühendisliği yönüyle ilgili birçok problemin çözülmesi için yeni yaklaşımlar kabul gördü. Ancak bu sonuçların deneysel bulgularla sürekliliklerinin sağlanması gerekir ki buda SSF’ in sıvı fermentasyon tekniklerine eşdeğer ticari ölçülerde mikrobiyal ürünlerin üretimini oluşturacak uygun bir teknoloji halini alana kadar çalışmaların devamıyla olur (Pandey, 2003, Soccol ve ark., 2003).

1.4.1. *SSF'in Genel Özellikleri*

SSF tekniğinde SmF tekniğinden farklı olarak fazla miktarda sıvı bulunmaz. Fermentasyon ortamı kullanışsız katı substratı , mikrobik hücreleri , sporları ve fermentasyon süresince ortaya çıkmış bir takım metabolitleri içerir (Tunga ve ark. 1999).

Teorik olarak su etkinliği baz alındığında SSF için en uygun organizmaların maya ve mantarlar olduğunu söyleyebiliriz . Özellikle mantarlar , ürettikleri enzimlerin ekstraselüler olması ve bu nedenle fermentasyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmelerinin yanında enzim üretme amacıyla mantar kullanımı GRAS (Generally Regarded As Safe) (Guchte ve ark. ,1990) özelliğinden dolayı daha güvenlidir (Germano ve ark. ,2003).

Bakteri kültürlerinin yüksek miktarda suya ihtiyaç duymaları , bunların SSF için uygun olamayacaklarını düşündürür. Ancak bu durumun aksine yapılan çalışmalar , bakteri kültürleriyle de SSF yöntemlerinden başarılı sonuçlar çıkarılabileceğini kanıtlamıştır (Lonsane ve ark. ,1990). Aynı mikroorganizma kullanılarak SSF ve SmF tekniğiyle enzim üretiminin karşılaştırılması Tablo 1.4'te gösterilmiştir (Hölker ve ark. ,2004).

Tablo 1.4. SSF ve SmF' in ürün veriminin karşılaştırılması.

Ürün	Mikroorganizma	Karşılaştırılan Parametre	SSF	SmF
Alfa – amilaz	<i>Streptomyces megasporus</i>	Verimlilik (U min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	206	643 – 804
Selülaz	<i>Bacillus subtilis</i>	Toplam enzim üretimi	12	1
Selülaz	<i>Trichoderma sp.</i>	Maliyet (US \$/kg)	0.2	20
Lakkaz	<i>Panus tigrinus</i>	Toplam enzim aktivitesi	2.5	1
Ligninaz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aktivite	6	1
Mangan peroksidaz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aktivite	10	1
Mangan peroksidaz	<i>Panus tigrinus</i>	Toplam enzim aktivitesi	7	1
Poligalakturonaz	<i>Bacillus sp</i> MG – cp – 2	Üretim U/g vs U/ml	23.706	360
Tannaz	<i>Rhizopus oryzae</i>	Aktivite (U/l)	32.76	23.86
Ksilinaz	<i>Streptomyces sp.</i> QG – 11 – 3	Üretim (U/ml)	203	81
Ksilinaz	<i>Penicillium canescens</i> 10 – 10c	Katabolik represyon	Yok	Var

Genellikle SmF 'le kıyaslandığında SSF'in ürün veriminin daha yüksek olduğu söylenebilir. Bunun nedeni mikroorganizmanın SSF te doğal ortamına daha yakın olması ve buna bağlı olarak daha etkin aktivite gösterebilmesidir (Pandey, 2003). SSF'te maksimum verime ulaşabilmek için, kullanılan mikroorganizmanın çevre koşullarını bilmek çok önemlidir (Tunga ve ark. ,1998). SSF yöntemlerinde daha yüksek miktarda ürün elde etmenin yanı sıra , az miktarda yan ürünün oluşması ve ekstre edilen enzimin yüksek kararlılık göstermesi bu tekniğin diğer önemli avantajlarıdır (George ve ark. ,1997).

Steril edilmiş ve soğumaya bırakılmış katı besin ile ekim materyalini oluşturan besiyeri (SSF) çok sıkı korunmayan bir ortamda bırakılsa dahi, kontaminasyon nadiren gerçekleşir. Bu durum sistemin düşük su içeriğinden dolayı mikroorganizmaların gelişmesine imkan vermemesiyle ilgili olabilir. Bunun yanında

SSF sistemlerinde yüksek oranlarda ekim yapmak da kontaminasyon problemini çözmede etkilidir .

Bazı SSF yöntemlerinde fermente edilmiş biyolojik materyalin çalkalama ortamına bırakılması, hücrelerin katı substrat yüzeyine yapışmalarına engel olduğundan üretilen enzim miktarında düşüşe neden olur . Bu duruma özellikle *Aspergillus niger* ve bazı *Rhizopus* türlerinde rastlanır. Ancak bakteriyel SSF yöntemlerinde ilk gelişme fazı süresince salgılanan ekzopolisakkaritler yardımıyla bakterilerin katı parçacıklara yapışmaları geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir (Lonsane,ve ark., 1990).

SSF yöntemlerinin bir başka önemli avantajı fermente edilmiş katı substratın enzim içeriğiyle birlikte kurutulmasına imkan tanınmasıdır. Kuru , fermente edilmiş substrat kurutma öncesi % 5 – 10 ‘luk etanol ile muamele edilip hücrelerin inaktive olması sağlanırsa enzim aktivitesinde ciddi bir kayıp gözlenmeksizin bir yıl kadar korunup saklanabilir (Lonsane ve ark. ,1990).

SSF ‘te yaygın olarak kullanılan ve birçok araştırmacı tarafından uygun olarak belirlenen substratların başında pirinç ve buğday kabuğu, darı, mısır, soya fasulyesi, muz kabuğu, manyok, kahve samanı ve patates artıkları gibi tarımsal ürünler gelir (Krishna ve ark. ,1996, Soccol ve ark., 2003). SSF’te kullanılan çeşitli substratlar, ürün ve mikroorganizmalar Tablo 1.5’te belirtilmiştir (Hölker ve ark. ,2004).

Tablo 1.5 SSF’te sıklıkla kullanılan bazı substratlar.

Substratlar	Ürün	Mikroorganizma
Badem gevreği	Lipazlar	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Elma artıkları ve arpa kabuğu	Boya Parçalayıcı (dye degradation)	White – rot fungi
Muz kabuğu	Ligninolitik enzimler	<i>Pleurotus sp.</i>
Kakao peltesi	Endopoligalakturonaz	<i>Peecilomyces clavissporus</i>
Manyok ve soya artıkları	Aroma	<i>Rhizopus</i>
Hindistan cevizi kabuğu	Lipazlar	<i>Candida rugosa</i>
Kahve artıkları	Yemeklik mantar	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Mısır püskülleri	Selülotik enzimler	<i>Fusarium oxysporum</i>
Linyit	Çözünür özellikte kömür (solubilised coal)	<i>Trichoderma atroviride</i>
Portakal kabuğu	Pektinaz	<i>Thermoascus aurantiacus</i>
Bazı meyve artıkları	Sitrik asit	<i>Aspergillus niger</i>
Kauçuk, silgi (rubber)	Geri dönüşümü sağlanır (recycling)	<i>Gordonia sp.</i>
Soya hamuru	Proteazlar	<i>Penicillium sp.</i>
Tahiti ıhlamuru	Pektinazlar	<i>Aspergillus sp.</i>
Ahududu tohumu karıştırılmış buğday	Ncomisin	<i>Streptomyces marinensis</i>

SSF tekniğini geliştirmeye yönelik değişik parametrelerle yapılan çalışmalarda , her bir parametrenin toplam enzim üretimi üzerinde etkili olduğu gibi organizmanın enzim sentezleyebilme yeteneğini de etkilediği bildirilmiştir (Krishna ve Ark.,1996, Couri ve ark.,2000). Bu parametrelerin başlıcaları şunlardır:

1.4.1.1 *Mikroorganizma Seçimi*

SSF 'te maksimum verim elde edebilmek için kullanılan mikroorganizmanın çevre koşullarını bilmek çok önemlidir (Tunga ve ark. ,1998). Genel olarak SSF'te üreyebilen mikroorganizma çeşitleri su etkinliğince belirlenir . Ortamın su etkinliği, mikrobik hücrelerden çözünen madde geçişi ve mikroorganizmanın yer değiştirmesi için gerekli en temel parametredir (Pandey, 2003).

Ekstraselüler proteazların mikroorganizmalar tarafından salgılanması esnasında, mikroorganizmaların besiyerindeki bileşiklerden özellikle karbon ve azot kaynaklarından, metal iyonlarından , pH , sıcaklık , ekim miktarı , çözünmemiş oksijen, inkübasyon süresi gibi fiziksel faktörlerden etkilendikleri bilinen bir gerçektir (Puri ve ark. , 2002).

Basillerde ekstraselüler proteolitik aktivitenin sporogen koşullarda artış göstermesi proteaz üretimi ile spor formasyonu arasında bir bağlantı olduğunu düşündürür (Higerd ve ark. , 1972).

1.4.1.2. *PH'nun Etkisi*

Mikroorganizmalar pH değişimlerine karşı oldukça duyarlıdır. kullanılan tamponun pH'sı organizmanın etkinliğini belirleyeceğinden ürün miktarını önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle her enzimin belirli PH aralıklarında kararlılık göstermesi , ürünün kalitesi açısından da bu parametrenin çok önemli olduğunu vurgular (Krishna ve ark., 1996).

1.4.1.3. *İnkübasyon Süresi*

İnkübasyon süresi mikroorganizmanın gelişme oranına ve enzim ~üretme özelliğine bağlı olup, kullanılan kültürün yapısına göre belirlenir (Baysal ve ark. ,2003, Uyar ve ark., 2004). Basillerde ekstraselüler proteolitik aktivenin sporogen koşullarda artış göstermesi proteaz üretimi ile spor formasyonu arasında bir bağlantı olduğunu belirtir (Higerd ve ark. ,1972, Ramesh ve ark. ,1990).

1.4.1.4. *Ekim Miktarı*

Ekim miktarı ilk fazın (lag faz) yavaşlamasını kontrol eder (Uyar, 1993). Az miktarda ekim ilk fazı genişletir. Çok miktardaki ekim nem içeriğini büyük ölçüde yükseltir. İçerde aşırı miktarda sıvı oluşması ve soğurulmadan kalması hem difüzyonal bir bariyerin oluşmasını sağlayacak, hem de substratın doğal katı yapısını etkileyerek gelişme ve enzim üretiminde azalmaya neden olacaktır (Krishna ve ark. , 1996).

1.4.1.5. *Nem Miktarı*

Optimum nem seviyesi aynı tür bakterinin farklı ırklarında ve mayalarda değişiklik gösterir. Gerek bakteriyel gerekse fungal SSF sistemlerinde yüksek nem içeriğinin gözenekleri azaltma , substratın yüzey alanını küçültme , sıkılaşmaya neden olma , gaz hacmini küçültme, gaz alışverişini azaltma , düşük difüzyon hızından kaynaklı oksijen transferini azaltma gibi olumsuz özelliklerini sayabiliriz.

Düşük nem içeriği substratın yapısında bulunan besin maddelerinin çözünürlüğünü ve substratın şişmesini engellediğinden ve de osmotik basıncı arttırdığından aynı olumsuz etkilere sahiptir (Ramesh ve ark. ,1990, George ve ark. ,1997, Baysal ve ark. ,2003, Pandey, 2003, Uyar ve ark., 2004).

SSF sistemleri için düşük miktardaki nem içeriğinin bazı avantajları da vardır, az miktardaki su metabolitlerin daha yoğun oluşmasını sağlar. Bu şekildeki metabolitlerin ortamdan eldesi daha az zaman ve maliyetle sağlanır .

Fungal sistemlerde düşük nem içeriği , doğal olarak ağaç kabuğu , tahta, yaprak ve kök gibi katı organik artıkların üstünde yaşayan lifli mantar türleri için optimum gelişme alanı sağlar. Düşük nemin fermentasyon boyunca bakterilerle oluşabilecek kontaminasyonu en aza indirmesi de önemli bir avantaj olarak görülebilir (Germano ve ark. ,2003).

1.4.1.6. *Parça Büyüklüğü*

Parça büyüklüğü SSF 'te kritik bir faktördür. Muz kabuğunun 400 µm büyüklüğündeki parçacıklarında diğer büyük parçacıklara oranla daha iyi α-amilaz üretildiği belirtilmiştir.

Küçük parçacıklarda yüzey alanı gelişme için daha elverişlidir ancak parçacıklar arası boşluk ve gözenekler yetersizdir. Büyük parçalarda , boşluk ve gözenekler daha iyi fakat doymuş yüzey alanı yetersizdir. Bu iki zıt faktör yüzey alanını düşürmek ve gözenek büyüklüğünü arttırmak suretiyle karşılıklı bir etkileşim sağlanarak en uygun gelişme ve en yüksek ürün verimi belirlenebilir (Krishna ve ark.,1996) .

1.4.1.7. *Sıcaklığın Etkisi*

SSF sistemleri için sıcaklık fermentasyonun amacına göre kullanılacak mikroorganizmanın gelişme kinetiğine bağlıdır.

SSF boyunca direkt mikroorganizmaların aktivitesine bağlı olarak çok miktarda ısı açığa çıkar . SSF’te kullanılan katı maddelerin çok düşük miktarda ısı iletebilmeleri nedeniyle ortamdaki ısı hareketi çok yavaş gerçekleşir. Bazen ortamda yüksek miktarda ısı birikir ve bu durum ürünün denatürasyonuna neden olur. SSF’in erken fazlarında sıcaklık ve oksijen konsantrasyonu substrat boyunca sabit kalır ancak fermentasyon ilerledikçe oksijen transferi yerini sıcaklık artışına bırakır. SSF sisteminin iç ve dış ısı iletimi fermentasyon sisteminin havalanmasıyla yakından ilgilidir.

Substrat sıcaklığında mikroorganizmaların üremelerini sporform ve büyümeleri ile ürünün yapısını etkilediğinden ayrıca önemlidir (Krishna ve ark.,1996, Pandey, 2003).

1.4.1.8. *Substratın Yapısı*

SSF’te uygun substratın seçilmesi bir başka kilit noktayı teşkil eder. Katı maddelerin çözünmeden kalabilmeleri mikroorganizmalar için hem fiziksel destek hem de besin kaynağı sağlar. Substrat seçimine ilişkin iki önemli durumdan birincisi; substratın özelliğine göre ortama uygun katkı ilavesi veya çıkarması , ikincisi ise üretilcek maddenin özelliğine göre amaca uygun substratın belirlenmesidir. İkinci durumda uygun substratı belirleyebilmek için çok sayıda çalışma ve gözlem gerekebilir (Pandey, 2003).

1.4.2. *SSF'in Uygulamaları*

Aroma bileşikleri, biyoyağlar, biyoherbisitler ve mikositleride içeren pestisitler ile organik asitleri, enzimleri, bitki büyüme faktörleri , alkaloidleri ve antibiyotikler ile besin değeri arttırılmış biyolojik olarak aktif olan sekonder metabolitlerin üretimi, tıbbi biyolojik ilaçların oluşturulması , karışık yapılı ve büyük biyolojik bileşiklerin parçalanıp, küçültülmesi, tarımsal sanayi atıklarının biyolojik detoksifikasyonlarının sağlanması, ekin artıklarının besinsel olarak zenginleştirilme biyodönüşümü ve biyolojik hamur yöntemlerinin geliştirilmesi için son zamanlardaki tüm ilgi ve eğilim SSF'in uygulamalarına yönelmiştir. SSF sistemleri geçen son 20 yıl boyunca biyofarmatikler gibi düşük maliyetli - yüksek fiyatlı ürünlerin üretimi için son derece önemli bir konuma gelmiştir (Soccol ve ark. ,2003).

Bazı sekonder metabolitlerin çeşitli mikroorganizma grupları tarafından SSF ve SmF 'te üretilmesi Tablo 1.6 'da verilmiştir (Hölker ve ark. ,2004).

Tablo 1.6 Bazı sekonder metabolitlerin SSF ve SmF'le üretilmesi.

Ürün	Mikroorganizma	Parametre	SSF	SmF
6 – Pentil - alfapiron	<i>Trichoderma harzianum</i>	Verimlilik	17	1
Bafilomisin B1+C1	<i>Streptomyces halstedii</i> K122	Üretim	Var(İnce tabakalar halinde)	Yok
Benzoik asit	<i>Bjerkandera adusta</i>	Üretim	3.5	1
Benzoik alkol	<i>Bjerkandera adusta</i>	Üretim	10	1
Sefamisin C	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Kararlılık	Yüksek	Düşük
Hindistan cevizi aroması	<i>Trichoderma sp.</i>	Üretim	Yüksek	Düşük
Ergot Alkoloidler	<i>Claviceps fusiformis</i>	Üretim	3.9	1
Giberilik asit GA3	<i>Giberella fujikuroi</i>	Üretim (mg/kg vs mg/l)	492	80
Giberilik asit GA ₃	<i>Giberella fujikuroi</i>	Üretim(mg/kg vs mg/l)	240	23
Giberilik asit GA ₃	<i>Giberella fujikuroi</i>	Verimlilik	3.5	1
İtürin	<i>Bacillus subtilis</i>	Verimlilik (ıslak kültürde)	0.55 – 0.8	0.032 – 0.044
Okratoksin	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ürün Verimi	Yüksek	Düşük
Oksitetrasiklin	<i>Streptomyces rimossus</i>	Saklama ömrü (6 aydan fazla)	Aktivite kaybı yok	Aktivite kaybı var
Penisilin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Üretim	13	9,8
Rifamisin B	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Üretim	16	1
Tetrasiklin	<i>Streptomyces viridifaciens</i>	Ürün kararlılığı	Yüksek	Düşük

1.5. SSF'te Substrat Olarak Muz Kabuğu

Dünya üretiminin % 14,37 si Hindistan tarafından karşılanan muz bitkisi tropikal ve subtropikal ülkelerde yetişir. Muz üretiminde meyve olarak muz artıklarının yanısıra ağaç artıkları (hevenk , yaprak, sap v.b.) birikerek çevre kirliliğine neden olur. Bu artıkların faydalı bir şekilde değerlendirilmesi ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin

azaltılması yada yok edilmesi konusunda bazı girişimlerde bulunulmuştur. Kabuk , hevenk, meyve artıklarının maya kullanımı , kuru yeşil meyve etinin de SSF'le protein bakımından zenginleştirilmesi sayesinde, biyolojik gaz etanol , bazı alkollü içkiler ve laktik asidin üretildiği belirtilmiştir.

Taze ve fermente edilmemiş muz kabuğu kuru ağırlık bazında % 56,8 toplam şeker , % 27,0 nişasta, % 4,65 indirgen şeker ve %4,3 oranında protein içerir . Fermentasyondan sonra nişasta (%75) , toplam şeker (% 85) ve indirgen şeker (%95) miktarında büyük bir azalma gözlenirken , protein miktarında (%50) artış gözlenmiştir (Krishna ve ark. ,1996).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bacillus subtilis bazı mutant türlerinin en az üç çeşit proteaz salgıladıkları belirtilmiştir. Bunlardan ilkinin endopeptidazların subtilisin sınıfında yer alan kazein hidrolizleyici alkalın proteaz , ikincisinin prostetik grup olarak Zn^{+2} içeren ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inaktive olan nötral proteaz , üçüncüsünde kazeini hidrolizlemeyen ancak yüksek esteraz aktivitesi gösteren bir proteaz olduğu saptanmıştır (Higerd ve ark. ,1972).

Baysal ve ark. (2003), *Bacillus subtilis*'in SSF'te α -amilaz üretimi üzerine bir dizi incelemede bulunmuş , maksimum ürünün; substrat olarak buğday kabuğu, pH:7 , % 30'luk nem içeriği , 24 – 48 saat inkübasyon süresi ve 1000 μ m parçacık büyüklüğü ile % 20 'lik ekim oranı uygulandığında elde edildiğini belirtmişlerdir.

Uyar ve ark. (2004), yeni izole edilmiş *Bacillus* sp.'nin SSF tekniğiyle buğday ve mercimek kabuğunda yüksek miktarda alkalın proteaz salgıladığını belirtmiştir. Ayrıca çalışmalarıyla, inkübasyon süresi, ekim miktarı, nem miktarı ve kullanılan tampon çözeltinin yapısı gibi faktörlerin ürün verimine etkilerini saptamışlardır.

Yang ve ark. (2000), Kuzey Tayvan'dan izole ettikleri *Bacillus subtilis* Y – 108 suşunun , kitin varlığında bazı kabuklu canlı artıklarını deproteinize ederek bir tür proteaz salgıladığını ve bu enzimin substrat olarak kazein kullanıldığında pH : 8 ve 50°C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları inhibisyon çalışmalarında enzimin EDTA ve Hg^{+2} ile kuvvetli şekilde inhibe olduğunu Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} varlığında ise aktivasyon kazandığını bildirmişlerdir.

Termofilik *Bacillus coagulans* B49 , SSF tekniğiyle buğday kabuğundan α -amilaz eldesi için kullanıldığında çok yüksek miktarda enzim salgıladığı görülmüştür (Başu ve ark. ,1995).

Mulimani ve ark. (2000), SSF yöntemiyle α -amilazın *Giberella fujikuroi* tarafından üretilmesini farklı substratlar kullanarak incelemiş sonuç olarak en iyi verime buğday kabuğunda rastlamışlardır.

Nagel ve ark. (2000), geliştirdikleri aseptik bir kürek yardımıyla katı substratın karışımını sağlayan fermentör modeliyle SSF sistemi içindeki ısının heterojen dağılımını önlemişlerdir.

Oostra ve ark. (2001), oksijen difüzyonunun SSF sistemleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir.

Fujiwara ve ark. (1987), topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. B21 – 2 ‘den ucuz olarak temin edebildikleri soya kabuklarını kullanarak bol miktarda proteaz üretmişlerdir.

Yapılan çalışmalar *Bacillus* sp. DTZ’nin SSF yöntemiyle çok yüksek miktarda , alkalın ve sığağa dayanıklı pektinaz ürettiğini göstermiştir. Bu enzimin üretiminin fermentasyon ortamının nem seviyesi , substratın yapısı , azot ve karbon kaynağı mineral ve vitamin içeriğı gibi faktörlerden etkilendiğı bildirilmiştir (Kashyap ve ark. ,2003) .

Suntornsuk ve ark. (1987), *Bacillus* sp. FK46 ‘nın tavuk tüyünü parçalama özelliğı üzerine bazı çalışmalarda bulunmuşlardır.

Uehara ve ark. (1987), *Bacillus subtilis* NP58’den elde ettikleri iki mutanta (NT02 ve NT17) yüksek miktarda nötral proteaz salgılayabilen *Bacillus nata* IAM 1212’den gen aktararak mutantlardan elde ettikleri enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine bir dizi çalışma gerçekleştirmiştir.

SSF yöntemiyle *Bacillus megaterium* 16M kullanılarak buğday kabuğundan α -amilaz üretimi için yapılan çalışmalarda, optimum pH:6 , sıcaklığın da 20 °C olduğı bildirilmiştir (Ramesh ve ark. , 1987).

Gessese ve ark. (1987), *Bacillus* sp. AR – 009 ‘un substrat olarak buğday kabuğı kullanıldığında yüksek oranda ksilinaz ürettiğini bildirmişlerdir.

Souza ve ark. (1987), kolay metabolize olan şekerlerin (glukoz, ksiloz, fruktoz, sellübioz ve laktoz) SSF yöntemiyle *Aspergillus tamari* 'nin ksilinaz üretimi üzerine bir dizi çalışma gerçekleştirmiştir .

Bacillus licheniformis M27 tarafından SmF tekniğiyle üretilen α -amilaz, fermentasyon ortamının %1 glukoz içermesi durumunda katabolik repressyon sonucu kuvvetli şekilde inhibe olmaktadır (Ramesh ve ark. ,1991).

Anderson ve ark. (1983), *Bacillus stearothermophilus* 1518 'in salgıladığı α -amilazı model kullanarak, bu enzimin yüksek ısı duyarlılığı üzerine incelemelerde bulunmuştur.

Alkalın ortamlarda iyi gelişme gösterebilen *Bacillus* No.221 'den bir çeşit kristal alkalın proteaz elde edilmiştir . Bu enzimin pH: 11,5 – 12,0 aralığında ve kazein varlığında maksimum aktivite göstermesine rağmen pH: 4,0 – 11 aralıklarında ve 60 °C sıcaklıkta 10 dk. kararlılığını koruduğu belirtilmiştir (Horikoshi, 1971) .

Ellaiah ve ark. (2002), *Aspergillus species*'i kullanarak SSF tekniğiyle glukamilazın üretimi üzerine bazı parametrelerin (substrat çeşidi , ekim miktarı, inkübasyon süresi , sıcaklık v.b.) etkisini incelediler.

Bacillus amyloliquefaciens 'in alkalın proteaz (apr [Bamp]) ve nötral proteaz (npr [Bamp]) ile ilgili genleri *Bacillus subtilis*'e aktarılarak etkileri incelenmiştir (Vasanth ve ark. ,1984).

Balton ve ark. (1997), *Bacillus plavothermus* tarafından üretilen α -amilazın , saflaştırılması ve özelliklerinin tespiti için yaptıkları incelemede maksimum aktivitenin nişasta üzerinde pH:5.5 – 6.0 , 60°C sıcaklıkta görüldüğünü bildirmişlerdir.

Gould ve ark. (1997), *Bacillus amyloliquefaciens* 'in eksraselüler enzimlerden α -amilaz ve proteazı bol miktarda salgıladığını tespit etmişler.

Aikat ve ark. (2001), *Rhizopus oryzae* 'i kullanarak buğday kabuğundan bol miktarda proteaz elde etmiş , ayrıca kullanılan fermentör modelinin üretilen enzim miktarını önemli ölçüde etkilediğini belirtmişler.

Yapılan çalışmalar, Ca^{+2} iyonlarının sıcaklıkla beraber proteaz aktivitesini artırdığını göstermiştir (Agrawal ve ark. ,2004).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. *Biyolojik Materyal*

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

3.2. *Kimyasal Maddeler*

Na_2CO_3 , NaOH, HCl, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tris-hidroksimetilaminomethan, NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{N}_0_4$, NaCl, TCA, CaCl_2 (Merck Darmstad' tan), EDTA, PMSF, Albumin Sigma'dan temin edildi.

Organik madde olarak Agar (Sigma'dan), Nutrient-Broth (Oxoid'ten), Azokazein (Sigma'dan), Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract, Kazein, Pepton, Casamino Acid , Bacto-Liver, Lizin ,Asparajin, Fruktoz, Ksiloz, ,Glukoz, Sukroz, Galaktoz, Maltoz, Methionin (Difco'dan) temin edildi.

3.3. *Kullanılan Cihazlar*

Blendir	(Waring Commercial Laboratuar Blender)
İnkübatör	(Sanyo MİR 552, MİR 5520)
Etüv	(Herause)
Steril Kabin	(Telstar , AV- 100)
Su Banyosu	(Grant 6G,-20/ +100 °C)
Digital Göstergeli hassas terazi	(Gecavery0,0001 gr)
Spektrofotometre	(Unicom, 8625, UV, VIS)
Vortex	(Stuart)
Magnetik Karıştırıcı	(Stuart)
PH metre	(Denway 3010, PCP 501 electrode)
Deep- freeze	(Haris, -95 °C)
Sterilizatör	(Herause)
Soğutmalı Santrifüj	(Sigma Christ 2K 15)
Çalkalamalı Su Banyosu	(Clifton)
Otoklav	

3.4. Besiyerleri

3.4.1. Katı Besiyeri

8 gr nutrient broth (NB), 16 gr Agar 1000 ml saf suda çözünerek otoklavlandı.

3.4.2. Sıvı Besiyeri

10gr Bacto-tryptone, 5gr Bacto-yeast extract, 10gr NaCl 1000ml saf suda çözünerek 100 ml'lik erlenler içerisine 50 ml hacminde paylaştırıldıktan sonra otoklavlanarak hazırlandı.

3.4.3. SSF Besiyeri

Kurutulmuş muz kabuğu, darı bitkisi ve pirinç kabuğu blendırdan geçirildi. Dört farklı elek yardımıyla dört farklı parça büyüklüğü elde edildi (500 μ m , 1000 μ m , 1500 μ m , 2000 μ m) . Her bir substrattan 5x4 tane 50 ml'lik erlen hacminin %3 ü olacak şekilde 1,5 gr tartılarak erlenlere bırakıldı. Üzerine 5 ml 0,1M Karbonat/Bikarbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$) (pH:10,14) tamponu eklenerek otoklavlanmak üzere hazırlandı.

3.5. Enzim Aktivitesinde Kullanılan Çözeltiler

3.5.1. Tampon Çözeltiler

a) 0,1 M Tris –HCl Tamponu (pH:8)

29 ml 0,1 M HCl üzerine 50 ml 0,1 M tris bırakılarak toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su eklenerek hazırlandı.

b) Karbonat – Bikarbonat Tamponu

pH : 9,16 10 ml 0,1 M Na_2CO_3

pH : 10,14 60 ml 0,1 M Na_2CO_3

pH : 10,83 90 ml 0,1 M Na_2CO_3

Çözeltilerine toplam hacim 100 ml olacak şekilde 0,1 M NaHCO_3 eklenerek hazırlandı.

c) pH : 12

0,1M Na_2HPO_4 üzerine 0,1 M 26,9 ml NaOH bırakılarak toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su eklenerek hazırlandı.

3.5.2. Azokazein

% 0.5 (w/v) oranında 0,1 M, pH:10.14 karbonat-bikarbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$) tamponuyla hazırlandı.

3.6. Farklı Substratların Elde Edilmesi

Muz kabuğu , darı ve pirinç kabukları blender yardımıyla küçük parçacıklara ayrıldı .Dört farklı gözenek büyüklüğüne sahip elekler kullanılarak bu parçacıklar dört farklı büyüklüğe ayrıştırıldı (500 μm , 1000 μm , 1500 μm , 2000 μm) . Her bir parça büyüklüğündeki substrata eşit miktarda bakteri ekilerek (1000 μl), enzim üretimi için uygun parça büyüklüğü belirlendi.

3.7. Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Sıvı besiyerinde 24 saat , 37 °C 'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılan bakterilerden , 5 adet SSF besiyerine 1000 μl ekim yapıldı. Her 24 saatte bir (24-48-72-96-120) örnek alınarak enzim aktivitesi kontrol edilerek uygun inkübasyon süresi belirlendi.

3.8. Enzim Üretiminde Kullanılan Üst Sıvının Eldesi

72. saatte inkübasyon ortamından çıkarılan SSF besiyerine 10 ml 0.1M pH:10,14 karbonat/bikarbonat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$) tamponu bırakılarak erlen iyice çalkalandı .- Karışım gazlı bez yardımıyla bir behere süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne aktarılarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendikten sonra üst sıvıdan aktivite tayini Leighton ve ark. (1973) göre yapıldı.

3.9. Azokazein İle Aktivite Tayini

Azokazeinle aktivite tayini Leighton ve ark. (1973) göre yapıldı. 0,1 M karbonat / bikarbonat (pH : 10,14) tamponu içinde % 0,5 'lik ticari azokazein çözeltisi hazırlandı. 500 µl azokazein çözeltisi ile 250 µl enzim reaksiyon tüpünde karıştırıldıktan sonra 37 °C de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 2 ml % 10 'luk TCA çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 15 dk 4 °C da bekletilen örnekler 5 dk 5000 rpm 'de santrifüjlendi. Üst sıvıdan 0,4 ml alınarak 0,8 ml 1,8 N NaOH çözeltisiyle karıştırıldı ve 420 nm 'de absorbanslar kaydedildi. Bir unite proteolitik enzim aktivitesi, (Uyar ve ark. (2004) göre, mililitrede 37 °C 1saat inkübasyon sonunda parçalanmış azokazein miktarı olarak belirlendi.

3.10. İnhibitör Maddenin Belirlenmesi

0,05 M konsantrasyonda hazırlanan EDTA ve PMSF den reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde ayrı ayrı 75 µl alınıp reaksiyon tüplerindeki 250 µl enzime aktarıldı ve 15 dk öninkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu tüplerdeki enzimlerle yapılan aktivite tayininde inhibitör belirlendi.

3.11. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Tampon çözeltiler pH : 8 (0,1 M tris – HCl) pH : 9,10,11 (0,1 M Na₂CO₃ / 0,1 M NaHCO₃) ve pH : 12 (0,1 M Na₂HPO₄ / 0,1 M NaOH) olarak hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak aynı pH değerinde SSF besiyeri ile azokazein (%05) çözeltileri elde edildi. Daha sonra her pH değeriyle ayrı ayrı yapılan aktivite tayini sonucunda optimum pH değeri belirlendi.

3.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Nem Miktarının Etkisi

SSF besiyerlerine, besiyerinin ağırlıkça % 20 , 30 , 40 , 50 , 60 'ı olacak şekilde farklı miktarlarda 0,1M karbonat / bikarbonat (pH: 10) tamponu bırakılarak otoklavlandı. Daha sonra örneklerle 1000 µl ekim yapıp inkübasyon ortamına bırakıldı. 72. saatte yapılan aktivite tayini sonucu optimum nem miktarı tespit edildi .

3.13. *Enzim Aktivitesi Üzerine Ekim Miktarının (inokulum) Etkisi*

SSF besiyerleri otoklavlandıktan sonra besiyerlerinin hacimce % 10 , 15, 20 , 25, 30 ' u olacak şekilde farklı miktarlarda ekim yapıldı. Örnekler inkübasyon ortamına bırakıldıktan sonra 72. saatte yapılan aktivite tayini sonucunda optimum ekim miktarı belirlendi.

3.14. *Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi*

Optimum pH değeriyle (pH : 10,14) hazırlanmış azokazein ve enzim çözeltisi kullanılarak, enzim – substrat karışımı 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C sıcaklıkta 30 dk. ayrı ayrı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamından alınan örneklerde aktivite tayini devam ettirilerek optimum sıcaklık belirlendi.

3.15. *Enzim Üretimi Üzerine Bazı Azot ve Karbon Kaynaklarının Etkisi*

3.15.1. *Azot Kaynakları*

SSF katı besiyeri hazırlandıktan sonra, %1 oranında 2.5 ml. tampon (0.1M pH:10.14 karbonat/bikarbonat) çözelti ile hazırlanan azot kaynaklarından; Pepton, Kazein, Amonyum nitrat, Amonyum sülfat, Bacto liver ve Amonyum klorür otoklavdan önce, Asparajin, Methionin, Lizin, Kazamino asit otoklavdan sonra besiyerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra 72 saatlik inkübasyona bırakılan örneklerin her birine, inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini uygulanarak etkileri Kanekar ve ark. (2002) göre belirlendi.

3.15.2. *Karbon Kaynakları*

SSF katı besiyerine 2,5 ml tampon (0.1M pH:10.14 karbonat/bikarbonat) bırakılarak otoklavlandı. %1 oranında 2.5 ml tampon(0.1M, pH:10.14 karbonat/bikarbonat) içerisinde çözünerek hazırlanan karbon kaynakları (Sukroz, Maltoz, Ksiloz, Fruktoz, Glukoz, Galaktoz), ekim yapılmadan önce besiyerine ilave edildi. Ekim yapıldıktan sonra 72 saat inkübasyona bırakılan örneklere bu süre sonunda aktivite tayini uygulanarak karbon kaynaklarının etkisi Souza ve ark. (2001) göre incelendi.

3.15.3. Azot ve Karbon Kaynağının Birlikte Kullanılması

SSF katı besiyeri hazırlandıktan sonra , enzim üretimini en çok arttıran azot kaynağı (Kazein) otoklavdan önce, karbon kaynağı (Galaktoz) otoklavdan sonra 2.5 ml tampon (0.1M pH:10.14 karbonat/bikarbonat) içinde çözünerek aynı besiyerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra 72 saat inkübasyona bırakılan örneğe süre sonunda aktivite tayini uygulanarak azot ve karbon kaynağının ortak etkisi incelendi.

3.15.4. Farklı Konsantrasyonlardaki Azot Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimini en çok arttıran azot kaynakları , Kazein ve Amonyum sülfat %05, %1, %2,%3 oranlarında ayrı ayrı hazırlandıktan sonra 2.5 ml tampon (0.1M pH:10.14 karbonat/bikarbonat) içinde çözünerek SSF katı besiyeri otoklavlanmadan önce besiyerine ilave edildi. Daha sonra örneklerle ekim yapılarak 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerle aktivite tayini uygulanarak etkileri incelendi.

3.16 . Ca^{+2} iyonlarının Enzimin Termal Stabilesine Etkisi

0.05 M konsantrasyonda hazırlanan $CaCl_2$ çözeltisinden, ortamdaki konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 150 μ l alınıp, 250 μ l enzim çözeltisiyle karıştırılıp 30- 80 °C'de bekletildikten sonra aktivite tayini uygulanarak Ca^{+2} iyonlarının etkisi incelendi.

3.17. Enzim İçin K_m ve V_{max} Değerinin Hesaplanması

250 μ l enzim çözeltisi, % 0.05, % 01, % 02, % 03, % 04, % 05 ve % 06' lık 0,1 M karbonat/bikarbonat (pH:10.14) tamponu içinde hazırlanan azokazein çözeltisi ile 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Aktivite tayini yapıldıktan sonra, Lineweaver- Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Uygun substrat tespiti

Her üç substrat örneği (Pirinç kabuğu, darı , muz kabuğu) için de dört farklı parça büyüklüğü (500, 1000, 1500, 2000 μm) ile hazırlanan ve 120 saat inkübasyona bırakılan örneklerle her 24 saatte bir alkalın proteaz aktivite tayini uygulandı . Aktivite tayinleri sonucunda elde edilen absorbands değerleri Tablo 4.1. , 4.2. , 4.3. verilmiştir.

Tablo 4.1. Pirinç kabuğunda 420 nm’de absorbands değerleri

Parça büyük (μm) ink. Süresi. (saat)	500	1000	1500	2000
24	0,075	0,063	0,054	0,111
48	0,098	0,102	0,194	0,133
72	0,118	0,143	0,215	0,172
96	0,125	0,150	0,206	0,180
120	0,110	0,135	0,175	0,126

Tablo 4.2. Darı’da 420 nm’de absorbands değerleri.

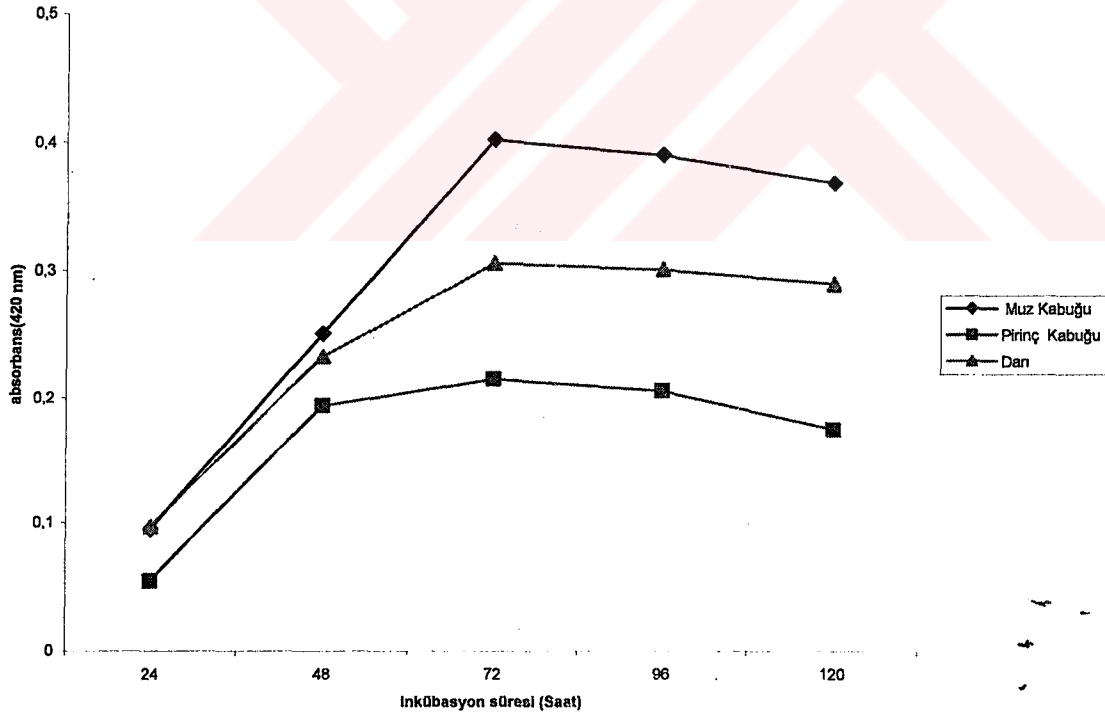
Parça büyük (μm) ink. Süresi. (saat)	500	1000	1500	2000
24	0,040	0,035	0,97	0,113
48	0,103	0,110	0,233	0,227
72	0,195	0,215	0,306	0,291
96	0,206	0,229	0,301	0,296
120	0,123	0,217	0,290	0,281

Tablo 4.3. Muz kabuğunda 420 nm'de absorbens değerleri.

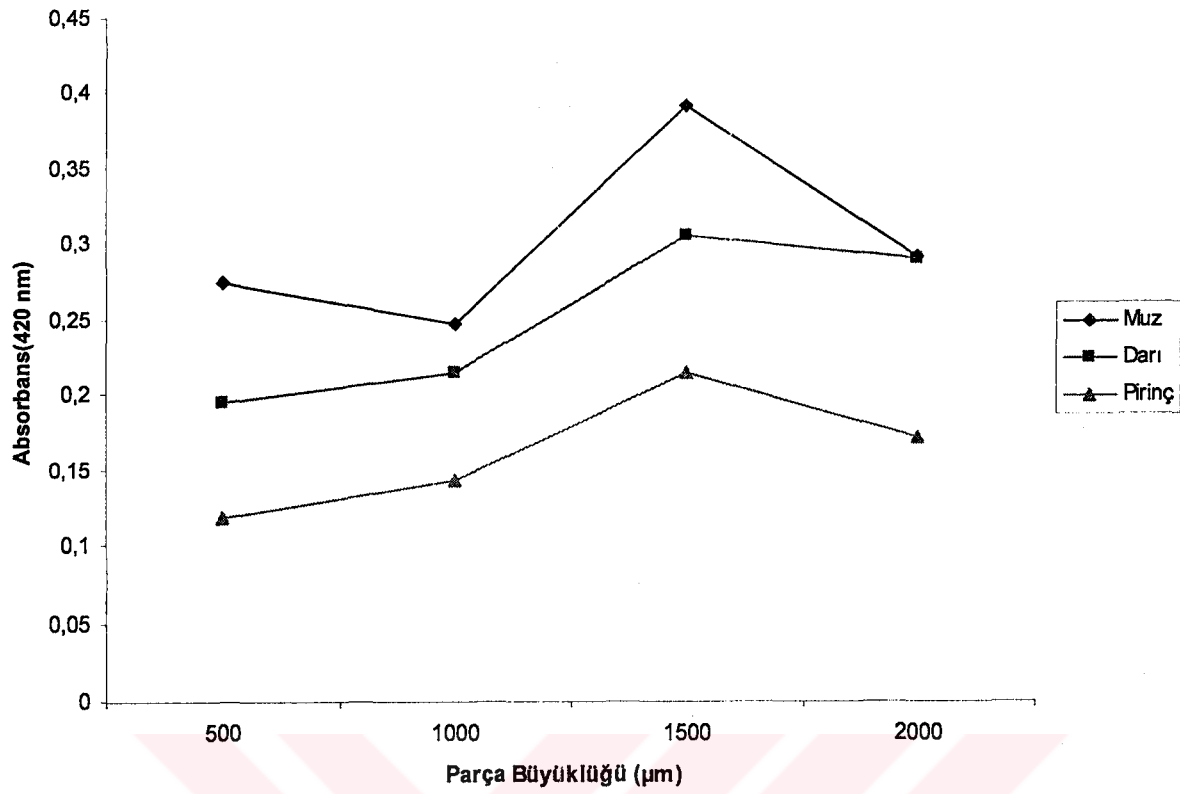
Parça büyük (μm) ink. Süresi. (saat)	500	1000	1500	2000
24	0,203	0,199	0,095	0,187
48	0,246	0,200	0,251	0,210
72	0,275	0,247	0,390	0,290
96	0,263	0,250	0,390	0,194
120	0,210	0,236	0,368	0,200

En yüksek enzim aktivitesi , muz kabuğunda 72. saatte 1500 μm parçacık büyüklüğünde görüldü.

Bu sonuçların karşılaştırılması Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı substratlarla alkalın proteaz için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi



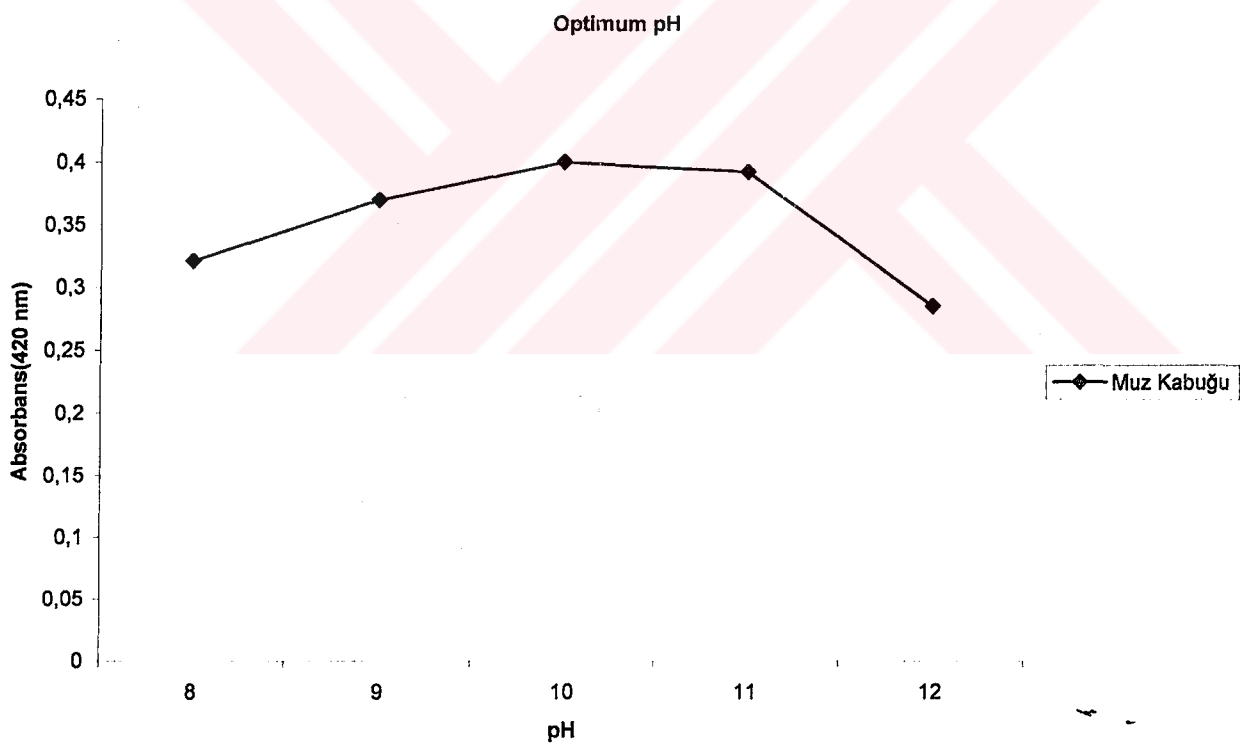
Şekil 4.2 Farklı substratlarla alkalın proteaz için uygun parça büyüklüğünün belirlenmesi

4.2. Uygun pH'nın Tespiti

pH: 8 (0,1 M tris – HCl) pH : 9, 10, 11 (0,1 M Na₂CO₃ / NaHCO₃)
pH: 12 (0,05 M Na₂HPO₄) tamponları ile hazırlanan besiyerleri inkübasyon ortamına alındı. Aynı tamponlarla hazırlanan azokazein kullanılarak yapılan aktivite tayinleri sonucunda en yüksek aktivite değeri pH : 10,14 'te görüldü. Bu sonuçlar Tablo 4.4 'te belirtilmiştir.

Tablo 4.4 Optimum pH değerinin belirlenmesi

pH	8,0	9,16	10,14	10,83	12,0
Absorbans (λ420 nm)	0,321	0,370	0,400	0,392	0,285



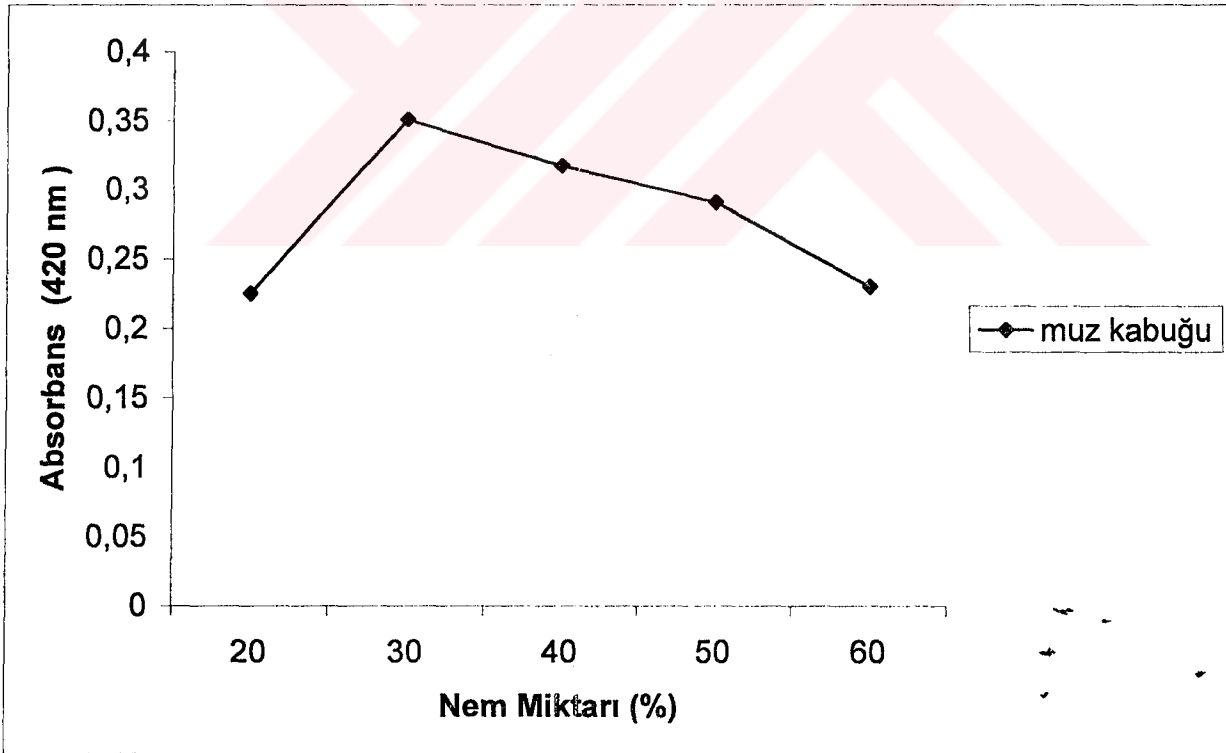
Şekil – 4. 3 Alkalın proteaz üretimine pH'nın etkisi

4.3. Uygun Nem Miktarının Tespiti

% 20 , % 30 , % 40 , % 50 , % 60 nem içeriğiyle farklı olarak hazırlanan örneklerle aktivite tayini uygulandığında optimum nem miktarı % 30 olarak görüldü. Bu sonuçlar Tablo 4.5 'te gösterilmektedir.

Nem Miktarı % w/v	20	30	40	50	60
Absorbans (λ 420 nm)	0,225	0,351	0,317	0,290	0,230

Tablo 4.5 Optimum nem miktarının belirlenmesi



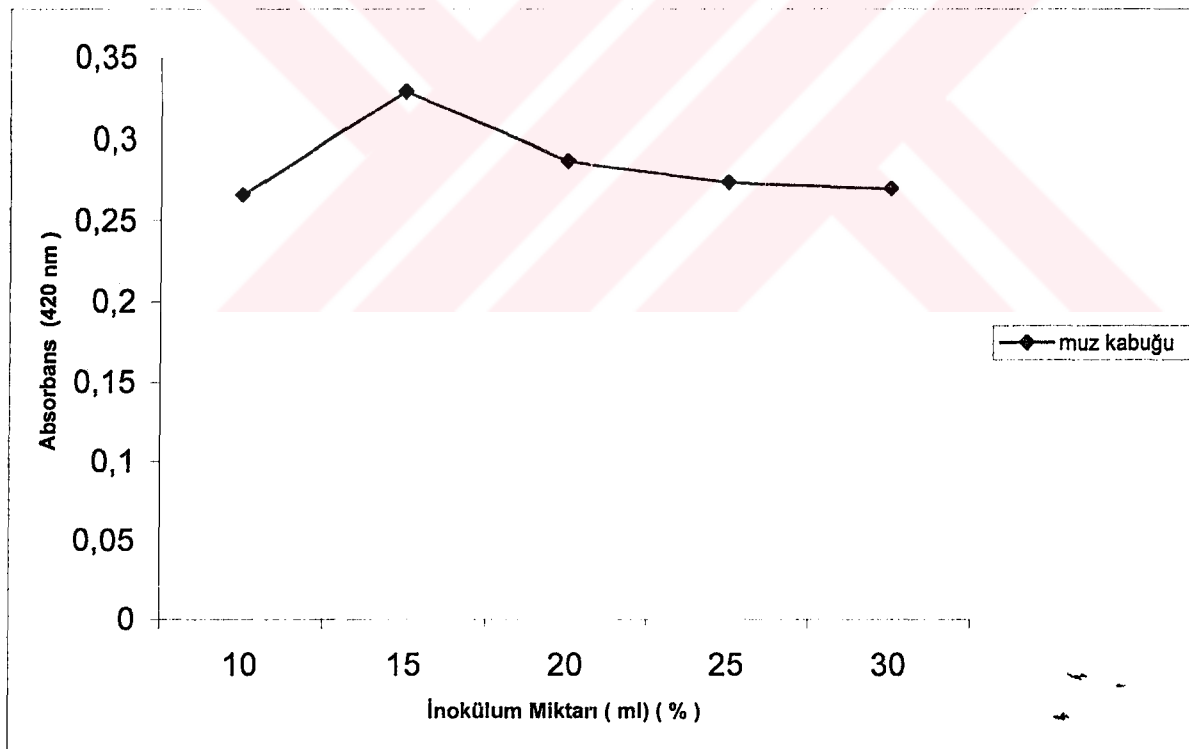
Şekil – 4.4 Alkalın proteaz için uygun nem miktarının tespit edilmesi

4.4. Uygun İnokulum Miktarının Tespiti

% 10, 15 , 20, 25, 30 olarak ekim yaptığımız besiyerlerinde inkübasyondan sonra yapılan aktivite tayinlerinde en yüksek enzim üretimi % 15 oranında ekim yapılan besiyerinde görüldü . Bu çalışma için optimum ekim miktarı % 15 olarak belirlendi.

Tablo 4.6 Optimum Ekim Miktarının belirlenmesi.

Ekim Miktarı % w/v	10	15	20	25	30
Absorbans (λ 420 nm)	0,266	0,329	0,287	0,274	0,270



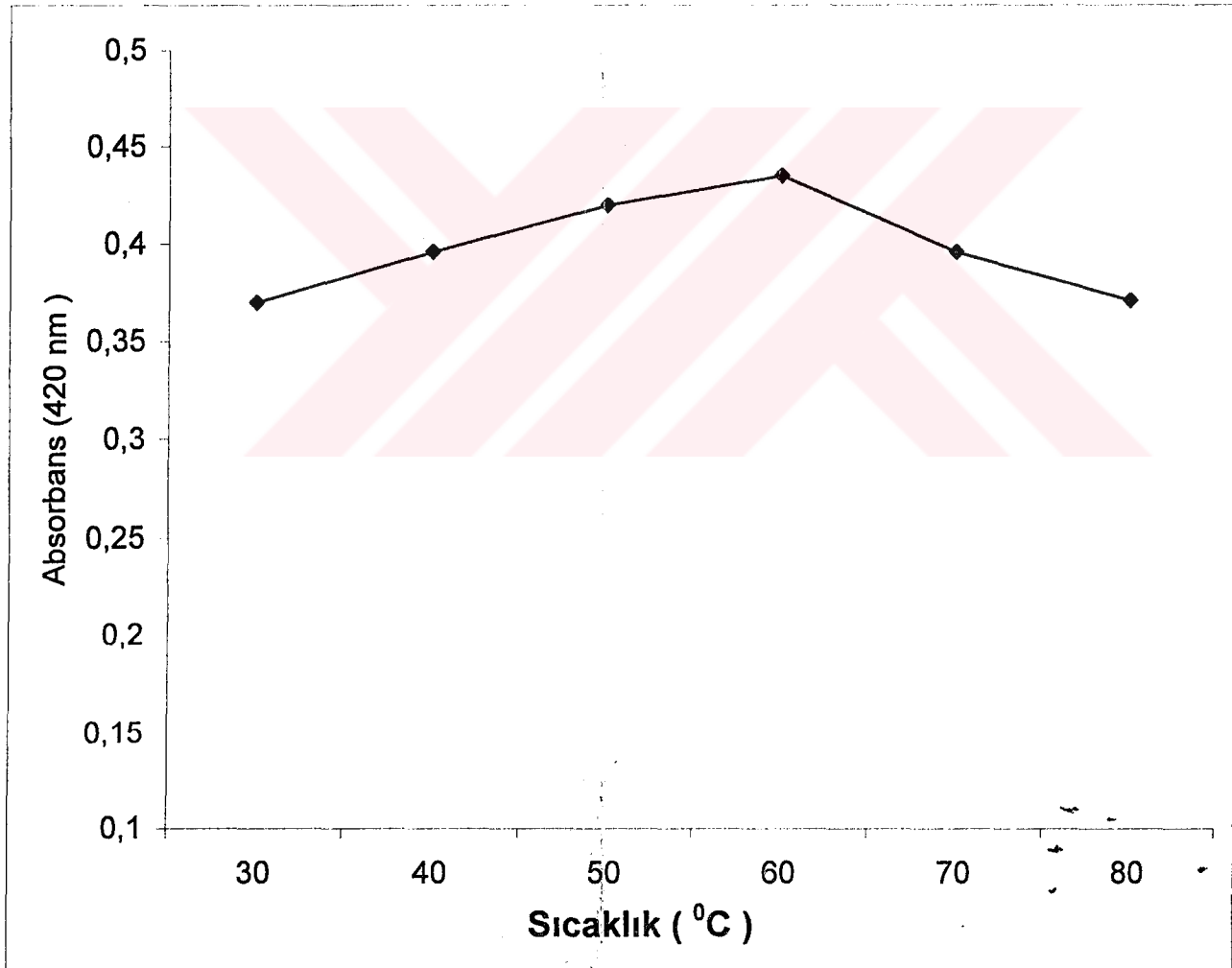
Şekil – 4. 5 Alkalın proteaz için uygun inokulum derişiminin belirlenmesi

4.5. Optimum Sıcaklığın Tespiti

30, 40, 50, 60, 70, 80 °C sıcaklık değerlerinde yaptığımız aktivite tayinleri sonucunda en yüksek aktivite 60 °C de görüldü.

Tablo 4.6. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

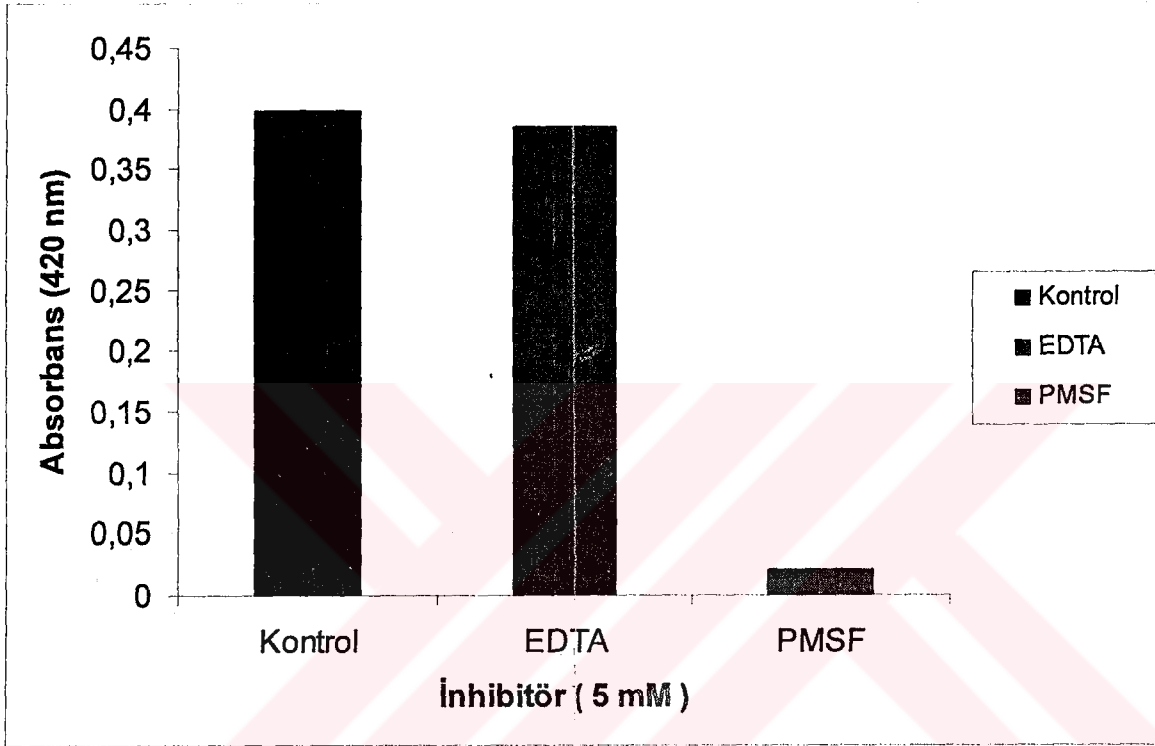
Sıcaklık °C	30	40	50	60	70	80
Absorbans ($\lambda 420$ nm)	0,370	0,396	0,420	0,435	0,396	0,371



Şekil – 4.6 Alkalın proteaz üzerine sıcaklığın etkisi

4.6. İnhibisyon Çalışması

EDTA ve PMSF ile yapılan inhibisyon çalışmasında , PMSF ile inhibe olan enzimin alkalın serin proteaz olduğu saptandı.



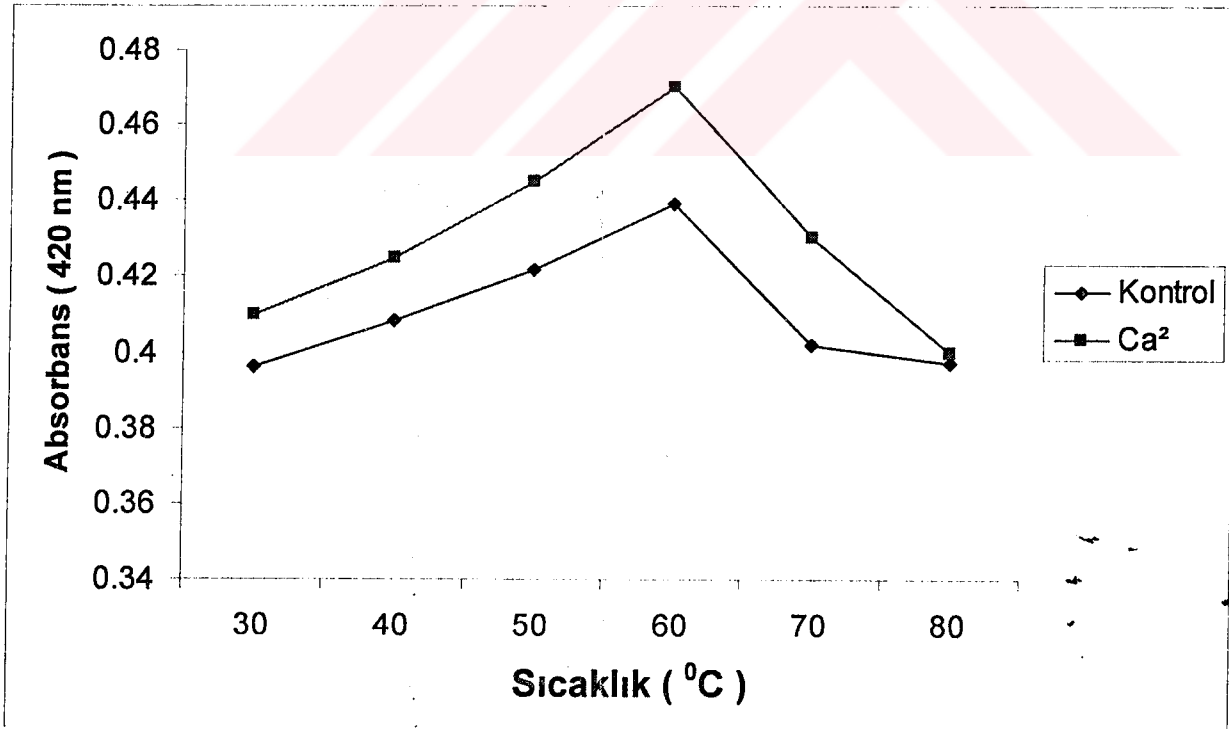
Şekil – 4.7 EDTA ve PMSF'nin alkalın proteaz üzerine etkisi

4.7. Ca^{+2} İyonlarının Enzimin Termal Stabilitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada Ca^{+2} iyonlarının ciddi olmamakla beraber enzimin termal stabilitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Tablo – 4.7 Ca^{+2} iyonlarının enzimin termal stabilitesi üzerine etkisi

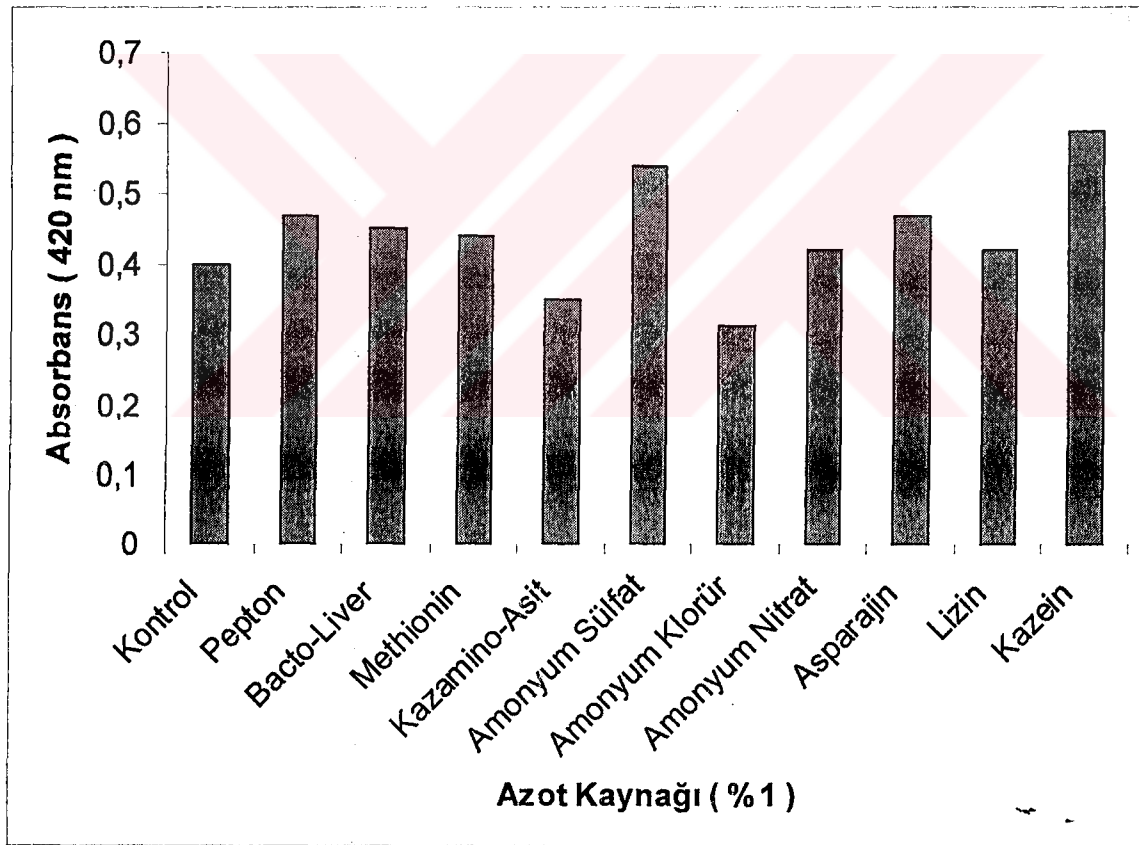
Sıcaklık (°C)	Kontrol ($\lambda 420$ nm)	CaCl_2 (10 mM) ($\lambda 420$ nm)
30	0,396	0,410
40	0,408	0,425
50	0,422	0,445
60	0,439	0,470
70	0,402	0,430
80	0,397	0,400

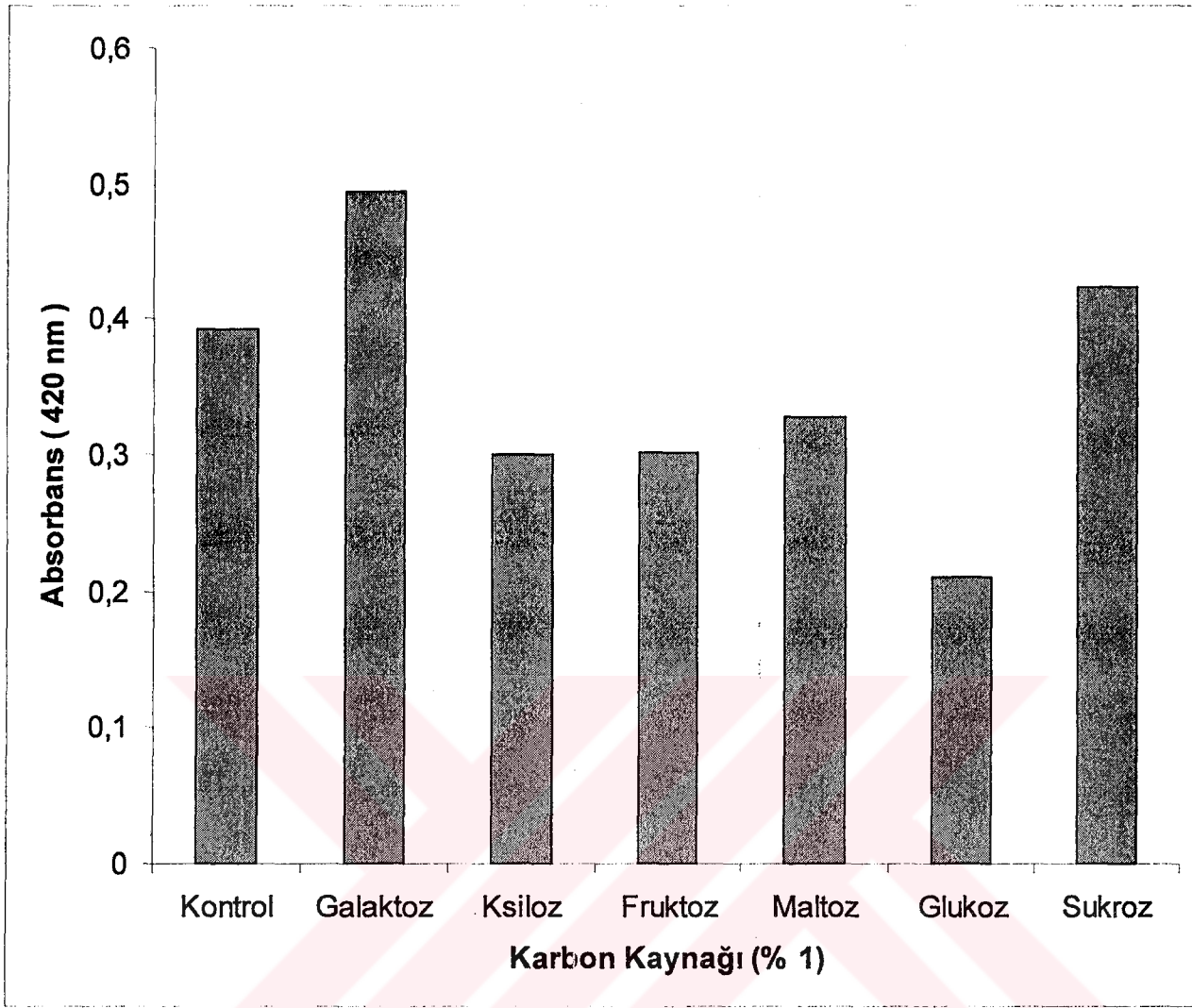


4.8. Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Bazı karbon ve azot kaynaklarının enzim aktivitesine etkileri incelendi. Azot kaynaklarından kazein, pepton, bacto – liver , amonyum sülfat (NH_4) $_2$ SO $_4$ amonyum nitrat, asparajin, lizin, methionin enzim üretiminde artış sağlarken NH_4Cl , Kazamino asit düşüşe neden olmuştur.

Karbon kaynaklarından galaktoz ve sukroz enzim üretimini arttırırken ksiloz, glukoz, fruktoz ve maltoz enzim üretimini azaltmıştır. Bakınız (Şekil – 9 ve Şekil –10)

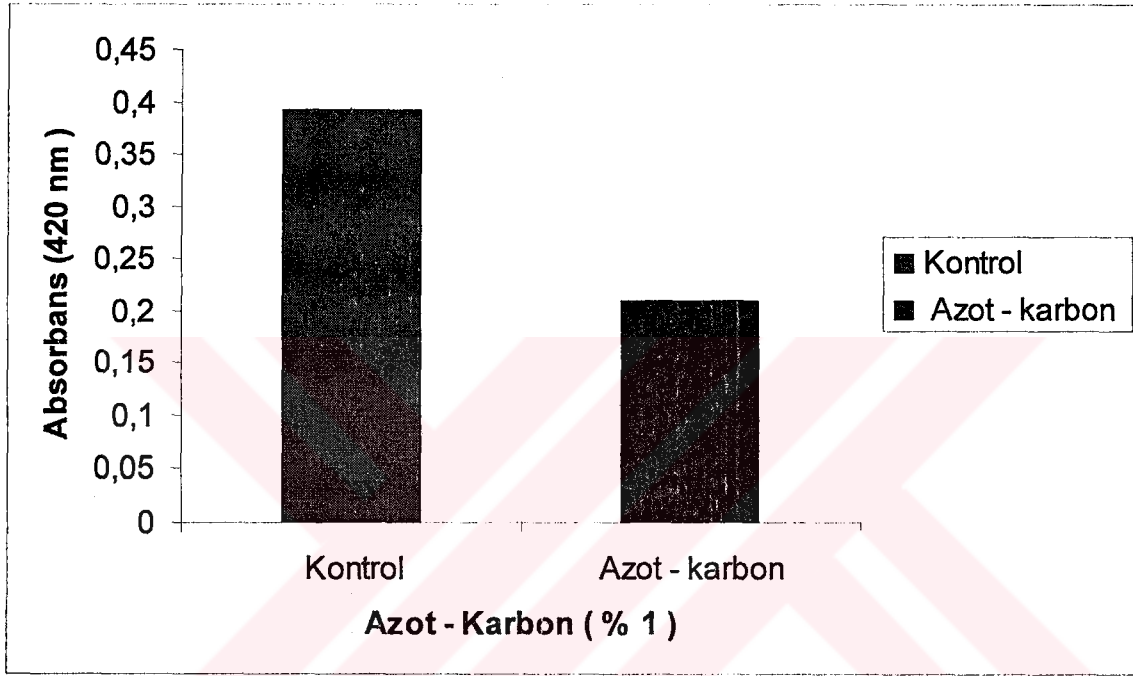




Şekil – 4.10 Bazı karbon kaynaklarının alkalın proteaz üzerine etkisi

4.9. Azot Ve Karbon Kaynağının Birlikte Kullanılması

Bu çalışmada azot kaynağı olarak %1 kazein ve karbon kaynağı olarak da %1 galaktoz aynı besiyeri içerisinde kullanıldığı zaman enzim üretiminin ciddi şekilde inhibe olduğu görüldü. Bakınız Şekil – 11



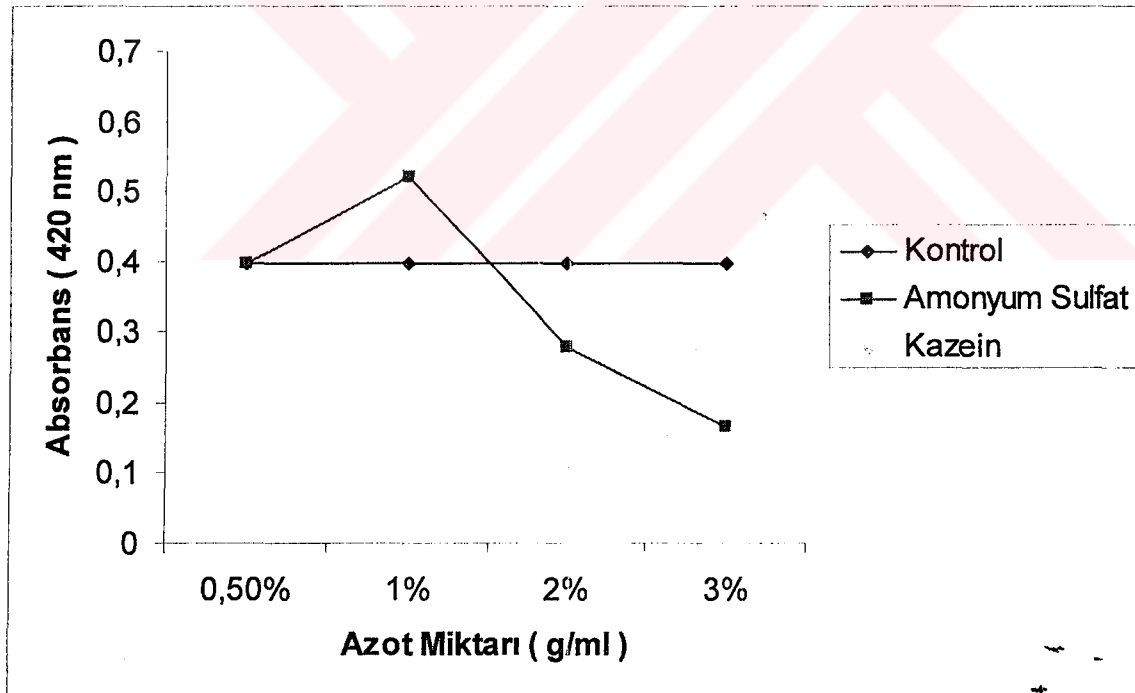
Şekil – 4.11 Azot ve karbon kaynağının birlikte kullanılmasının alkalın proteaz üretimine etkisi

4.10. Farklı Konsantrasyonlarda Azot Kaynağının Kullanılması

Bu çalışmada enzim üretimini en çok arttıran azot kaynaklarından kazein ve amonyum sülfatın % 0,5, % 1, % 2 ve % 3 konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde enzim üretiminin en çok olduğu besiyerinin , % 1 oranında azot içeren olduğu görüldü . % 1 üstündeki değerlerde enzim üretiminin düştüğü gözlemlendi.

Tablo – 4.8 Farklı konsantrasyonlarda kullanılan azot kaynaklarının etkisi

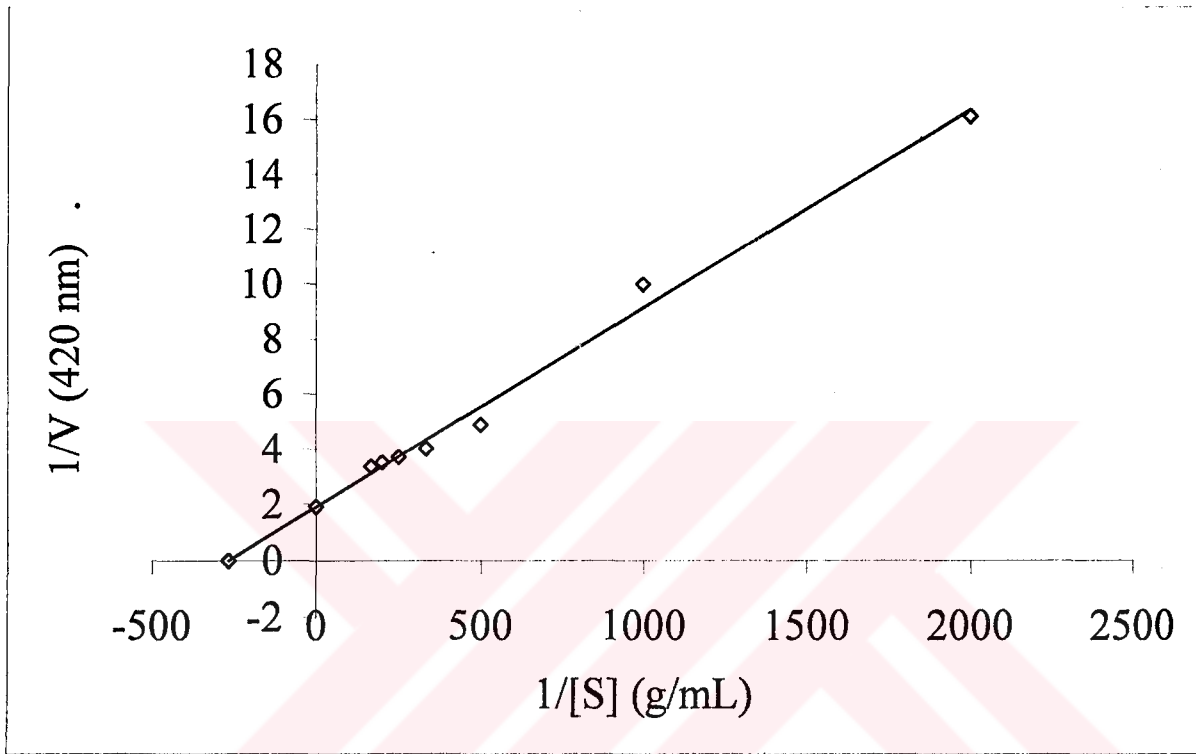
(λ 420 nm)	% 0,5	% 1	% 2	% 3
Amonyum sülfat	0,395	0,521	0,278	0,165
Kazein	0,452	0,587	0,353	0,255
Kontrol	0,395	0,395	0,395	0,395



Şekil – 4.12 Farklı konsantrasyonlardaki azot kaynaklarının alkalın proteaz üretimine etkisi

4.11. Enzim İçin K_m Değerinin Hesaplanması

Farklı substrat, sabit enzim derişiminde yapılan kinetik çalışmasıyla enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $3,8 \cdot 10^{-2}$ ve 0,527 olarak bulundu.



Şekil – 4.13 Enzim için K_m ve V_{max} değerinin belirlenmesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kullanılan üç substrat çeşidi içerisinde maksimum aktivite muz kabuğunda görüldü. Her üç substrat türü için de uygun inkübasyon süresinin 72. saat olması, yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir (Babu ve ark. ,1995) . 72.saatten sonra ortamda oluşmaya başlayan sekonder metabolitlerin, enzimin denatürasyonuna neden olup, enzim miktarında düşüşe yol açtığı sanılmaktadır (Ramesh ve ark. ,1987, Baysal ve ark. , 2003, Ramachandran ve ark. , 2004). Kullanılan bakterinin büyüme hızı ve enzim üretme özelliği de inkübasyon süresini etkilemektedir (Baysal ve ark. , 2003, Uyar ve ark. ,2004).

Her üç substrat türü içinde en yüksek aktivitenin 1500 µm parçacık büyüklüğünde görülmesi , parçacık büyüklüğünün enzim üretiminde etkili olduğunu belirtir.

Küçük parçacıklarda yüzey alanı gelişme için daha elverişlidir ancak parçacıklar arası gözenekler yetersizdir. Büyük parçacıklar da gözenekler , mikroorganizmaların gelişmesi için daha elverişli ancak doymuş yüzey alanı yetersizdir (George ve ark. ,1997 Baysal ve ark. ,2003, Uyar ve ark. ,2004).

Optimum pH değeri 10,14 olarak tespit edilse de, farklı pH değerleriyle yapılan çalışmalarda enzim üretimi bakımından büyük bir fark görülmemiştir. Bu durum enzimin pH değişimlerine toleranslı olması ve alkaline pH'larda kararlılık göstermesiyle açıklanabilir (Horikoshi, 1971, Rao ve ark. ,1998).

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde (30 °C – 80 °C), enzimin sıcaklıkla denatüre olmadığı yapısını koruduğu tespit edildi .

Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerine baktığımızda alkali pH'larda iyi aktivite göstermesi, yüksek sıcaklıklarda da aktivitesini koruyor olması endüstriyel anlamdaki önemini anlamamıza yardımcı olacaktır (Maurer ve ark., 2004).

Sistemin % 30'luk nem içermesi %20, 40, 50, 60 'lık nem içeriğine oranla çok daha fazla olmasa da daha yüksek miktarda enzim üretimine yol açmıştır.

Düşük nem içeriği , mikroorganizmaların yeterince gelişememesine neden olur . Bu durum enzim üretiminde düşüşe yol açar. Bunun yanında , yüksek nem içeriği , substratın gözenek sayısını azaltığından ve gaz hacmini düşürdüğünden enzim üretimini olumsuz etkiler (Pandey , 2003, Uyar ve ark. ,2004).

Çalışmalarımız sonucunda optimum ekim miktarı %15 olarak tespit edilmiş olsa da diğer örneklerle (% 10, 20 ,25 , 30) kıyaslandığında büyük bir fark görülmemiştir. Yüksek miktarda ekim ortamının nem seviyesini arttırarak , yüzeyde emilmeyen bir tabaka oluşmasına ve difüzyon bariyeri gibi görev yapmasına yol açacaktır . Bu durum mikrobiyal aktiviteyi azaltacağından , enzim üretiminde düşüşe neden olur (Krishna ve ark. ,1996).

İnhibisyon çalışması sonucunda , enzimin EDTA ile aktivitesini koruması ancak PMSF ile inhibe olması ,enzimin aktif bölgesinde serin artığı bulundurduğunu belirtir. PMSF alkalın serin proteazlar için kuvvetli inhibitör etkiye sahiptir (Yang ve ark. 2000).

Ca^{+2} iyonlarının serin proteazın aktivitesi ve termal stabilitesi üzerine etkisi incelendiğinde ; Ca^{+2} iyonları enzimin termal stabilitesini biraz arttırsada bu konuda ciddi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Gessese ve ark. (2003), yaptıkları çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Besiyerinin azot ve karbon kaynağı içermesi , genel olarak mikroorganizmaya besin teşkil ettiğinden , enzim üretimini olumlu yönde etkiler (Souza ve ark. 2001).

Bu çalışmada karbon kaynaklarından sukroz ve galaktozun enzim üretimine indükleyici, diğer şekerlerin (maltoz, ksiloz ve fruktoz) hafif represe edici etkisi- olduğu görülmüştür. Ayrıca besiyerinin %1 oranında glukoz içermesi durumunda enzim üretiminin %45 azaldığı bildirilmiştir (Joo ve ark. , 2002).

Azot kaynaklarının etkisine baktığımızda kazein, pepton, bacto-liver, amonyum sülfat ve amonyum nitratın enzimi indüklediğini, amonyum klorür ve kazamino asitin enzimi inhibe ettiğini görmekteyiz .

Azot ve karbon kaynağının birlikte kullanılması enzim üretimini ciddi şekilde represe etmektedir. Bunun nedeni olarak ortamda bulunan fazla besin maddesinin bakterinin üreme seyrini etkilemesi ve buna bağlı olarak uygun inkübasyon süresini değiştirmesi sanılmaktadır.

Artan konsantrasyonlarda azot kaynağı kullanıldığında, besiyerinin %1 oranında azot içermesi durumunda enzim üretiminde maksimum artış görülürken bu oranın üstündeki değerlerde enzim üretiminin inhibe olduğu görülmektedir. Kanekar ve ark. (2002), yaptıkları çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Enzim için yapılan kinetik çalışmasında K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $3,8 \cdot 10^{-2}$ ve 0,527 olarak bulundu.

6. KAYNAKLAR

Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T. and Patil, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to say protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 30 (2004) 981-997.

Aikat K., Bhattacharyya B.C., Protease production in a 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 Biochemistry*. 36 (2001) 1059-1068.

Anderson J.E., Adams D.M. and Walter JR. W.M., Conditions under which bacterial amylases survive ultrahigh temperature sterilization. *Journal of food science*. 48 (1983) 1622-1631.

Babu K.R. and Satyanarayana T., α - Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 30 (1995) 305 – 309.

Baysal Z., Uyar F., Aytekin Ç., Solid – state fermentation for production of amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot – spring water. *Process Biochemistry* . 38 (2003) 1165 – 1668.

Bolton D. J., Kelly C.T. and Fogarty W. M., Purification and cahracterizantion of the α - amylase of *Bacillus flavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 20 (1997) 340 – 343.

Couri S., Terz S.C., Pinto G. A. S., Freitas S. P., Costa A. C. A., Hydrolytic enzyme production in solid – state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8⁺. *Process Biochemistry*. 36 (2000) 255 – 261.

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.

Fujiwara N. and Yamamoto K., Production of alkaline protease in a low cost medium by alkaliphilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. *J. Ferment. Technol.* 65 (1987) 345 – 348 .

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 .

Germano S., Pandey A., Osaku C. A., Racha S.N., Soccol C. R., Characterization and stability of proteases. *Enzyme and Microbial Technology.* 32 (2003) 246 – 251.

Gessese A. , Kaul R. H. , Gashe B.A. , Mattiasson B. , Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology.* 312 (2003) 519-524.

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.

Gould A.R., May B.K. and Elliot W. H., Release of extracellular enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Bacteriology* . Apr (1975) 34 – 40.

Guchte M V., Kadde J., Vossen J.V., Kok J. and Venema G., Heterologous gene expression in *lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Applied and Environmental Microbiology.* Sept (1990) 2606 – 2611.

Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P., Bacterial alkaline proteases : Molecular approaches and industrial applications . *Applied Microbiology and Biotechnology.* 59 (2002) 15-32.

Higerd T.B., Hoch J. A. and Spizizen J., Hyperprotease-Producing Mutants of *Bacillus*. *Journal of Bacteriology.* Nov (1972) 1026-1028.

Hoogschagen M.J., Entius S.D. J., Haemers S., Tramper J., Rinzema A., A dynamic model for shrinkage effects in solid – state fermentation International Congress on Bioreactor Technology. 14 – 18 july 2003 Trampre Finland

Horikoshi K., Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agriculture Biology Chemistry*. 35 (1971) 1407-1414.

Hölker U., Höfer M., Lenz J., Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64 (2004) 175-186.

Johnvesly B., Naik G.R ., Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. 5B-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*. 37 (2001) 139-144.

Joo , H.S., Kumar, C.G., Park, C.G., Paik, S. R., Chang, C.S., Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*. 38 (2002) 155- 159.

Kanekar P.P., Nilejonkar S.S., Sarnaik S.S. and Kelkar A.S., Optimation of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Bioresource Technology* . 85 (2002) 87-93.

Kashyap D. R., Soni S. K., Tewari R., Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 88 (2003) 251 – 254.

Kaya Z., Subtilizin kinetiği ve etilmetan sülfonatın sporlaşma üzerine etkisi. Dicle Üniv. Fen-Bilimleri Enstitüsü yayınları, 1996, (Doktora Tezi).

Krishna C., Chandrasekaran M., Banana waste as substrate for α - amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid – state fermentation. *Appl. Microbial Biotechnol*. 46 (1996) 106 – 111.

Kumar C.G., Takagi H., Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17 (1999) 561-594.

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.* 76 (1973) 22-103.

Lonsane B. K. and Ramesh M. V., Production of bacterial thermostable α -amylase by solid – state fermentation. *Adv. Applied Biochemistry*. 35 (1990) 1-56.

Maurer K.H., Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology*. 15 (2004) 330- 334.

Mulimani V.H., Patil G.N., Ramalingam., α - Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochemical Education*. 28 (2000) 161-163.

Nagel F.J.J., Tramper J., Bakker M.S.M., Rinzema A., Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid – state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 72 (2001) 231 – 243.

Ooijkaas L. P., Weber F.J., Buitelaar R. M., Tramper J. and Rinzema A., Defined media and inert supports: their potential as solid state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*. 18 (2000) 356-360.

Oostra J., Comte E.P., Heuvel V. D., Tramper J., Rinzema A., Intraparticle oxygen diffusion limitation in solid – state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 74 (2001) 13- 24.

Özçelik S., Genel Mikrobiyoloji . Süleyman Demirel Üniv. yayınları ,1998.

Pandey A. , Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13 (2003) 81-84.

Puri S., Beg Q. K., Gupta R., Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Current Microbiology*. 44 (2002) 286 – 290.

Ramachandran S., Anil K., Pate K., Nampoottiri M., Francis F., Nagy V., Szakacs G. and Pandey A., Coconut oil cake – a potential raw material for the production of α – Amylase. *Bioresource Tecnology*. 93 (2004) 169 – 174 .

Ramesh M. V. and Lonsane B. K., Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α - amylase production by *Bacillus licheniformis* m27 *Appl Microbial Biotechnol* . 35 (1991) 591 – 593.

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.

Ramesh M.V. and Lonsane B. K., Solid state fermentation for production of α - amylase by *Bacillus megaterium* 16m. *Biotechnology Letters*. 9 (1987) 323 – 328.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (1998) 597-635.

Soccol C.R., Vandenberghe P.S.L., Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. 13 (2003) 205-218.

Souza D.F., Sovaza C. G. M. , Peralta R. M., Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaritii* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 36 (2001) 835 – 838.

Suntornsuk W., Suntornsuk L., Feather degradation by *Bacillus* sp. Fk. 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*. 86 (2003) 289 – 243.

Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R., Purification and characterization of a protease from solid- state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*. 38 (2003) 1553-1558.

Tunga R., Banerjee R., Bhattacharya B.C., Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. *Bioprocess Engineering*. 20 (1999) 485 – 489.

Tunga R., Banerjee R., Bhattacharyya B.C., Optimizing some factors affecting protease proudction under solid-state fermentation. *Bioprocess Engineering*. 19 (1998) 187-190.

Uehara H., Yamane K. and Marvo B., Thermosensitive, extracellular neutral proteases in *Bacillus subtilis*: isolation, characterization, and genetics. *Journal of Bacteriology* . Aug (1979) 583 – 590.

Uyar F., Baysal Z., Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 39 (2004) 1893-1898.

Uyar F. , Prokaryotlarda proteolitik aktivite. Dicle Üniv. Fen-Bilimleri Enstitüsü yayınları, 1993, (Yüksek Lisans Tezi).

Vasanthan N., Thompson L. D., Rhodes C., Banner C., Nagle J. and Filpula D., Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefociens* contatin a large oper reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *Journal of Bacteriology*. Sept (1984) 811- 819.

Yang J.K., Shih I.L., Tzeng Y .M., Wang S . L., Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Microbial Technology*. 26 (2000) 406 – 413 .

Yıldız A., Endüstriyel mikrobiyoloji . Dicle Üniv. yayınları ,2002, (Ders Notları).

7. ÖZGEÇMİŞ

1979 Siirt doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya'da tamamladım. 1998 yılında Malatya Atatürk Kız Lisesi 'nden mezun oldum. 2002 yılında Dicle Ünv. Fen Edb. Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdim . 2002 Eylül ayında Dicle Ünv. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. Evli ve bir çocuk annesiyim .

