

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* İLE α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN
KATI SUBSTRAT FERMANTASYONU İLE İNCELENMESİ**

Veyis SELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2006

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

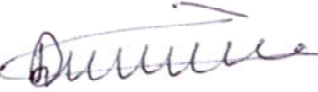
**BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS İLE α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN KATI SUBSTRAT
FERMANTASYONU İLE İNCELENMESİ**

Veyis SELEN

Yüksek Lisans Tezi
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu tez, 28 / 12 / 2006 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu ile başarılı /başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Dursun ÖZER



Üye: Prof. Dr. Ahmet ÖZER



Üye: Yrd. Doç. Dr. Gülşad USLU



Üye: Prof. Dr. Gülbeyi DURSUN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mehmet ERDEM

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS İLE α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN KATI SUBSTRAT FERMANTASYONU İLE İNCELENMESİ

Veyis SELEN

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

2006, Sayfa: 72

Bu çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 ile α -amilaz üretimi için ortam parametrelerinin etkisi ve optimum enzim üretim ortamı katı substrat fermantasyonunda incelenmiştir. Katı substrat olarak fındık küspesi kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle organik ve inorganik azot kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve daha sonra, karbon kaynağı miktarı, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl, EDTA, ekim konsantrasyonu, fermantasyon sıcaklığı, karıştırma hızı ve başlangıç pH'sı gibi parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

Organik azot kaynaklarının, inorganik azot kaynaklarına nazaran enzim aktivitesi üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu görülmüştür. İnorganik azot kaynaklarından NaNO_3 'ın enzim üretimine negatif bir etki yaparak aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir. Ortam bileşiminin yanı sıra fiziksel parametrelerden sıcaklığın ve karıştırma hızının da enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda maksimum enzim üretimi (4531 IU) 20 g/l fındık küspesi, 5 g/l pepton, 2.5 g/l yeast ekstrakt, 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren fermantasyon ortamında, 33 °C ve 150 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Diğer ortam bileşenlerinin ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl, EDTA gibi.) ise enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durum mikroorganizmanın farklı ortamlarda ihtiyaç duyduğu bu elementlerin doğal substrattan ve musluk suyundan karşıladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : α -Amilaz, Mikrobiyal enzim üretimi, *B. amyloliquefaciens*, Katı substrat fermantasyonu.

ABSTRACT

MSc Thesis

**INVESTIGATION OF α -AMYLASE PRODUCTION BY *BACILLUS*
AMYLOLIQUEFACIENS USING SOLID-SUBSTRATE FERMENTATION (SSF)****Veyis SELEN**

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

2006, Page: 72

In this study, the effect of medium conditions on production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 and medium of optimum enzyme production in solid substrate fermentation were examined. Hazelnut oil cake was used as a solid substrate. Primarily the effects of organic and inorganic nitrogen sources on production of α -amylase was investigated and than quantity of carbon source, effects of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , EDTA, like inoculum concentration, fermentation temperature, shake speed and initial pH parameters were examined.

It was seemed to sources of organic nitrogen in comparison to inorganic nitrogen sources had positive effect on production of enzyme. NaNO_3 , one of inorganic sources, negatively effects on enzyme production and decreases activity. Besides medium components, from physical parameters temperature and shake speed have effect on enzyme activity was deduced.

Maximum enzyme production was obtained as 4531 IU in fermentation medium containing 25 g/l hazelnut oil cake, 5 g/l peptone, 2.5 g/l yeast extract, 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 33 °C and 150 rpm. There was not significant effect of the other medium components on α -amylase production in solid substrate fermentation. This shows that microorganism in different mediums compensate needty of these elements from natural substrate and tap water.

Keywords: α -Amylase, Microbial enzyme production, *B. amyloliquefaciens*, Solid substrate fermentation. .

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, planlamasında, deneysel çalışmalarım için gerekli kimyasal ve teçhizatların sağlanmasında ve tezimin yazımında yardımını hiç esirgmeden bütün desteğiyle her an her konuda yanımda olan sayın hocalarım Prof. Dr. Dursun ÖZER'e ve Prof. Dr. Murat ELİBOL'a en samimi duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI'na ve Arş. Gör. Şule BULUT'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezim süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan FÜBAP'a ve sağlanan uygun çalışma koşulları nedeniyle Kimya Mühendisliği Bölümüne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
SİMGELER	X
1. GİRİŞ	1
2. FERMANTASYON	2
2.1. Fermentasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler	2
2.1.1. Substratın seçimi ve hazırlanması	3
2.1.2. Substratın sterilizasyonu	3
2.1.3. Aşılama kültürünün hazırlanması	3
2.1.4. Fermentasyon	4
2.1.5. Fermentasyon sıvısından biyokütlenin kazanılması	4
2.1.6. Ürünün kazanılması	5
2.2. Fermentasyonla Enzim Üretim Yöntemleri	5
2.2.1. Katı substrat fermentasyonu (Yüzey kültür fermentasyonu)	5
2.2.1.1. Katı substrat fermentasyonun avantajları ve dezavantajları	6
2.2.1.2. Katı substrat fermentasyonunun uygulamaları	7
2.2.1.3. Katı substrat fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmalar	7
2.2.1.4. Katı substrat fermentasyonunda kullanılan substratlar ve özellikleri	9
2.3. Daldırmalı fermentasyon yöntemi (Derin kültür fermentasyonu)	13
2.4. Türkiye'de enzim üretimi	14
3. ENZİMLER	16
3.1. Enzim Nedir?	16
3.2. Enzimin Yapısı ve Fonksiyonu	17
3.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	18
3.4. Enzim Kaynakları	20
3.4.1. Hayvansal enzimler	20
3.4.2. Bitkisel enzimler	20
3.4.3. Mikrobiyal Enzimler	20
3.4.3. Enzim kaynaklarının karşılaştırılması	22
4. MİKROBİYAL ENZİM ÜRETİMİ	24
4.1. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar	25
4.1.1. Bakteriler	25
5. AMİLAZLAR	28

5.1.	Amilazların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizması	29
5.1.1.	Termofilik amilazlar	31
5.1.2.	Alkalın amilazlar	32
5.1.3.	Asidik amilazlar	32
5.2.	Amilazların Endüstriyel Kullanımları	32
5.3.	α -Amilaz Üretimi ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar	34
6.	MATERYAL VE METOT	40
6.1.	Mikroorganizma	40
6.2.	Bakteri Üretim Besiyerleri ve Koşulları	40
6.3.	Doğal Substrat İçeren Fermantasyon Ortamı	42
6.4.	Yapılan Analizler	42
6.4.1.	Enzim aktivitesin ölçülmesi	42
7.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	44
7.1.	Azot Kaynaklarının Etkisi	46
7.2.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konsantrasyonunun Etkisi	50
7.3.	Fındık Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi	51
7.4.	Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi	52
7.5.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Konsantrasyonunun Etkisi	53
7.6.	CaCl_2 Konsantrasyonunun Etkisi	53
7.7.	NaCl Konsantrasyonunun Etkisi	55
7.8.	EDTA Konsantrasyonunun Etkisi	55
7.9.	Ekim Konsantrasyonunun Etkisi	56
7.10.	Başlangıç pH'sının Etkisi	58
7.11.	Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi	58
7.12.	Çalkalama Hızının Etkisi	60
8.	GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
9.	KAYNAKLAR	64
10.	EKLER	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Fermantasyon akış şeması	2
Şekil 2.2. Katı maddelerin kültür karışımından ayrılması	4
Şekil 2.3. Nişastanın yapıtaşları amiloz (a) ve amilopektinin (b) yapısı	12
Şekil.4.1. Endüstriyel enzimlerin dünya pazarındaki sektörlere göre yüzde dağılımı	25
Şekil 4.2. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması	25
Şekil 5.1. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler	30
Şekil 6.1. Enzim üretiminde takip edilen yol	41
Şekil 7.1. Fındık küspesinin kullanıldığı ortamda enzim aktivitesinin zamanla değişimi	44
Şekil 7.2. Fındık küspesine azot ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	45
Şekil 7.3. Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	46
Şekil 7.4. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	47
Şekil 7.5. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	48
Şekil 7.6. NaNO_3 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	49
Şekil 7.7. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	50
Şekil 7.8. Fındık küspesi konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	51
Şekil 7.9. KH_2PO_4 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	52
Şekil 7.10. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	53
Şekil 7.11. CaCl_2 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	54
Şekil 7.12. Na^+ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	55
Şekil 7.13. EDTA konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	56
Şekil 7.14. Ekim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	57
Şekil 7.15. Başlangıç pH'sının enzim aktivitesine etkisi	58
Şekil 7.16. Farklı ortam sıcaklıklarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	59
Şekil 7.17. Çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil.E1.1. Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri	71
Şekil.E1.2. 600 nm'de nişasta kalibrasyon grafiği	72

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Farklı ekonomik sektörlerde KSF'nun temel uygulamaları	8
Tablo 2.2. Katı substrat proseslerinde kullanılan temel mikroorganizma grupları	8
Tablo 3. 1 Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları	16
Tablo 3.2. Bazı önemli enzimler, kaynakları ve kaynaklarına göre kullanım alanları	21
Tablo 3.3. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar	23
Tablo 4.1. Fermantasyon için gerekli hammaddeler	24
Tablo 5.1 α -Amilaz kaynakları ve aktivite için optimum değerleri	31
Tablo 5.2. Amilazların uygulama alanları	34
Tablo 5.3. Farklı türden mikroorganizma kullanarak değişik C ve N kaynaklarıyla α -amilaz üretimi üzerine yapılan çalışmalar	39
Tablo 6.1. Deneylerde kullanılan bakterinin saklanması ve geliştirilmesinde kullanılan besiyeri	40
Tablo 6.2. Doğal substratlarla yapılan deneylerde kullanılan musluk suyunun mineral içeriği	42
Tablo 6.3. Fındık küspesi bileşimi	42
Tablo 7.1. Yapılan deneylerde elde edilen sonuçların ve optimum ortamın gösterimi	61
Tablo E1.1. Fındık küspesi bileşimi	71
Tablo E1.2. Doğal substratlarla yapılan deneylerde kullanılan musluk suyunun mineral içeriği	71
Tablo E1.3. %5'lik nişasta çözeltisinin dalga boyu taraması	71
Tablo E1.4. Nişasta çözeltisinin kalibrasyon verileri	72

SİMGELER

FK	Fındık Küspesi
YE	Yeast Ekstrakt
T	Sıcaklık
KH	Karıştırma hızı
pH _b	Başlangıç pH'sı
MO	Mikroorganizma

1. GİRİŞ

Canlı için yaşamsal rolü olan pek çok fonksiyonu kontrol eden enzimler, çok uzun zamanlardan beri insanlar tarafından kullanılmıştır. Ancak fonksiyonlarının tam anlaşılması ve endüstriyel anlamda kullanılması 19. yüzyılda başlamıştır ve biyoteknolojinin son 50 yıldaki gelişimi ile biyolojik katalizörlerin, sistemlerin, proseslerin endüstride kullanımı hız kazanmıştır. Özellikle son çeyrek yüzyılda çevre ve insan sağlığının ön plana çıkması ile enzimlerden teknolojiye daha iyi yararlanılma yolları aranmış ve önemli başarılar elde edilmiştir. Endüstriyel üretimde kimyasal katalizörler yerine, katalitik olarak daha etkili, ürün spesifikasyonu yüksek, istenmeyen ürün oluşumunu büyük ölçüde azaltan, enerji maliyeti düşük prosesler gerektiren, çevre dostu enzimlerin kullanımı artmıştır. Bugün yazılı olarak 2500'den fazla enzim bilinmesine rağmen bunların sadece 150 kadarı ticari bakımdan önem taşımaktadır (Gözükara, 1997; Telefoncu, 1986; Gonzalez vd., 2003; Tanyıldızı, 2005; Kılıç, 2002).

Biyoteknolojideki gelişmeye paralel olarak endüstriyel enzim kullanımı giderek artmaktadır. Enzim kaynaklarından elde edilen farklı özelliklerdeki enzimlerin bulunmasıyla enzimlerin kullanım alanları genişlemektedir. Özellikle endüstriyel proseslerde hidrolitik enzimlerin kullanıldığı görülmektedir. Bunlardan proteaz toplam enzim tüketiminde yaklaşık % 60'lık bir oranı oluştururken bunu takiben amilazlar ise % 30'luk bir paya sahiptir. α -amilaz mısır nişastasından glikoz ve fruktoz üretimi başta olmak üzere tekstil, bira ve meyve suyu, deterjan, ekmek üretimi gibi birçok sanayide uygulama alanı bulmuştur. Endüstriyel proseslerde kullanım uygulanabilirliği açısından termostabil enzimler tercih edilmektedir. Bu tür enzimler genellikle bakteriyel kaynaklardan elde edilebildiğinden dolayı yapılan araştırmalar bakteriyel kaynaklı enzim üretimi üzerinde yoğunlaşmıştır (Rehm vd.,1987).

Bu çalışmanın amacı, fındık küspesi kullanarak *Bacillus amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu, ilave azot kaynakları, diğer ortam bileşenleri konsantrasyonu, başlangıç pH'sı, fermentasyon sıcaklığı ve karıştırma hızının etkileri incelenerek; endüstriyel bir yan ürün olan fındık küspesinin değerlendirilebilirliğini araştırmaktır.

2. FERMANTASYON

Fermantasyon, organik maddelerin enzim katalizli dönüşümlerini gerçekleştirmek için mikroorganizmalar kullanılarak belirli ürünlerin oluşturulma prosesi olarak tanımlanır. Molekül ağırlıkları büyük organik maddelerin, havalı ya da havasız şartlarda, molekül ağırlığı daha küçük organik maddelere mikroorganizmalar tarafından parçalanmasıdır (Pekin, 1980).

Fermantasyon prosesi için genel eşitlik şu şekilde ifade edilebilir;

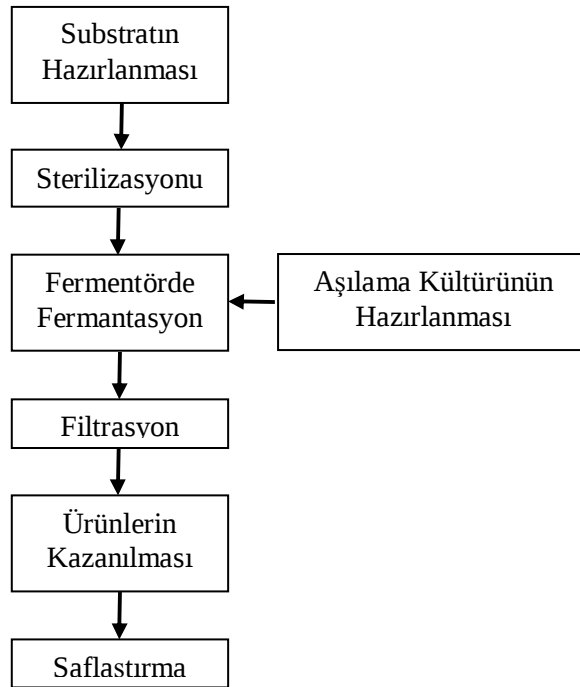
Mikroorganizma + Substrat $\longrightarrow$ Daha Fazla Mikroorganizma + Fermantasyon Ürünleri

Fermantasyon ürünlerini dört ana grupta toplayabiliriz;

1. Mikrobiyal hücreler
2. Enzim ve polisakkarit gibi büyük moleküller
3. Primer metabolitler
4. Sekonder metabolitler

2.1. Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler

Fermantasyon için uygulanan teknik işlemler Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Fermantasyon akış şeması.

2.1.1. Substratın seçimi ve hazırlanması

Bu konuda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta mikroorganizmaların kullanabileceği ucuz substratların seçimidir. Mikroorganizmaların gelişmesi için suyun varlığı ön planda gelir. Birçok mikroorganizma gelişmesi için gerekli olan karbonlu bileşikler organik karbon kaynaklarından karşılar ve biyosentezi de bu yoldan yapar. Azot kaynağı olarak organik azotlu maddeler (üre vb.) ya da inorganik azotlu maddelerden yararlanılır. Mikroorganizmaların temel karbon ve azot kaynaklarının dışında oksijen, hidrojen, fosfat, kükürt, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir gibi elementlere de ihtiyaç duyduğu bir gerçektir (Bulut, 2001).

Bu amaçla fermantasyon ortamına eklenen substratlar arasında; nişasta, nişastaca zengin tarım ve gıda endüstrisi yan ürünleri (küspe, melas vb.), kağıt fabrikası atıklarının sülfite şurubu vb. sayılabilir.

2.1.2. Substratın sterilizasyonu

Hazırlanan besiyeri ve kullanılan sistem yabancı mikroorganizma ihtiva etmemelidir. Bu nedenle fermantasyon işleminde kullanılan besi yerinin, aletlerin ve eğer fermantasyonda havalandırma yapılıyorsa kullanılan havanın sterilize edilmesi zorunludur.

Besiyerinin sterilizasyonunda ısısal (termal) yöntemler kullanılır ve genellikle “yüksek sıcaklık kısa süre” tekniği uygulanır. Besiyerinde, vitamin gibi ısıya az dirençli bileşiklerin ısısal bozunma aktivasyon enerjilerinin bilinmesi ve sterilizasyonun mikroorganizmaları öldürecek, ancak besiyerindeki yararlı bileşikler en az oranda bozacak koşullarda yapılması gerekmektedir. Sterilizasyon için uygulanan yöntemler şu şekilde sıralanabilir;

- Su buharı ile doğrudan sterilizasyon
- Su buharı ile basınç altında sterilizasyon
- Kuru hava ile sterilizasyon
- Kimyasal maddelerle sterilizasyon
- Işınlamayla sterilizasyon
- Filtrasyon ile sterilizasyon

2.1.3. Aşılama kültürünün hazırlanması

Laboratuarda slantlarda saklanan, çalkalayıcı erlenmayer ve laboratuvar fermantöründe üretilen aşı kültürü oradan fermantasyonun yapıldığı ürün oluşum fermantörüne aktarılır. Aşı kültürünün çoğaltılmasında genellikle üretim fermantöründe kullanılan substrat ve besi yeri seçilir. Böylece fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmalar fermantörde kullanılacak olan substrata ve besiyerine alıştırmış olur. Aşı kültürünün çoğaltılmasında genellikle kültür, kendisinin 10-100 katı hacmindeki besiyerine aşılanır.

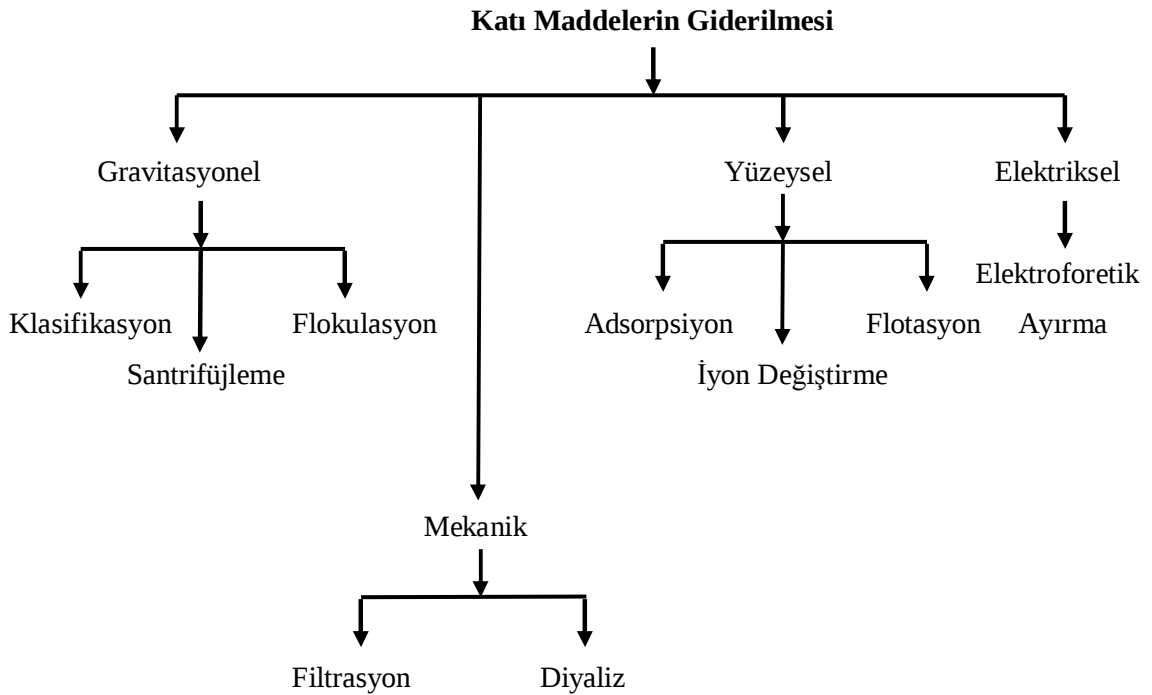
2.1.4. Fermantasyon

Fermantasyonda kullanılacak olan mikroorganizmalar istenilen oranda çoğaltıldıktan sonra üretim fermantöründe esas fermantasyona geçilir. Üretim fermantörüne mikroorganizma aşıl原因 olarak belirlenen şartlarda fermantasyon sürdürülür. Laboratuarda üretim için genellikle çalkalama sistemli erlenmayerlerden faydalanılır. Bunlar inkübasyon odalarında kullanıldığı gibi sıcaklık kontrollü olanlarda vardır.

2.1.5. Fermantasyon sıvısından biyokütlenin kazanılması

Fermantasyon sıvısında ürünün yanı sıra mikroorganizmalar, besiyerini oluşturan harcanmamış substratlar, nutrientler ve yan ürünler de bulunabilir. Ürünün saflaştırılmasına geçilmeden önce fermantasyon sıvısından katı maddelerin ayrılması gerekmektedir. Katı partiküllerin fermantasyon sıvılarından ayrılma yöntemleri Şekil 2.2.'de özetlenmektedir.

Fermantasyon endüstrisinde en çok gravitasyonel ve mekanik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bunlar arasında da santrifüjleme ve filtrasyon ilk sırada yer almaktadır.



Şekil 2.2. Katı maddelerin kültür karışımından ayrılması (Pekin, 1980).

Fermantasyon işleminde kimi durumlarda ürün, hücre içerisinde bulunan herhangi bir enzim ya da nükleik asit gibi biyokimyasal maddeler veya maya ve aşı örneğinde olduğu gibi mikroorganizmanın bizzat kendisi de olabilir. Ürün olarak mikroorganizma veya bunların

içerisindeki enzim yada diğer biyokimyasal maddelerin kazanılması isteniliyorsa, saflaştırmaya yönelik temel işlemler fermantasyon sıvısından ayrılan katı taneciklere uygulanır. Eğer ürün, fermantasyon sıvısında ise, saflaştırma işlemi taneciklerden ayrılan bu sıvı üzerine uygulanır.

2.1.6. Ürünün kazanılması

Fermantasyon sıvısında oluşan ürünler, mikroorganizmalar tarafından dışarıya salgılanan hücre dışı enzimler yada hücrelerin parçalanması sonucu ortama yayılan enzim, protein, RNA, DNA vb. tür biyokimyasal maddeler istenilen saflık derecesine göre çeşitli saflaştırma yöntemleri uygulanarak saflaştırılırlar (Bulut, 2001).

2.2. Fermantasyonla Enzim Üretim Yöntemleri

Endüstriyel enzim üretiminde kullanılan mikroorganizmalar bakteri, maya, mantar ve küf olabilir. Seçilen bir tek organizma 1000'den fazla farklı enzim çeşidine sahiptir. Enzim üretimi kısaca şu şekilde özetlenebilir; laboratuvar ölçekli çalışmalarda istenen enzimi üreten mikroorganizma bulunduktan sonra bu organizmanın genetiği enzimi daha fazla üretecek şekilde değiştirilir. Daha sonra mikroorganizma endüstriyel büyüklükteki fermantörlerde büyütülerek istenen enzim üretilir. Fermantasyon sonucu oluşan atıklar ise gübre olarak kullanılmaktadır (Sağıroğlu, 1999; Tatar, 1997).

Buna göre mikrobiyal fermantasyonla enzimlerin üretimi iki temel şekilde gerçekleştirilir.

- Yüzey kültür yöntemi
- Derin kültür yöntemi

2.2.1. Katı substrat fermantasyonu (Yüzey kültür fermantasyonu)

Katı Substrat Fermantasyonu (KSF), mikroorganizmaların serbest suyun yokluğunda nemli katı materyaller üzerinde büyümesi ve fermantasyonu olarak tanımlanabilir. Tipik bir daldırma fermantasyonun su içeriği % 95'den fazla iken KSF'nda katı lapanın su içeriği % 40 ile % 80 arasında değişebilmektedir. KSF ile üretilen enzimlere amilaz, proteaz, laktaz, pektinaz, amiloglikozidaz ve renin örnek olarak verilebilir.

KSF biyokimya ve mikrobiyoloji prensipleri tam olarak anlaşılmadan önce fermente edilen yiyecekler hazırlanmasında (koji prosesiyle), ayrıca mavi damarlı peynirlerin olgunlaşmasında kullanılmıştır. KSF'nun temelini oluşturan geleneksel koji prosesi, 25-30 °C'de havalandırılmalı bir ortamda tabakalarca istiflenmiş bambu sepetlerde yüksek nemlilikte aşılınmış substratın fermantasyonuyla meydana gelmektedir. Substrat olarak pirinç, buğday veya soya fasulyesi gibi nemli karışık maddeler kullanılmaktadır. Bu substratlar üzerinde

Aspergillus oryzae gibi filamentli mantarların gelişmesiyle proteolitik ve amilolitik ekstraselüler enzim karışımı üretilir ve besinlerin tadı değiştirilir. Bu tür endüstriyel proseslerin kontrolü çok güçtür. Bu proseslerde hedeflenen modifikasyonlar, sıcaklık, pH ve nemlilik gibi çevresel koşulların kontrolünü kolaylaştırmak ve bu kontrolleri fermentasyon yığınının tümünü etkileyecek şekilde geliştirmektir. Yakın zamanlarda yem olarak kullanılan tarımsal yan ürünlerde protein zenginleştirmede, enzim, organik asit ve diğer metabolitlerin üretiminde kullanımı yaygınlaşmıştır (Ooijkaas vd., 2000; Orhan, 2002).

KSF'nun özelliği küf gibi miselli organizmaların büyümesi için seçici ortamı sağlayan düşük nem seviyesinde işletilmesidir. Ortamın minimum nem içeriği %12'nin altına düştüğünde mikrobiyal aktivite durur. KSF'nun çoğu küf fermentasyonu olmasına rağmen, bakteri ve maya proseslerine dayanan katı substrat fermentasyonu nispeten yüksek nem seviyelerinde (% 75 - 90) kullanılır.

KSF kullanılan katı substratın yapısına bağlı olarak iki kısma ayrılabilir. Birincisi, yaygın olarak kullanılan ve KSF denilince genelde anlaşılan sistem ekimin doğal ortama yapıldığı fermentasyon şeklidir. Burada kullanılan katı madde hem destek materyali hem de karbon ve nütrient kaynağı olarak işlev görmektedir. Substrat olarak genellikle hem ekonomik açıdan hem de çevre faktörleri yönünden tarımsal ve endüstriyel yan ürünler kullanılmaktadır. İkincisi ise (çok fazla kullanılmayan) sıvı ortamla doyurulan katı destek malzemesi üzerine ekimin yapıldığı sistemdir. Buradaki katı sadece mikroorganizmanın tutuklamasına yardımcı olur. Bu fermentasyonda tipik olarak kendir tohumu, perlit, poliüretan köpükler, şeker kamışı küspesi ve vermikulit (Mg, Al, Fe, Si, H, O içeren mineral) kullanılmaktadır (Ooijkaas vd., 2000).

Çoğu ticari ürün üretimi için baskın maliyet karbon kaynağıdır. Bu ortamın toplam maliyetinin yaklaşık % 80'ini oluşturmaktadır. Bundan dolayı karbon maliyetinin minimize edilmesi istenir. Bu amaçla hububat, soya unu gibi katılar veya melas gibi sıvı kompleks kaynaklar ve bunların fermentasyonuna uygun katı substrat fermentasyonu üzerinde çalışılmaktadır (Rehm vd., 1987).

2.2.1.1. Katı substrat fermentasyonun avantajları ve dezavantajları

Katı substrat fermentasyonunun avantajlarını aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür (Raimbault, 1998).

- Genel olarak birkaç inorganik tuzun ilave edildiği buharla muamele edilmiş hububat gibi çok basit ortamlar kullanılmakta ve kullanılan ekipmanlar düşük güç harcamaktadır.
- Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için çoğu kontaminant bakteri türlerinin üremesi inhibe olmaktadır ve kapsamlı sterilizasyon proseslerine olan ihtiyaç azalmaktadır.

- Nem miktarı düşük olduğundan substratın birim ağırlığı başına olan hacmi düşük olacağından, kepekteki enzim aktivitesi çok yüksek olabilir. Böylece verilen fermentör hacmindeki enzim verimi derin fermentör sistemlerinden çok daha büyük olabilmektedir. Ayrıca atıkların işleme gereksinimleri azalabilir.
- Aşılama basamakları gereksizdir, genelde sporlarla yapılan ekim yeterli olmaktadır.
- Küçük hacimli suyla fermentasyon kepeğinden nispeten konsantre enzim çözeltileri elde edilebilir.

Katı substrat fermentasyonu ile enzim üretiminin dezavantajları ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- Düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen organizmalar veya mantarlarla sınırlıdır.
- Proses parametrelerinin ölçümü kültürün homojen olmamasından dolayı güçtür.
- Sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi fermentasyon parametrelerinin kontrolü güçtür.
- Substratların çoğu ön işlemler, özel ekipmanlar ve çok fazla el emeği gerektirmektedir.

Enzimlerin mikrobiyal yolla üretimlerinin yanı sıra ortamdan izole edilmeleri oldukça pahalı işlemler gerektirir. Bu nedenle bazı proseslerde eğer enzim çözeltileri daha az saflık derecelerinde kullanılabiliyorsa işlemleri kolaylaştırmak ve maliyeti düşürmek amacıyla saflaştırma işlemlerine geçilmeden kullanılabilir.

2.2.1.2. Katı substrat fermentasyonunun uygulamaları

Katı substrat fermentasyonunun ticari olarak çoğu Güney-Doğu Asya, Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, Avrupa ülkelerinde de son on yıl içerisinde yükselen bir ilgi bulunmaktadır. Tablo 2.1.'de KSF'nun farklı ekonomik sektörlerdeki uygulamaları verilmiştir (Raimbault, 1998).

2.2.1.3. Katı substrat fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmalar

Bakteri, maya ve mantarlar katı substratlar üzerinde gelişebilirler. KSF'na en iyi adaptasyon filamentli mantarlarla sağlanır ve araştırmalarda da bu tür mikroorganizmalar daha baskındır. Katı substrat fermentasyonunda kullanılan bazı mikroorganizmalar ve kullanım alanları Tablo 2.2.'de görülmektedir.

Tablo 2.1. Farklı ekonomik sektörlerde KSF'nun temel uygulamaları (Pérez-Guerra vd., 2003).

Sektör	Uygulamalar	Örnekler
Tarım-Gıda Endüstrisi	Tarımsal atıkların biyotransformasyon ile güvenli bertarafı	Yaygın gıda fermantasyonu (Koji vb.), Protein zenginleştirme ve tek hücreli protein üretimi, mantar üretimi
	Gıda katkı maddeleri	Tatlandırıcılar, organik asitler
Çevresel Kontrol	Tehlikeli ürünlerin biyolojik olarak parçalanması	PCBs
	Tarım endüstrisi atıklarının biyolojik deoksidasyonu	Bitki Küspeleri (Şeker pancarı, buğday kepeği vb.)
Endüstriyel Fermantasyon	Enzim üretimi	Amilaz ve türevleri, proteaz, lipaz vb.
	Biyoaktif ürünler	Antibiyotik, hormonlar vb.
	Organik asit üretimi	Sitrik asit, laktik asit vb.
	Organik maddelerden alkol sentezi	Etanol üretimi
	Çok yönlü bileşikler	Pigmentler, biosürfaktanlar, vitaminler

Tablo 2.2. Katı substrat proseslerinde kullanılan temel mikroorganizma grupları (Raimbault, 1998).

Mikroorganizmalar	Kullanılan prosesler
Bakteriler	
<i>Bacillus sp.</i>	Amilaz, Organik maddelerin bozunması
<i>Pseudomonas sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Serratia sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Streptococcus sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Lactobacillus sp.</i>	Gıda, silolama
<i>Clostridium sp.</i>	Gıda, silolama
Mayalar	
<i>Endomicopsis burtonii</i>	Kassava, pirinç
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gıda, Etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, Amilaz
Mantarlar	
<i>Altemaria sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Aspergillus sp.</i>	Organik maddelerin bozunması, Gıda
<i>Fusarium sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Monilia sp.</i>	Organik maddelerin bozunması,
<i>Mucor sp.</i>	Organik maddelerin bozunması, Gıda, Enzim
<i>Rhizopus sp.</i>	Gıda, Enzim, Organik Asitler
<i>Trichoderma sp.</i>	Organik maddelerin biyolojik kontrolü, Biyointekstid
<i>Amylomyces rouxii</i>	Koji, Gıda, Sitrik asit

Bakteriler genellikle silolamada ve bazı yiyecek proseslerinde kullanılır. Mayalar yiyecek, gıda ve etanol üretimi için kullanılabilir. Fizyolojik, enzimolojik ve biyokimyasal özellikleri yönünden KSF proseslerinde kullanılan en önemli mikroorganizma grubu filamentli mantarlardır. Mantarların düşük su aktivitelerinde ve yüksek ozmotik basınç koşullarında iyi

toleransa sahip olması, katı substratların biyodönüşümü için kullanımı yaygınlaştırmaktır (Tanyıldızı, 2005).

2.2.1.4. Katı substrat fermantasyonunda kullanılan substratlar ve özellikleri

Bütün katı substratların ortak özelliği makro moleküler bir yapıya sahip olmalarıdır. Genellikle, KSF substratları tarımsal veya tarımsal artıklarının kompozit ve heterojen yan ürünleridir. Bu substratlar, karbon ve enerji kaynağı içeren (şekerler, yağlar, organik asitler) inert bir madde (şeker kamışı bagası, inert fiberler, reçineler) yapısındadır.

KSF’unda kullanılan substratların tipik özelliği aşağıdaki şekilde sıralanabilirler (Raimbault, 1998).

- Katı substrat mikrobiyal aktivitelere inhibitör olarak etki etmemelidir. Ayrıca selüloz, nişasta, şeker gibi karbonhidratları, peptid, üre, amonyak gibi azot kaynaklarını ve mineral tuzları absorblamamalıdır.
- Birim hacimde büyük yüzey alanına sahip, mikrobiyal büyümeye müsait bir yapıda olmalıdır.
- Substrat, kuru ağırlığa göre bir veya birkaç kat su absorblayabilmeli. Biyokimyasal proseslerin yüksek hızlarına imkan sağlamak için gaz - katı ara yüzeyinde nispeten yüksek su aktivitelerine sahip olmalıdır.
- Nispeten düşük basınç ve fermantasyon karıştırma koşulları altında oksijenle birlikte diğer gazları içeren hava ortamında akabilmelidir.
- Küf, maya ya da bakterilerin, saf ya da karışık kültürlerinin hızlı gelişimi için iyi bir gaz - katı ara yüzeyi sağlamalıdır.
- Katı substrat, fermantasyon proseslerindeki karıştırma sonucu oluşan mekanik bozulmalara dayanıklı olmalıdır.

İşlenmemiş substratları mikroorganizmaların kullanabilmesi için gerekli olan hazırlama ve ön işlem basamakları şu şekilde sıralanabilir,

- Ögütterek ya da keserek boyut küçültme,
- Mikroorganizmaların substratları kullanabilmesini kolaylaştırmak için polimerlerin fiziksel, kimyasal veya enzimatik hidrolizi,
- Mineral çözeltisi içerisine gerekli nütrientlerin (fosfor, azot, tuzlar vb.) ilavesi,
- pH ve nem içeriğinin ayarlanması,
- Makro moleküler yapıların ön parçalanma işlemi için pişirme yada buhar muamelesi ve ana kontaminantların elimine edilmesi.

KSF'ndaki en önemli problem katı substratlarda bulunan yüksek heterojen yapılarıdır. Bu yapı prosesleri bir kategoride toplanmasını zorlaştırır ve modelleme çalışmalarını güçleştirir. Bu heterojenlik bazı problemlere neden olabilmektedir ve bu problemleri şu şekilde sıralayabiliriz;

- Üniform olmayan substrat yapısından dolayı oluşan farklılıklar (Lignoselüloz, pektin, nişasta karışımının farklı bileşimleri),
- Tekrar üretilebilirliği sınırlandıran substrat yığınları arasındaki farklılık,
- Üniform büyümeyi sağlamak için yapılan katı kütlenin karıştırılmasındaki zorluklar.

Katı substratların yapısında bulunan makro moleküler yapılar farklı özellikler göstermektedir. Bunlar;

Lignoselüloz: Hemiselüloz, lignin ve pektin içerisinde selüloz mikroliflerinden oluşur ve bitki hücre duvarlarında bulunur. Her bir bitki değişen oranlarda kimyasal bileşen içerir. Lignoselüloz parçalanmasını sınırlandıran iki temel problem olabilir:

- Selüloz I, II, III, IV olarak bilinen farklı kristal yapılı selüloz vardır. Çeşitli kimyasal ve termal işlemler kristal yapıyı amorf yapıya dönüştürebilir.
- Selülozu parçalamak için endo ve ekzo selülaza ilaveten sellobioz gibi farklı enzimler gerekir.

Lignoselüloz hidrolizi çok kompleks bir prostestir. Etkin bir selüloz hidrolizi selülaz, hemiselülaz ve lignin peroksidaz gibi birkaç enzimin eş zamanlı etkisini gerektirir. Buna rağmen lignoselüloz çok bol ve çok ucuz tekrar elde edilebilen bir malzemedir. Bu yüzden özellikle mantarlarla yapılan çok sayıda çalışmada bu tür substratlar kullanılmaktadır.

Pektin: Pektinler farklı oranda metilasyon ve dallanmaya sahip galakturonik asit polimerleridir. Pektini ekzo ve endo pektinazlar ve dimetilazlar, metanol ve galakturonik aside hidrolizler.

Lignin: Lignoselülozun % 26-29 arasında olan lignin selüloz ve hemiselüloza kuvvetlice bağlıdır. Böylece hidroliz etkilerinden kendilerini saklar ve korur. Lignin parçalanmasını sağlayan temel enzim lignin peroksidazdır. *Phanerochaete chrysosporium* lignin parçalanması için en bilinen mantardır.

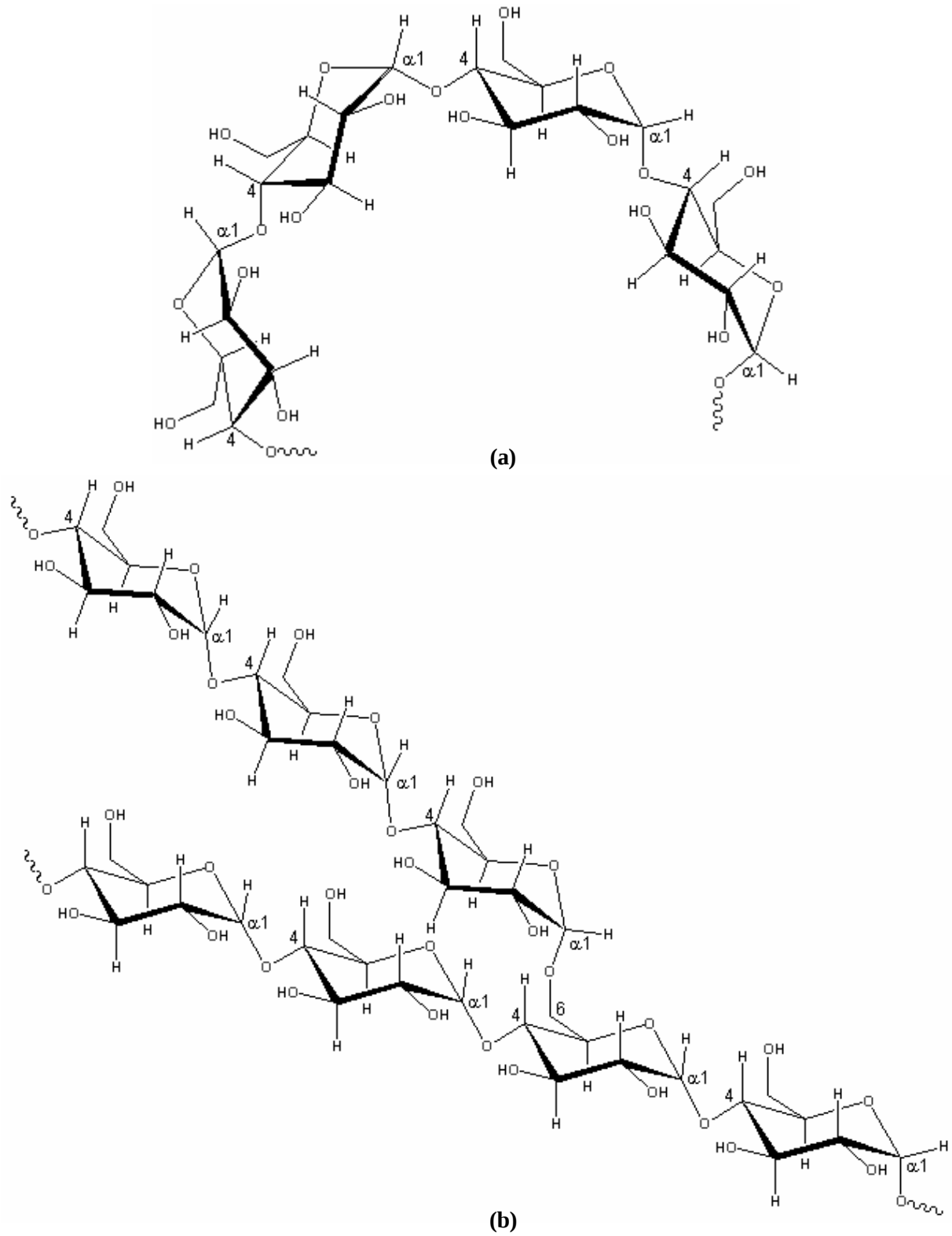
Nişasta: Bir başka çok önemli ve bol miktarda bulunan doğal katı substrat nişastadır. Nişasta içeren ürünlerin doğrudan tüketilmesinin yanında, kimyasal ve enzimatik yolla glikoz, fruktoz şurupları, nişasta ve maltodekstrin türevleri ve siklodekstrinler gibi birçok ürüne de dönüştürülmektedir. Nişasta esaslı ürünler insanlar tarafından tüketilen yiyecekler içerisinde önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Çok sayıda bitki tarafından nişasta üretilmesine rağmen endüstriyel nişasta proseslerinde birkaç bitki önemlidir. Endüstride kullanılan kaynaklar mısır,

patates, tapyoka ve buğdaydır. 1998 yılında Avrupa birliğinde 3.6 milyon ton mısır nişastası, 2 milyon ton buğday nişastası ve 1.8 milyon ton patates nişastası üretilmiştir (Maarel vd., 2002).

Nişastanın kimyasal yapısı lignoselüloz substratlarına göre nispeten daha basittir. Nişasta kaynağına bağlı olarak farklı oranlarda iki yakın yapılı polimerlerden oluşur. Bunlar amiloz (% 16-30) ve amilopektin (% 65-85)'dir. Amiloz temelde düz zincirli α -1,4 bağıyla bağlı glikoz polimeridir. Amilopektin dalları α -1,6 bağıyla bağlı çok dallanmış glikoz polimeridir (Şekil 2.3.).

Birçok mikroorganizma nişastayı hidrolizleyebilir. Jelatinleştirmek için büyük miktarlarda enerji gerekir. Bu yüzden ham nişastada (jelatinleştirilmemiş) gelişen mikroorganizmaların kullanılması çekici olmaktadır.

Özellikle mantarlar nişasta içeren KSF prosesleri için uygundur. Nişasta degradasyonunda glukoamilaz, α -amilaz, β -amilaz ve izoamilaz kullanılır. α -Amilaz nişasta molekül büyüklüğünü hızlıca azaltacak şekilde, α -1-4 bağlarını etkileyen bir endo amilazdır. Bunun sonucu olarak nişasta sıvılaşır. Bir ekzo enzim olan glukoamilaz amiloz ve amilopektin zincirlerinden glikoz üretir (Raimbault, 1998).



Şekil 2.3. Nişastanın yapıtaşı amiloz (a) ve amilopektinin (b) yapısı (Tanyıldızı, 2005).

2.3.Daldırmalı fermantasyon yöntemi (Derin kültür fermantasyonu)

Ticari enzimlerin çoğunun üretiminde daldırmalı fermantasyon tercih edilmektedir. Bu sistemlerde prosesin kontrolü ve sterilizasyonu mühendislik açısından daha kolaydır. Daldırmalı fermantasyon sıvı ortamda çözünmüş yada katı süspansiyon halinde nütrientleri kullanarak süspanse haldeki mikroorganizmaların gelişmesiyle oluşur.

En basit daldırma metodu, aşılınmış sıvı kültürünün çalkalanmasıdır. Bunun için dairesel veya yatay hareketler yapan çalkalama makinelerine yerleştirilen erlen mayerler, istenilen hız, süre ve sıcaklık sağlanarak çalkalanır. Fakat daha büyük hacimde çalışılabilmek için fermantörler kullanılır. Fermantörler, fermantasyon teknolojisinde kullanılan özel tepkime kaplarıdır ve bunları aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz;

1. Kesikli çalışan fermantörler,
2. Sürekli karıştırmalı tank fermantörler,
3. Borusal akış fermantörleri,
4. Akışkan yataklı fermantörler

Kullanılan sistemlere göre fermantasyon, kesikli, yarı kesikli ve sürekli fermantasyon olarak üç gruba ayrılır.

Kesikli fermantasyonda, besiyeri başlangıçta fermantöre konularak sterilize edilir. Sonra mikroorganizma ile aşılınarak karıştırılır ve gerekli dönüşüm sağlanıncaya kadar belirli bir süre beklenir. Bir kesikli fermantasyon için gerekli zaman, sağlanacak çalışma koşullarına göre birkaç saatten birkaç haftaya kadar değişebilir. Bu süre boyunca mikrobiyal kirlenmeden sakınılmalı ve kaptaki bileşenler karıştırılıp, sıcaklık kontrolü sağlanmalıdır.

Yarı kesikli fermantasyonda, fermantasyon maksimuma ulaştığı zaman fermantördeki maddenin tamamı boşaltılmaz. Bir kısmı aşılama kültürü olarak fermantörde bırakılır ve bunun üzeri yeni substrat ile doldurulur.

Sürekli fermantasyonda, fermantöre ilave edilen yeni substrat miktarı kadar fermantörden fermante olmuş besin ve üretilen ürün alınır. Bu sistemde yeni substrat mikroorganizmanın eksponansiyel gelişme fazının sona erdiği anda fermantöre verilir ve aynı miktar ürün alınır. Böylece mikroorganizma sürekli maksimum ürün üretebileceği yerde tutulmuş olur.

Mevcut sistemlerin çeşitliliğine rağmen pratikte ticari enzim fermantörleri ağırlıklı olarak 2. türden sürekli karıştırmalı tank fermantörlerinde gerçekleştirilir. Bu yöntemde uygun büyüklükteki (10-15 lt) karıştırmalı bir tanka gerekli bileşimde hazırlanan hammaddeler beslenir. Burada istenen pH değerine ayarlanır ve sürekli HTST (yüksek sıcaklık kısa süreli) sterilizasyon birimi yardımıyla daha önceden buharla sterilize edilmiş fermentöre beslenir. Eğer gerekirse bazı ısı stabil ilaveler, köpük kırıcı maddeler ve viskozite ve çözünürlüğünü

ayarlayan maddeler steril ortama ayrıca ilave edilir (Topal, 1985). Diğer koldan mikroorganizma fermentasyon prosesi üretim tankına gelmeden önce birkaç aşı hazırlama safhasından geçer. Kullanılan tanklar fermentasyon ortamının korozif özelliklerine uygun bir paslanmaz çelikten geniş bir basınç aralığında (tipik olarak vakumdan 20 kPa basıncına kadar) çalışacak şekilde dizayn edilir. Tipik enzim üretim sistemlerinde kullanılan tankların hacmi ise 0.1-250 m³ arasında değişmektedir. Endüstriyel enzimler aerobik mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Bu nedenle fermentasyon ortamına steril hava verilmesi gerekir. Ayrıca oksijenin gaz fazdan sıvı faza transferi için ortamın karıştırılması gerekmektedir. Verilen hava içerisindeki mikrobiyal hücrelerin uzaklaştırılmasında endüstride kullanılan temel iki prosesten birincisi, hidrofobik silikon esaslı membran filtreler kullanarak yapılır, diğeri ise ısıyla ön sterilize edilebilen lifli maddeleri içeren filtreler kullanılarak yapılır (Rehm, 1987).

Sterilize edilen hava fermentasyon ortamına tek veya çok girişli dağıtıcı bir sistem yardımıyla verilir. Karıştırma ise dikey olarak dönen bir shaft üzerine bindirilmiş çok kanatlı disk türbinlerle yapılır.

Aerobik mikrobiyal büyüme ekzotermik bir prosestir ve ısı üretilir. Havalandırma ve karıştırma prosesleriyle ısı dağılımına ilave olarak fermentasyon sıcaklığını 30 – 35 °C’de tutmak için ortamdaki ısı uzaklaştırılmalıdır. Bakteriyel fermentasyonda daha fazla metabolik ısı üretilmektedir ve bu bazı durumlarda diğer organizmalar için olan değerin iki katı olabilir. Büyümenin ve enzim üretiminin kontrol edildiği bir ortamda sürekliliği sağlayabilmek için çeşitli parametreler hem aşı geliştirme, hem de fermentasyonla üretim aşamasında dikkatlice takip edilmelidir. Fermentasyon ortamının sıcaklığını, soğutma suyunun sıcaklığını, sıvı hacmini, karıştırıcı hızını, gücünü veya torkunu, hava ve sıvı besleme hızını kültür ortamındaki köpük varlığı gibi fiziksel parametreleri izlemek için çeşitli cihazlar kullanılır. Fermentasyon analizinde online ve offline ölçümlerden yararlanılır. Online olarak takip edilen parametreler pH, çözünmüş oksijen ve karbondioksit, redoks potansiyeli, fermentörü terk eden gaz içerisindeki oksijen ve karbon dioksit konsantrasyonlarını içerir. Çeşitli anyonlar ve katyonlar (Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, NO₃⁻, Cl⁻) gibi diğer türler iyon seçici elektrotlar kullanılarak ölçülebilir. Ancak bu iyonlar genellikle biomass konsantrasyonu, karbon azot substrat seviyesi ve enzim ürün aktivitesi gibi parametrelerle birlikte offline olarak belirlenirler. Bu parametreler mikrobiyal büyümenin doğrudan ve dolaylı olarak belirlenmesinde kullanılabilir.

2.4. Türkiye’de enzim üretimi

Ülkemizde enzim üretimini gerçekleştiren ORBA A.Ş. adındaki kuruluş orta ölçekli bir işletme olup hiçbir know - how almayıp tümüyle araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucu

tasarlanmış ve faaliyete geçmiştir. Gıda ve tekstil sektörü için amilaz enzimi üretmektedir. Kuruluşta son zamanlarda deri ve deterjan sektörü için alkalen fosfataz üretimini kapsayan bir araştırma projesi tamamlanmış ve bu enzimin üretimine de başlanmıştır (Tüba, 1996).

3. ENZİMLER

Enzimler, ilk defa 1897’da Buncher tarafından canlı hücrelerden ekstrakte edilmiştir. İlk saf enzimin izalasyonu ise 1926’da Sumner tarafından gerçekleştirilmiştir. 1930-1936 yılları arasında pepsin, tripsin ve chymotrypsin Norhtrop tarafından kristal halde izole edilmiştir. Günümüzde binlerce enzim tespit edilmiştir ve bunların çoğu saf halde izole edilebilmektedir (Bahar, 1996).

3.1. Enzim Nedir?

Enzimler doğal katalizörler olarak işlev görerek hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü belirleyen, protein yapısında olan ve bütün canlı organizmalarda bulunan makro moleküllerdir (Kılıç, 2002).

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alırken, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını inanılmaz boyutlarda hızlandırırlar. İşlem sonunda, tepkimeye girdikleri ilk hallerinde tepkimeden çıkarlar. Bu nedenle, her enzim bir biyokatalizördür. Başka bir deyişle, enerji açısından normal koşullarda hiç gerçekleşemeyecek ya da çok yavaş gerçekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip, bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır (Sağıroğlu, 1999).

Kullanım amacına göre enzimler üç gruba ayrılabilirler (Telefoncu, 1986);

1. Endüstriyel Enzimler: Endüstride üretime yönelik çeşitli reaksiyonların katalizlenmesinde kullanılırlar ve saflık dereceleri düşüktür. Bu gruba giren başlıca enzimler ve bunların kullanım alanları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Endüstride kullanılan bazı enzimler ve kullanım alanları (Telefoncu, 1986).

Renin	Peynir Üretimi
Çeşitli Proteazlar	Sindirime Yardımcı
Papain	Et yumuşatma ve birada bulanıklığın giderilmesi
Çeşitli Proteazlar	Dericilik
Amilaz (α ve β)	Nişasta hidrolizi
İnvertaz	Sakarov inversiyonu
Nükleazlar	Lezzet kontrolü
Oksidazlar	Oksidasyonun önlenmesi ve besin maddelerinde renk kontrolü
Laktaz	Laktozun hidrolizi
Selüloz	Selülozun hidrolizi
Katalaz	Soğuk pastörizasyon
Değişik Enzimler	Organik sentezler

2. Analitik Enzimler: Bilimsel araştırmalar için kullanılırlar. Saflık dereceleri endüstriyel enzimlere nazaran daha yüksektir. Bu gruba giren başlıca enzimler; heksokinaz, alkoldehidrojenaz, glukozoksidaz, galaktozoksidaz, kolesteroloksidaz v.b.’dir.
3. Klinik Enzimler: Çeşitli fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılırlar ve saflık dereceleri oldukça yüksektir. Özellikle parenteral yoldan alınan enzimlerde yabancı aktivite hiç istenmez. Bu amaçla kullanılan başlıca enzimler şunlardır; proteaz, lipazlar, asparaginaz, streptokinaz, v.b.’dir.

3.2. Enzimin Yapısı ve Fonksiyonu

Enzimler, molekül ağırlıkları genellikle 6000 ile 600000 dalton arasında değişen uzun aminoasit zincirleridir. Genler tarafından şifrelenen enzimlerin aminoasit dizilimi kendilerine özğüdür. Bu nedenle her enzim farklı üç boyutlu bir yapıya sahiptir (Kılıç, 2002).

Biyolojik sistemlerde meydana gelen reaksiyonlar laboratuvar koşullarında oluşturulmak istendiğinde çok yüksek sıcaklık ve basınç gibi ağır fizikokimyasal işlemlerin uygulanması gerekir. Bu koşullar altında bile reaksiyonların birçoğu izlenemeyecek derecede yavaştır. Karbonhidrat, lipit ve proteinler ancak derişik asit ve bazik çözeltelerde kaynatılarak hidroliz edilebilmesine karşın enzimler yardımıyla sindirim sisteminde çok daha ılımlı koşullarda (örneğin 37 °C’de) hidroliz edilirler (Pekin, 1980).

Böyle bir molekülün kimyasal tepkimelere katılıp onları milyonlarca kez hızlandırabilmesi amino asitlerin kimyasal yapısında gizlidir. Amino asitler bir tane karbon atomuna (C) bağlanmış bir amino grubu (-NH₂), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu (-COOH) ve bir de değişken yan gruptan (-R) oluşurlar. Yirmi amino asidin hepsi de bu temel yapıya sahiptir. Onları farklı yapan tek şey, taşıdıkları yan grupların büyüklük, şekil, elektrik yükü, suya duyulan ilgi ve aktiflik açısından farklı olmalarıdır. İşte enzimi oluşturan bu amino asitler birbirleriyle etkileşerek, zincirin kıvrılıp bükülmesine ve sonuçta da üç boyutlu bir yapı kazanmasına neden olurlar. Ayrıca, bu yapıdaki bazı aminoasitlerin taşıdıkları yan gruplar, enzimin üç boyutlu yapısında bir bölgede toplanarak aktif bölge denen bir alan oluştururlar. Enzimlerin tepkimeleri kataliz etme ve çok seçici olmalarının sırrı bu bölgedir. Bölgenin oluşturduğu boşluğun şekli o kadar özeldir ki, sadece o enzimin katalize edeceği tepkimeye girecek madde, başka bir deyişle enzimin substratı, bu boşluğa girebilir. Bir kez enzimin içine girdikten sonra, substratla enzimin bu aktif bölgesinde bulunan kimyasal gruplar arasında kimyasal etkileşimler meydana gelir.

Sonuçta aktif bölgeye bağlanan substrat, “geçiş durumu yapısı” denen ve normalde çok kararsız olan bir yapıya dönüşür. Daha sonra bu yapı ya ürünü oluşturacak ya da substrata geri dönecektir. İşte enzimin aktif bölgesinde oluşan bu bağlar, kararsız yapıyı kararlı kılmaya yarar

ve böylece, ürünün oluşması için enzime daha fazla zaman tanınmış olur. Normalde kimyasal tepkimenin oluşması için bu geçiş durumu yapısının oluşması, bunun içinse aktivasyon enerjisinin sağlanması gerekir. Katıldıkları tepkimelerde enzimler, aktif bölgelerinin üç boyutlu özel şekilleri sayesinde, bu geçiş durumunun oluşumunu kolaylaştırır ve dolayısıyla gerekli enerjiyi azaltırlar. Böylece tepkimeyi cazip hale getirip, tepkimenin daha az enerjiyle daha çabuk gerçekleşmesini sağlarlar.

Enzimler temel olarak iki kısımdan oluşur;

- 1- Apoenzim: Enzimlerin protein kısmıdır. Bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini belirler.
- 2- Koenzim: Organik ya da inorganik çoğu zaman fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük molekül, enzime katalitik aktivite özelliğini veren kısımdır.

Apoenzim ve koenzim kısımlarının ikisine birden haloenzim adı verilir.

3.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Başlangıçta enzimler gelişmiş güzel bir biçimde adlandırılırlardı. Saf kristal formda elde edilen enzimlerin sayısı arttıkça zamanla adlandırılmada büyük bir kargaşa ortaya çıktı. İlk kez 1961 yılında International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tarafından oluşturulan uluslararası bir komisyon enzimlerin adlandırılmasında göz önüne alınacak kuralları tespit etmekle görevlendirildi. Bu komisyon her enzim için bir tavsiye edilen isim (genellikle kısa ve yaygın olarak kullanılan isim), birde sistematik isim (katalizlenen reaksiyonun tipine uygun) ve sınıflandırılma numarası (uluslararası bilimsel dergilerde ve özetlerde kuşkuyla yer vermeyecek biçimde enzimin tamamlanması için) önermiştir. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında aşağıdaki temel ilkeler göz önüne alınmaktadır.

- a) Bütün enzimler –az son ekini alırlar. Birden fazla enzimden oluşan enzim sistemleri ise -az sistem şeklinde adlandırılırlar (örnek : Piruvat – dehidrogenaz sistemi) .
- b) Enzimler, kendilerince katalizlenen reaksiyona uygun olarak adlandırılırlar ve sınıflandırılırlar. Aynı fonksiyonu gösteren fakat farklı kaynaklardan (mikroorganizma, hayvan, bitki) elde edilen enzimler genellikle aynı adı alırlar.
- c) Birbirinden farklı tipte birden çok reaksiyon adını katalizleyen enzim adlandırılırken katalizlediği ilk reaksiyon adını esas alınır.

Yukarıda belirtildiği gibi her enzimin bir sistematik adı ve dört kısımdan oluşan bir kod numarası vardır. Enzimlerin sistematik isimlendirilmesinde genel olarak şu sıra izlenir; dönüşüme uğratılan substratın adı + katalizlenen reaksiyon tipi + az eki. Sistematik isimler çok uzun olduğundan çoğu kez geleneksel isimler tercih edilmektedir.

Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında uyulacak kuralları tespit etmek üzere oluşturulan uluslararası komisyon katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır (Tanyıldızı, 2005).

Oksidoreduktazlar: Redoks reaksiyonları katalizleyen bu enzimler dehidrogenaz veya reduktaz çerçeve isimleriyle tanınırlar. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidaz adı ile anılırlar. Örnekler: Alkol dehidrogenaz, reduktaz, peroksidaz, glikoz oksidaz, sitokromoksidaz vb.

Transferazlar: Donör (verici) üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcısı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Örnekler: Formil-transferazlar (transaminazlar), fosfotransferazlar (kinazlar), CoA transferazlar v.b

Hidrolazlar: Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, glikozid, peptid, C-N, asitanhidridi, C-C, C-X veya P-N bağlarını parçalarlar. Örnekler: lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar, vb.

Liyazlar: Çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Etkiledikleri substrattan ya bir kimyasal bir grubu ayırır yada ilave ederler. Önemli örnekler: dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar (fumaraz, akonitaz), karboksilazlar, amonyak-liyazlar.

İzomerazlar: Molekül içini yeniden düzenlenmeleri katalize ederler. Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizlerler. Bunlar, molekül içinde oksidoreduksiyonu, grup transferini ve çift bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (intramoleküler liyazlar, intramoleküler transferazlar).

Ligazlar: Enzimin etkilediği iki maddenin birleşmesini katalize ederler. Amino asitleri aktive eden enzimler, piruvat karboksilazlar, açılaz CoA sentazlar.

Her enzimin kod numarası 4 rakam ile tarif edilmektedir. 1. rakam grup no, 2. rakam sınıf no, 3. rakam alt sınıf no, 4. rakam enzim seri numarasını gösterir. Örneğin nişastanın hidrolizinde kullanılan α -amilaz enzimi, 3 (hidrolaz), 2 (glikoz bileşiklerine etki yapan sınıf), 1

(glikozit hidrolaz), 1 (alt sınıftaki enzimlerin arasındaki yeri), 3.2.1.1. rakamları ile tarif edilir (Arslan, 1999).

3.4. Enzim Kaynakları

Doğada bulunan enzim kaynaklarını başlıca 3 grupta toplayabiliriz. Tablo 3.2.'de bazı önemli enzimler, kaynakları ve kaynaklarına göre kullanım alanları görülmektedir. Tablo 3.2.'de de görüldüğü gibi farklı kaynaklardan elde edilen aynı enzimlerin kullanım alanları da farklılıklar göstermektedir.

3.4.1.Hayvansal enzimler

Hayvanlardan sağlanan bazı enzimler özel kullanım alanlarında bazı avantajlar sağlayabilir. Bu enzimler hayvanların atılan veya az değerli olan organlarından elde edilir. Örneğin pankreas çok zengin bir enzim kaynağıdır. Buradaki proteinin % 23 tripsinojen, % 10-14 kimotripsojenden ibarettir. Hazmı kolaylaştıran ve pankreatin olarak isimlendirilen amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimleri içerir.

Rennet olarak bilinen kimosin peynir üretiminde sütün koagülasyonunda kullanılan asit proteazdır. Bu enzim süttten kesilmemiş danaların midesinden elde edilmektedir. Pepsin, proteolitik bir enzim olup domuzların mide mukozasında bulunmaktadır. Sığır karaciğerinden elde edilen katalaz ise bir peroksidaz enzimi olup, organizmada oluşan H_2O_2 'i parçalayarak hücrenin zarar görmesini önler. Domuz pankreasından tripsin, kimotripsin, at karaciğerinden alkoldehidrogenaz üretilmektedir.

3.4.2.Bitkisel enzimler

Bitkiler de birçok enzime kaynak olmuştur. Tropik bölgelerde uzun zamandan beri kullanılan eti yumuşatma etkisine sahip ve çok yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan papaya bitkisi proteaz ailesinden papain enzimi üretimi için yetiştirilmektedir. Ayrıca, fisin enzimi incir ağacı sütünden, bromealin enzimi ananas meyvesinden ve diğer bazı bitkilerin öz suyundan bol miktarda enzim izole edilmektedir. Bu bitkilerin en önemli avantajı içerdikleri öz suların kolaylıkla alınabilmesidir.

3.4.3.Mikrobiyal Enzimler

Mikrobiyal hücreler enzim kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve onlar birçok avantaj sağlarlar. Büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca mikroorganizmaların ikilenme süreleri çok kısa olduğundan üretim prosesleri kolaylıkla pazar

ihtiyaçlarına uyarlanabilir. Kesikli bir fermentasyonda üretim 1,5 ile 10 gün arasında olurken bu daha yüksek organizmalarda 2 ay ile birkaç yıl arasında olmaktadır (Telefoncu, 1986).

Tablo 3.2. Bazı önemli enzimler, kaynakları ve kaynaklarına göre kullanım alanları (www.lsbu.ac.uk).

Enzim ^a	EC numarası ^b	Kaynak	Hücre içi/dışı ^c	Üretim ölçeği ^d	Endüstriyel Kullanımı
Hayvansal Enzimler					
Katalaz	1.11.1.6	Ciğer	I	-	Yiyecek
Kimotripsin	3.4.21.1	Pankreas	E	-	Deri
Lipaz ^e	3.1.1.3	Pankreas	E	-	Yiyecek
Rennet ^f	3.4.23.4	mide	E	+	Peynir
Tripsin	3.4.21.4	Pankreas	E	-	Deri
Bitkisel enzimler					
Aktinitin	3.4.22.14	Kivi suyu	E	-	Yiyecek
α-Amilaz	3.2.1.1	Malt arpa	E	+++	İki
β-Amilaz	3.2.1.2	Malt arpa	E	+++	İki
Bromealin	3.4.22.4	Ananas özsuğu	E	-	İki
β-Glukanaz ^g	3.2.1.6	arpa	E	++	İki
Fisin	3.4.22.3	İncir özsuğu	E	-	Yiyecek
Lipoksigenaz	1.13.11.12	Soya fasulyesi	I	-	Yiyecek
Papain	3.4.22.2	Papaya özsuğu	E	++	Et
Bakteriyel enzimler					
α-Amilaz	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	E	+++	Nişasta
β-Amilaz	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	E	+	Nişasta
Asparaginaz	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	I	-	Sağlık
Glikoz izomeraz ^h	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	I	++	Fruktoz şurubu
Penisilin amidaz	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	-	Farmakoloji
Proteaz ⁱ	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	E	+++	Deterjan
Pullulanaz ^j	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	E	-	Nişasta
Mantar Enzimleri					
α-Amilaz	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	E	++	Pişirme
Aminoasilaz	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	I	-	Farmakoloji
Glukoamilaz ^k	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	E	+++	Nişasta
Katalaz	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	I	-	Yiyecek
Selulaz	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	E	-	Atık
Dekstranaz	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	E	-	Yiyecek
Glikoz oksidaz	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	I	-	Yiyecek
Laktaz ^l	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	E	-	Süt
Lipaz ^e	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	E	-	Yiyecek
Rennet ^m	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	E	++	Peynir
Pektinaz ⁿ	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	E	++	İecekler
Proteaz ^m	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	E	+	Pişirme
Rafinaz ^o	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	-	Yiyecek
Maya enzimleri					
İnvertaz ^p	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	I/E	-	Tatlıcılık
Laktaz ^l	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	-	Süt
Lipaz ^e	3.1.1.3	<i>Candida</i>	E	-	Yiyecek

^a Verilen isimler yaygın olarak kullanılanlardır. Endüstriyel enzimlerin çoğu enzim karşımlarından oluştuğundan dolayı, bu isimler esas bileşenin standart isimlerinden ayrılabilir. Uygun yerlerde bu ana komponentin standart isimleri aşağıda verilmiştir.; ^b temel komponentin EC numarası;

^c I-H. içi enzim; E-H. dışı enzim; ^d +++ > 100 ton yıl⁻¹; ++ > 10 ton yıl⁻¹; + > 1 ton yıl⁻¹; - < 1 ton yıl⁻¹.

^e triasilgliserol lipaz ⁱ subtilisin ^m mikrobiyal aspartik proteinaz

^f chymosin ^j α-dekstrin endo-1,6-α-glukosidaz ⁿ poligalakturonaz

^g Endo-1,3-4β-glukanaz ^k glukon 1,4-α-glukosidaz ^o α-galaktosidaz

^h ksiloz izomeraz ^l β-galaktosidaz ^p β-fruktofuranosidaz

Hayvansal ve bitkisel kaynakların bazı temel dezavantajları vardır. Enzim ekstraksiyonunda kullanılan hayvansal dokular sınırlıdır ve taleplerin ani olarak değişmesine cevap veremez. Ayrıca gerekli olan işçilik daha fazladır. Bitkisel kaynaklı enzimlerde ise kaynaklar sezona ve iklimlere bağlı olarak değişmektedir (Rehm, 1987).

3.4.3.Enzim kaynaklarının karşılaştırılması

Ayrıca mikrobiyal hücrelerin dışında hayvan ve bitki hücreleri de laboratuvar ölçeğinde bazı özel enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ancak bu endüstriyel ölçekte başarılı olma ihtimali azdır. Bitki hücreleri mikrobiyal hücrelerden çok daha yavaş olarak büyümektedirler. Bu durumda kültür ortamının kontaminasyon şansı artmaktadır. Hayvan hücreleri ise aşırı narindirler, onların hayatta kalabildiği büyük ölçekli fermantasyon tanklarının dizaynı henüz mümkün değildir. Yapılan araştırmalara göre bitki ve hayvan hücrelerinden elde edilen üretimini devam ettirebilmek mikrobiyal fermantasyonla elde edilen enzim maliyetinden 1000 kat daha fazla maliyet gerektirmektedir.

Enzim üretiminde kullanılan kaynaklar değerlendirildiğinde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin teknolojik ve ekonomik yönden hayvansal ve bitkisel hücrelerden elde edilenlere göre daha avantajlı olduğu belirtilmiştir (Topal, 1985).

Fermantasyon prosesinin esnekliği ve çok yönlülüğü sütü koagüle eden renin enziminin üretiminde görülmüştür. Bu amaçla buzağı midelerinden renin ve proteinaz içeren enzimler ekstrakte edilmektedir. 1950'lerde daha az sayıda kesim yapılmakla beraber daha fazla peynir yapılmaya başlanmış ve peynir mayası kıtlığı görülmüştür. Bunun üzerine mikrobiyal substituentini bulmak amacıyla 921 mikrobiyal tür test edilip ve *Endothia Parasitica* küfünün enzimi ürettiği belirlenmiştir. Başka bir tarama sonucunda *Mucor pusillus* mikroorganizması bulunmuştur. Halen sütü koagüle eden enzimler fermantasyonla üretilenler ve domuz ile sığır pepsini içeren buzağı reneti karışımıyla ticari bir yarış halindedir.

Bir fermantasyon işletmesi talebin seviyesine göre uygun ölçekte dizayn edilebilir. Bu işletmeler çeşitli ürünler için kullanılabilir ve taleplerin değişmesiyle başka ürünler üretilir. 1970'lerin başında temizlikte kullanılan proteinaza olan talep aniden düşüp ve aynı zamanlarda nişasta proseslerinde kullanılan enzime olan talep artmıştır. Böylece proteinaz üretiminde kullanılan işletmeler amiloglikosidaz üretecek şekilde düzenlenmiştir.

Benzer reaksiyonları katalizleyen farklı kaynaklardan elde edilen enzimler genellikle farklı özellikler gösterirler. Bu farklılıktan dolayı bazı kaynaklar tercih edilebilir. Örneğin, tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde 3 tip α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Bunlar pankreas, bakteri ve malttan elde edilen amilazlardır. Tablo 3.3.'den yararlanarak bakteriyel kaynaklı enzimlerin kullanılma nedenlerini şöyle açıklayabiliriz (Sarıkaya, 1995);

- Isıya dayanıklı olmaları,
- Geniş bir pH aralığında çalışmaları,
- Haşıl alma işlemini kısa sürede tamamlayabilmeleridir.

Tablo 3.3. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar.

α -Amilazın cinsi	En uygun pH	En uygun sıc.	Etkili olduğu pH	Etkili olduğu sıc.
Pankreas	6.8	50-55	4.5-9.0	60-65
Malt	4.6-5.2	60-65	2.1-8.1	85
Bakteri	5.4-7.0	60-65	2.0-9.0	90 ve üstü

4. MİKROBİYAL ENZİM ÜRETİMİ

Enerji bakımından zengin organik maddelerin, mikroorganizmalar tarafından enzimatik yolla başlangıç substratına göre enerji içeriği fakir organik maddelere parçalanmaları “Fermantasyon” olarak adlandırılır. Tipik bir fermantasyon prosesinde kullanılan substratlar Tablo 4.1.’de verilmiştir. Burada açığa çıkan enerji miktarı tam oksidasyonun 1/3’ü kadardır. Enerjinin geri kalan kısmı, son ve ara ürünlerin bünyesinde tutulmaktadır.

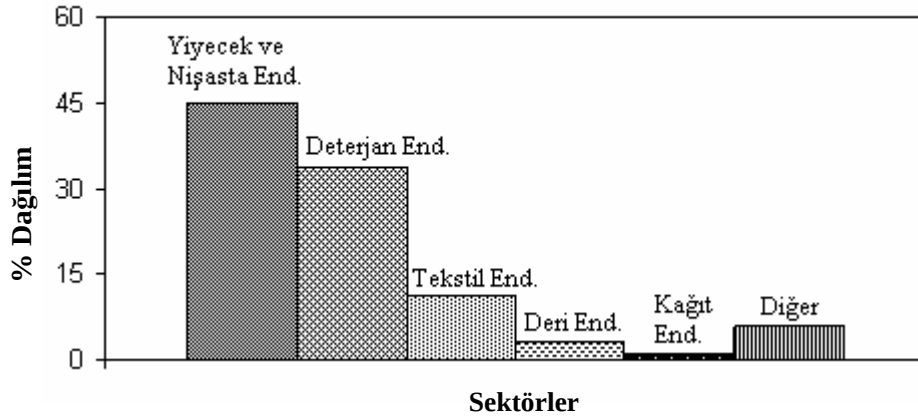
Fermantasyon ile ürün üretiminde ürün kalitesinin aynı tutulabilmesi üretim mikroorganizması türünün genetik stabilizesinin korunmasından daha zordur. Bu sebeple prosesin sıkı kontrol altında tutulması gerekir.

Enzim hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte mikrobiyal yolla enzim üretimi daha yakın bir geçmişte önem kazanmıştır. Bu yolla üretilen fungal enzimlerin ilk defa ticari kullanımlarının 20. yüzyılın başlarında, bakteriyel enzimlerin kullanımının ise I. Dünya savaşı sırasında başladığı bildirilmektedir (Topal, 1985; Radley, 1976).

Fermantasyonla elde edilen enzimler yaklaşık olarak toplam üretimin % 80’nini oluşturmaktadır. Fermantasyon dışı üretilen enzimler sığır reneti, arpa β -amilazı, pankreatik proteinaz ve küçük hacimlerde üretilen eczacılık ve analitik enzimler oluşturmaktadır. Enzim pazarında en büyük oran deterjanlarda kullanılan alkalın proteazdır. Hidrolitik enzimler toplam enzim pazarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Hidrolitik olmayan enzimler içerisinde en büyük oran % 6 ile glikozizomeraza aittir. Toplam üretilen enzim miktarını ve maliyetini belirlemek güçtür. Çünkü üretimin önemli bir kısmı küçük ölçekli olarak yapılabilmektedir. Özellikle kendi amilolitik glikoizomeraz enzimini üreten nişasta işleyen işletmeler ve sentetik penisilin yapımı için kendi penisilin asilazını yapan antibiyotik üreticileri vardır. Enzim üretimi son 15 yılda 5 kat artmıştır. Şekil 4.1.’de 2000 yılında 3.5 milyar dolar olan endüstriyel enzim pazarındaki endüstrilerin oranları verilmiştir (Saha, 2000).

Tablo 4.1. Fermantasyon için gerekli hammaddeler.

C- içeren saf substratlar	Karbonhidratlar, Hidrokarbonlar, Alkoller, CO ₂
Kompleks Substratlar	Melas, Selüloz içeren atık sular, Ksiloz çözeltisi (odunun şekerleştirilmesinden), Hayvan yemi (pancar küspesi gibi), Mandıra atıkları, Maya ekstraktı, Soya unu, Protein hidrozilatı
N- Kaynaklar	NH ₃ , Nitrat, Üre, Amino Asitler, Soya
Elementler	Fosfat, Sülfat, Klorür, K, Na, Mg, Ca, Fe, Ca, Zn



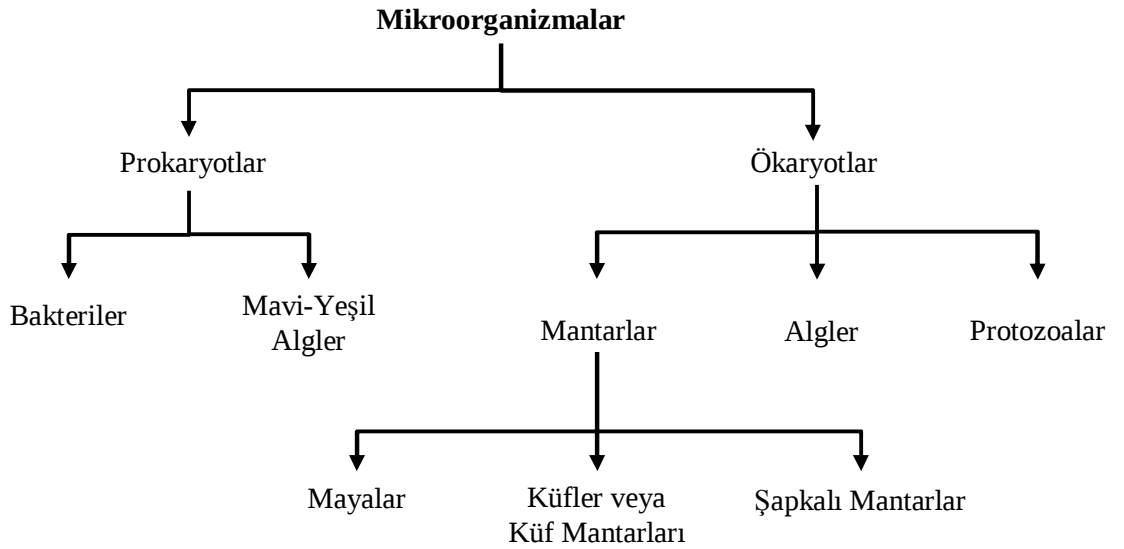
Şekil.4.1. Endüstriyel enzimlerin dünya pazarındaki sektörlere göre yüzde dağılımı (Saha, 2000).

4.1. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermantasyon işleminde ve atık suların arıtılmasında rol oynayan mikroorganizmalar Şekil 4.2.'ye göre sınıflandırılabilir.

4.1.1. Bakteriler

Bakteriler, prokaryotlar sınıfından olup boyutları genel olarak 0.5 - 20 μ uzunluk ve 0.2 - 4 μ çapındadır. Prokaryotik bir yapı gösterdiğinden ökaryotik hücrelerden farklı olarak çekirdeklerinin çevresinde zar bulunmamaktadır. İnce iplikli zar görünümünde olan çekirdeği doğrudan doğruya stoplazma ile sınırlandırılmıştır.



Şekil 4.2. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması (Bulut, 2001).

Çok ilkel bir mikroskop kullanarak çalışmış olan Antony Van Leeuwenhoek'dan beri bakteriler görünüm bakımından yuvarlak şekilli, çomakçık ve sarmal şeklinde olmak üzere üç esas grupta incelenmiştir. Işık mikroskoplarının gelişmesi, karanlık alan, ultraviyole, faz mikroskopisi ve elektron mikroskoplarının ortaya çıkması ile bile görünüm bakımından yapılmış olan bu gruplama önemini kaybetmemiştir.

1. Yuvarlağımsı Bakteriler (Koklar); Uygun ortamda üretilmiş yeni kültürlerinde koklar, ortalama 0.8 – 1.5 μm boyunda ve yuvarlak şekilli bakterilerdir. Bazı koklar normal olarak kahve çekirdeği veya hafif oval görünüm verirler. Üreme anında birbirinden ayrılmayarak yanyana kalan kok şeklindeki bakteriler bu halleri ile gösterdikleri şekillere göre şu şekilde adlandırılırlar.

- Diplokoklar
- Streptokok biçimi
- Stafilokok biçimi

2. Çomağımsı Bakteriler; sert veya esnek çeperli, düzenli veya düzensiz çomakçık veya silindir şeklinde olan bakterilere basil denir. Basiller görünüm özelliklerine ve bulundukları ortamın çeşitli etkilerine bağlı olarak değişik görünümde bulunabilirler. Genel olarak 0.5 – 20 μ uzunluk ve 0.5 – 4 μ genişlikte dirler.

3. Çok kıvrıma sahip halde bulunabilirler. Bunları iki gruba ayırmak mümkündür.

Birinci grupta vücutları bükülebilen ve kıvrılarak yılanımsı hareket edenler bulunmaktadır. Sarmal biçimindeki bakteriler; bu bakteriler bazen yalnız bir kıvrımlı bazen de 15'den büyük olabilirler bunlara Spiroketler denir. İkinci grupta ise sert vücutlu kıvrılamayan sarmal şeklindeki bakteriler bulunmaktadır ki bunlara da Spiriller denir. Yaklaşık olarak 10 μ uzunluk ve 0.5 μ genişlik gösterirler.

Birçok bakteri üretildikleri ortamdaki besin maddelerinden faydalanmak için ekstrasellüler enzim salgırlarlar. Çoğunu hidrolaz ve proteazların oluşturduğu bu enzimler besi yerinde bulunan substratı bakterinin kullanacağı forma katalizlerler (Tolan, 1997). *Bacillus*'un farklı türleriyle hücre dışı enzim üretimi endüstriyel ölçüde oldukça önemlidir (Andersson vd., 1988). Endüstride, geniş kullanım alanı bulan 10'dan fazla mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsinin türleri ve alt türleri tarafından sentezlendiği görülmüştür. Ayrıca bu bakteri türlerinin kemoorganotrof olması, kültüre alınabilmesi ve yapılarında heterojenlik olmaması nedeniyle ilgili endüstride tercih edilmektedir. Yapılan araştırmalar *Bacillus*'un türlerinin diğer bakteriyel kaynaklara göre daha fazla amilaz sentezlediği saptanmıştır (Priest, 1977; Ülger, 1997).

- ***Bacillus amyloliquefaciens***

Bacillus amyloliquefaciens, çoğunlukla α -amilaz ve proteaz üretiminde kullanılan bir mikroorganizmadır. Toprakta izole edilmiştir. *B. subtilis*'e benzemesinden dolayı uzun süre '*Bacillus subtilis subs. Amyloliquefaciens*' şeklinde bir alt tür olarak görülmüştür. *B. amyloliquefaciens* fenotipik olarak *B. subtilis*'e çok benzediği için sadece temel klasik testlerle bu mikroorganizmaları ayırmak mümkün değildir.

Gram (+) ve çubuk şeklindedir. Enleri 0.7 – 0.9 μm , boyları 1.8 – 3.0 μm dir. Hücreler zincirler şeklindedir. Pertirış flagellerle hareket edebilirler. Kabartı meydana getirmeyen sporları 0.6 – 0.8 μm ile 1.0 - 1.4 μm boyutlarında, oval, sentral veya parasentraldir. Üreme için en uygun sıcaklık 30 – 40 °C'dir. 15 °C'nin altında ve 50 °C'nin üzerinde üreme görülmez (Ülger, 1997).

5. AMİLAZLAR

Amilazlar nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize ederek, glikoz ünitelerinden meydana gelen daha küçük polimerler ve dekstrinler gibi ürünleri oluşturan hücre dışı enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı asıl kaynağı mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Fogarty, 1983).

Amilaz üretiminde en önemli faktör uygun mikroorganizmanın seçimidir. α -Amilaz kabul edilebilir sınırlar içerisinde birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. candidus* gibi bazı funguslar, *Pseudomonas saccharophila*, *Clostridium* bazı türleri ve en önemlisi de doğada geniş bir yayılış alanına sahip olan bazı *Bacillus* türü bakteriler α -amilaz üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel α -amilazlardan daha az stabil olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağı daha çok bakterilerdir. Bu amaçla genellikle *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. Bu cinsin özellikle 8 tanesinin sentezlediği α -amilaz enzimi çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. caldolyticus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus* ve *B. amylosaccharitucus*'dur. *Bacillus* türlerinden sentezlenen α -amilaz enzimi ekstraselüler bir enzimdir (Priest, 1977; Sarıkaya, 1995; Pandey, 2000).

Amilaz enziminin buğday nişastasını üzerinde parçalayıcı bir etkisinin olduğu, 1811 yılında Kirchhoff tarafından henüz daha ne olduğu bile anlaşılmadan tanımlanmıştır. Benzer bir etkinin insan tükürüğü ile de elde edilebileceği Leuchs tarafından 1831 yılında gösterilmiştir. Bernfeld (1951) tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğini, 1833'de Payen ve Persoz'un ise maltta nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. 1895'de Beijerinck'in önerisinden bu yana tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak adlandırılmıştır. Bu terim sadece hidrolitik enzimler için kullanılmıştır. Meyer ve arkadaşları domuz pankreasından α -amilaz enzimini saflaştırıp tanımlamışlardır (Greenwood, 1970).

α -Amilazlar, aktiviteleri için herhangi bir koenzim gereksinim olmayan ve kalsiyum taşıyan metalo proteinlerdir. Kalsiyum, enzim substrat ikilisinin oluşumuna katılmaz, fakat enzimi maksimum dayanıklılık ve yüksek aktivite için doğru konformasyonda tutar (Greenwood, 1970). Divalent metal iyonları proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarını korur ve dayanıklılaştırır. Protein molekülü uygun bir divalent metal iyonu ile bağlı olduğu sürece preteolitik aktiviteye karşı korunur. α -amilaz, bir divalent metal iyonu olan Ca^{++} ile birleştiği zaman proteazlara karşı maksimum direnç gösterir. Ca^{++} uzaklaştırıldığında preteolitik atağa

duyarlı olurlar. Bundan dolayı, kalsiyumun α -amilaz üzerinde hem koruyucu etkiye sahip olacağı hem de kofaktör olarak işlev görebileceği düşünülmüştür. Saflaştırılmış α -amilazda proteinin her bir molünde 1 atom gram Ca^{++} 'a rastlanmıştır. Ayrıca Ca^{++} iyonları α -amilazı, yüksek ısılarla maruz kaldığı zaman, inaktivasyondan korur (Larabeke vd., 1974; Srivastana, 1987).

Farklı *Bacillus* türlerinden hatta aynı türden elde edilen α -amilaz enzimlerinin farklı molekül ağırlığına sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir. Borgia ve Cambell (1978) *B. amyloliquefaciens*'in 5 farklı suşundan elde ettikleri α -amilaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının 49.000 dalton olduğunu, buna karşın Kochhar ve Dua (1990) *B. amyloliquefaciens* α -amilaz enziminin molekül ağırlığının 68.000 dalton olduğunu belirtmişlerdir (Sarıkaya, 1995).

Ortamda protein, peptid, pepton gibi organik maddelerin varlığında, bakterinin bunları kaynak olarak kullanıp ekzoenzim sentezini arttırdığı saptanmıştır. Farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak üretilen bakterilerde α -amilaz üretimi ile üreyen bakteri miktarı arasında bir orantı olmadığı belirtilmektedir. Karbon kaynağı olarak nişasta kullanılmasının, şekerlere oranla daha yüksek amilaz üretimini gerçekleştirdiği, azot kaynağı olarak da organik azot kaynaklarının amilaz üretimini arttırdığı, inorganik kaynaklarının kullanımının ise amilaz üretimini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Tolan, 1997).

5.1. Amilazların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizması

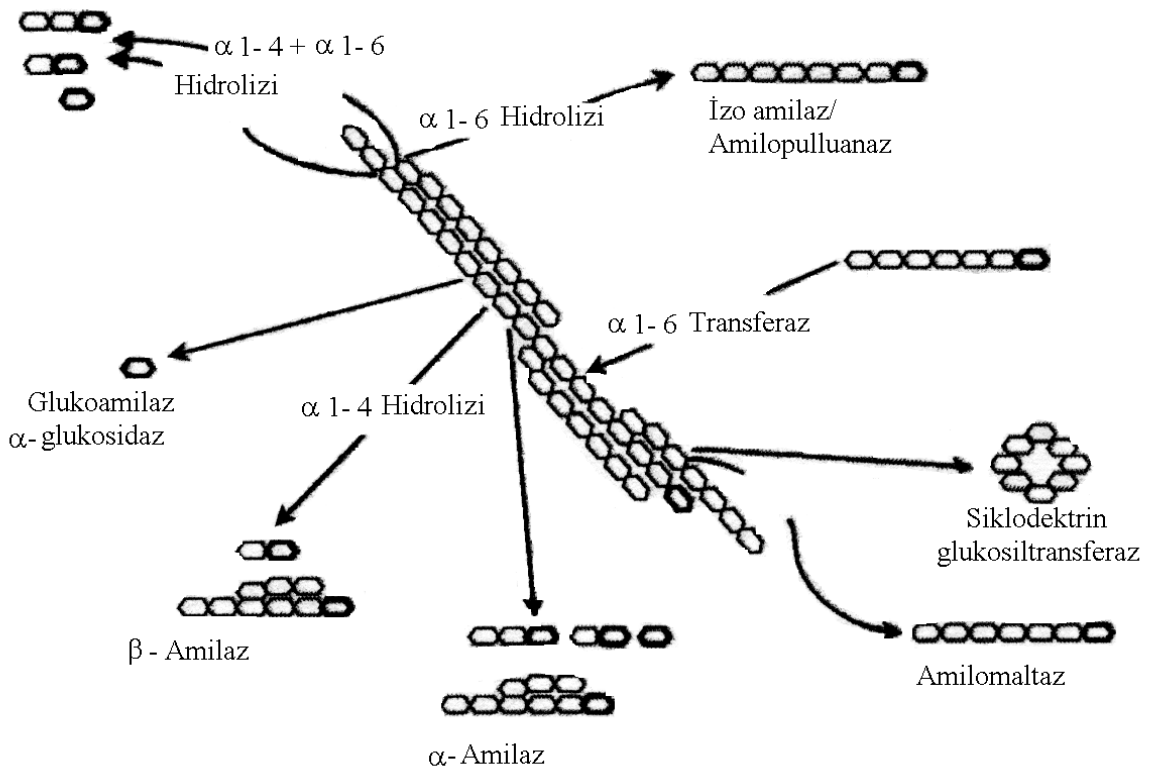
1930 yılında Ohlsson'un malttan elde ettiği nişasta parçalayıcı enzimler, parçalama ürünlerinin anomerik tiplerine göre α -(alfa) ya da β -(beta) amilazlar olarak adlandırılmıştır. Mybrach ve Neamuler (1950) ise amilazlar için endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere başka bir adlandırma sistemi önermişlerdir. Amilazlar; amiloz, amilopektin ve glikojen gibi polisakkaritlerde ve bunların yıkım ürünlerinde yer alan α -1-4-glikozitik bağlarını katalizler. Bir endo amilaz olan α -amilaz polisakkaritlerdeki α -1-4 bağına gelişi güzel kırar. Amilopektin ve glikojenin dallanma noktalarındaki α -(1→6) bağlarına etki etmezler (Windish ve Mhatre, 1965). Birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen α -amilazın etki mekanizması ve özellikleri enzimin kaynağına göre farklıdır. α -Amilaz tarafından amilozun hidroliziyle maltotrioz ve maltoz oluşur. Bunu takip eden ikinci reaksiyon ise, küçük bir molekül olan maltotriozun hidrolizidir. Amilopektinin hidrolizi ise bir dizi dallı α -limit dekstrinlere ilave olarak glikoz ve maltoz gibi ürünler verir (Fogarty, 1983).

Ekzoamilazlar ise polisakkaritlerin indirgen olmayan uçlarına atak yaparak amiloz molekülünü son ürün olan glikoz veya maltozu meydana getirmek üzere hidrolize ederler (Şekil

5.1). Son ürün glikoz ise, enzim glukoamilaz olarak, son ürün maltoz ise enzim β -amilaz olarak adlandırılmaktadır (Lehniger, 1987).

Bugün amilazlar nişastaya etki mekanizmaları ve oluşturdıkları ürünlere bağlı olarak α -, β - ve amiloglukosidazlar olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır. Diğer yandan Milletlerarası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan enzim sınıflandırılmasında tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 sınıfa ayrılmışlar ve amilazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmişlerdir (Sarıkaya, 1995).

Bakteriyel α -amilaz kullanımındaki artıştan dolayı endüstriyel kullanımına daha uygun karakteristiklerdeki enzim üretimi ve daha yüksek üretim sağlayan suşların elde edilmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmalardan, onları üreten mikroorganizmanın çeşitliliği kadar alfa amilaz karakteristiklerinin de farklı olduğu görülmüştür (Tablo 5.1). Amilazlar ayrıca termofilik, asidik ve alkalın amilazlar olmak üzere 3 grup halinde incelenebilir (Ingle ve Erickson, 1978).



Şekil 5.1. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler (Maareal vd., 2002).

5.1.1. Termofilik amilazlar

Pratikte çoğu bakteriyel α -amilazlar nispeten yüksek sıcaklıkta (80–90 °C) kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli mikroorganizmalardan alternatif enzimlerin izolasyonu ve bu enzimlerin termofilik özelliklerin geliştirilmesiyle ilgilenilmektedir. Ayrıca *Bacillus* türü amilazların, ısıya karşı dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bu termostabil özelliğin, kofaktörden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu mikroorganizmalar ve enzimlerini karakteristikleri Tablo 5.1’de özetlenmiştir (Schaiffer, 1969).

Termofilik mikroorganizmaların termofilik enzimler üreteceği muhtemel görünmesine rağmen, ekstraselüler α -amilaz ile mikroorganizmanın termofilik özelliği arasında zorunlu bir ilişki yoktur. Örneğin *Thermonopora curvata*’dan üretilen enzim optimum 65 °C’de, *B. acidocaldarius* elde edilen enzim 60 - 63 °C’de optimum olmasına rağmen genellikle termofil olmadığı düşünülen *Bacillus licheniformis*’den üretilen α -amilaz 76 °C’de optimum olmaktadır. Belli bir trend olmasına rağmen organizmalardan elde edilen ekstraselüler enzimlerin yapısı hakkında genel bir sonuç çıkarmak için bir çok kısıtlamalar vardır.

Tablo 5.1 α -Amilaz kaynakları ve aktivite için optimum değerleri (Ingle and Erickson, 1978).

Suş	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	Tip
Asidik α-Amilazlar			
<i>B. acidocaldarius</i> 104-1A	4.5	60-63	Endo-amilaz
<i>B. acidocaldarius</i> Agnano 101	3.5	75	Endo-amilaz
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	4.0	50	Tanımlanmamış
Termostabil α-Amilazlar			
<i>Thermomonospora curvata</i>	5.5-6.0	65	Maltotetroz ve maltopentoz karışık formunu üretir.
Thermophile V-2	6.0-7.2	70 °C’de optimum 80 °C’de 2 saat kararlı.	Açık değil fakat başlangıçta glikoz ve maltoz üretmiyor
<i>B. stearothermophilus</i>	5.0-6.0	70 °C’de optimum aktivite, enzim izolasyonu ve büyüme sıcaklığına göre değişir.	α -Amilaz I-II farklı optimum sıcaklıklar
<i>B. licheniformis</i>	5.0-8.0	76 °C’de optimum aktivite, 90 °C’de maksimum aktivitenin yarısı	İlk reaksiyon ürünlerinde yüksek moleküllü oligosakkaritlerin baskınlığı
Alkalın α-Amilazlar			
<i>Bacillus alkophilus</i>	9.2	51	Endo amilaz
<i>Bacillus</i> No.A-40-2	10.5	50-55	EDTA dan etkilenmez
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	8.0	40 °C üzerinde inaktive	Sakkarifikasyon, EDTA dan etkilenmez

5.1.2. Alkalın amilazlar

Yüksek pH'da aktivite gösteren enzimlerin araştırılması deterjanlarda enzimlerin kullanılması ile başlamıştır. Sonradan çok sayıda patentler ve yayınlar görülmüştür. Robyt ve Ackerman (1971) *Psuedomonas stutzeri*'den elde edilen amilazın optimum pH'sını 8 olarak tanımlamıştır. Bazı *Bacillus* türlerinin 10 veya daha yüksek pH'larda optimum olan alkalın amilazlar ürettiği belirtilmiştir.

Boyer ve Ingle (1972) optimum pH değeri 9.2 ve optimum sıcaklığı 50 °C olan amilazı *B. alkalophilic*'den elde edilmiştir. Enzim bir endo amilazdır ve şelatlayıcı maddelere karşı duyarlı değildir. Şelatlayıcı maddelere duyarlı olmaması tripolifosfat içeren deterjanlarda kullanımı için temel avantajı olarak düşünülür.

Yamamoto ve Umeki (1972) alkalofik bakterilerde bulunabilen α -amilazın çok geniş bir aralığa sahip olduğunu gösterdi. İzole edilen 300 suş arasından 8 suş seçildi. Optimum amilaz aktivitesi için pH değerinin 4 - 11 aralığında değiştiğini gösterdi.

Termofilik mikroorganizmalar ve enzimlerden farklı olarak alkalofilik bakterilerin tümü alkalofilik ekstraselüler enzimler üretir.

5.1.3. Asidik amilazlar

pH 4-5 civarında yüksek aktivite veren amilazlar, asidofilik amilazlardır. Endüstriyel proseslerin bazıları pH 4-5 aralığında dekstroz üretimi ile ilgilendiğinden dolayı, asidofilik sıvılaştırıcı amilazla bir avantaj sağlanabilir. Enzimlerin bu türleri hakkında çok az bilgi bulunmasına rağmen, bunların varlığı nişasta proseslerinde potansiyel bir gelişme olarak görülmektedir. *B. acidocadarius* ile katı ortamda nişasta hidrolizinin gözlemleri alfa amilaz karakterleri üzerine çalışmalara yol açmıştır. Bu enzim katı kültürden izole edilip karakterize edilmiştir (Ingle and Erickson, 1978).

5.2. Amilazların Endüstriyel Kullanımları

α -Amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşıl alma işlemi için *A. oryzae* kültüründen α -amilaz enzimi üretilmiştir. 1908 ve 1915'de Boiden ve Effornt haşıl alma amacıyla bakteriyel amilaz üretim metodu ile ilgili bir patent almışlardır. 1939 yılında *B. subtilis* sp.'den α -amilazın endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda α -amilaz enzimi nişasta işleme endüstrisinde, nişasta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmıştır. 1959'da ise α -amilaz ve amiloglukosidaz kullanılarak nişastadan toz ve kristal dekstroz'un endüstriyel üretimine başlanmıştır (Bernfeld, 1951; Sarıkaya, 1995).

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olup kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşıllama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır.

Gıda endüstrisinde ise nişastanın α -amilaz enzimi tarafından hidrolizi ile açığa çıkan ürünler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmadan önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür. Dekstrinler çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite arttırıcı yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Nişasta dekstrinlere kadar parçalandıktan sonra glukozamilazın ortama ilavesi ile glikoza kadar ayrışmaktadır. Açığa çıkan glikoz ya şurup halinde, ya da kristal toz şeklinde elde edilmektedir. Glikoz şurubuna glikozizomeraz enzimi katılarak yüksek fruktozlu şurup üretimi sağlanmaktadır. Bu ürün yüksek bir tatlılığa sahip olup, meşrubat üretiminde, süt ürünlerinde, ekmekçilik ürünlerinde, konservecilikte, pasta ve şekerleme yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Nişastanın maltoza tam hidrolizi, nişastanın öncelikle α -amilaz tarafından sıvılaştırılıp, daha sonra da ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin ilavesi ile sağlanmaktadır. Açığa çıkan yüksek saflıktaki maltoz reçel, şekerleme, ekmek ve bira üretiminde kullanıldığı gibi, gıdalarda tatlandırıcı ve kaliteyi arttırıcı olarak da kullanılmaktadır. Nişasta hidrolizi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan maltotetroz da nem tutucu özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Bira üretimi sırasında arpadaki nişastanın parçalanması için de α -amilaz enzimi kullanılmakta ve bu sırada fermente edilebilir şekerler açığa çıkmaktadır (Wiseman, 1987).

α -amilaz enzimi alkol üretiminde de kullanılmaktadır. Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller α -amilaz ve amiloglukosidaz enzimleri ile muamele edilmektedir. Nişasta yeterince parçalandıktan sonra ortama maya aşılansarak fermentasyon işlemine geçilmektedir. Fırıncılıkta, hamurun yapısını iyileştirmesinden ve ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır.

α -Amilazlar meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulmakta, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyvelerin nişasta içeriği meyve suyunda bulanıklığa yol açmaktadır. Bu sorun ortama α -amilaz ilavesiyle çözülmektedir.

α -Amilazın giderek artan bir kullanım alanı da çamaşır ve bulaşık deterjanlarıdır. Tüketiciler arasındaki modern eğilim bulaşık ve çamaşır makinelerini daha düşük sıcaklıklarda kullanmaktır. Bu düşük sıcaklıklarda elbiselerden ve bulaşıklardan nişastayı uzaklaştırmak

problem olmaktadır. α -amilaz içeren deterjanlar uygun sıcaklık ve pH da bu problemi çözmeye yardımcı olmaktadır. Hayvan yemlerinde sindirimi kolaylaştırmak amacıyla da α -amilaz enzimi kullanım alanı bulmaktadır (Maarel vd., 2002).

Günümüze kadar gerek ülkemizde ve gerekse dünyada enzimler konusunda ve özellikle amilaz enzimi konusunda üretimi, uygulanması ve niteliklerinin belirlenmesi konusunda pek çok araştırma yapılmıştır. Giderek artan kullanım alanları sayesinde enzim üretiminin yaklaşık % 30'unu amilazlar oluşturmaktadır (Maarel vd., 2002). Tablo 5.2.'te Amilazların uygulama alanları görülmektedir.

5.3. α -Amilaz Üretimi ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Birçok bakteri üretildikleri ortamdaki besin maddelerinden faydalanmak için ekstrasellüler enzim salgırlar. Çoğunu hidrolaz ve proteazların oluşturduğu bu enzimler besi yerinde bulunan substratı bakterinin kullanacağı forma katalizlerler (Tolan, 1997). Hemen hemen tüm *Bacillus* türü mikroorganizmaların α -amilaz ürettiği ve bu tür mikroorganizmaların enzim endüstrisinde önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Santos vd., 2003; Andersson vd., 1988). Endüstride, geniş kullanım alanı bulan 10'dan fazla mikrobiyal enzimin *Bacillus* türleri ve alt türleri tarafından sentezlendiği görülmektedir. Ayrıca bu bakteri türlerinin kemoorganotrof olması, kültüre alınabilmesi ve yapılarında heterojenlik olmaması nedeniyle ilgili endüstrilerde tercih edilmektedir. Yapılan birçok araştırmada *Bacillus* türlerinin diğer bakteriyel kaynaklara göre daha fazla α -amilaz sentezlediği saptanmıştır (Priest, 1977; Ülger, 1997).

Tablo 5.2. Amilazların uygulama alanları (Atlas, 1994).

Kullanılan Endüstri	Kaynak		Uygulaması
	<i>Bacillus</i>	<i>Apegillus</i>	
Alkol	+	+	Sakkarifikasyon için malt ilavesinden önce nişastanın sıvılaştırılması için
Piştirme maddesi		+	Fermente edilebilir karbonhidratların oranının artırılması
İçki	+		Arpanın hazırlanması, sıvılaştırıcı ilavesi
İçki		+	Hububatların fermentesini kolaylaştırmak, bira özelliklerinin modifikasyonu
Yem	+		Yemlerde arpanın enzimatik olarak işlenmesinin geliştirilmesi
Deterjan	+		Yıkamada temizleme gücünün artırılması
Kağıt	+		Kağıdın yazma kalitesini artırmak için şeker üretmeksizin nişastanın sıvılaştırılması
Tekstil	+		Yüksek sıcaklıklarda sürekli haşılama
Şeker	+		Glikoz, fruktoz ve maltoz üretiminde özsuda bulunan nişastayı parçalayarak filtrasyonu geliştirmek

Enzim üretiminde artış mikroorganizma gelişme şartları ve ortam bileşiminin iyi seçilmesi ile elde edilebilir (Souza vd., 1996). Karbon kaynağı α -amilaz üretiminde önemli bir etkiye sahiptir ve en yaygın kullanılan ise enziminde substratı da olan nişastadır. Bazı karbon kaynaklarıyla α -amilaz üretimi ile hücre büyümesi arasında ters bir ilişki olduğu yapılan çoğu araştırmada belirtilmektedir. Özellikle maltoz, nişasta ve sitrat bu ilişkiyi doğrulamamaktadır. Bu substratların α -amilaz oluşumunu stimule ettiği ifade edilmektedir (Bajpai vd., 1989).

α -amilaz sentezi nişasta ya da düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritler varlığında uyarıldığı birçok çalışmada belirtilmektedir. Nişasta, büyük bir molekül olduğundan hücre içerisine girmesi oldukça güçtür. Bu maddenin nasıl uyarıcı olabileceği konusunda birkaç varsayım ileri sürülmüştür. Bunlardan biri bu molekül için hücre yüzeyinde özgül reseptörlerin bulunduğu olmakla beraber, bu varsayımı destekleyen herhangi bir bulgu mevcut değildir. İkincisi, bu molekülün organizma tarafından yavaş olarak hücre içine alınarak metabolize edilmesidir ancak, bu da kanıtlanamamıştır. Üçüncüsü ise, nişastanın hidroliz ürünlerinin enzim biyosentezinden sorumlu olacağıdır. Üçüncü varsayımı destekleyen birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda substratın parçalanma ürünleri olan maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheptoz ve maltohegzoz gibi maltooligosakkaritlerin hem *B. stearothermophilus* hem de *B. licheniformis* α -amilazının sentezlenmesini indükledikleri saptanmıştır. Buna karşın, *B. amyloliquefaciens*'in α -1,4 bağlı oligosakkaritler yokluğunda da enzim sentezlediği rapor edilmiştir (Sankaya, 1995).

Glikoz ve fruktoz gibi kolay metabolize olan substratların *Bacillus* türü mikroorganizmaların karbonhidratları parçalayan enzimlerin sentezinde, katabolitik represyonun neden olduğu ifade edilmektedir (Lin vd., 1998). Benzer şekilde Kelly vd. (1997) *Bacillus flavothermus* kullanarak α -amilaz üretimini incelediği çalışmada, sakaroz, glikoz ve fruktoz gibi karbon kaynakları kullanıldığında iyi bir hücre gelişimiyle birlikte α -amilaz üretiminde azalma görüldüğünü belirtmektedir. Mei vd. (1997) tarafından yapılan *Bacillus amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarını incelediği çalışmada ise α -amilaz salgılanması üzerine maltozun herhangi bir indüksiyon etkisinin olmadığını, glikozun ise bir çok fermantasyon sisteminde olduğu gibi katabolit represyon etkisi gösterdiğini ifade etmiştir.

Syu ve Chen (1997) *B. amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretimine farklı karbon kaynaklarının (glikoz, maltoz, ksiloz ve nişasta) etkilerini araştırmış ve en yüksek spesifik büyüme hızı ve hücre yoğunluğu glikoz kullanılan ortamda elde edildiğini fakat en yüksek enzim aktivitesinin ve spesifik enzim aktivitesinin nişasta ile elde edildiğini belirtmiştir. Yine aynı mikroorganizma türü ile Yoo vd. (1988) yaptığı çalışmada, karbon kaynağı olarak maltoz kullanıldığı durumda enzim üretiminde bir artış gözlenirken, glikoz

kullanımının enzim üretimini bir çok fermantasyon prosesinde olduğu gibi bastırıldığını tespit etmişlerdir.

Yapılan birçok çalışmada α -amilaz üretimi için yeast ekstraktın önemli bir parametre olduğu belirtilmiştir. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim üretiminde çok önemli bir parametre olduğu belirtilmektedir. *B. amyloliquefaciens* ile 2-10 g/l konsantrasyonlarında yapılan bir seri deney sonucunda, 2 ile 5 g/l yeast ekstrakt konsantrasyonları arasında α -amilaz üretiminin arttığı, daha yüksek yeast ekstrakt konsantrasyonlarında ise hızlı bir düşüşün meydana geldiği belirlenmiştir. Daha yüksek yeast ekstrakt konsantrasyonlarında yapılan çalışmalarda sıkı bir pH kontrolünün yapılması gerektiği belirtilmiştir. Düşük pH değerlerinin enzim üretimini bastırıldığı belirtilmektedir (Alam vd., 1989; Santos vd., 2003).

B. licheniformis kullanılarak farklı azot kaynaklarının etkisinin incelendiği çalışmada maksimum enzim üretimi için en iyi azot kaynağı olarak pepton ve bunu takiben et ekstrakt ve yeast ekstrakt bulunmuştur. %1 pepton konsantrasyonunun maksimum α -amilaz üretimi sağladığı ifade edilmiştir (Bajpai vd., 1989).

B. subtilis ile α -amilaz üretimine ortam bileşenlerinin etkisini incelediği çalışmasında, yeast ekstraktın ve peptonun eklendiği deneylerde lag fazının kısaldığı ve hem hücre konsantrasyonunun hem de enzim üretiminin arttığını belirtilmiştir (Teodoro vd., 2000).

Bakteriyel α -amilaz, farklı fermantasyon teknikleri ve farklı substratlar kullanılarak üretilmektedir. Çoğu ticari enzim üretim prosesi için maliyeti artıran etmenlerden en önemlisi karbon kaynağıdır. Toplam ortam maliyetinin önemli bir kısmını bu substratlar oluşturduğundan ucuz substratların araştırılması gereklidir (Rehm vd., 1987). Endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesiyle şeker kamışı küspesi, buğday kepeği, soya küspesi gibi tarımsal ve endüstriyel atıkların katı substrat fermantasyonunda ucuz substratlar olarak kullanımının araştırılması giderek yaygınlaşmaktadır (Pandey vd., 2000; Baysal vd., 2003; Abate vd., 1999). Basit bir teknik olması, yatırım maliyetlerinin ucuz olması, daha düşük katabolit represyon ve daha iyi ürün kazanımı gibi birçok avantajı bulunan katı substrat fermantasyonun (KSF) da genellikle mantarların kullanıldığı bilinmektedir. Ancak doğada başarılı bir şekilde bakterilerin katı substrat fermantasyonuyla geliştiği bilinmektedir. Bu konuda son zamanlarda sağladığı avantajlardan dolayı yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Baysal vd., 2003).

Baysal vd. (2003) buğday kepeği, pirinç kabuğu, yeast ekstrakt, beef ekstrakt kullanarak *B. subtilis* ile α -amilaz üretimi incelediği araştırmasında, maksimum enzim üretimini % 30 nem içeren, fosfat tamponuyla pH'sı 7'ye ayarlanan ortamda elde etmiştir. Tanecik boyutunun ve ekim konsantrasyonunu incelediği çalışmasında buğday kepeği kullanılan ortamlarda enzim üretiminin pirinç kabuğu kullanılan ortama göre 7.3 kat daha yüksek olduğunu belirtmiştir.

Berovic ve Ostroversnik (1997), elma posası kullanarak katı substrat fermantasyonu ile pektinolitik enzimlerin üretimini *A. niger* kullanarak incelemiştir. Soya unu, buğday kepeği ve basit bazı tuzların ilave edildiği doğal ortamda, daldırmalı fermantasyondan daha yüksek enzim üretimi sağlandığı belirtilmiştir.

KSF lignoselülozik maddelerin protein içeriklerinin artırılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Basit bir teknoloji olması, dönüştürülen substrat başına düşük reaktör hacmi gerektirmesi ve doğrudan besin maddesine uygulanabilmesinden dolayı bu konu araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Robinson vd., 2003). Emtiazi ve Nahvi (2000) buğday kepeği kullanılan doğal ortamda *Cellulomonas sp.* ile bazı enzimlerin üretimi araştırmıştır. Buğday kepeği kullanılan KSF ile selüloz, ksilanaz, α -amilaz ve mangan peroksidaz enzimlerinin üretilbildiğini belirtmiştir. Elde edilen α -amilaz, mangan peroksidazın termostabil özelliklere sahip olduğunu belirttiği çalışmasında üretilen enzimlerin tavuk yemlerine katılmasıyla yumurta üretiminin %10 arttırıldığını belirtmiştir.

Krishna ve Chandrasekaran (1996) *B. subtilis* (CBTK 106) ile substrat olarak muz atıklarının kullanıldığı α -amilaz üretimini katı substrat fermantasyonu ile araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimini % 70 nem içeren, 400 μ m tanecik büyüklüğüne sahip, başlangıç pH'sının 7.0' ayarlandığı 35 °C'de yürütülen fermantasyon ortamına, % 1 amonyum sülfat ve sodyum nitrat , % 0.5 beef ekstrakt ve pepton, %0.1 glikoz, sakaroz, maltoz ve nişasta, %1 potasyum klorür ve sodyum klorür katılan ortamda 24 saat fermantasyon sonunda ulaşmıştır. Muz atıklarının kullanıldığı ortamda, buğday kepeği kullanılan ortama göre enzim verimini 2.65 kat arttırdığını belirtmişlerdir. Sürekli birikme sonucunda çevresel problemlere neden olan bu gibi atıkların ekonomik ve emniyetli bir şekilde değerlendirilebileceğini belirten Krishna, muz atıkları kullanarak katı substrat fermantasyonuyla büyük ölçekte endüstriyel enzimlerin üretilbileceğini belirtmiştir.

Ramachandra vd. (2004) hindistancevizi yağ kekini (HYK) kullanarak *A. oryzae* ile α -amilaz üretimini incelediği çalışmasında, HYK'nin % 68 nem içeren ortamda mikroorganizmanın gelişmesi ve enzim üretimi için uygun olduğunu belirtmiştir. Glikozun ve nişastanın enzim üretimini artırırken, maltozun inhibisyona neden olduğunu ifade ettiği çalışmasında, maksimum enzim üretimine denenen azot kaynaklarından peptonun % 1 konsantrasyonunda ulaşmıştır. Enzim üretiminin hücre gelişimiyle birlikte gerçekleştiğini ve biomasın pik verdiği noktada aktivitenin de maksimum olduğu belirtmiştir.

Sodhi vd. (2005) substrat olarak buğday kepeği kullanarak *B. subtilis* ile α -amilaz üretimini incelenmişlerdir. Buğday kepeğiyle birlikte gliserin (% 1 w/w), soya fasulyesi (% 1 w/w), L-prolin (% 0.1), B vitamin kompleksi (% 0.01), Tween-40, MgSO₄.7H₂O ile musluk suyu bulunan ortamda maksimum enzim üretiminin elde edildiği belirtilmiştir. Elde edilen

enzimin etanol üretimi için nişasta hidrolizinde amiloglikoksidaz ile birlikte eşzamanlı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Omidiji vd. (1997) α -amilaz üretimi için soya fasulyesi, mısır ıslatma şurubu ve peynir altı suyu kullanarak basit ve ucuz ortamlar geliştirmiş ve endüstriyel α -amilaz üretimi için bu ortamların kullanılabileceğini belirtmiştir.

Helow vd. (1996) farklı nütrientleri içeren üç değişik ortamdan α -amilaz üretimini karşılaştırmışlardır. Seçilen ortamda ayrı ayrı kısmen yer değiştirilen farklı substratlarla (pancar küspesi, mısır koçanı, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve saman) farklı ortamlar elde etmiştir. Yaptığı çalışmada maksimum α -amilaz üretiminin buğday kepeği ve mısır koçanıyla gerçekleştiğini belirtmiştir.

Kelly vd. (1997) daha yüksek α -amilaz aktivitesine ulaşmak için iki aşamalı proseslerle α -amilazın üretimini tanımlamışlardır, oksijen transfer şartları ve özellikle çözünmüş oksijen miktarı α -amilaz üretimi için en önemli faktörler olarak rapor edilmiştir. Yüksek havalandırma hızları iyi bir enzim verimi için önemli olduğu bulunmuştur. Babu ve Satranayana (1995) havalandırmalı reaktörlerle maksimum α -amilaz verimine ulaşıldığını belirtmişlerdir.

Bajpai vd. (1992) *B. amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretimine oksijen transfer koşullarını incelemişler ve yüksek havalandırma hızı (% 2 vvm) kullanılarak optimize edilmiş ortamda çok yüksek α -amilaz verimine ulaşılabileceğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde aynı mikroorganizma ile oksijen transfer şartlarının enzim üretimine etkisini inceleyen Milner vd. (1996) yüksek havalandırma hızının enzim üretimini artırdığı, ancak deneylerinde köpük problemi çıktığını belirtmişlerdir. Antifoam konsantrasyonunun artırılmasının ise çözünmüş oksijen konsantrasyonunu azalttığını belirttiği çalışmasında bu problemten dolayı enzim üretiminin daha fazla artırılmadığını ifade etmiştir.

Literatürde farklı mikroorganizma ve karbon kaynağı kullanılarak α -amilaz üretiminin değişimi ve elde edilen enzimin özellikleri hakkında yapılan çalışmaların bir kısmı Tablo 5.3.'de verilmiştir.

Bu çalışmada üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla literatürde çalışılmamış doğal bir substrat olan fındık küspesi kullanılarak α -amilaz üretimi incelenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 5.3. Farklı türden mikroorganizma kullanarak değişik C ve N kaynaklarıyla α -amilaz üretimi üzerine yapılan çalışmalar.

Mikro. Türü	Kullanılan C kaynağı	Kullanılan N kaynağı	Referans
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nişasta, dekstrin, glikojen, sellobioz, Maltoheksoz , Laktoz	$(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Srivastava , 1986
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Nişasta, maltoz, dekstrin, pulluan	Trypton, meat ekstrakt, yeast ekstrakt	Melasn timer N.1987
<i>Bacillus cogulans B49</i>	Buğday kepeği, hardal yağı keki, tapyoka, mısır kepeği	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Babu and Satyanarayana ,1995
<i>Bacillus sp. IMD 435</i>	Nişasta(çözünabilen), β -siklodextrin, maltoz, glikoz, fruktoz, Laktoz	Mısır ıslatma şurubu, Yeateks, Yeast ekstrakt, Baktopepton, soya fasulyesi	Hamilton.,vd. 1999
<i>Bacillus sp. JF.</i>	Glikoz, Sakaroz, Maltoz, Rafinoz, Pirinç, Soya fasulyesi, buğday, Mısır, Darı, Süpürge darısı	Trypton, Pepton, Yeast ekstrakt, Beef ekstrakt, Üre, $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$	Jin., vd .2000
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Patates unu, buğday unu, mısır unu, arpa unu, tapyoka unu,çözünabilir nişasta	NH_4Cl	Ramesh ,2001
<i>Bacillus Licheniformis GCBU-8</i>	Buğday kepeği, Ayçekirdeği atıkları, Pamuk çekirdeği atıkları, soya fasulyesi atıkları, pirinç kabukları ve kepeği	Nütrient broth,	Haq, 2003

6. MATERİYAL VE METOT

6.1. Mikroorganizma

Deneylerde NRRL kültür koleksiyonundan temin edilen *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 türü bakteri kullanılmıştır.

6.2. Bakteri Üretim Besiyerleri ve Koşulları

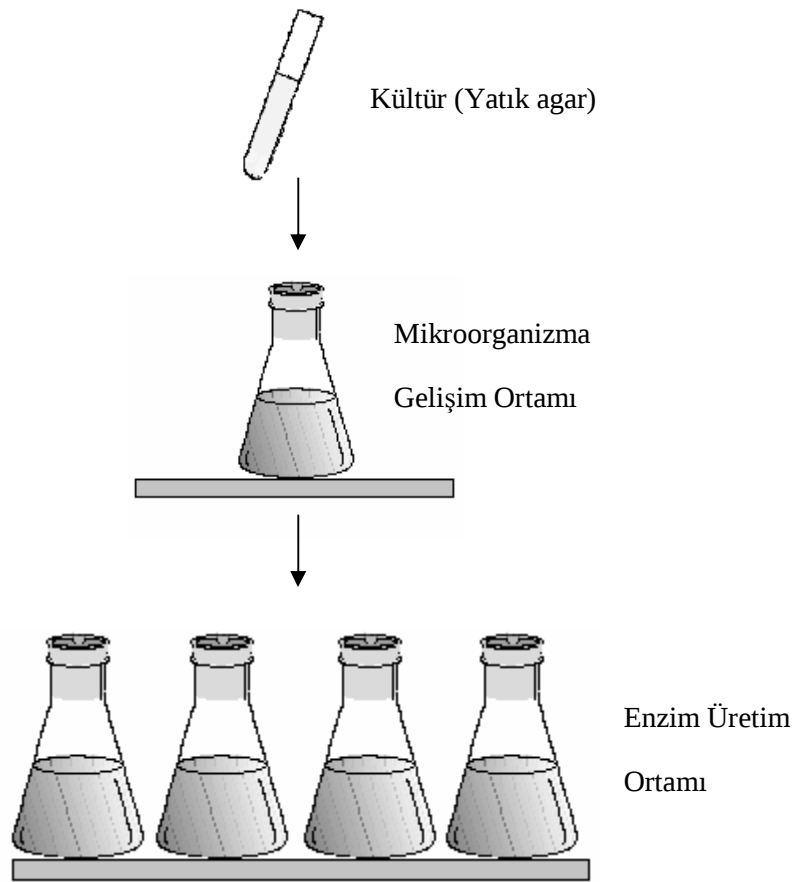
α -Amilaz üretiminde kullanılan bakterilerin saklanması ve geliştirilmesi için gerekli olan besi yeri bileşimi Tablo 6.1.'de verilmiştir. Stok kültürler Tablo 6.1.'de verilen kültür saklama besi yerine ekilerek inkübasyon sonrasında buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir. Kültürler 30 günde bir yenilenmiştir. Enzim üretiminde kullanılan bakteriler iki aşamada ekilmiştir, ilk olarak kültür saklama ortamından bakteri geliştirme ortamına ve daha sonra bakteri gelişme ortamından alınan mikroorganizmalar enzim üretim ortamına ekilmiştir.

Hazırlanan besiyerlerinden 50 ml alınarak 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Başlangıç pH'ları 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanarak ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde

Tablo 6.1. Deneylerde kullanılan bakterinin saklanmasında ve geliştirilmesinde kullanılan besiyeri.

	Kültür Saklama Besiyeri (g/l) (Yıldız,1993)	<i>B.Amyloliuefaciens</i> (g/l) (Shu,1997)
		Bakteri Gelişim Besiyeri
Glikoz	4.0	10.0
Niştasta		
Gliserin		
Bakto Pepton		1
Yeast ekstrakt	0.5	1
MgSO ₄ .7H ₂ O		0.5
NaCl	2.0	
CaCl ₂ .2H ₂ O		0.1
KH ₂ PO ₄		1
Et peptonu	8.0	
Kazein peptonu	2.0	
Agar-agar	18.0	
MnSO ₄ .7H ₂ O		0.01
FeSO ₄ .7H ₂ O		0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄		5
Başlangıç pH'sı	7.0	7.0
Karıştırma hızı (rpm)		150
Ferm. ortam sic. (°C)		37

hazırlanan besiyeri 121 °C’de ve 1.2 bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda (Prior Clave 129) sterillemiştir. Sterillenen besi yerleri laminer flow’da ortam sıcaklığına soğutulmuştur. Eğik slantlarda (yatık agar) bulunan bakteri kültürleri steril bir öze (loop) yardımıyla 50 ml bakteri gelişme ortamı içeren 250 ml’lik erlenlere aşılanmıştır. Erlenlere aşılanan kültür 37 °C’de 150 dev./dk. çalkalama hızına sahip orbital inkübatörlü çalkalayıcıda (Selecta Rotabit) 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Sterillenmiş enzim üretim besiyeri içeren erlenlere 0.5 ml bakteri gelişme ortamından aşılanmıştır.



Şekil 6.1. Enzim üretiminde takip edilen yol.

6.3. Doğal Substrat İçeren Fermantasyon Ortamı

Bu çalışmada, Ordu Yağ Sanayi A.Ş. Fabrikası'ndan temin edilen fındık küspesi doğal substrat olarak kullanılmıştır. Kullanılan doğal substrat 70 °C'de 24 saat süreyle etüvde kurutulmuş ve kapalı kaplarda muhafaza edilerek deneylerde kullanılmıştır. Enzim üretim ortamında mineral içeriği Tablo 6.2'de verilen musluk suyu kullanılmıştır. 250 ml'lik erlenlere 50 ml enzim üretim ortamı konulmuş, sterilizasyondan sonra 0.5 ml bakteri gelişme ortamından aşılınmış ve 96 ile 120 saat süresince inkübasyona tabi tutulmuştur.

Fındık, bol miktarda üretildiği yıllarda ve pazara arz edilecek kalitede olmadığında, yağı ekstrakte edilerek değerlendirilir. Genellikle iç fındık kullanıldığından, küspe proteince zengin ve selülozca fakir sayılabilir. Fındık küspesi bileşimi Tablo 6.3. de verilmiştir (Ergün vd., 2004).

6.4. Yapılan Analizler

6.4.1. Enzim aktivitesin ölçülmesi

Bakteri kültürlerinde α -amilaz aktivitesi tayininden önce, hücrelerin ve diğer katı kısımların ayrılması amacıyla 5000 rpm'de 5 dakika fermantasyon ortamı santrifüjlendi (Hettich Eba21) ve daha sonra kültür sıvısı kullanılarak enzim aktivitesinin tayini yapıldı. Deneylerde aktivite tayini için Pfueller ve Elliotun (1969) dekstrinojenik yöntemi kullanıldı. α -Amilaz aktivitesinin tayini dekstrinojenik yöntem ile iyot'un nişastayla verdiği renk esasına dayanılarak ölçüldü. Bu yöntemle göre nişasta parçalandıkça iyotla verdiği (mavi) renk açılmaktadır.

Tablo 6.2. Doğal substratlarla yapılan deneylerde kullanılan musluk suyunun mineral içeriği.

Mineraller	ppm
Kalsiyum	67.9
Fosfor	-
Potasyum	1.28
Klor	18
Magnezyum	% 0.29
Kükürt	% 0.6
Sodyum	26.1
Demir	-
Çinko	18
Mangan	-
pH	6.94

Tablo 6.3. Fındık küspesi bileşimi (Ergün vd., 2004).

Küspe	Yapılan Analiz Sonuçları				
	Kuru Madde	Ham Protein	Ham Yağ	Ham Selüloz	Diğer
Fındık Küspesi	95.54	22.43	7.79	7.95	57.37

Nişasta α -amilaz tarafından adım adım parşalandığında, kısa zincirli dekstrinler üretilir ve renk mavi-mor-kırmızı-turuncu yolundan sarıya dönüşür. İyot metodu kolaylığı ve iyi sonuç vermesinden dolayı aktivite ölçümünde kullanılmıştır.

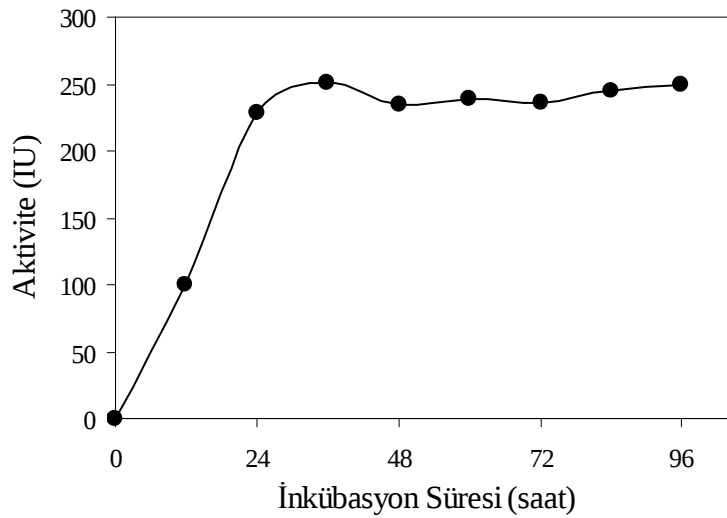
Aktivite ölçümlerinde, %3' lük 2.3 ml çözünür nişasta, 1 ml 0.1 M CaCl_2 , 250 ml 0.1 M potasyum fosfat tamponu (0.025 M NaCl içeren, pH=6.2), 200 ml distile su'dan oluşan karışım substrat çözeltisi olarak kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde, bir kontrol ve üç numune tüpü olmak üzere toplam dört tüp kullanılmıştır. Tüplere 4.5 ml substrat çözeltileri eklendikten sonra 37 °C'de su banyosunda 5 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra numune tüplerine 0.5 ml enzim ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında hem örnek tüplerine hem de kontrol tüplerine 1 M 0.9 ml HCl çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Kontrol tüpüne 0.5 ml enzim çözeltisi konduktan sonra renk oluşumunu gözlemek için 0.1 ml iyot ayırıcı (% 0.3 I, % 3 KI) eklenmiştir. 4 ml distile suyla hacim tamamlandıktan sonra vorteks'de karıştırılarak absorbansların okunmasına geçilmiştir. Örnekler ve kontrol tüpleri 9 ml distile su, 0.9 ml 1 N HCl ve 0.1 ml iyot ayırıcı içeren kör numuneye karşı 620 nm'de spektrofotometre (Jenway-6105) yardımıyla ölçülmüştür. Kontrol tüpünün verdiği değerden, örnek tüpünün verdiği değer çıkarılarak, aralarındaki fark yardımıyla enzim aktivitesi International Unite (IU/ml) olarak hesaplanmıştır. Bir ünite enzim, 37 °C'de yukarıda tanımlanan deney koşullarında 0.0284 optik densite (OD) azalmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Sarıkaya, 1995). Yüksek enzim aktivitelerinde, uygun oranlarda fosfat tamponuyla enzim çözeltisi seyreltilmiş ve sonuç seyrelme faktörüyle çarpılmıştır.

$$IU = \frac{(Kontrol - Numune)}{0.0284} * (SeyreltmeOranı)$$

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

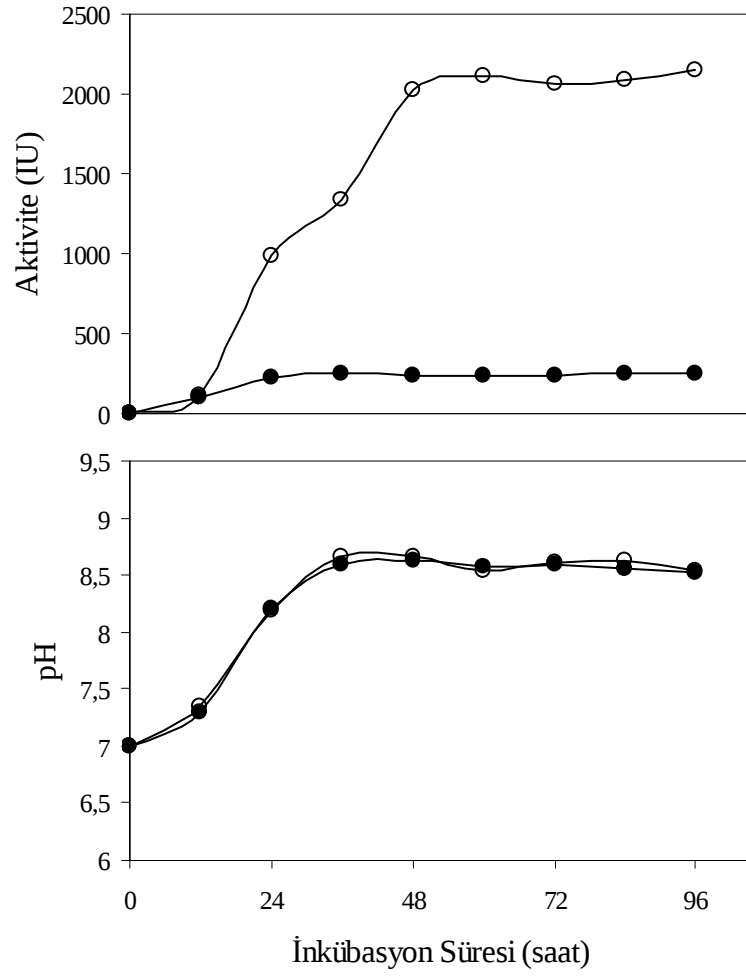
Yapılan deneylerde fındık küspesi katı substrat olarak kullanılmış ve fermentasyon ortamındaki enzim aktivitesiyle birlikte pH değerleride takip edilmiştir.

Sadece musluk suyu ve fındık küspesi kullanılarak fermentasyon ortamında elde edilen enzim aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 7.1.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi fermentasyon ortamında katı substrat ve musluk suyu kullanıldığında, ortamdaki enzim aktivitesinin çok düşük değerlerde olduğu görülmüştür. KSF'nunda ideal bir substrat, mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu tüm nütrientleri içeren maddelerdir. Ancak çoğu substratlar optimum üretim için gerekli olan konsantrasyonun altında bileşen içerdiğinden eklenmesi gerekmektedir (Sodhi, 2005). Bu nedenle fermentasyon ortamına çeşitli maddeler ilave edilerek enzim üretiminin artırılması amaçlanmıştır.



Şekil 7.1. Fındık küspesinin kullanıldığı ortamda enzim aktivitesinin zamanla değişimi (●10 g/l fındık küspesi, KH:150 rpm, pH_b:7.0, T:37°C).

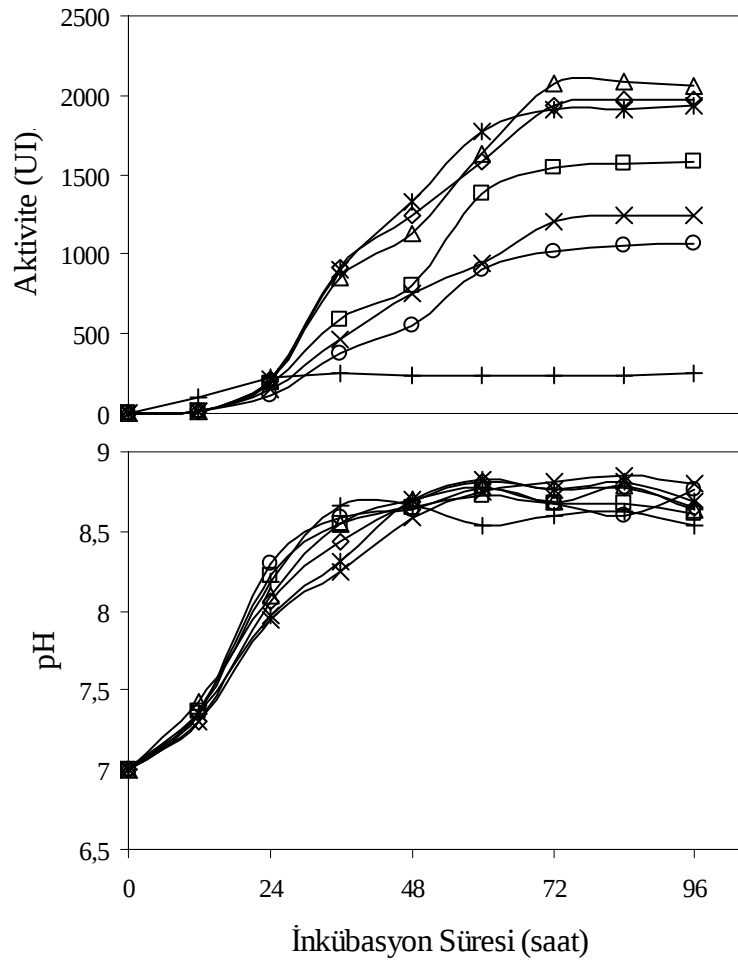
Enzim aktivitesinin düşük oluşu azot kaynağının yetersiz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Azot kaynağı olarak (2.5 g/l pepton + 1 g/l yeast ekstrakt) kullanılmıştır (Tanyıldızı, 2005). Bu fermentasyon ortamında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 7.2.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretiminde önemli miktarda bir artış gözlenmiştir.



Şekil 7.2. Fındık küspesine azot ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi (●10 g/l fındık küspesi, ○ 10 g/l fındık küspesi, 2.5 g/l pepton + 1 g/l yeast ekstrakt, KH:150 rpm, T:37°C, pH₀:7.0).

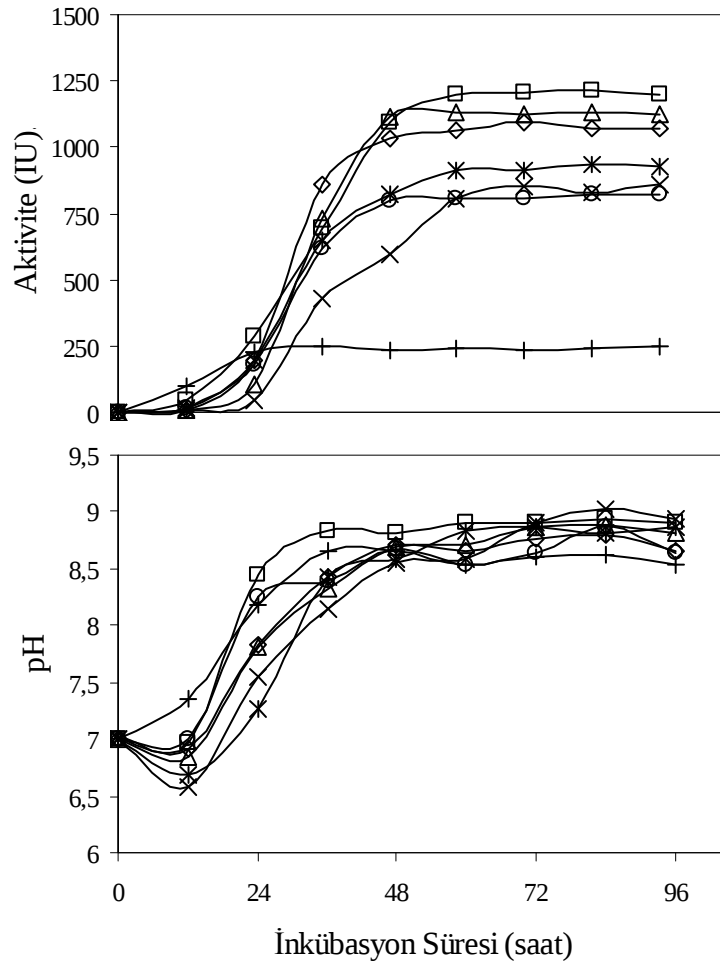
7.1. Azot Kaynaklarının Etkisi

Yapılan çalışmalarda C/N oranının α -amilaz üretiminde önemli olduğu bildirilmektedir ve C/N oranı optimum olduğunda, α -amilaz üretiminin maksimum değere ulaşacağı belirtilmektedir (Farez vd., 1992; Ülger vd., 1992). Azot kaynaklarının enzim üretimine etkisini görmek için pepton, yeast ekstrakt, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılmıştır. 10 g/l fındık küspesi içeren ortama altı farklı konsantrasyonlarda (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 g/l) pepton ilave edilerek yapılan deney sonuçları Şekil 7.3.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 5 g/l'ye kadar pepton ilavesi ile enzim aktivitesi artarken, daha yüksek pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesi düşmüştür. Düşük pepton konsantrasyonlarında azot kaynağının yetersiz olması enzim aktivitesini düşürmüştür. Yüksek pepton konsantrasyonunda enzim üretiminin bastırıldığı gözlenmiştir. Maksimum enzim üretimi (2063 IU) 5 g/l pepton kullanılan ortamda elde edilmiştir ve azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi araştırıldıktan sonra yapılan deneylerde pepton konsantrasyonu 5 g/l olarak alınmıştır.



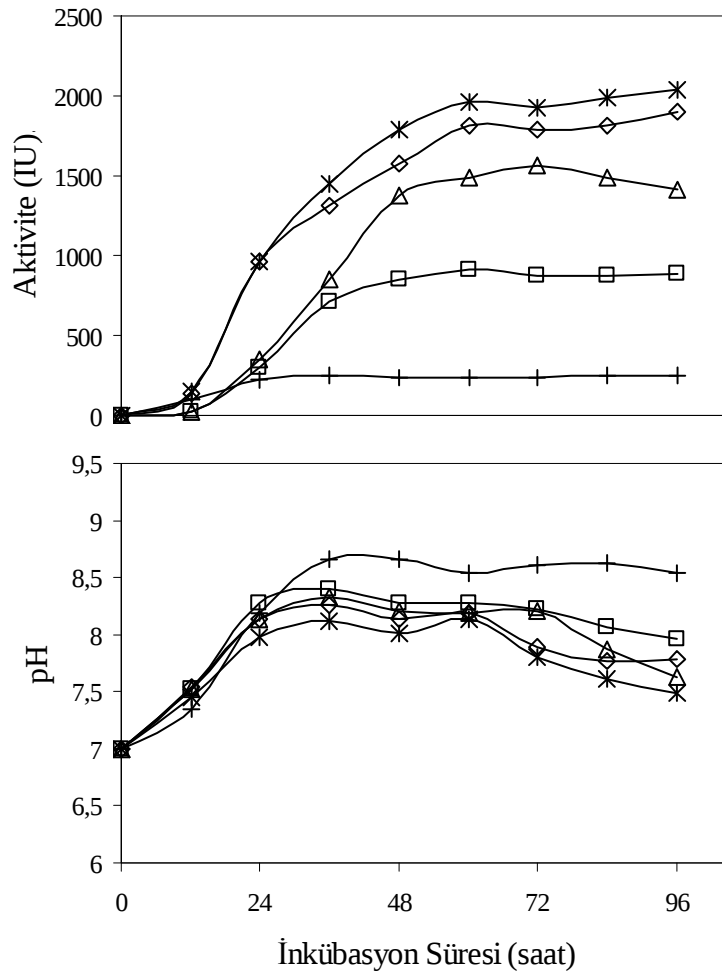
Şekil 7.3. Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, o 1 g/l, □ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, ◇ 7.5 g/l, * 10 g/l, x 20 g/l pepton, 10 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH₀:7.0).

10 g/l fındık küspesi içeren fermantasyon ortamına, altı farklı konsantrasyonda (1, 2,5, 5, 10, 15, 20 g/l) yeast ekstrakt eklenerek yapılan deney sonuçları Şekil 7.4.'de verilmiştir. Düşük yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamında yapılan deneyde enzim üretiminin düşük olduğu, yeast ekstrakt konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretimindeki artışın 2,5 g/l yeast ekstrakt konsantrasyonuna kadar sürdüğü görülmüştür. Literatürde, ortamda yeterli konsantrasyonlarda azot kaynağı olmaması halinde enzim üretiminin düşük olacağı, bununla birlikte yüksek azot konsantrasyonlarında ise enzim üretiminin inhibisyonuna neden olabileceği belirtilmektedir (Hamilton vd, 1999). Maksimum enzim üretimi (1201 IU) 2,5 g/l yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamında elde edilmiştir. 20 g/l yeast ekstrakt içeren ortamda yapılan deneyde enzim üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve peptonu mukayese edersek, maksimum enzim üretimi açısından peptonun daha kullanışlı olduğu Şekil 7.3. ve Şekil 7.4.'de görülmektedir. Azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi araştırıldıktan sonra yapılan deneylerde ortama azot kaynağı olarak 2,5 g/l yeast ekstrakt ilave edilmiştir.



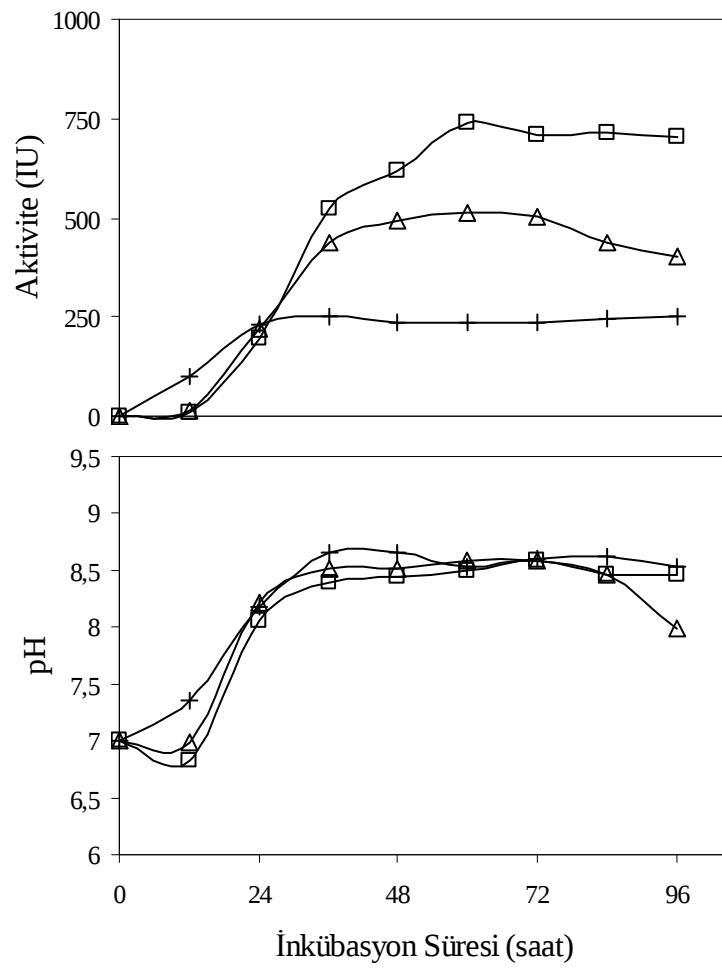
Şekil 7.4. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, o 1 g/l, □ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, ◇ 10 g/l, * 15 g/l YE, 10 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b:7.0).

10 g/l fındık küspesi içeren fermantasyon ortamına inorganik azot kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla, dört farklı konsantrasyonda (2.5, 5, 7.5, 10 g/l) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenerek yapılan deney sonuçları Şekil 7.5.'de verilmiştir. Düşük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren fermantasyon ortamında yapılan deneyde enzim üretiminin düşük olduğu, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretimindeki artışın sürdüğü ve 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunda maksimum (2039 IU) olduğu görülmüştür. Organik azot kaynaklarıyla kıyaslandığında peptonla eşdeğer, yeast ekstrakt'a nazaran da daha fazla enzim aktivitesinin olduğu görülmektedir. Ancak organik azot kaynaklarının (yeast ekstrakt, pepton, beef ekstrakt, mısır ıslatma şurubu gibi.) bakteriyel suşlarda maksimum enzim üretimi sağladığı yapılan birçok çalışmada ifade edilmektedir (Jin vd., 1990; Cheng vd., 1989). Azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanıldığı ortamda, pepton kullanılan ortamda elde edilen aktivite değerlerinin birbirine yakın oluşu her bir suşun farklı azot kaynaklarında farklı enzim üretim kapasitesine sahip olduğu bilgisini güçlendirmektedir (Tanyıldızı, 2005).



Şekil 7.5. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, $\square$ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, $\diamond$ 7.5 g/l, * 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH₀:7.0).

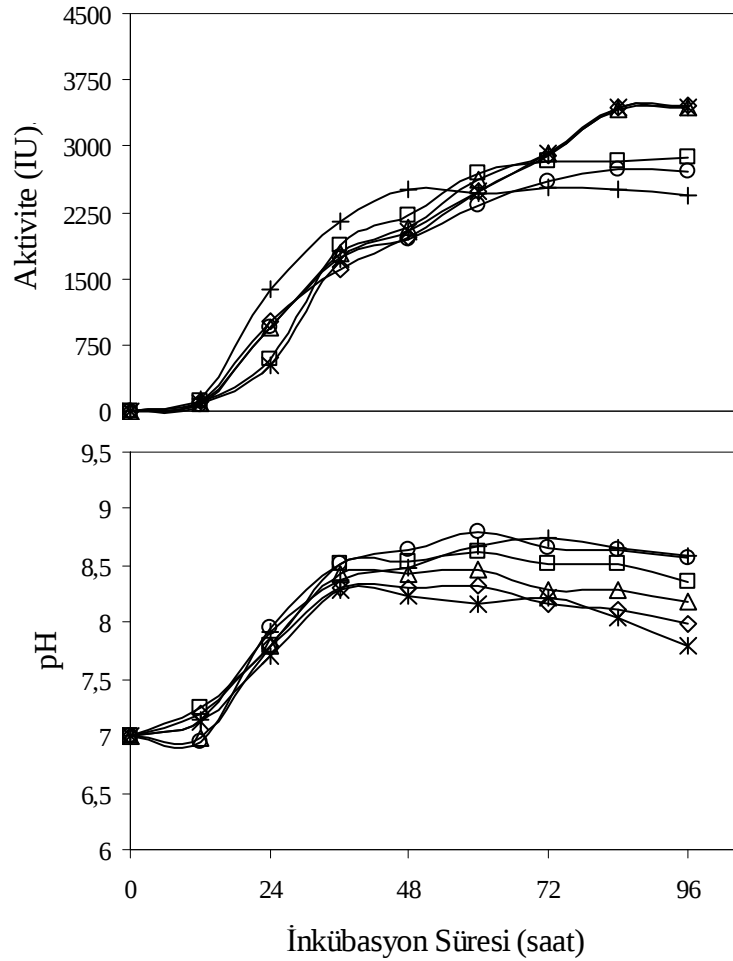
10 g/l fındık küspesi içeren fermantasyon ortamına, iki farklı konsantrasyonda (2.5, 5 g/l) NaNO_3 eklenerek yapılan deney sonuçları Şekil 7.6.'da verilmiştir. Düşük NaNO_3 içeren fermantasyon ortamında yapılan deneyde enzim üretiminin yüksek olduğu, NaNO_3 konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretiminin düştüğü görülmüştür. Yüksek enzim üretimi 2.5 g/l NaNO_3 içeren fermantasyon ortamında elde edilmiştir. Denenen diğer azot kaynaklarıyla (pepton, (2063 IU), yeast ekstrakt, (1201 IU), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (2039 IU)) kıyaslandığında NaNO_3 kullanılan ortamda çok daha düşük (704 IU) enzim aktivitesinin olduğu görülmektedir.



Şekil 7.6. NaNO_3 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, □ 2.5 g/l, Δ 5 g/l NaNO_3 , 10 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b :7.0).

7.2. (NH₄)₂SO₄ Konsantrasyonunun Etkisi

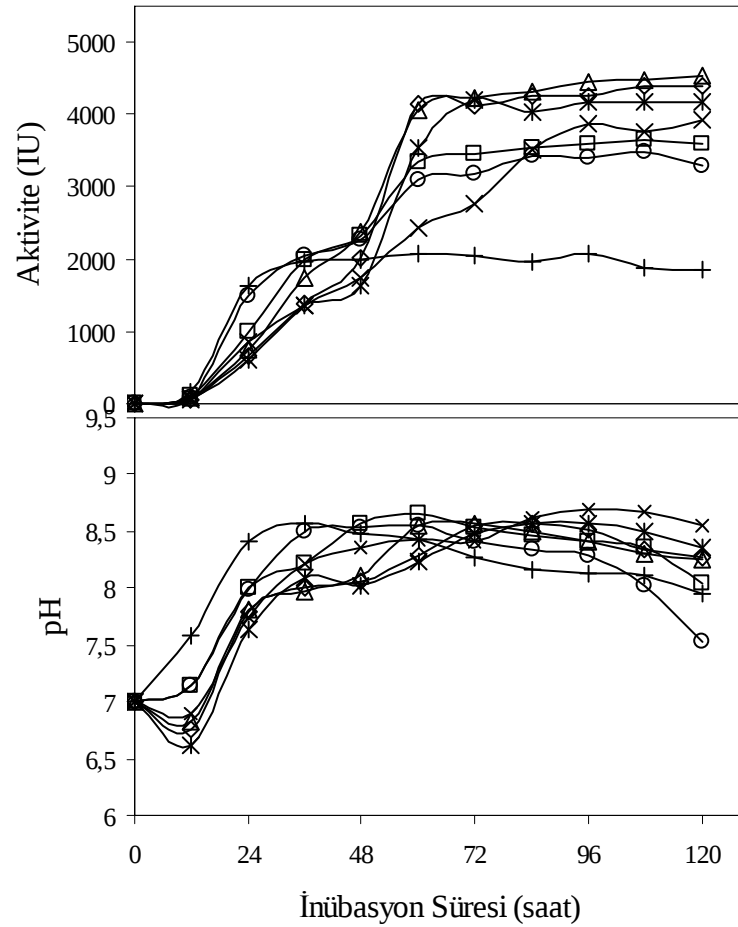
10 g/l fındık küspesi, 5 g/l pepton ve 2.5 g/l Y.E. içeren fermantasyon ortamına, beş farklı konsantrasyonda (1, 2.5, 5, 7.5, 10 g/l) (NH₄)₂SO₄ eklenerek yapılan deney sonuçları Şekil 7.7.'de verilmiştir. Daha önce 10 g/l fındık küspesi içeren ortamda farklı konsantrasyonlarda denenilen (NH₄)₂SO₄'ın yine enzim aktivitesini konsantrasyondaki artışla birlikte arttırdığı görülmüştür. Ancak maksimum enzim üretimindeki (3437 IU) (NH₄)₂SO₄ değerinin 5 g/l olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın nedeni olarak mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu azotun büyük kısmının organik azot kaynakları tarafından karşılandığı sonucuna varılabilir. Bundan sonra yapılan deneylerde 5 g/l (NH₄)₂SO₄ ortama ilave edilerek deneyler sürdürülmüştür.



Şekil 7.7. (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, o 1 g/l, □ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, ◇ 7.5 g/l, * 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 10 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH₀:7.0).

7.3. Fındık Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi

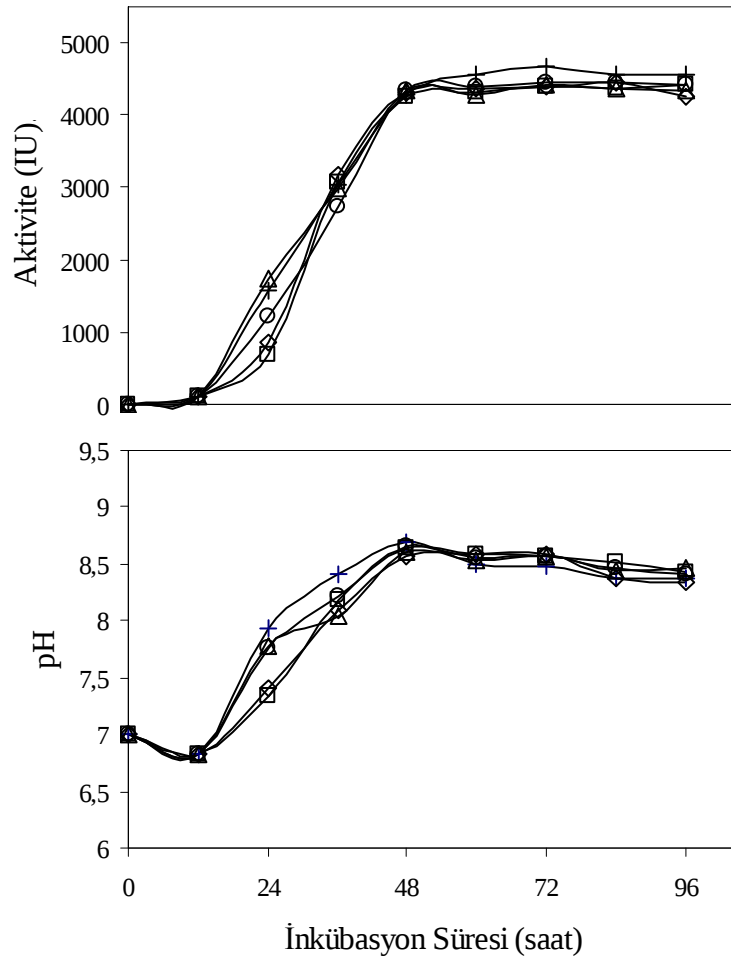
Farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 g/l) fındık küspesinin enzim üretimine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 7.8.'de verilmiştir. Ortamın nem içeriğinin de değiştiği bu deneylerde, düşük substrat konsantrasyonlarında enzim üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Katı substrat fermantasyonunda ortamın nem içeriği kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Enzimin biyosentezi ve salgılanması katı haldeki substratın nemle etkileşimiyle ilişkilendirilebilir. Yüksek nem içeriği substratın gözeneklerini tıkar, yapışkanlık özelliğini artırır, gaz hacmini azaltır, difüzyonu düşürür ve oksijen limitasyonu ile sonuçlanabilirken, düşük nem içeriği katı haldeki nutrienlerin ortama geçebilmesi için yeterli olmayabilir (Ellaiah vd., 2002; Sodhi, 2005). 20, 30 ve 40 g/l fındık küspesi içeren ortamlardaki enzim aktivitesi sırasıyla 4531 IU, 4400 IU ve 4183 IU olarak elde edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesine 20 g/l fındık küspesi konsantrasyonundaki ortamda ulaşılması nedeniyle çalışmanın geriye kalan kısmında bu konsantrasyon değerinde çalışılmıştır.



Şekil 7.8. Fındık küspesi konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 5 g/l, o 10 g/l, □ 15 g/l, Δ 20 g/l, ◇ 30 g/l, * 40 g/l, x 50 g/l FK, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l (NH₄)₂SO₄, KH:150 rpm, T:37°C, pH₀:7.0).

7.4. Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

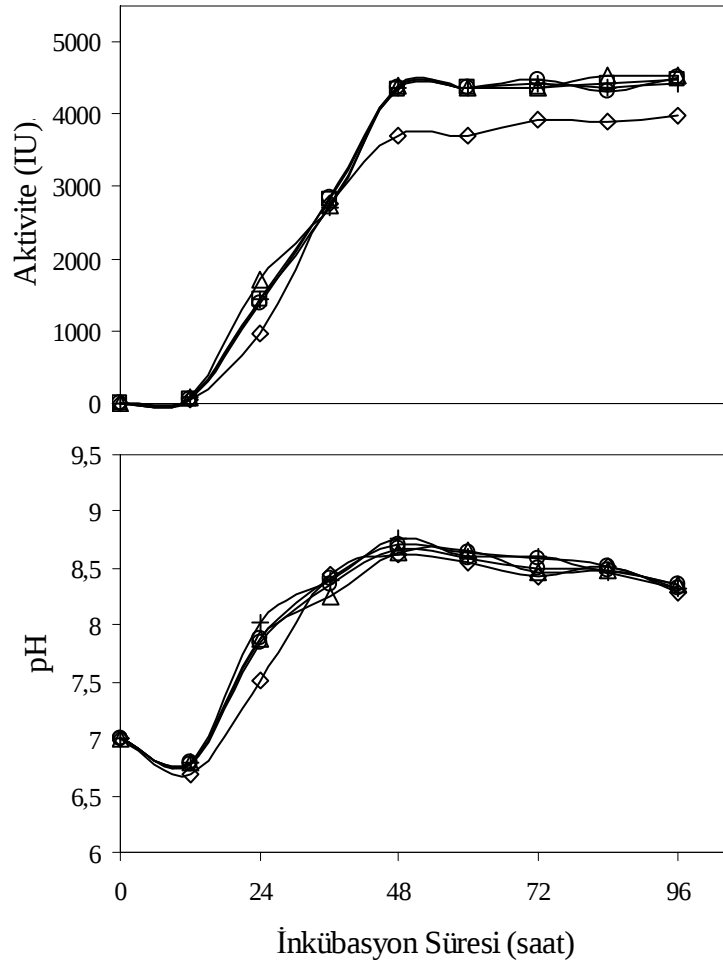
Literatürde fosfatın α -amilaz üretimi için etkin bir promotor olduğu belirtilmektedir. α -Amilaz üretimi için optimum fosfat konsantrasyonu Fukomoto ve arkadaşları tarafından 0.1 M olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon mikroorganizmanın gelişmek için ihtiyaç duyduğu değerin çok üzerindedir (Fukomoto vd., 1958). Mikroorganizmaların gelişebilmesi ve enzim üretebilmesi için ihtiyaç duyduğu elementlerden biri olan fosfatın, dört farklı konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2, 3 g/l) enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 7.9.'de verilmiştir. KH_2PO_4 'ın tüm konsantrasyonlarında kullanılmasıyla enzim aktivitesinde azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir. Buda ortamda fazla miktarda bulunan fosfatın ortam bileşenleri veya ürünlerle kompleks oluşturmasından kaynaklanabilir (Yağız, 2000; Pekin, 1980).



Şekil 7.9. KH_2PO_4 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, o 0.5 g/l, □ 1 g/l, Δ 2 g/l, ◇ 3 g/l KH_2PO_4 , 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b :7.0).

7.5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda kullanılan (0, 0.5, 1, 2, 4 g/l) magnezyum sülfatın enzim üretimine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 7.10.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ın enzim üretimi üzerine pozitif bir etkisi görülmemiştir. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ın yüksek konsantrasyonlarda kullanılması halinde enzim üretimini azalttığı görülmektedir. Kullanılan ortamda $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ın pozitif bir etkisinin olmaması mikroorganizmanın gelişmek ve enzim üretebilmek için ihtiyaç duyduğu elementleri kullanılan musluk suyundan (Tablo 6.2., %0.29) ve doğal substrat kaynağından karşıladığı düşünülmektedir.

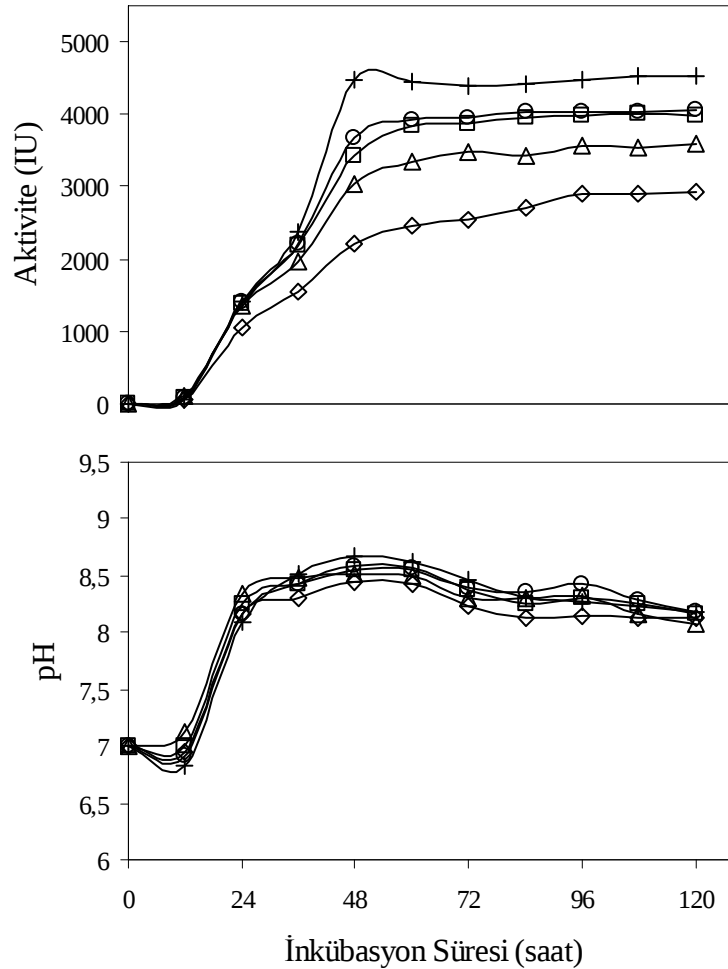


Şekil 7.10. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, o 0.5 g/l, □ 1 g/l, Δ 2 g/l, ◇ 4 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH₀:7.0).

7.6. CaCl_2 Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim stabilizasyonu ve proteolitik etkilere karşı korunması için mutlaka ortamda etkili metal iyonlarının bulunması gerekmektedir (Manning and Campel, 1961). Bir metalo enzim olan

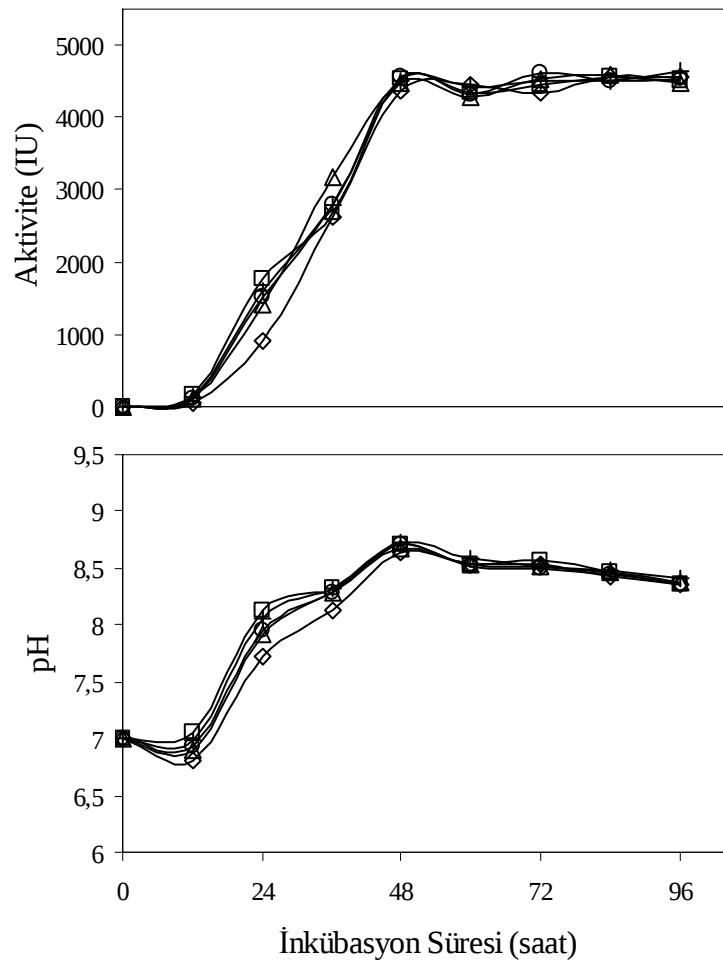
α -amilaz, aktivite gösterebilmesi için ortamda özellikle kalsiyum iyonuna ihtiyaç duymaktadır (Fogarty,1983). Farklı kaynaklardan saflaştırılan α -amilazların mol başına 1 mol kalsiyum iyonu bağladıkları belirtilmektedir (Fischer, 1961). Bu bilgilerden hareketle, CaCl_2 konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1, 2, 4 g/l) CaCl_2 enzim üretim ortamına ilave edilmiş ve deney sonuçları Şekil 7.11.'de verilmiştir. Ancak fındık küspesi kullanılan deney ortamına eklenen CaCl_2 'nin enzim üretimi üzerine negatif bir etkisinin olduğu görülmektedir. Buradan, doğal substratın yapısında mevcut olan elementlerin ve musluk suyundaki iyon miktarının (Ca =67.9 ppm, Cl_2 =18 ppm) mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu değeri karşıladığı ve bu elementlerin fazla miktarlarda ortamda bulunması halinde enzim üretiminin düşeceği sonucuna varılabilir. Fındık küspesinin ve musluk suyunun Ek 1.'de verilen spesifikasyonları mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu CaCl_2 'nin büyük bir kısmının musluk suyundan da karşıladığını göstermektedir.



Şekil 7.11. CaCl_2 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, ○ 0.5 g/l, □ 1 g/l, △ 2 g/l, ◇ 4 g/l CaCl_2 , 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_0 :7.0).

7.7. NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Ortaman iyonik gücünü dengelemesi açısından önemli olan NaCl'in etkisinin araştırıldığı bu deneyde, dört farklı konsantrasyonda (0.5, 1, 2, 4 g/l) deneyler yapılmış ve deney sonuçları Şekil 7.12.'de verilmiştir. Fındık küspesi kullanılarak gerçekleştirilen katı substrat fermentasyonunda ortama eklenen sodyum iyonlarının enzim üretimi üzerine bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Fındık küspesinin ve musluk suyunun Ek 1.'de verilen spesifikasyonları mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu Na^+ iyonunun büyük bir kısmının musluk suyundan (26.1 ppm) karşılandığını göstermektedir. Ortam maliyetinin düşürme açısından musluk suyu kullanımının avantaj sağlayacağı görülmektedir.

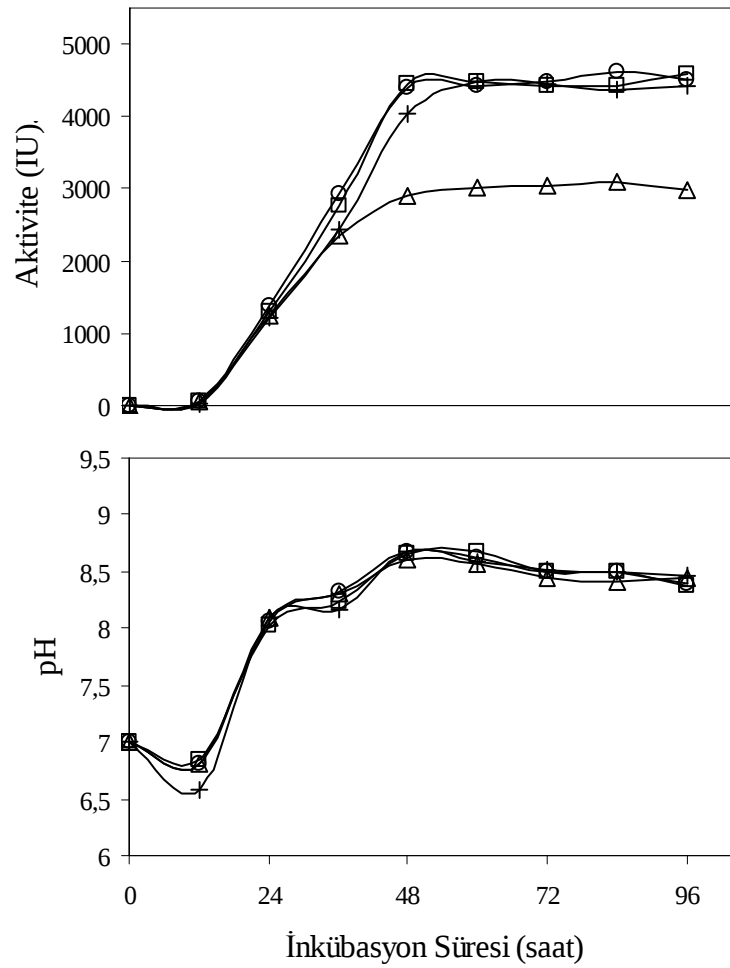


Şekil 7.12. Na^+ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, ○ 0.5 g/l, □ 1 g/l, △ 2 g/l, ◇ 4 g/l Na^+ , 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b :7.0).

7.8. EDTA Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda kullanılan (0, 0.5, 1, 2 g/l) EDTA'nın enzim üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı deney sonuçları Şekil 7.13.'de verilmiştir. Yapılan çalışmalarda ortamda

bulunan EDTA'nın, substrat bünyesinde bulunan metal iyonlarını ve ortamda bulunan diğer metal iyonlarını bağladığı böylelikle enzim aktivitesini düşürdüğü belirtilmektedir (Gülsün, 1994). Şekil 7.13'den de görüldüğü gibi fermantasyon ortamında EDTA'nın düşük konsantrasyonlarda ilavesiyle etkilenmediği, yüksek EDTA konsantrasyonlarına çıkıldığında aktivitede bir azalma olduğu net bir şekilde görülmektedir. Bunun nedeni olarak EDTA'nın ortamda bulunan ve mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu metal iyonlarıyla kompleks oluşturarak enzim üretimini azalttığı söylenebilir.

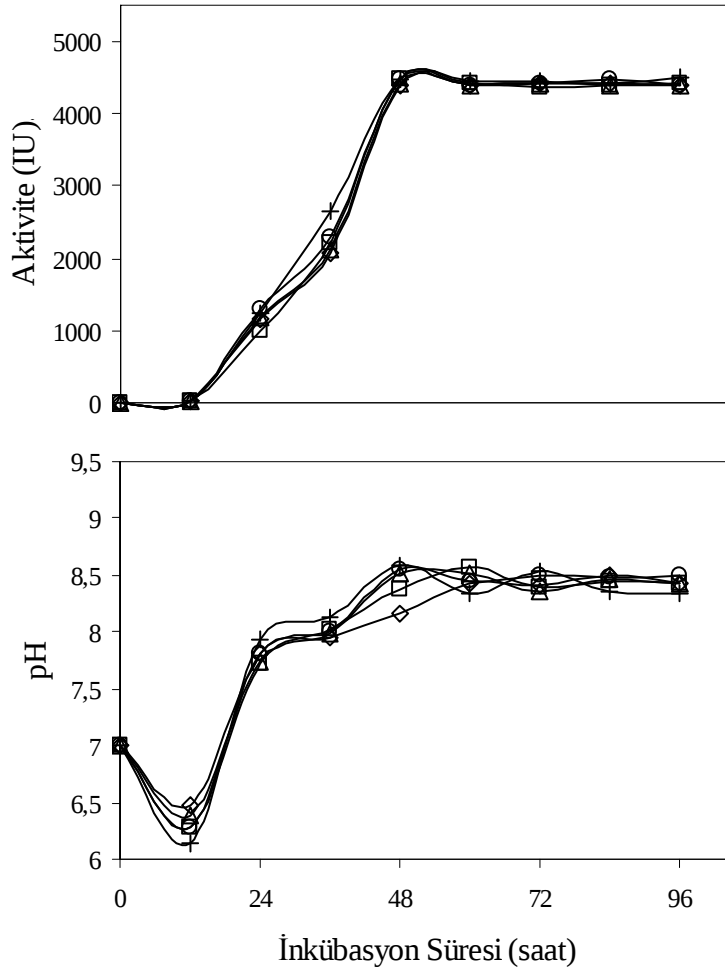


Şekil 7.13. EDTA konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0 g/l, o 0.5 g/l, □ 1 g/l, Δ 2 g/l EDTA, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l (NH₄)SO₄, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b:7.0).

7.9. Ekim Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı ekim konsantrasyonlarında (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 ml/50 ml) yapılan deney sonuçları Şekil 7.14.'de verilmiştir. Ekim konsantrasyonunun büyüklüğü başlangıç lag fazının kontrolünde etkilidir. Düşük ekim konsantrasyonlarında lag fazın uzun olduğu, halbuki yüksek

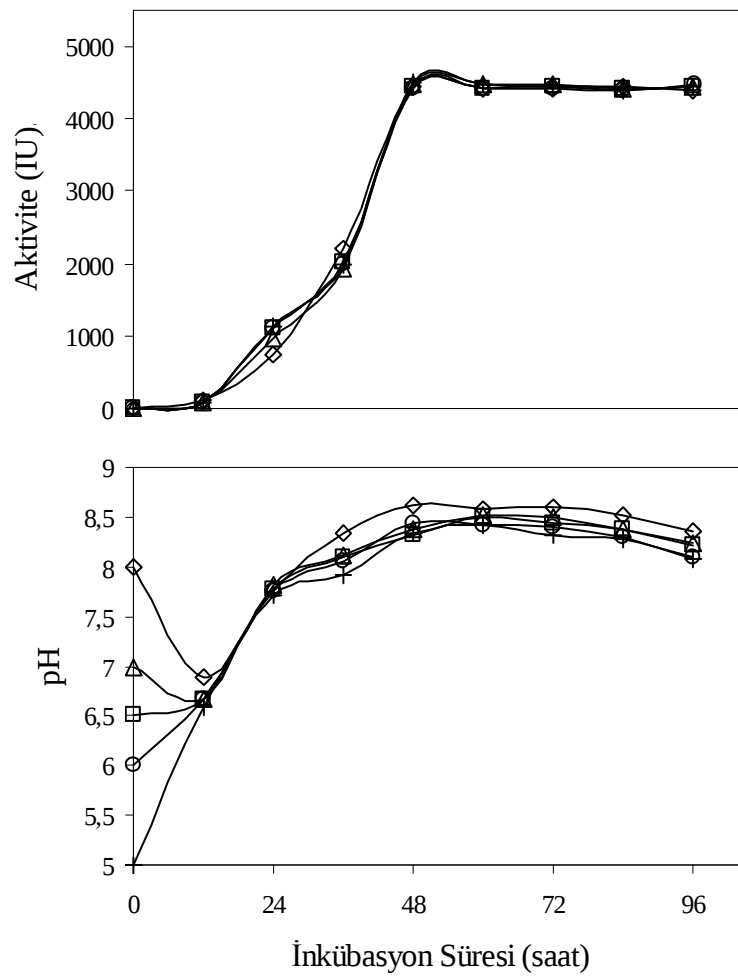
ekim konsantrasyonlarında ise nem içeriğinin artmasıyla yine lag fazın önemli miktarda uzayacağı belirtilmektedir (Krishna vd., 1996). Yapılan deneyler neticesinde lag fazının oldukça uzun olduğu ve ekim konsantrasyonunun bu evreyi azaltmada pozitif bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Doğal ortamlarda enzim üretimi diğer ortamlara nazaran daha yavaş gerçekleşmektedir (Tanyıldızı, 2005). Mikroorganizmanın besiyerinde bulunan glikoz, nişasta gibi nütrientleri doğal substratlara göre daha hızlı metabolize etmesi sonucu bu beklenen bir sonuçtur. Katı substratın ortama geçmesi, bu substratları mikroorganizmanın kullanacak forma getirmesi gibi ara kademeler sonucu ortamdaki enzim aktivitesi daha geç belirlenebilmiştir. Şekil 7.14.'den de görüldüğü üzere, ekim konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine bir etkisi görülmemiştir.



Şekil 7.14. Ekim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (+ 0.1 ml/50 ml, o 0.25 ml/50 ml, □ 0.5 ml/50 ml, Δ 1 ml/50 ml, ◇ 2 ml/50 ml, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l (NH₄)SO₄, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b:7.0).

7.10. Başlangıç pH'sının Etkisi

Farklı başlangıç pH'larında (5, 6, 6.5, 7, 8) yapılan deney sonuçları Şekil 7.15.'de verilmiştir. Başlangıç pH'sının değişmesiyle enzim üretiminde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ortam pH'sının kısa süre sonra tüm deneylerde aynı noktaya geldiği görülmüştür. pH'daki bu değişim başlangıçtan itibaren doğal substratın bünyesinde bulunan proteinlerin ortama salgılanmasıyla ve daha sonraki pH artışı ise mikroorganizmanın protein üretimi ile açıklanabilir (Tanyıldızı, 2005). Enzim üretiminin maksimum olduğu zaman dilimlerinde ortam pH'sında yaklaşık olarak aynı ve paralel bir trend izlediği görülmektedir.

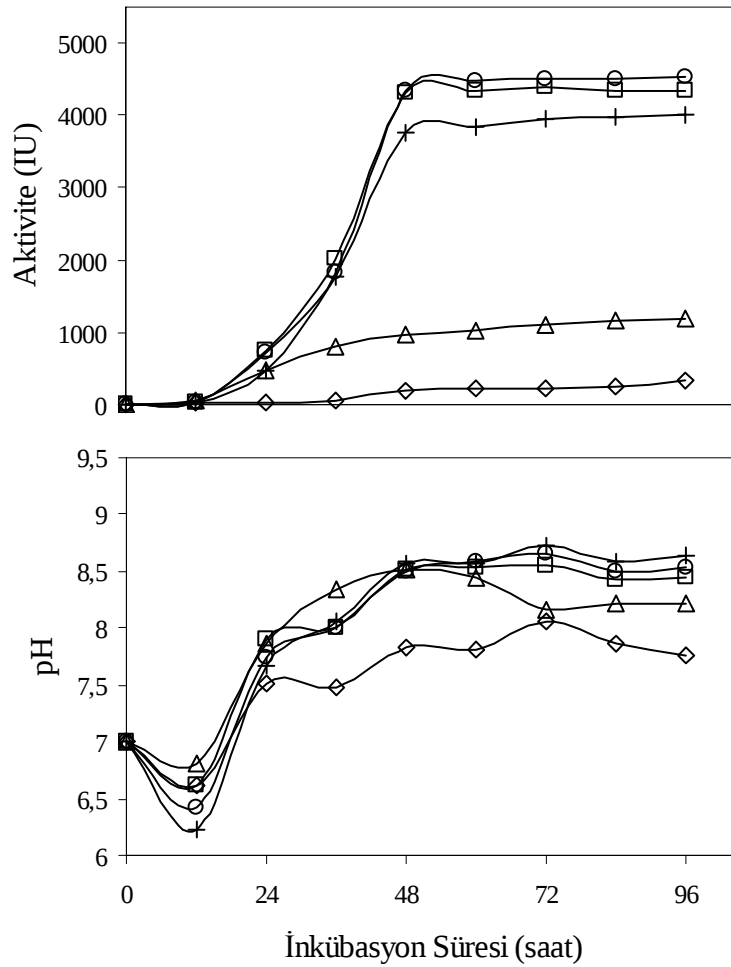


Şekil 7.15. Başlangıç pH'sının enzim aktivitesine etkisi (+ 5, o 6, □ 6.5, Δ 7, ◇ 8, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l (NH₄)SO₄, 20 g/l FK, KH:150 rpm, T:37°C, pH_b:7.0).

7.11. Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi

Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 7.16.'da verilmiştir. Bu amaçla beş farklı ortam sıcaklığında (30, 33, 37, 40, 45 °C) deneyler yapılmıştır. KSF'unda sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın

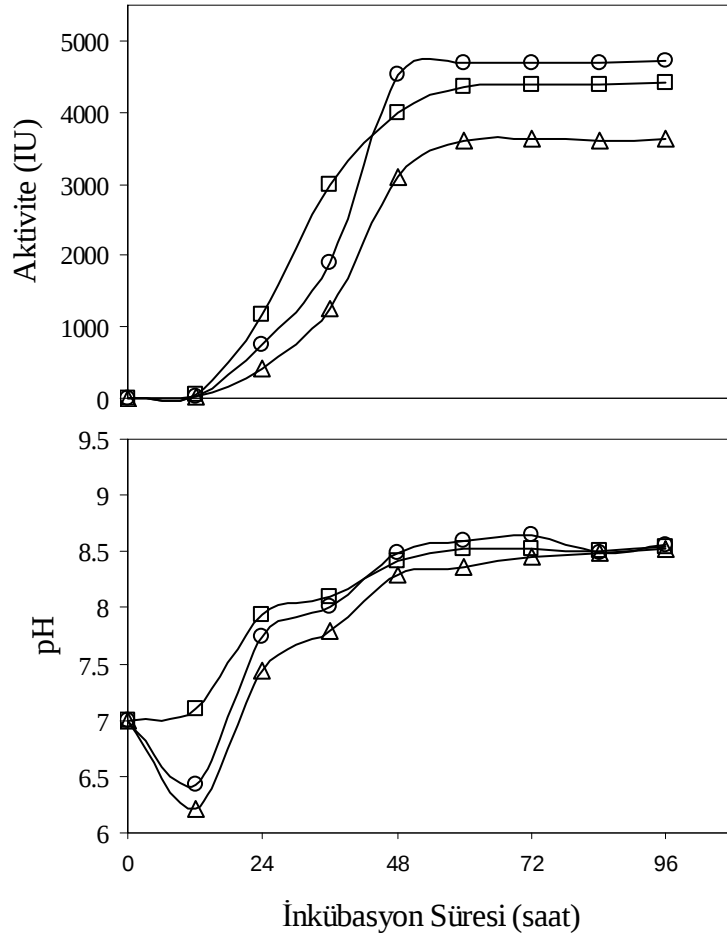
gelişebilmesi, enzim yada metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığıyla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sodhi vd., 2005). Genellikle katı substrat fermantasyonunda ortam sıcaklığı 25-32 °C aralığında değişmektedir ve mikroorganizmanın büyüme kinetiğine bakıldığında sıcaklığa bağlı olarak bu sıcaklık aralıklarında kararlı kaldığı belirtilmektedir (Krishna vd., 1996). 30, 33 ve 37 °C’de yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktiviteleri oldukça yakın olmalarına rağmen maksimum enzim üretimi 33 °C’de yapılan deneylerde elde edilmiştir ve bu sıcaklık literatürde belirtilen sıcaklık değerlerine oldukça yakındır. Ortam sıcaklığının 37 °C’den 33 °C’ye düşürülmesiyle maksimum enzim üretiminde bir artış gözlenmiştir. Sıcaklığın 37 °C’den 45 °C ye çıkarılmasıyla da enzim üretiminde yaklaşık olarak % 93’lük bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca fermantasyon sıcaklığındaki bu azalma ortamın buharlaşma hızını düşürmesi açısından da avantaj sağlamaktadır.



Şekil 7.16. Farklı ortam sıcaklıklarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (+ 30 °C, o 33 °C, □ 37 °C, Δ 40 °C, ◇ 45 °C, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l (NH₄)SO₄, 20 g/l FK, KH:150 rpm, pH_b:7.0).

7.12. Çalkalama Hızının Etkisi

Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanında ortam şartlarının da etkin olduğu bilinmektedir. Sentetik ortama göre, doğal substratların kullanıldığı ortamlarda oksijen transferinin daha yavaş olduğu bilinmektedir. Oksijen transferini önemli oranda etkileyen çalkalama hızının incelendiği deney sonuçları Şekil 7.17.'de verilmiştir. 100 ve 200 rpm de yapılan deney sonucunda enzim üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, derin fermentasyona göre daha viskoz olan katı substratın kullanıldığı ortamda düşük karıştırma hızında oksijen transferi sınırlanmakta, yüksek karıştırma hızlarında ise mikroorganizmanın gelişmesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Düşük karıştırma hızında incelenen deneyde pH değerindeki değişimin daha yavaş olması, fermentasyonun oksijen sınırlandırmasından ve/veya katı substrata bağlı nutrienlerin ortama yeterince geçememesinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Maksimum enzim üretiminin 150 rpm karıştırma hızında yapılan deneyde elde edilmiştir.



Şekil 7.17. Çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine etkisi (Δ 100 rpm, ○ 150 rpm, □ 200 rpm, 5 g/l Pepton, 2.5 g/l YE, 5 g/l (NH₄)SO₄, 20 g/l FK, T:33 °C rpm, pH_b:7.0)

Tablo 7.1. Yapılan deneylerde elde edilen sonuçların ve optimum ortamın gösterimi (KH:150 rpm, pH_b:7.0, T:33°C).

	Diğer Bileşenler	Substrat	Konsantrasyonlar	Maksimum Enzim Aktivitesi (IU)
Azot Kaynaklarının Etkisi	10 g/l Fındık Küspesi	Pepton	1 (g/l)	1070
			2.5 (g/l)	1585
			5 (g/l)	2063
			7.5 (g/l)	1975
			10 (g/l)	1937
			20 (g/l)	1239
		Yeast Ekstrakt	1 (g/l)	824
			2.5 (g/l)	1201
			5 (g/l)	1127
			10 (g/l)	1067
			15 (g/l)	930
			20 (g/l)	863
		(NH ₄)SO ₄	2.5 (g/l)	887
			5 (g/l)	1415
			7.5 (g/l)	1901
			10 (g/l)	2039
		NaNO ₃	2.5 (g/l)	704
			5 (g/l)	504
		Pepton + Y.E. + (NH ₄)SO ₄	5 (g/l) + 2.5 (g/l) + 0 (g/l)	2437
			5 (g/l) + 2.5 (g/l) + 1 (g/l)	2710
			5 (g/l) + 2.5 (g/l) + 2.5 (g/l)	2871
			5 (g/l) + 2.5 (g/l) + 5 (g/l)	3437
			5 (g/l) + 2.5 (g/l) + 7.5 (g/l)	3427
Karbon Kaynağı Etkisi	5 (g/l) Pepton, 2.5 (g/l) Y.E., 5 (g/l) (NH ₄)SO ₄	Fındık Küspesi	10 (g/l)	3437
			15 (g/l)	3584
			20 (g/l)	4531
			30 (g/l)	4400
			40 (g/l)	4183
Elementlerin Etkisi	5 (g/l) Pepton, 2.5 (g/l) Y.E., 5 (g/l) (NH ₄)SO ₄ , 20 (g/l) F.K.	KH ₂ PO ₄	0 (g/l)	4531
			0.5 (g/l)	4419
			1 (g/l)	4411
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0 (g/l)	4531
			0.5 (g/l)	4499
			1 (g/l)	4486
		CaCl ₂ .2H ₂ O	0 (g/l)	4531
			0.5 (g/l)	4066
			1 (g/l)	3984
		NaCl	0 (g/l)	4531
			0.5 (g/l)	4527
			1 (g/l)	4510
Optimum Ortam		Fındık Küspesi	20 (g/l)	4531
		Pepton	5 (g/l)	
		Yeast Ekstrakt	2.5 (g/l)	
		(NH ₄) ₂ SO ₄	5 (g/l)	

8. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bacillus amyloliquefaciens ile α -amilaz üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelendiği bu çalışmada aşağıdaki genel sonuçlar elde edilmiştir.

1. Karbon kaynağı olarak fındık küspesinin kullanılmasının mikroorganizmanın enzim üretebilmesi için yeterli olduğu belirlenmiştir.
2. Organik ve inorganik azot kaynaklarının enzim üretimini artırdığı belirlenmiştir.
3. Enzim üretiminde Ca^{++} iyonunun önemli bir rolü olmasına rağmen yapılan çalışmada pozitif bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.
4. Yapılan çalışmada, literatürde α -amilaz üretiminde önemli rol oynadığı belirtilen KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$ gibi bileşiklerin enzim üretimini artırmadığı belirlenmiştir. Bu bileşenlerin önemli bir etkiye sahip olmaması, kullanılan doğal substratın bünyesinde bulunmasıyla açıklanabilir ve bu maddelere ihtiyaç duyulmaması ortam maliyetini azaltmak yönünden önemlidir.
5. Ortamda ilave azot kaynaklarının bulunmadığı deneyde, enzim üretiminin oldukça düşük olduğu ve mikroorganizmanın da enzim üretebilmesi için ilave azot kaynaklarına ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda ortama ilave edilen pepton (5 g/l), yeast ekstrakt (2,5 g/l), $(NH_4)_2SO_4$ (5 g/l) gibi azot kaynaklarıyla maksimum enzim aktivitesine ulaşılmış ve yaklaşık 18 katlık bir artış değeri gözlenmiştir.
6. Fermantasyon sıcaklığının enzim üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve sıcaklık değerlerinde küçük değişikliklerin enzim üretimini büyük ölçüde etkilediği belirlenmiştir.

7. Fındık küspesinin endüstriyel α -amilaz üretiminde etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.
8. Fermantasyon süresinin, literatürdeki sentetik ortamlarda yapılan çalışmalarla kıyaslandığında daha uzun olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu oksijenin ve nütrientlerin ortama geçişinin sentetik ortamlara nazaran daha yavaş olması gösterilebilir.

Öneriler ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Doğal ortamda incelenen α -amilaz üretimi karıştırmalı fermantörlerde incelenebilir. Aşırı köpük oluşumundan dolayı bu çalışma karıştırmalı fermantörde yapılamamıştır. Farklı fermantör tipleri kullanılmak suretiyle enzim üretimi arttırılırken süreyi kısaltmak mümkün olabilir.
2. Daha sonraki çalışmalarda üretilen enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılabilir.

9. KAYNAKLAR

- Abate M.A., Castro G.R. Sineriz F., Callieri D.A.S., 1999, 'Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*', *Biotechnology Letters*, 21, 249-252.
- Alam, S., Hong, J. and Weigand, W. A. ,1989, Effect of yeast extract on α -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 780-785.
- Andersson, E., Hahn-Hagerdal, B., 1988, High concentration of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force α -amylase production with *Bacillus amyloliquefaciens* in aqueous two-phase systems and PEG solution, *Appl. Microb. And Biotech.*, 29,329-336.
- Arslan, N., 1999, Gıda Kimyasına Giriş, Çağ Ofset , Elazığ.
- Atlas R.M. 1994, *Microorganisms in our World*, Mosby, pp724-726.
- Babu K.R., Satyanara T., 1995, α -amylase Production by Thermophilic *Bacillus coagulans* in Solid State Fermentation, *Process Biochemistry*, 30,4,305-309.
- Bahar, T., 1996, Enzim immobilizasyonu için manyetik polistiren partiküllerin hazırlanması ve bu partiküllerdeki immobilize edilmiş glukoamilazın manyetik olarak stabilize edilmiş akışkan yatak reaktör (MSAYR)'de kullanılması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 3-17, Ankara.
- Bajpai, P., Bajpai, P. K., 1989, High-temperature alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 72-78.
- Bajpai, P., Gera, R. K. and Bajpai, P. K., 1992, Optimization studies for the production of α -amylase using cheese whey medium, *Enz. Microb. Technol.* 14, 670–683.
- Baysal, Z., Uyar, F., Aytekin Ç., 2003, Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water, *Process Biochemistry*, 38 , 1665- 1668.

Bernfeld P., 1951, Enzymes of Starch Degradation and Synthesis, Adv. In Enzymology, 12, 379-428.

Berovic, M., Ostrovernik, 1997, Production of *Aspergillus niger* pectolytic by solid state bioprocessing of apple pomace, Journal of Biotechnology, 53, 47-53.

Bulut, Ş., 2001, *Rhizopus Oryzae*'den Laktik Asit Üretimi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.

Cheng, C.,Y., Yabe , I., Toda, K.,1989, Predominant growth of α -amylase regulation mutant in countinuous culture of *Bacillus caldolyticus*, J. Ferment Bioeng., 67, 176-181.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu B., 2002, Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, Process Biochemistry, 38, 615-/620.

Emtiazi, G., Nahvi, I., 2000, Multi-enzyme production by *Cellulomonas sp.* grown on wheat straw, Biomass and Bioenergy, 19, 31-37.

Ergün, A., Çolban, İ., Yıldız, G., Küçükeraslan, S., Tuncer, Ş.,D., Yalçın S., Küçükeraslan M.K., Şehu, A., 2004, Yemler yem hijyeni ve teknolojisi, Ankara.

Farez-Vidal, M.E., Fernandez-Vivas, A., Arias, J.M., 1992, Journal of Applied Bacteriology, 213, 148-156.

Fishcher, E.H., Stein E.A., 1961, Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 313.

Fogarty, W., M., 1983, Microbial Enzymes and Biotechnology, Aplied Science, 2-72.

Fukomoto,J, Yamamoto,T., Tsuru, D.,1958, Proc intern symp, Enzyme Chem, Tokyo Kkyoto, 365-369, Tokyo.

Gonzalez, G., V., Torres, E., F., Aguilar, C.N., Gomez, S., J., R.,Godynez, G., D., Augur., C., 2003, Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, Biochemical Engineering Journal, 13, 157–167.

Gözükara, E.,M., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

Greenwood, C.,T., 1970, Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry, Vol II, second edition, Academic Pres, New York, 471-514.

Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., 1999, Production and properties of the raw starch digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435, Process Biochemistry, 35, 27-31.

Helow, E.R., El-Gazerly, M.A., 1996, *Bacillus subtilis* α -amylase, lichenase, β -mannanase and xylanase: screening for their induction by agro-industrial byproducts and precipitation by organic solvents, J. Basic Microbiol. 36, 75-81.

Ingle, M.R., Erickson, R.J., 1978, Bacterial alpha-amylases, Adv. Applied Microbiol. 24, 257-278.

Jin F. Cheng, X., Shi Y., Zhang, C., 1990, İsolation of new thermophilic aerobic bacteria which produce thermostable α -amylase, J. Gen . Appl. Microbiol. 36, 415-424.

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

Kelly, C. T., Bolton, D. J., Fogarty, W. M., 1997, Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation, Biotechnol. Lett., 19, 675-677.

Kılıç, D., 2002, Mısır nişastasının hidrolizinde α -amilaz enziminin aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Larabeke V., Eagler, G., Holster , M., “Nature”, 1974, 252, 169-170.

Lehniger, A.,L., 1987, Sugars, Storage Polysacchardies and Cell Walls, Biochemistry, Worth Publihers, 277-303.

Lin, L. L., Chyau, C. C., Hsu, W. H., 1998, Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23., Biotechnol. Appl. Biochem, 28, 61-68.

Maarel, M. J.E.C., Veen B., Uitdehaag J. C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, Review article, Journal of Biotechnology, 94, 137–155.

Manning, G.B., Cambell, L.L., 1961, Thermostable Alpha amylase of *Bacillus stearothermophilus* crystallization and some general properties, J. Biol. Chem , 236, 2952-2957.

Milner, J. A., Martin, J. D. and Smith, A., 1996, Oxygen transfer conditions in the production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*, Enzyme Microb. Technology, 18, 507-512.

Omidiji, O., Amund, O. O., Braimoh, A. A. and Ilori, M. O., 1997, Purification and Properties of an α -Amylase Produced by a Cassava-Fermenting Strain of *Micrococcus luteus* Microbios 90, 155–162.

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

Orhan, A., 2002, *Rhizopus arrhizus*'dan Katı Hal Fermantasyonu ile Lipaz Üretimi, Yüksek lisans tezi, Fırat üniversitesi, Elazığ.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., 2000, Advances in microbial amylases, Biotechnol. Appl. Biochem. 31, 135–152

Pekin, B., 1980, Biyokimya Mühendisliği, Birinci Kitap İkinci Kısım, Ege Üniv., İzmir.

Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C. and Pastrana, L., 2003, Main characteristics and applications of solid substrate fermentation, Electron. J. Environ. Agric. Food Chem., 343-350

Pfueller S.L., Eliot W.H., 1969, The extraceluler α -Amylase of *Bacillus stearothermophilus*, J. Biological Chemistry, 244, 48-54.

Priest, G.P., 1977, Extracellular Enzymes synthesis in the Genus *Bacillus*, J. Biological Reviews, 41, 711-753.

Radley, J.A., 1976, Production Of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production Technology (L.A. Underkofler),16, 295-309, Aplied Science Publishers Ltd. Ripple Road, England.

Raimbault M., 1998, General and aspects of solid substrat fermentation, Electronic journal of Biotechnology, 1,3, 174-181.

Ramachandran, S., Patel, A.,K., Nampoothiri K.,M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G., Pandey A., 2004, Coconut oil cake, a potential raw material for the production of α -amylase, Bioresource Technology, 93, 169–174.

Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F., 1987, Biotechnology, 7a, 5-100, Vch, New York.

Robinson,T., Nigam, P., 2003, Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation, Biochemical Engineering Journal, 13, 197–203.

Robyt, J. R., Ackerman, R. J., Chittenden, C. G., 1971, Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: A case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in *Aspergillus oryzae* alpha amylase, papain, and lysozyme., Archives of Biochemistry and Biophysics, 147, 262-269.

Sağiroğlu, A.K., 1999, Bilim ve Teknik, No:383, 74-80.

Saha B., C., 2000, Enzymes in Biotechnology, Fermentation Biotechnology Research Unit National Center for Agricultural Utilization Research Agricultural Research Service, USA.

Santos, E., O., Meire Lelis Leal Martins M., L., L., 2003, Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus sp.*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 46, 1, 129-134.

Sarıkaya, E., 1995, Alfa Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniv, Ankara.

Schaiffer, P., 1969, Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins, Bacteriol Rev., 33, 48-71.

Sodhi, H., K., Sharma, K., Gupta, J.K., Soni S.K., 2005, Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus sp.* PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, 40, 525-534.

Souza, E. L., Hoffmann, E. H. E., Castilho, V. M., de Lima, V. A. and Bellini, M. Z., 1996, Arq. Biol. Technol. 39, 831–839

Srivastana, R., A., K., 1987, Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*, Enzyme Microbial Technology, 9, 12, 749-754.

Syu M., Chen., Y.H, 1997, A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*, Chemical Engineering journal, 65, 237-247.

Tanyıldızı, M. Ş., 2005, Çeşitli bakteri türleriyle farklı ortam ve çalışma şartlarında α -amilaz üretiminin incelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Tatar, F., 1997, *Aspergillus niger* Kullanarak Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi Üzerinde Araştırmalar, Yüksek Lisans Semineri, Uludağ Üniv., Bursa.

Telefoncu, A., 1986, Temel Ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniv, İzmir.

Teodoro, C.E.S., Martins, M.L.L., 2000, Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.*, Brazilian Journal of Microbiology, 31, 298-302.

Tolan V. ,1997, Endosülfanın *Bacillus subtilis*'te üreme, plazmit ve α -amilaz sekresyonu üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniv., Diyarbakır.

Topal, S., 1985, Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi Ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri, Gıda, 10(1), 25-37.

Tüba, 1996, Genetik-Gen Mühendisliği-Biyoteknoloji Alanına Yönelik Politikalar Çalışma Grubu Raporu, Ankara.

Ülger, C., Çırakoğlu, Ç., 1992, Hacettepe Buletion of Natural Sciences and Engineering,21,33-42.

Ülger, C., 1997, Production of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase in aqueous two phase systems, Doktora Tezi, Hacettepe Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Windish, W.W., Mhatre, N.S., 1965, Microbial Amylase, Adv. Appl. Microbial., 7, 273-304.

Wiseman, A., 1987, Handbook of Enzyme Biotechnology, 3, The Application of Enzyme in Industry, 275-373.

Yağız, M., 2000, Rekombinant *B. subtilis* ile alkali proteaz üretimi için kompleks üretim ortamı tasarımı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. ANKARA.

Yamamoto T., Umeki, K., 1972, Structures of branched dextrans produced by saccharifying α -amylase of *Bacillus subtilis*, J Biochem, 72, 1219-1226.

Yoo Y.J., Camdan T.W., Hong J., Hatch R.T., 1988, Kinetics of α -amylase synthesis from *Bacillus amyloliquefaciens*, Biotechnology and Bioengineering, 31, 357-365.

www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/sources.html

10. EKLER

Ek.1.

Tablo E1.1. Fındık küspesi bileşimi (Ergün vd., 2004).

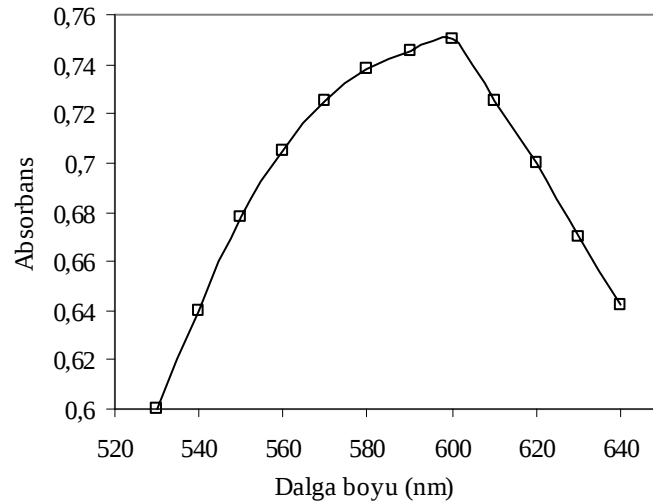
Küspe	Yapılan Analiz Sonuçları				
	Kuru Madde	Ham Protein	Ham Yağ	Ham Selüloz	Diğer
Fındık Küspesi	95.54	22.43	7.79	7.95	57.37

Tablo E1.2. Doğal substratlarla yapılan deneylerde kullanılan musluk suyunun mineral içeriği

Mineraller	ppm
Kalsiyum	67.9
Fosfor	-
Potasyum	1.28
Klor	18
Magnezyum	% 0.29
Kükürt	% 0.6
Sodyum	26.1
Demir	-
Çinko	18
Mangan	-
pH	6.94

Tablo E1.3. %5'lik nişasta çözeltisinin dalga boyu taraması.

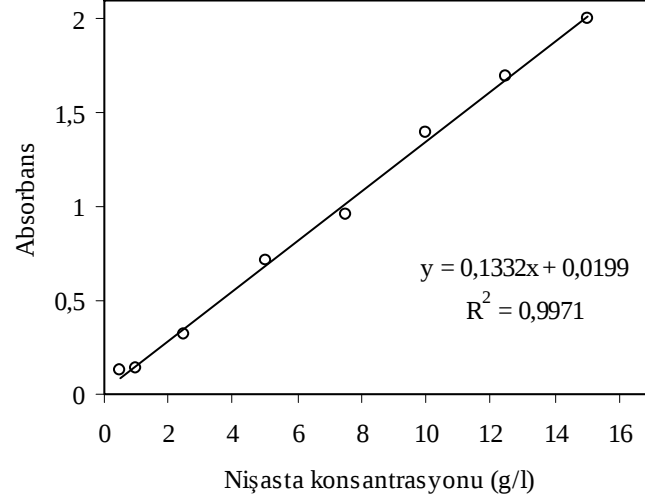
Dalga Boyu(nm)	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
Absorbans	0.6	0.64	0.68	0.70	0.72	0.74	0.74	0.75	0.72	0.7	0.67	0.64



Şekil.E1.1. Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri.

Tablo E1.4. Nişasta çözeltisinin kalibrasyon verileri.

Nişasta (g/l)	0.5	1	2.5	5	7.5	10	12.5	15
Abs. (600nm)	0.125	0.135	0.321	0.715	0.955	1.4	1.7	2



Şekil.E1.2. 600 nm’de nişasta kalibrasyon grafiği.

Fosfat Tamponu: 0.1 M KH_2PO_4 ’den 868.4 ml, 0.1 M K_2HPO_4 ’den 131.6 ml alınıp içerisinde 0.025 N NaCl konularak hazırlanmıştır (pH=6.2).