

***BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*'DEN SOYA KÜSPESİ
KULLANILARAK α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

Ali YARAŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Dursun ÖZER
OCAK-2011**

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

***BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*'DEN SOYA KÜSPESİ KULLANILARAK
 α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali YARAŞ

(07118102)

Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği

Programı: Proses ve Reaktör Tasarımı

Danışman: Prof. Dr. Dursun ÖZER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14 Ocak 2011

OCAK-2011

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS'DEN SOYA KÜSPESİ KULLANILARAK
 α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

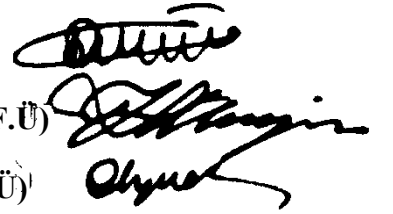
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali YARAŞ

(07118102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24 Aralık 2010
Tezin Savunulduğu Tarih : 14 Ocak 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dursun ÖZER (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. H.Soner ALTUNDOĞAN (F.Ü)
Doç. Dr. Arzu Yadigar DURSUN (F.Ü)



OCAK-2011

ÖNSÖZ

Canlılar için oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, enzimlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

“*Bacillus amyloliquefaciens*’den Soya Küspesi Kullanılarak α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi” konulu FÜBAP projesinde, tarımsal yan ürün olan soya küspesinin günümüzde endüstriyel alanlarda kullanılan α -amilaz üretimi için besi ortamı olarak değerlendirilebilirliği incelendi.

Çalışmam süresince, engin tecrübesi ve yapmış olduğu değerlendirmeler ile bana yol gösteren, yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren yardımlarını benden esirgemeyen ve her aşamada beni destekleyen tez danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Dursun ÖZER’e,

Çalışmam sırasında hiçbir yardımdan kaçınmayan ve bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan Sayın Hocalarım Yrd. Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI’na ve Arş. Gör. Veyis SELEN’e,

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemedi, hayatımın her anında yanımda olan sevgili aileme,

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan FÜBAP’a ve sağlanan uygun çalışma koşulları nedeniyle Kimya Mühendisliği Bölümüne,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ali YARAŞ
ELAZIĞ-2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMLER	3
2.1. Enzimlerin Özellikleri.....	3
2.2. Enzimlerin Yapısı	4
2.3. Enzimlerin Etki Mekanizması.....	4
2.4. Enzimatik Reaksiyonların Hızına Etki Eden Faktörler	6
2.4.1. Sıcaklığın Etkisi	6
2.4.2. pH' nın Etkisi.....	7
2.4.3. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	8
2.4.4. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	8
2.4.5. Enzim İnhibitörleri	9
2.5. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması	9
2.6. Enzim Kaynakları.....	11
2.6.1. Bitkisel Kaynaklı Enzimler.....	11
2.6.2. Hayvansal Kaynaklı Enzimler.....	11
2.6.3. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler	13
2.7. Kullanım Amaçlarına Göre Enzimler	13
2.8. Salgılanma Şekillerine Göre Enzimler	14
2.8.1. İntraselüler Enzimler.....	14
2.8.2. Ekstraselüler Enzimler	14
3. FERMANTASYON	15
3.1. Substratın Seçimi ve Hazırlanması	15
3.1.1. Substratın Sterilizasyonu.....	16
3.1.2. Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler	16
3.1.3. Fermantasyon Sıvısından Biyokütlenin Kazanılması.....	17
3.1.4. Ürünün Kazanılması.....	18
3.2. Fermantasyon ile Enzim Üretim Yöntemleri.....	18
3.2.1. Katı Substrat Fermantasyonu	18
3.2.2. Katı Substrat Fermantasyonunun Avantajları ve Dezavantajları.....	20
3.2.3. Katı Substrat Fermantasyonu Uygulama Alanları.....	22
3.2.4. Katı Substrat Fermantasyonu ile Enzim Üretimi.....	22
3.3. Daldırmalı Fermantasyon Yöntemi (Derin Kültür Fermantasyonu).....	23
3.4. Fermantasyon İşlemlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar	25
3.4.1. Bakteriler	25
3.4.2. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler	26
3.4.3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27

4.	AMİLAZLAR	29
4.1.	Amilazların Sınıflandırılması	31
4.1.1.	Asidik Amilazlar	32
4.1.2.	Termofilik Amilazlar	33
4.1.3.	Alkalın Amilazlar.....	33
4.2.	α -Amilaz Enziminin Özellikleri.....	34
4.3.	Amilazların Endüstriyel Uygulama Alanları	35
4.4.	Türkiye’ de Amilaz Enzimi Üretimi.....	36
4.5.	α -Amilaz Üretimi İle İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar	37
5.	MATERYAL ve METOT	44
5.1.	Mikroorganizma	44
5.2.	Bakteri Üretim Besi Yerleri ve Koşulları.....	44
5.3.	Doğal Substrat İçeren Fermantasyon Ortamı	45
5.4.	Yapılan Analizler	46
5.4.1.	Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	46
6.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	48
6.1.	Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	48
6.1.1.	Soya Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi	49
6.1.2.	Mısır Proteini Konsantrasyonunun Etkisi	49
6.1.3.	Buğday Kepeği Konsantrasyonunun Etkisi	50
6.1.4.	Fındık Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi	51
6.1.5.	Peynir Altı Suyu Konsantrasyonunun Etkisi.....	53
6.2.	Azot Kaynaklarının Etkisi.....	55
6.2.1.	Peynir Altı Suyu Konsantrasyonunun Etkisi.....	56
6.2.2.	Pepton Konsantrasyonunun Etkisi.....	56
6.2.3.	Yeast Ekstrakt Konsantrasyonunun Etkisi	56
6.2.4.	Üre Konsantrasyonunun Etkisi	58
6.2.5.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konsantrasyonunun Etkisi	59
6.2.6.	NaNO_3 Konsantrasyonunun Etkisi	60
6.2.7.	NH_4NO_3 Konsantrasyonunun Etkisi	61
6.3.	NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	62
6.4.	Sıcaklığının Etkisi	64
6.5.	Çalkalama Hızının Etkisi.....	65
6.6.	Başlangıç pH’sının Etkisi.....	66
6.7.	Ekim Konsantrasyonunun Etkisi	67
7.	ÖNERİLER.....	71
	KAYNAKLAR.....	72
	EKLER.....	78
	ÖZGEÇMİŞ	80

ÖZET

Bu çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 ile soya küspesinden α -amilaz üretimi için gerekli olan proses şartları ve ortam parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Çalışmada ilk olarak α -amilaz üretimi üzerine soya küspesinin yanı sıra buğday kepeği, mısır proteini, fındık küspesi, peynir altı suyu gibi ilave karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Daha sonra α -amilaz üretimi üzerine organik ve inorganik azot kaynakları, NaCl, ekim konsantrasyonu, sıcaklık, karıştırma hızı ve başlangıç pH'sı gibi parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

İlave karbon kaynağı olarak kullanılan buğday kepeği, mısır proteini, fındık küspesi, peynir altı suyu gibi doğal substratların enzim üretiminde pozitif yönde bir etkiye sahip oldukları görülmüştür. Üre, NH_4NO_3 ve NaNO_3 gibi azot kaynaklarının enzim üretimi üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu ve aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir. Ortam bileşiminin yanı sıra sıcaklık ve karıştırma hızı gibi fiziksel parametrelerin de enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda maksimum enzim üretimi (4257 U) 20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, %5(v/v) peynir altı suyu, 1 g/l pepton, 0.5 g/l yeast ekstrakt, 2.5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren fermentasyon ortamında, 33 °C ve 150 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Diğer ortam bileşenlerinin ise enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durum mikroorganizmanın farklı ortamlarda ihtiyaç duyduğu bu elementlerin kullanılan doğal substratlardan ve musluk suyundan karşıladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: α -amilaz, *B.amyloliquefaciens*, Soya Küspesi.

SUMMARY

Investigation of α -Amylase Production By *Bacillus Amyloliquefaciens* By Using Soybean Meal

In this study, the effect of medium parameters and required process conditions on α -amylase enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 using soybean meal were investigated. Firstly, in addition to soybean meal, the effect of additional carbon sources such as wheat bran, corn protein, hazelnut oil cake and whey on α -amylase production were investigated. Then, the effect of parameters such as organic and inorganic nitrogen sources, NaCl, inoculum concentration, temperature, shaking speed and initial pH on α -amylase production were investigated.

Natural substrates are used as additional carbon sources such as soybean meal, wheat bran, corn protein, hazelnut oil cake and whey that have a positive effect on enzyme production, were found. Nitrogen sources such as urea, NH_4NO_3 and NaNO_3 have negative effect on enzyme production and decrease activity. Besides medium composition, physical parameters such as temperature and shaking speed have effect on enzyme activity was deduced.

Maximum enzyme production was obtained as 4257 U in fermentation medium containing 20 g/l soybean meal, 5 g/l wheat bran, %5 (v/v) whey, 1 g/l peptone, 0.5 g/l yeast extract, 2.5 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. This shows that microorganism in different mediums compensate needty of these elements from natural substrate and tap water.

Key words: α -amylase, *B.amyloliquefaciens*, Soybean Meal.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Anahtar ve kilit modeli	5
Şekil 2.2	Uyarılmış biçimleme modeli	6
Şekil 2.3.	Enzim tepkimesinin hızı ile sıcaklık arasındaki değişim	7
Şekil 2.4.	Enzimatik tepkimenin hızı ile pH arasındaki değişim	7
Şekil 3.1.	Fermantasyon akım şeması	17
Şekil 3.2.	Katı maddelerin kültür karışımından ayrılmaları	18
Şekil 3.3.	Bakterilerin çeşitli şekil ve dizilişleri	26
Şekil 3.4.	Bakteriyel hücreleri içeren <i>Bacillus</i> sporları	27
Şekil 3.5.	Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması	28
Şekil 4.1.	Amilaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	31
Şekil 4.2.	Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler.....	32
Şekil 5.1.	Enzim üretiminde takip edilen yol.....	46
Şekil 6.1.	Soya küspesi konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	50
Şekil 6.2.	Mısır proteini konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	51
Şekil 6.3.	Buğday kepeği konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	52
Şekil 6.4.	Fındık küspesi konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 6.5.	Peynir altı suyu konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	54
Şekil 6.6.	Peynir altı suyu konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	57
Şekil 6.7.	Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.....	58
Şekil 6.8.	Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	59
Şekil 6.9.	Üre konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	60
Şekil 6.10.	(NH ₄) ₂ SO ₄ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.....	61
Şekil 6.11.	NaNO ₃ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	62
Şekil 6.12.	NH ₄ NO ₃ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.....	63
Şekil 6.13.	NaCl konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	64
Şekil 6.14.	Farklı ortam sıcaklıklarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi.....	65
Şekil 6.15.	Çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine etkisi	66
Şekil 6.16.	Başlangıç pH'ının enzim aktivitesine etkisi.....	67
Şekil 6.17.	Ekim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	68

Ek Şekil 1.1. Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri.....	81
--	----

TABLÖLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Bazı enzimlerin optimum pH'ları	8
Tablo 2.2 α -Amilaz ailesi (GH)	12
Tablo 2.3. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar	13
Tablo 2.4. Çeşitli enzimler ve endüstride kullanım alanları	14
Tablo 3.1. Çeşitli çalışmalarda kullanılan katı substratlar	21
Tablo 3.2. Katı substrat fermantasyonunun ekonomik sektörlerdeki uygulama alanları.....	23
Tablo 4.1. Bazı amilazların Ca^{+} iyonu gereksinimleri.....	30
Tablo 4.2. Bazı <i>Bacillus</i> türlerine ait nişastayı hidrolize eden termostabil enzimler ve kaynakları	34
Tablo 4.3. Ticari olarak piyasada yer alan amilazlar	37
Tablo 4.4. Türkiye' de ithalat yoluyla sağlanan toplam enzim miktarları ve ödenen para değerleri	37
Tablo 4.5. Amilazların uygulama alanları	39
Tablo 4.6. Farklı türden mikroorganizma kullanarak değişik C ve N kaynaklarıyla α -amilaz üretimi üzerine yapılan çalışmalar	42
Tablo 5.1. Deneylerde kullanılan bakterinin saklanması ve geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri	44
Tablo 6.1. Karbon kaynaklarının α -amilaz aktivitesine etkisi	55
Tablo 6.2. Azot kaynaklarının α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Ek Tablo 1.1. Soya küspesi, buğday kepeği ve mısır proteini bileşimleri.....	80
Ek Tablo 1.2. Fındık küspesi bileşimi	80
Ek Tablo 1.3. Peynir altı suyu bileşimi	80
Ek Tablo 1.4. %5'lik nişasta çözeltisinin dalga boyu taraması	81

SEMBOLLER LİSTESİ

KH	: Karıştırma hızı
pH_b	: Başlangıç pH'sı
T	: Sıcaklık (°C)
rpm	: Devir/dakika

1. GİRİŞ

Enzimler kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan salgılanan protein yapısında moleküllerdir. Enzim hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte enzimlerin üretimi daha yakın bir zamanda önem kazanmıştır. Buna bağlı olarak enzim biyoteknolojisindeki gelişmeler sayesinde endüstriyel öneme sahip enzimlerin daha saf, ucuz ve bol miktarda üretilmesi sağlanmıştır.

Tarihsel gelişim açısından bakıldığında enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal kaynaklı enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilik ve genetik manipülasyonlar açısından mükemmel birer enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca mikroorganizmaların ürettiği enzimler, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, ucuz ve fazla miktarda elde edilebilmelerinden dolayı hayvansal ve bitkisel kaynaklı dokulardan elde edilen enzimlere göre çok daha avantajlıdır. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı fermantasyon yoluyla elde edilmektedir (Gupta vd., 2003; Tanyıldızı, 2005).

Dünya genelinde endüstriyel enzimlerin ticari pazar payının oldukça yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Bu enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında % 29'unun gıda endüstrisinde, % 15'inin hayvan yemi sektöründe ve % 56'sının ise genel amaçlı teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir. Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Ticari olarak kullanılan enzimler arasında proteazlar ilk sırayı alırken karbonhidratazlar ikinci sırada yer almaktadır. Karbonhidratı parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık % 25'lik bir paya sahiptirler (Bhat, 2000; Sidhu vd., 1997).

Mikrobiyal enzimler arasında yaygın olarak kullanılan α -amilaz enzimi; gıda endüstrisinin farklı alanlarında, meyve suyu endüstrisinde, deterjan üretiminde, ilaç üretiminde, tekstil endüstrisinde ve alkol üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, *Bacillus amyloliquefaciens* ile soya küspesinden α -amilaz üretimine ilave karbon kaynakları, ilave azot kaynakları ve diğer ortam bileşenleri konsantrasyonlarının yanı sıra başlangıç pH'sı, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi fiziksel

parametrelerin etkileri incelenerek; endüstriyel bir yan ürün olan soya küspesinin değerlendirilebilirliğini araştırmaktır.

2. ENZİMLER

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen protein yapısına sahip biyomoleküllerdir. Enzimler, diğer proteinler gibi birbirlerine peptid bağları ile bağlanmış uzun aminoasit zincirlerinden oluşmaktadır. Yaşamın devamlılığı için enzimlerin varlığı önemlidir. Hayvan, bitki ve mikroorganizmaların hücrelerinde gerçekleşen karmaşık ve birbirleriyle bağlantılı kimyasal tepkimelerin hemen hemen hepsi enzim katalizörlüğünde gerçekleşir.

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonları hızlandırır. Teorik olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip, herhangi bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli aynı tepkimelere katılabilir. Ancak gerçekte durum böyle değildir. Çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır. Bütün enzimler proteindir ancak her protein enzim değildir. Ayrıca enzimatik reaksiyonlar çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Sağıroğlu, 1999).

Enzimler, ilk defa 1897'de Buncher tarafından canlı hücrelerden ekstrakte edilmiştir. İlk saf enzimin izolasyonu ise 1926'da Sumner tarafından gerçekleştirilmiştir. 1930-1936 yılları arasında pepsin, tripsin ve kemotripsin Norhtrop tarafından kristal halde izole edilmiştir. Günümüzde binlerce enzim tespit edilmiştir ve bunların çoğu saf halde izole edilebilmektedir.

2.1. Enzimlerin Özellikleri

- Enzimlerin tümü protein yapısındadır veya yapılarında protein kısım bulundurulur.
- Etki ettiği maddenin sonuna –az eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar. Örneğin, kitine etki eden kitinaz enzimi, lipide etki eden lipaz enzimi, proteine etki eden proteaz enzimi.
- Enzimin etki ettiği bileşiğe substrat denir. Bazı enzimler çok spesifiktir ve yalnızca bir substrata etki ederler. Örneğin üreaz sadece üreye ve fumaraz yalnız fumarik aside etki eder. Bazı enzimler ise çeşitli substratlara etki ederler.
- Enzimler hücrede takım halinde beraber çalışır. Bir enzimin son ürünü kendisinden sonraki enzimin substratını oluşturur. Örneğin amilaz enzimi nişastayı iki zincirli maltoza, maltaz enzimi ise maltozu tek zincirli glikoza çevirir.

- Teorik olarak enzimatik reaksiyonlar tersinirdir. Örneğin, lipaz enzimi yağı parçalar ve aynı zamanda gliserin ile yağ asitlerini birleştirir. Denge noktası yani tepkimenin hangi yöne gideceği termodinamik yasalarına göre belirlenir.

2.2. Enzimlerin Yapısı

Enzim molekülü, birbirine peptid bağlarıyla bağlanmış aminoasit moleküllerinden oluşan biyolojik bir polimerdir. Bu nedenle, enzim moleküllerine belirli bazı biyokimyasal tepkimeleri katalizleyebilecek özellikleri olan bir protein molekülü olarak bakılabilir. Enzimlerin katalitik etkileri molekülü oluşturan aminoasitlerin sayısı ve diziliş sırasına, aminoasit zincirinin hidrojen bağları, hidrofobik bağlar, elektrostatik çekim kuvveti ve disülfid bağları tarafından oluşturulan üç boyutlu sarmal yapısına ve aktif bölgede bulunan fonksiyonel grupların özelliklerine bağlıdır.

Enzimlerin yapısında genel olarak iki kısım bulunur. Bunlardan birine “apoenzim” diğerine de “kofaktör” (bazı hallerde koenzim) adı verilir. Bunların her ikisine birden “haloenzim” de denilmektedir. Saf haldeki enzimlerin mikroskop, elektron mikroskobu ve X ışınları spektroskopisi yöntemleriyle incelenmesi sonucunda bunların farklı yapıda katı ve kristal özellikte oldukları saptanmıştır.

Enzimlerin apoenzim kısmı büyük protein moleküllerinden oluşmuştur. Apoenzim protein yapısı yani proteinler içindeki aminoasitlerin türleri ve dizilişleri, enzimden enzime değişir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve spesifikliğini sağlayan kısım apoenzimdir. Bir kısım enzimler sadece proteinden oluştuğu halde bir kısımda metal iyonlarını da içerirler ve konjuge protein yapısındadırlar. Protein olmayan kısmına prostetik grup denir ve katalitik etkiden sorumludurlar. Ancak enzim etkisi için protein kısmına da ihtiyaç vardır. Apoenzime katalitik etki özelliği veren kısım kofaktördür. Apoenzimler yalnız başına hiçbir katalitik etki göstermezler. Kofaktörlerin ise yalnız oldukları zaman çoğunlukla enzime kıyasla çok düşük, bazı hallerde ise hiç katalitik etkileri yoktur. Ancak bir apoenzimle kofaktör bir arada olduğu zaman gerçek etkisi gözlenebilir.

2.3. Enzimlerin Etki Mekanizması

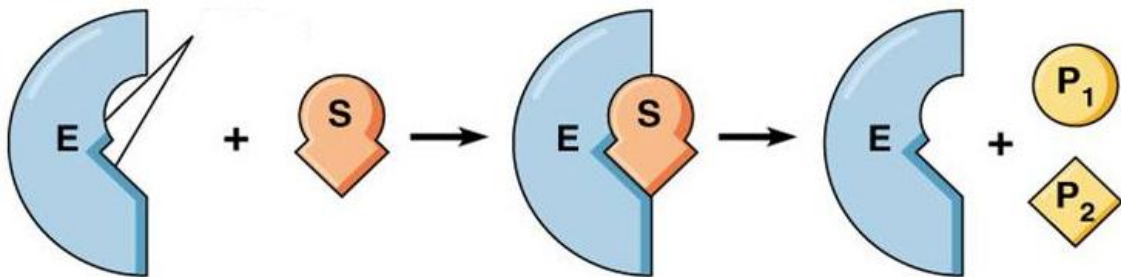
Biyokimyasal tanımlamalarda tepkimeye giren maddeye substrat (S) denir. Enzim aktivitesi “turnover sayısı” ile belirlenir. Turnover sayısı, 1 mol etkin enzim tarafından 1 dakikada (ya da 1 saniyede) ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanmıştır.

Genellikle enzimler belirli tepkimeleri katalize etmektedirler. Bu duruma enzimlerin spesifikliği denir. Enzimlerin katalitik özellikleri enzim molekülünün tümünden ileri gelmez. Bu özellik, molekülde bulunan bazı küçük bölgelerde gözlenmiştir. Bu kısımlara “aktif merkezler” veya “etkin bölge” denilmektedir.

Enzimlerin dönüştürdükleri substrata karşı gösterdikleri yüksek spesifiklik, tepkime hızının substrat konsantrasyonu ile değişim karakteri ve reaksiyona giren moleküllerin enzim deaktivasyonunu önleme özelliğinin belirlenmesi, enzimatik tepkimelerde ilk basamağın bir enzim-substrat arabileşğinin oluşumu olduğunu ortaya koymuştur. Bu arabileşğın, substrat molekülünün enzim üzerinde “aktif bölge” olarak adlandırılan bölgeye tutunması sonucu oluştuğu bilinmektedir. Aktif bölgenin, substrat molekülleri üzerinde bulunan bazı gruplarla etkileşim özelliğine sahip aminoasit yan gruplarının çok özgül ve üç boyutlu bir yapı oluşturabilecek şekilde dizilişı sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Enzimlerin gösterdikleri seçicilik, enzim-substrat etkileşimi için ileri sürülen modellerin çıkış noktası olmuştur. Tek evreli tepkime sistemleri için geliştirilen bu modellerden en temel olanları Fischer tarafından ileri sürülen “anahtar ve kilit modeli” ve Koshland tarafından ileri sürülen “uyarılmış biçimleme modeli”dir (Segel, 1975).

Anahtar ve Kilit Modeli: Bu model substrat molekülünün, enzim üzerinde kendisine geometrik olarak benzer ve değişmez bir şekli olan etkin bölgeye bağlanarak tepkimeye girdiğini varsayar (Şekil 2.1.).

Uyarılmış Biçimleme Modeli: Anahtar ve kilit modelinin birçok enzim tepkime mekanizmasını açıklayabilmesine karşın, modelin açıklayamadığı etkileşim türlerinin bulunması sonucunda, uyarılmış biçimleme modeli ileri sürülmüştür (Şekil 2.2.) (Segel, 1975).



Şekil 2.1. Anahtar ve kilit modeli (E: Enzim, S: Substrat, ES: Enzim-Substrat arabileşğı (Segel, 1975).

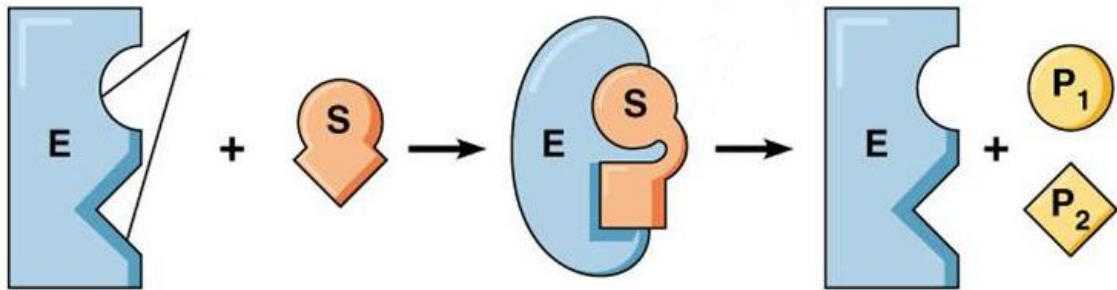
Substrat molekülüne kimyasal yapı olarak benzeyen ancak değişik yan gruplar içeren moleküllerin enzime sıkıca bağlanmasına karşın tepkimeye girmemesi, iki substratlı enzimatik tepkimelerde gözlenen substratların sıralı etkileşim özelliği, allosterik enzim davranışı, “cooperative” substrat bağlanması gibi gözlemler, substrat moleküllerinin sonucunda enzimde konformasyonel bir değişime sebep olması ve bu değişim sonucunda enzim üzerindeki gruplarla etkileşebilecek şekilde yönlendirilip biçimlenmesi şeklinde özetlenebilecek uyarılmış biçimleme modeli ile açıklanabilmektedir. Bu modele göre, bir molekülün tepkimeye girebilmesi için hem aktif bölgeye tutunması hem de aktif bölgedeki grupların uygun şekilde yönlendirilmesini sağlayacak değişimi gerçekleştirmesi gerekmektedir.

2.4. Enzimatik Reaksiyonların Hızına Etki Eden Faktörler

Molekül içi kuvvetler arasındaki denge, enzimlerin (proteinlerin) bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Çevredeki herhangi bir değişiklik, enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi tayin eder. Bir başka deyişle kararlı veya denatüre (bozunmuş) olmasını sağlar. Doğal enzimler sadece kendi çevrelerinde kararlıdır. Denatürasyon veya inaktivasyon koşullarında enzimlerin yapıları değişir ve bunun sonunda enzimler inaktif hale gelirler. Enzimatik reaksiyonların hızı; sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenir.

2.4.1. Sıcaklığın Etkisi

Enzimler protein yapısına sahip olduklarından dolayı belirli bir sıcaklıktan sonra yapısal değişmeye ve denatüre olmaya başlar. Bunun sonucu olarak da enzim aktivitesi azalır. Bu nedenle optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda enzim tepkimeleri yavaşlamaya başlar ve bir süre sonra enzim tamamen denatüre olacağından tüm aktivitesini kaybederek etkisiz hale geçer ve tepkime durur.

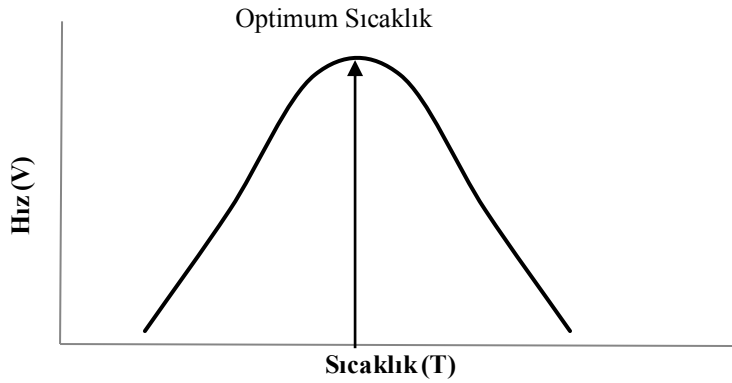


Şekil 2.2. Uyarılmış biçimleme modeli (Segel, 1975).

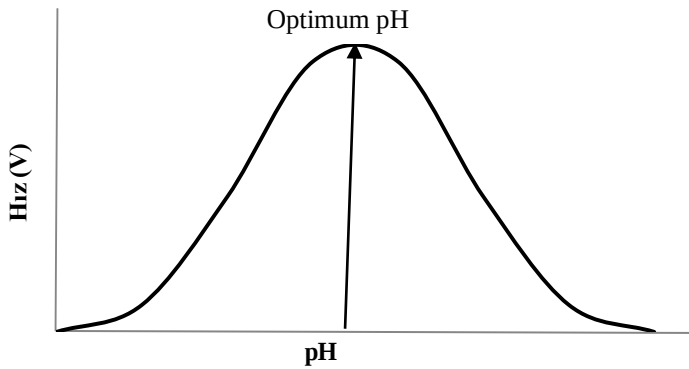
Bu nedenle enzimler, maksimum aktivite gösterdikleri bir optimum sıcaklığa sahiptirler. Genellikle enzimlerin çoğu 50-60 °C’de etkisiz (inaktif) hale geçmektedir. Bununla beraber 80-100 °C sıcaklığa kadar aktivitelerini koruyan enzimler de mevcuttur. Enzimatik reaksiyonun hızı ile sıcaklık arasındaki değişim Şekil 2.3.’de gösterilmektedir.

2.4.2. pH’ nın Etkisi

Enzimler asidik, bazik veya nötral gruplar içeren amino asitlerden oluşurlar. Bu gruplar çoğu kez enzimin aktif konumunun önemli bir parçasıdır ve katalitik aktivite için belli bir iyonlaşma durumunda olmaları gereklidir. Bu nedenle her enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğu özgün bir pH değeri vardır. Bu değerden yüksek ya da düşük pH’larda enzimlerin etken grupları değişime uğrayarak ya da kendileri belirli ölçülerde denatüre olarak etkisiz (inaktif) hale geçerler. Enzimatik reaksiyonun hızı ile pH’sı arasındaki değişim Şekil 2.4.’de gösterilmektedir. Bazı enzimlerin optimum çalışma pH değerleri ise Tablo 2.1.’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Enzim tepkimesinin hızı ile sıcaklık arasındaki değişim



Şekil 2.4. Enzimatik tepkimenin hızı ile pH arasındaki değişim

Tablo 2.1. Bazı enzimlerin optimum pH' ları (URL-1)

Enzimler	Optimum pH
Alkalın Fosfataz	10
Peroksidaz	6
Lipaz	7
Pepsin	2
Amilaz	7 - 9

2.4.3. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Substrat konsantrasyonu, enzimatik tepkimelerin reaksiyon hızına etki eden önemli faktörlerden biridir. Belirli bir miktardaki enzimin reaksiyon hızı başlangıçta substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Başlangıçta bu ilişki lineer olarak devam ederken daha sonra hiperbolik bir şekil almaktadır. Bu durum reaksiyon kinetiğinin iki fazlı olduğunu göstermektedir. Başlangıç fazında reaksiyon lineer bir şekilde ilerlemekte ve reaksiyon hızı substrat konsantrasyonunun artışına paralel olarak artmaktadır. Enzim reaksiyonu bu durumda sıfırıncı dereceden bir kinetik göstermektedir. Hız substrat konsantrasyonunun artması ile bir maksimuma yaklaşmıştır. Enzim, substratı ile enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturmuşsa çalışıyor kabul edilmektedir. Enzim serbest kaldığı zaman, enzimin tekrar bir substrat molekülü ile birleşmesi için bir süre geçmektedir. Bu zaman esnasında enzim molekülü serbesttir. Substrat konsantrasyonu arttıkça serbest enzim daha sık çarpışacak ve substratla daha sık birleşecektir. Reaksiyon hızı substrat konsantrasyonunun artması ile gittikçe artacaktır. Bir süre sonra enzim substrata karşı doymuş hale gelecek ve reaksiyon hızını arttırmak mümkün olmayacaktır.

2.4.4. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim tarafından katalize olunan bir reaksiyonun başlangıç hızı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bunun nedeni de her enzim molekülünün diğerlerinden bağımsız olarak çalışmasıdır. Bu nedenle de ne kadar çok enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, reaksiyon da o kadar hızlı olacaktır.

2.4.5. Enzim İnhibitörleri

İnhibitörler, enzime bağlanarak enzim aktivitesini azaltan ya da reaksiyonu durduran maddelerdir. Enzim inhibitörleri iki ana gruba ayrılır;

1- Tersinir inhibitörler; Enzime zayıf bağlarla bağlanan ve tersinir etki gösteren inhibitörlerdir. Konsantrasyonları düşürüldüğünde, enzimlerden ayrılma eğilimi gösterdiklerinden dolayı enzim aktivitesi normal seviyeye döner. Tersinir inhibitörler enzime bağlandıkları yere göre üç gruba ayrılırlar.

- **Yarışmalı (competitive) İnhibitörler;** Yapıları bakımından substrata benzeyen inhibitörlerdir. Substratın bağlanacağı aktif bölgeye bağlanıp substrat molekülünün enzime bağlanmasını engelleyerek reaksiyon hızını düşürürler. Yani, substrat ve inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanabilmek için rekabete girerler. Yarışmalı inhibitörlere, sülfamitler ve malonik asit örnek olarak verilebilir.

- **Yarışmasız (non-competitive) İnhibitörler;** Enzim molekülünde aktif bölgenin dışında bir yere bağlanırlar, aktif kısımda şekil değişikliği yapar ve ardından substrat bağlandığında ürün oluşumunu engellerler. Yani, enzim konformasyonunu değiştirerek reaksiyonun oluşumunu engellerler. Bu inhibitörlerin, substrata benzerliği yoktur. Yarışmasız inhibitörlere örnek olarak, siyanür ve karbonmonoksidin sitokrom oksidaz enzimini inhibe etmesi sonucu hücre solunumuna engel olması verilebilir.

- **Yarı Yarışmalı (uncompetitive) İnhibitörler;** Daha önce substrat bağlanmış enzime (enzim substrat kompleksine) bağlanırlar.

2- Tersinmez İnhibitörler; Enzime genellikle kovalent bağlarla bağlanan ya da enzim yapısındaki kovalent bağları parçalayan inhibitörlerdir.

2.5. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Bilinen enzimlerin sayısı 1950'lerin sonuna doğru çok hızlı bir şekilde artmış ve birçok kişinin aynı enzime farklı isimler vermelerinden dolayı adlandırmada karmaşa ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda adlandırılması yapılan birçok enzimin, katalizlediği reaksiyon hakkında herhangi bir bilgi içermemesi de bu karmaşayı arttırmıştır. Bu karışıklığın düzeltilmesi amacı ile 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) kurulmuştur. Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi için kabul edilen sistem üç genel prensibi içermektedir (Telefoncu, 1997).

Birincisi –az (-ase) eki ile sonlanan enzim isimleri, tek enzimler için kullanılmalıdır. İkincisi, enzimler katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılır ve isimlendirilir. Son

prensip ise enzimler katalizledikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Bu sistem, enzim komisyonu (E.C) tarafından belirlenen kod numaraları kullanılarak enzimlerin açık bir şekilde tanımlanmalarını sağlar.

Bir enzimin genellikle iki ismi mevcuttur. Biri sistematik ya da tavsiye edilen, diğeri ise yaygın olarak kullanılan, daha kısa ve kolayca uygulanan genel ismidir. Bir enzim, sistematik ismi ve E.C. kod numarası ile tanımlandıktan sonra önerilen isim herhangi bir karışıklık olmaksızın sorunsuzca kullanılabilir. Bu tür yaklaşımlar literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin isimlendirilmesi 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 isimleriyle tanınırlar. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidaz adı ile anılırlar. Örnek olarak alkol dehidrogenaz, reduktaz, peroksidaz, glikoz oksidaz, sitokromoksidaz vb. verilebilir.

Transferazlar: Donör (verici) üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcısı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimlere örnek olarak, formil-transferazlar (transaminazlar), fosfotransferanazlar (kinazlar), CoA transferazlar v.b. verilebilir.

Hidrolazlar: Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, glikozid, peptid, C-N, asitanhidridi, C-C, C-X veya P-N bağlarını parçalarlar. Lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar) vb. bu enzimlere örnek olarak verilebilir.

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

İzomerazlar: Molekül içindeki yeniden düzenlenmeleri katalize ederler. Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizlerler. Bunlar, molekül içinde oksidoredüksiyonu, 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, asilaz CoA sentazlar ligazlara örnek olarak verilebilir.

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.

Nişastayı parçalayan enzimlerin çoğu primer yapılarındaki aminoasit benzerlikleri ve farklılıklarına göre glikozid hidrolazlar (GH) ailesinde sınıflandırılmıştır. Buna göre α -amilazlar ailesi GH13, β -amilazlar ailesi GH14 ve glikoamilazlar ailesi GH15 olarak belirlenmiştir. Bir endoamilaz olan α -amilazın da yer aldığı GH13 ailesi genişlemekte ve bu aile α -amilazlarla dizi benzerliği gösteren yaklaşık 30 farklı enzim içermektedir. Günümüzde bu enzimlerin tamamı GH ailesini oluşturan GH13, GH70 ve GH77 aileleri içerisinde sınıflandırılmaktadır. Ayrıca GH31 ve GH57 aileleri GH13 ailesi ile hiçbir dizi benzerliği olmadığı halde birkaç amilolitik özellikleri içermektedirler (MacGregor, 2005; Henrissat ve Bairoch, 1996). GH ailesine ait olan enzimlerin sınıflandırılması Tablo 2.2.'de verilmiştir.

2.6. Enzim Kaynakları

Enzim kaynaklarını bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı enzimler olmak üzere üç ana grupta toplamak mümkündür.

2.6.1. Bitkisel Kaynaklı Enzimler

Bitkiler birçok enzim üretimine kaynak teşkil etmektedir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilmektedir. Toksik olmayan bu yiyeceklerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır. Bu sınıftaki en önemli enzim arpa tohumlarından elde edilen ve bira üretiminde kullanılan malt amilazdır. 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.

2.6.2. Hayvansal Kaynaklı Enzimler

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle tavuk yumurtalarının beyazı, domuz midesi, pankreas, geviş getiren hayvanların karın bölgesi ve karaciğerlerinden izole edilmektedir. Hayvansal kaynaklı enzimlere pankreatik lipaz ve proteazlar, pepsinler, pregastrik esterazlar ve rennetler örnek olarak verilebilir.

Tablo 2.2. α -amilaz ailesi (GH), (Polaina ve MacCabe, 2007).

Enzim Sınıfı	Enzim	EC	GH ailesi
Hidrolazlar	α -amilaz	3.2.1.1.	13
	Oligo-1,6-glikozidaz	3.2.1.10	13
	α -glikozidaz	3.2.1.20	13
	Pullulanaz	3.2.1.41	13
	Amilopullulanaz	3.2.1.1/41	13
	Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	13
	Maltotetraohidrolaz	3.2.1.60	13
	İzoamilaz	3.2.1.68	13
	Dekstranglikozidaz	3.2.1.70	13
	Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	3.2.1.93	13
	Maltohekzaohidrolaz	3.2.1.98	13
	Maltotriohidrolaz	3.2.1.116	13
	Maltojenik α -amilaz	3.2.1.133	13
	Maltojenik amilaz	3.2.1.133	13
	Neopullulanaz	3.2.1.135	13
	Maltooligosiltrehaloz hidrolaz	3.2.1.141	13
	Maltopentaohidrolaz	3.2.1.-	13
Transferazlar	Amilosükraz	2.4.1.4	13
	Glikosiltransferaz	2.4.1.5	70
	Sükrosea fosforilaz	2.4.1.7	13
	Glukan dallı enzim	2.4.1.18	13
	Siklodekstrin glukanotransferaz	2.4.1.19	13
	4- α -glukanotransferaz	2.4.1.25	13,77
	Glukan dallı olmayan enzim	2.4.1.25/3.2.1.33	13
	Alternansükraz	2.4.1.140	70
	Maltosiltransferaz	2.4.1.-	13
İzomerazlar	İzomaltuloz sentaz	5.4.99.11	13
	Trehaloz sentaz	5.4.99.15	13
	Maltooligosiltrehaloz sentaz	5.4.99.16	13

Bitkisel kökenli enzimlerin üretiminde olduğu gibi hayvansal kökenli enzimlerin üretiminde de, kesim için yetiştirilen hayvanları kontrol eden politik ve tarımsal kuruluşların izledikleri politikalar etkin rol oynamaktadır. Birçok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması, hayvanların ve hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınmasında katı kısıtlamaların uygulanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan hastalıkların (özellikle viral hastalıkların) hayvanlar ve hayvansal dokular vasıtasıyla bir ülkeden diğerine yayılması büyük endişelere sebep olmaktadır. Bütün bu sebepler hayvan ve hayvansal ürün ticaretini kısıtlamaktadır.

2.6.3. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler

Mikrobiyal enzimler özel mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bu mikroorganizmalar sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilirler. *Bacillus* ve *Aspergillus*'dan izole edilen proteazlar, deterjan üretimi ve dericilikte derinin yumuşatılması amacı ile de kullanılmaktadır. Ayrıca farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik ve alkalifik bakteriler şeklinde sınıflandırılmış ve bunlardan üretilen enzimler çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır.

Birçok endüstriyel alanlarda kullanılan amilazların etkili oldukları pH ve sıcaklık değerleri Tablo 2.3.'de gösterilmektedir.

2.7. Kullanım Amaçlarına Göre Enzimler

Kullanım amaçlarına göre enzimleri üç grupta toplamak mümkündür (Telefoncu, 1986);

1- Endüstriyel Enzimler: Endüstride üretime yönelik çeşitli reaksiyonların katalizlenmesinde kullanılırlar ve saflık dereceleri düşüktür.

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 aktivitenin olması kesinlikle istenmez. Bu amaçla kullanılan başlıca enzimler proteaz, lipazlar, asparaginaz, streptokinaz, v.b.'dir.

Endüstriyel uygulamalarda kullanılan çeşitli enzimlerin isimleri ve kullanım alanları Tablo 2.4.'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar (URL-1)

α -Amilaz Cinsi	En Uygun pH	En Uygun Sıcaklık (°C)	Etkili Olduğu pH	Etkili Olduğu Sıcaklık (°C)
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

2.8. Salgılanma Şekillerine Göre Enzimler

2.8.1. İntraselüler Enzimler

İntraselüler enzimler, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları; şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneğinde olan moleküllerdir.

2.8.2. Ekstraselüler Enzimler

Ekstraselüler enzimler, besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır. Ekstrasellüler yani ortama salgılanan enzimlerin şu avantajları vardır;

- Enzim dışarıya salgılandığı için, büyük ölçekli üretimde oldukça zor olan hücre parçalama tekniklerinin kullanılmasına gerek kalmaz.
- Sadece belirli sayıda protein salgılar, dolayısıyla istenen enzim karışımından izole edilmesi nispeten kolay olur. İntrasellüler yani hücre içi enzimlerde ise enzimin diğer bütün proteinlerden ayrılması gerekir.
- Ekstrasellüler enzimler, intrasellüler enzimlerden daha sağlam yapıya sahip olup denatürasyona karşı daha az hassastırlar.

Tablo 2.4. Çeşitli enzimler ve endüstride kullanım alanları (Çetin, 1983; Telefoncu,1995).

Enzim	Endüstriyel Uygulama Alanları
Laktaz	Gıda sanayi, laktozsuz süt üretimi, peynir altı sularının hidrolizinde
Proteaz	Gıda sanayi, deterjan, kağıt ve deri endüstrisi, yem sanayi
Selüloz	Tekstil ve deterjan endüstrisi, hayvan yem sanayi ve eczacılık alanında
α -amilaz	Tekstil ve gıda endüstrisi, deterjan sanayi, atık su arıtımında
Lipaz	Deterjan sanayi, gıda ve kağıt endüstrisi, deri sanayi ve eczacılık alanında
İnvertaz	Gıda sanayinde reçel, marmelat, çikilota ve dondurma üretiminde kristallenmeyi önleyici olarak
Keratinaz	Tekstil ve deri sanayinde kılların deriden ayrılmasında
Pektinaz	İçecek endüstrisinde; meyve sularının berraklaştırılmasında
Pepsin	İçecek sanayinde biralara berraklaştırılmasında, şarap üretiminde ve eczacılık alanında
Hemi-Selüloz	Gıda sanayinde tatlandırıcı olarak
Katalaz	Gıda endüstrisinde konservelerde glikoz oksidaz enzimiyle birlikte oksijen çıkarıcı olarak ve sütlerin soğuk pastörizasyonunda kullanılır.

3. FERMANTASYON

Fermantasyon; mikroorganizmaları kullanarak, organik maddelerin enzim katalizli dönüşümlerini gerçekleştirmek için belirli ürünlerin meydana geldiği proses olarak tanımlanır. Büyük molekül ağırlığına sahip organik maddelerin, oksijenli ya da oksijensiz ortamda, mikroorganizmalar tarafından daha küçük molekül ağırlığına sahip organik maddelere parçalanması olayıdır. Diğer bir ifadeyle, fermantasyon bir biyolojik dönüşümdür (Pekin, 1983). Fermantasyon prosesini ifade eden genel eşitliği şu şekilde yazmak mümkündür;

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

1. grupta tek hücre proteini olan maya gibi ürünler, 2. grupta ise biyolojik katalizör görevi yapan enzimler ve polisakkarit gibi büyük moleküller elde edilir. Primer metabolit ürünler ise mikroorganizmaların üremelerine paralel olarak oluşan küçük molekül ağırlığına sahip ürünlerdir. Bu tür metabolitlerin biyosentezi, mikroorganizmaların üremeleri durduğu zaman durur ve zamanla bozunmaya başlarlar. Bütirik asit ve laktik asit gibi organik asitleri bu gruba örnek olarak vermek mümkündür. Bazı mikroorganizmalar genellikle gelişme evrelerinin sonunda gelişme ve üreme için gerekli olmayan maddeleri de sentezler. Genel itibarıyla kimyasal yapı bakımından birbirine benzeyen moleküllerin karışımı şeklindeki bu maddeler sekonder metabolitlerdir. Bu gruba örnek olarak mikotoksinler, antibiyotikler ve pigmentler verilebilir (Pekin, 1983).

3.1.Substratın Seçimi ve Hazırlanması

Üretilen enzim özelliğine bağlı olarak kullanılacak olan substratın seçimi önem arz etmektedir. Örneğin lignin içeriği açısından zengin olan tarımsal katı atıkların substrat olarak kullanımı lignin peroksidaz enziminin üretimini artırır. Ayrıca yüksek oranda nişasta içeren pirinç kullanımı da amilaz üretimini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra mikroorganizmanın büyümesi ve enzim üretebilmesi için fermantasyon ortamının optimum nem içeriğine sahip olması gerekmektedir (Cauto ve Sanroman, 2005).

Fermantasyon ortamının nem içeriği, kullanılan substrat ve mikroorganizmaya göre değişmektedir. Örneğin, cassava ve buğday kepeği gibi nişastalı substratlar üzerinde *Aspergillus niger*'ın kullanıldığı fermantasyon ortamının nem düzeyi kahve pulpu ve şeker kamışı posası'ninkinden daha düşüktür (Raimbault, 1998). Bu durumun substratların su tutma kapasitelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Birçok mikroorganizma, gelişmesi için gerekli olan karbonlu bileşikleri organik karbon kaynaklarından karşılar ve biyosentezi de bu yoldan yapar. Azot kaynağı olarak organik azotlu maddeler (pepton, 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.

Bu nedenle fermantasyon ortamına eklenen tarım ve gıda endüstrisi yan ürünleri (melas, küspe vb.) doğal substratlar olarak kullanılabilir.

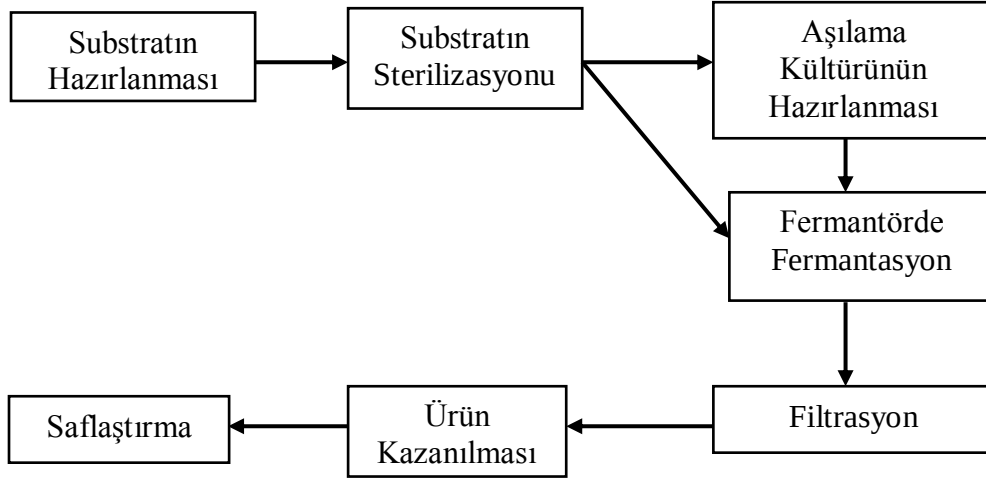
3.1.1.Substratın Sterilizasyonu

Kullanılacak olan sistem ve hazırlanan besiyeri yabancı mikroorganizmaları içermemelidir. Bu nedenle fermantasyon işleminde kullanılan besiyerinin, aletlerin ve eğer fermantasyonda havalandırma yapılıyorsa kullanılan havanın sterilize edilmesi gerekmektedir. Besiyeri sterilizasyonunda ısısal (termal) yöntemlerden 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 bileşikleri 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
- Filtrasyon ile sterilizasyon

3.1.2.Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler

Fermantasyon için uygulanan teknik işlemler Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



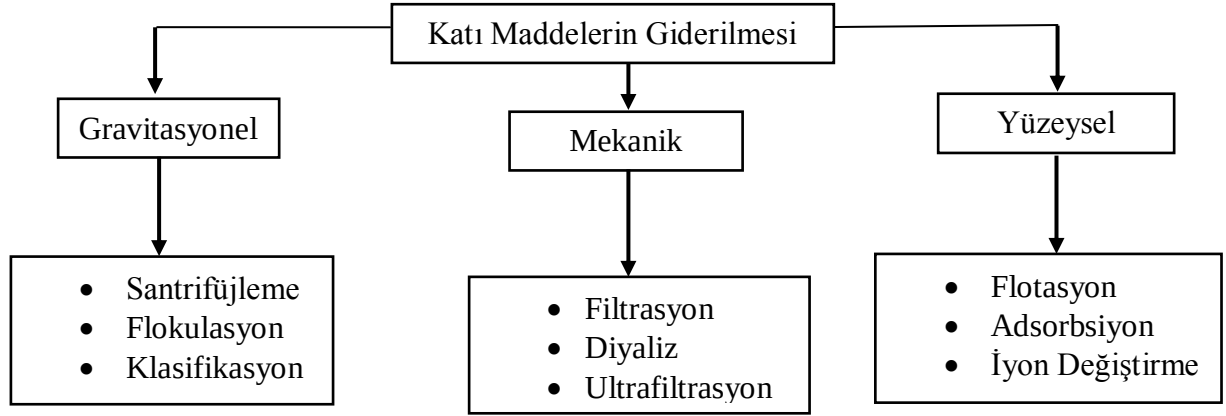
Şekil 3.1. Fermantasyon akım şeması (Telefoncu, 1995).

3.1.3. Fermantasyon Sıvısından Biyokütlenin Kazanılması

Fermantasyon sıvısında ürünün yanı sıra mikroorganizmalar, besiyerini oluşturan kullanılmamış substratlar, nutrientler ve yan ürünler de bulunabilir. Ürünün saflaştırılmasına geçilmeden önce fermantasyon sıvısından katı maddelerin ayrılması gerekmektedir. Katı partiküllerin fermantasyon sıvılarından ayrılma yöntemleri Şekil 3.2.'de özetlenmektedir.

Fermantasyon endüstrisinde en çok gravitasyonel ve mekanik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bunlar arasında da santrifüjleme ve filtrasyon ilk sırada yer almaktadır. 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 ya da 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. Fermantasyon sıvısından biyokütlenin geri kazanılması sırasında uygulanan ayırma işlemlerinde dikkat edilmesi gereken parametreler;

- Ürünün yüksek oranda kazanılması.
- Ayırma işleminde kullanılan proses ve aletlerin güvenilir ve dayanıklı olması.
- Ayırma prosesi enerjisi giderinin düşük olması.
- Proses süresinin kısa olması.



Şekil 3.2. Katı maddelerin kültür karışımından ayrılımları (Telefoncu, 1995)

3.1.4. Ürünün Kazanılması

Fermantasyon sıvısında oluşan ürünler, mikroorganizmalar tarafından dışarıya salgılanan hücre dışı enzimler ya da hücrelerin parçalanması sonucu ortamda bulunan enzim, protein, RNA, DNA vb. tür biyokimyasal maddeler, istenilen saflık derecesine göre çeşitli saflaştırma yöntemleri uygulanarak saflaştırılırlar.

3.2. Fermantasyon ile 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 bulunur ve daha sonra mikroorganizma endüstriyel büyüklükteki fermantörlerde büyütülerek istenen enzim üretilir. Fermantasyon sonucu oluşan atıklar ise gübre olarak kullanılmaktadır (Sağiroğlu, 1999; Tatar, 1997).

Buna göre mikrobiyal fermantasyonla enzimlerin üretimi iki temel şekilde gerçekleştirilir.

- Katı Substrat Fermantasyonu
- Daldırmalı Fermantasyon (Derin Kültür Fermantasyonu)

3.2.1. Katı Substrat Fermantasyonu

Katı substrat fermantasyonu işlemleri, Asya ülkelerinde eski zamanlardan beri uygulanmaktadır. Batı ülkelerde ise 1940'lı yıllardan sonra önem kazanmaya başlamıştır. 1950-1960 yılları arasında fungal kültürler kullanılarak steroid transformasyonu gerçekleştirilmiştir. 1960-1970 yılları arasında katı substrat fermantasyonu ile

mikotoksinlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Tarım endüstrisi atıklarının besiyeri olarak kullanılmasıyla protein bakımından besin değeri yüksek sığır yemi üretimi, düşük maliyeti nedeniyle oldukça önem taşımaktadır. Katı substrat fermantasyonuna ilgi gün geçtikçe artmaya devam etmektedir (Pandey, 2003).

Katı substrat fermantasyonuna örnek olarak Japonya’da buharla muamele edilmiş pirinç kullanılan “koji”, Endonezya’da mikrobiyal kaynak olarak küf ve katı substrat olarak buhar uygulanmış bezelye tohumlarının kullanıldığı “tempeh” veya Hindistan’a ait “ragi” verilebilir. Yine *Penicillium roquefortii* veya *P.camemberti* ile küflü peynir üretimi uzun yıllardan beri uygulanan katı substrat fermantasyonlarına örnek olarak verilebilir. Katı substrat fermantasyonu, özellikle Japonya’da büyük ölçekli endüstriyel işlemlerde uygulanmaktadır. Japonya dışında, Hindistan’da orta ölçekte enzim üretiminin yapıldığı bilinmektedir. Koji tipi işlemler Uzak Doğu’daki fabrikalarda geniş ölçüde uygulanmaktadır (Raimbault, 1998).

Katı substrat fermantasyonu, serbest akıcı suyun yokluğunda nemli substratlar üzerinde mikroorganizmaların büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Perez-Guerra vd., 2003). Katı substrat fermantasyonunda mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu, düşük nem içeriğine sahip katı substrat partikülünün yüzeyinde veya yakınında meydana gelmektedir. Ayrıca lignin, pektin, lignoselüloz gibi bileşenleri içeren doğal substratları kullanan ve esas olarak kesikli bir işlem olan katı substrat fermantasyonunu, serbest su akışının olmadığı ve nemli katı substrat üzerinde mikroorganizmaların üretildiği bir proses olarak da tanımlamak mümkündür (Raimbault, 1998; Raghavarao vd., 2003).

Bu işlemde kullanılan substrat, mikroorganizmaların üreme ve metabolizması için ihtiyaç duyduğu yeterli nemi sağlamalıdır. Kullanılan katı substrat, mikroorganizma için besin kaynağı olarak rol oynayacağından uygun katı substratın seçimi önemlidir. Bu nedenle, substratın parça büyüklüğü, gözenekliliği ve kimyasal bileşimi uygulama açısından önem arz etmektedir. Ayrıca mikrobiyal ürünlerin üretiminde katı substrat fermantasyonu, substrat olarak ucuz ve bol miktarda bulunan tarım endüstrisi atıklarının kullanılabilmesi gibi ekonomik avantajlarından dolayı önem taşımaktadır. Bu atıkların pek çoğunun ligninolitik aktivitenin indükleyicisi olan lignin, selüloz ve hemiselülozu içermesi ve çoğunun yüksek oranda şeker ihtiva etmesi, işlemlerin daha ekonomik olmasını sağlamaktadır (Shankar ve Mulimani, 2006; Pandey, 2003; Raghavarao vd., 2003). Bunun yanı sıra katı substrat fermantasyonu tarımsal katı atıkları substrat olarak kullanabildiğinden dolayı tarımsal atıkların meydana getireceği çevre kirlenmelerine

alternatif bir çözüm olarak görülebilir. Katı substrat fermantasyon şartları birçok mikroorganizma için doğadaki şartlarına benzer olduğundan üreme için yeterli koşullar sağlanabilir. Günümüzde katı substrat fermantasyonunda farklı tarımsal atıklar, bakteri ve funguslarla enzim üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Milagres vd., 2004; Gomez vd., 2005). Yapılan çalışmalarda farklı mikroorganizmalarla çeşitli katı substratların etkileşimi katı substrat fermantasyonu yöntemiyle incelenmektedir. Tablo 3.1.'de katı substrat fermantasyonlarında kullanılan çeşitli substratlar ve mikroorganizmalar verilmiştir.

3.2.2. Katı Substrat Fermantasyonunun Avantajları ve Dezavantajları

Katı substrat fermantasyonunun avantajlarını şu şekilde sıralamak mümkündür (Mazutti vd., 2006; Hölker vd., 2004; Perez-Guerra vd., 2003).

- Ortamdaki suyun az olmasından dolayı bakteri veya mayaların kullanıldığı fermantasyon ortamında kontaminasyon riski azdır. Bu durum aseptik koşullarda çalışmaya imkan sağlar.

- Uygulamanın durumuna göre katı substrat fermantasyonunda, derin kültür fermantasyonuna göre daha fazla ürün elde etmek mümkündür.

- Hazırlanan besi yerindeki substrat genellikle mikroorganizmanın üremesi için gerekli bütün besinleri içerdiğinden fermantasyon ortamı oldukça basittir.

- Enerji ihtiyacı oldukça düşüktür.

- İşlem sırasında çok az miktarda su kullanıldığından atık su çıkışı oldukça azdır.

- Fermantasyon ortamı düşük nem seviyesine sahip olduğundan derin kültür fermantasyonu ile üretilmeyen ya da çok az miktarda üretilen özgül bileşiklerin üretimi sağlanabilir.

- Kullanılan substratın konsantrasyonundan dolayı derin kültür fermantasyonu ile karşılaştırıldığında aynı miktarda substrat için katı substrat fermantasyon işleminde daha küçük hacimli reaktörler kullanılabilir.

- Katı substrat fermantasyon ortamı, mikroorganizmaların yetiştiği ve adapte olduğu doğal çevrelere benzer.

- Oksijen sirkülasyonu oldukça iyidir.

- Kullanılan substratlar ucuz ve boldur.

- Fermantasyon sonucu meydana gelen ürünün kararlılığı daha yüksektir.

Tablo 3.1. Çeşitli çalışmalarda kullanılan katı substratlar (Kuru, 2007).

Substrat	Ürün/Uygulama	Mikroorganizma
Badem Kabuğu Tozu	Lipaz	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Elma Ezmesi	Etanol Üretimi	<i>Trichoderma harzianum</i>
	Sitrik Asit Üretimi	<i>Aspergillus niger</i>
	Amilaz	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	Proteince Zenginleştirme	<i>Neurospora sitophila</i>
Buğday Kepeği	Pektinaz	<i>Aspergillus niger</i>
	Aroma	<i>Ceratocystis fimbriata</i>
	Proteaz	<i>Aspergillus niger</i>
	Gibberellik Asit	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Buğday Samanı	Ksilenaz	<i>Paecilomyces thermophila</i>
	Lignoselülozik Enzimler	<i>Lentinus tigrinus</i>
	Lakkaz	<i>Trametes pubescens</i>
Muz Atığı	Proteince Zenginleştirme	<i>Aspergillus niger</i>
	Ligninolitik Enzim Üretimi	<i>Pleurotus sp.</i>
Kassava Posası	Aroma, Tatlandırıcı Ürünler	<i>Rhizopus oryzae</i>
Şeker Kamışı Posası	Aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>
	Sitrik Asit Üretimi	<i>Aspergillus niger</i>
Kahve Atıkları	Yenilebilir Mantar	<i>P. osteratus</i>
Portakal Posası	Pektinaz Üretimi	<i>Thermoascus aurantiacus</i>
Ananas, Karışık Meyve	Sitrik Asit Üretimi	<i>Aspergillus niger</i>
Soya Kabuğu	Proteaz Üretimi	<i>Penicillium sp.</i>
		<i>A. oryzae</i>
Hindistan Cevizi Kabuğu	Lipaz Üretimi	<i>Penicillium restrictum</i>
Kahve Kabuğu	Sitrik Asit Üretimi	<i>Aspergillus niger</i>
	Tatlandırıcı Üretimi	<i>Ceratocystis fimbriata</i>
	Pektinaz Üretimi	<i>Aspergillus niger</i>
Kahve Özü	Besince Zenginleştirme	<i>Aspergillus niger</i>
Üzüm Çekirdeği	Lakkaz	<i>Trametes hirsuta</i>
Pirinç Kepeği	Proteaz	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Soya Fasulyesi	Fermente Besin Üretimi	<i>Rhizopus sp.</i>
Kivi Atığı	Sitrik Asit Üretimi	<i>Aspergillus niger</i>

Katı substrat fermantasyonu bir takım avantajlara sahip olmasına rağmen, büyük ölçekli uygulamalarda bazı dezavantajlara da sahiptir (Perez-Guerra vd., 2003). Bu dezavantajları şu şekilde sıralamak mümkündür;

- Katı substrat fermantasyonunda sadece düşük nem seviyesinde üreyebilen mikroorganizmalar veya mantarlar kullanılabilir.
- Substratlar genellikle öğütme, parçalama, homojenizasyon, fiziksel, kimyasal ve enzimatik hidroliz, buhar uygulama gibi birtakım ön işlemlere ihtiyaç duyar.

- Derin kültür fermentasyonuna göre biyokütle (üreme) miktarının saptanması oldukça zordur. Çünkü misel ve katı substrat arasındaki sıkı penetrasyon biyokütlenin tamamen elde edilmesini engeller.

- Substratın katı olması nedeniyle pH, nem içeriği ve oksijen konsantrasyonu gibi fermentasyon parametrelerinin kontrolü oldukça zordur.

- Bazı işlemlerde yüksek miktarda katı substrat konsantrasyonu nedeniyle ortamdaki oksijen sirkülasyonu zor olabilir. Ayrıca doğal substrat içeren fermentasyon ortamlarında yüksek karıştırma hızlarında köpük oluşumu söz konusu olabilir.

- Katı substrat fermentasyonunda üretim süresi, derin kültür fermentasyonuna göre çok daha uzundur.

- Büyük ölçekli reaktörlerin dizaynı ve işletilmesi hakkındaki bilgiler çok azdır.

- Eğer sporla üretime başlanacaksa, çimlenme gereksinimi nedeniyle uzun lag fazı süresine ihtiyaç duyulabilir.

3.2.3. Katı Substrat Fermentasyonu Uygulama Alanları

Tarihsel bir öneme sahip olan katı substrat fermentasyonu esas itibarıyla “koji”, “tempeh” ve “ragi” gibi geleneksel olarak fermente edilmiş yiyeceklerin üretimiyle ilgilidir. Bunun yanı sıra; antibiyotik, enzim, organik asit, biyopestisit, mikopestisit, biyoherbisit, biyosüpfektan ve aromatik bileşikler gibi önemli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Pandey, 2003; Raimbault, 1998).

Ayrıca katı substrat fermentasyonu son yıllarda çevrenin korunması amacıyla tehlikeli bileşiklerin biyolojik yıkımında (biyodegradasyonu), tehlikeli bileşiklerin biyolojik olarak iyileştirilmesinde (biyoremediasyon), tarım ve diğer endüstri atıklarının biyolojik detoksifikasyonunda, biyolojik kağıt hamuru üretiminde ve kağıt hamurunun ağartılmasında kullanılmaktadır (Gomez vd., 2006; Brand vd., 2000).

3.2.4. Katı Substrat Fermentasyonu ile Enzim Üretimi

Enzim üretimi biyoteknolojinin önemli uygulama alanlarından biridir. Katı substrat fermentasyonu ile üretilen enzimler günümüzde pek çok endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Tablo 3.2.). Enzimler hücre içinde ve dışında etkin olabildiklerinden dolayı endüstri, çevre ve tıp alanlarında uygulama imkanı bulmaktadır. Son on yılda katı substrat fermentasyonu ile enzim üretimine olan ilgi giderek artmıştır. Günümüzde çok az

sayıda da olsa ticari öneme sahip enzimlerin üretimi katı substrat fermantasyonu ile gerçekleştirilmektedir.

3.3. 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 süspansiyon 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

Tablo 3.2. Katı substrat fermantasyonunun ekonomik sektörlerdeki uygulama alanları

Ekonomik Sektör	Uygulama	Örnek
Tarımsal Yiyecek	Ticari Yiyecek fermantasyonları	Koji, fermente Ürünler
Endüstrisi	Gıda katkı maddeleri	Tatlandırıcılar, organik asitler
Tarım	Bioinsektisitler	Trichoderma
	Bitki Büyüme Hormonları	Gibberellinler
	Enzimler	Amilazlar, selülozlar, proteazlar, pektinazlar, ksilinazlar
Endüstriyel	Antibiyotikler	Penisilin, Probiyotikler
Fermantasyon	Organik asit üretimi	Sitrik asit, laktik asit vb.
	Fungal Metabolitler	Hormonlar

aynı miktar ürün alınır. Böylece mikroorganizma sürekli maksimum ürün üretebileceği yerde tutulmuş olur.

Mevcut sistemlerin çeşitliliğine rağmen pratikte ticari enzim fermentörleri ağırlıklı olarak 2. türden sürekli karıştırmalı tank fermentörlerinde gerçekleştirilir. Bu yöntemde uygun büyüklükteki (10-15 L) 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 taraftan mikroorganizma, fermantasyon prosesi üretim tankına gelmeden önce birkaç aşı hazırlama safhasından geçer. Kullanılan tanklar fermantasyon ortamının korozyon 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 fermantasyon 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 vd., 1987). Sterilize edilen hava fermantasyon ortamına tek veya çok girişli dağıtıcı bir sistem yardımıyla verilir. Karıştırma ise dikey olarak dönen bir şaft üzerine bindirilmiş çok kanatlı disk türbinlerle yapılır.

Aerobik mikrobiyal büyüme ekzotermik bir süreçtir ve bu süreçte ısı üretilir. Havalandırma ve karıştırma prosesleriyle ısı dağılımına ilave olarak fermantasyon

sıcaklığını 30–35 °C’de tutmak için ortamdan ısı uzaklaştırılmalıdır. Bakteriyel fermantasyonda 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 fermantasyonla üretim aşamasında dikkatlice takip edilmelidir. Fermantasyon 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. Fermantasyon analizinde online ve offline ölçümlerden yararlanılır. Online olarak takip edilen parametreler pH, çözünmüş oksijen ve karbondioksit, redoks potansiyeli, fermantörü terk eden gaz içerisindeki oksijen ve karbondioksit konsantrasyonlarını içerir. Çeşitli anyonlar ve katyonlar (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , NO_3^- , Cl^-) gibi diğer türler iyon seçici elektrotlar kullanılarak ölçülebilir. Ancak bu iyonlar genellikle biomas 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.

3.4. Fermantasyon İşlemlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

3.4.1. Bakteriler

Bakteriler mikroskopik görünüm bakımından yuvarlak, çomak ve sarmal şekiller olmak üzere üç ana grupta toplanırlar.

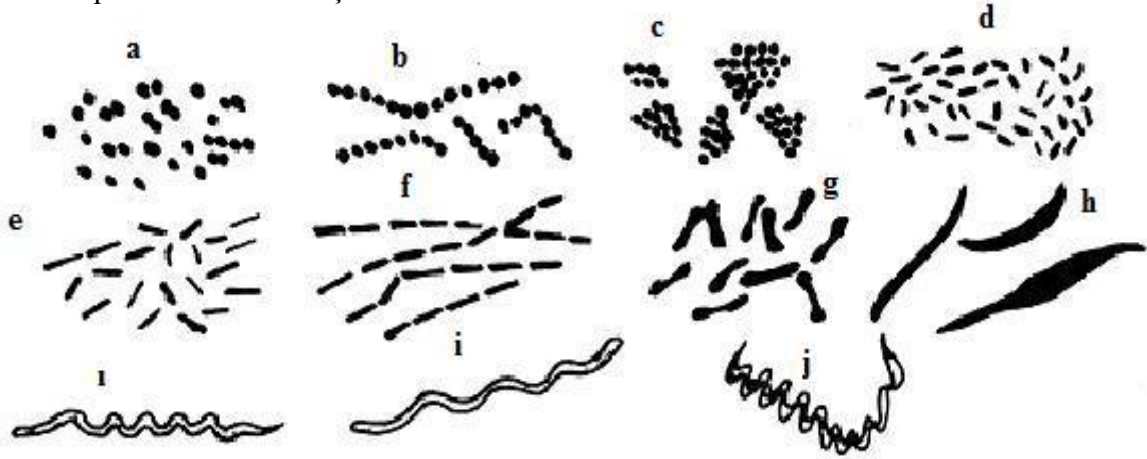
• **Yuvarlak Şekli Bakteriler (Koklar) :** Ortalama 0.8-1.5 mikrometre (μm) boyutlarında yuvarlak şekilli bakterilerdir. Koklar ikili (diplokok) zincir şeklinde (streptokok) veya üzüm salkımı şeklinde (stafilokok) diziliş gösterebilirler. Diplokoklar yuvarlak bakterilerin bölünmeleri esnasında birbirlerinden ayrılmayarak ikiye bölünerek kalırları sonucu oluşur. Örnek olarak *Streptococcus pneumoniae*, ters mum alevi şeklinde dizilim gösteren diplokoklardır. Üremeleri bir çizgi boyunca bölünmek suretiyle gerçekleşen yuvarlak şekilli bakterilerin bir zincir oluşturması şeklindedir. Bu görünüme Streptokok denir. Bu gruba örnek olarak irinli infeksiyonlarda etken olan *Streptococcus pyogenes*’i verebiliriz. Bazı yuvarlak şekilli bakteriler üç boyut halinde de üreyebilirler. Bunların dizilimi üzüm salkımını andırdığından stafilokoklar olarak adlandırılır. *Streptococcus aureus*, bu grubun tipik örneğini oluşturur. Bakterilerin çeşitli şekil ve dizilişleri Şekil 3.3.’de gösterilmiştir;

• **Çomakcık Şeklindeki Bakteriler (Basiller):** Silindir şeklindeki bakterilerdir. Ortalama 0.5-1 µm eninde 1-5 µm boyundadırlar. Kokobasil şeklinden büyük bir basil şekline kadar değişen uzunlukta olabilirler. Zincir biçiminde ve uç uca dizilebilirler. Bu görünüm streptobasil olarak tanımlanır.

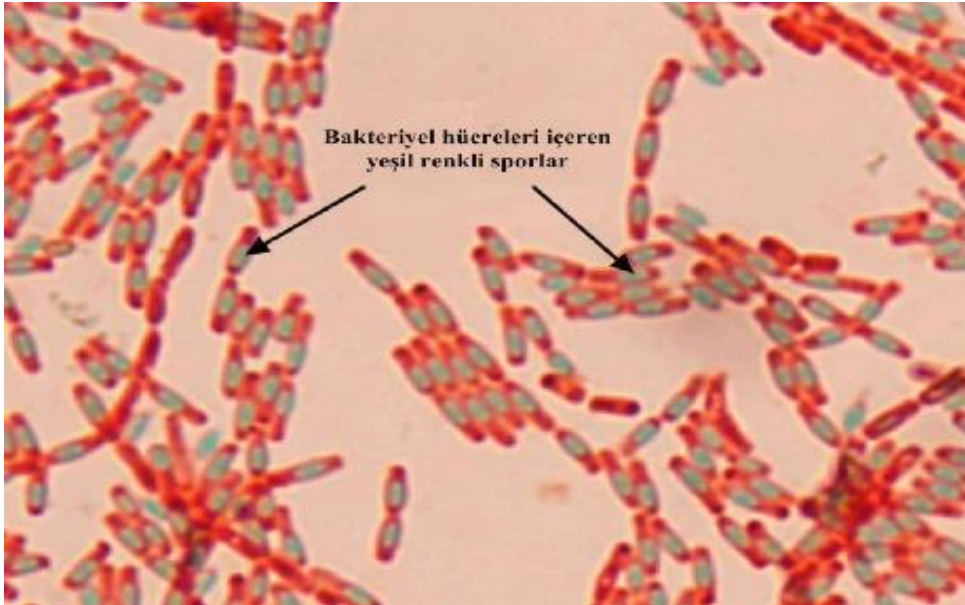
• **Sarmal Şekilli Bakteriler:** Sarmal bakteriler yalnız bir kıvrımlı olabildiği gibi bazen de 10-15 kıvrıma sahip olabilirler. Sarmal bakteriler iki gruba ayrılır. Birinci grupta vücutları yumuşak, bükülebilen ve kıvrılarak yılanı hareket edebilen bakteriler (spiroketler), ikinci grupta ise sert vücutlu, kıvrılmayan sarmal şekilli bakteriler bulunmaktadır. Kolera etkeni tek kıvrımlı bu tür bakterilere örnek olarak verilebilir.

3.4.2. *Bacillus* Cinsi Bakteriler

Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli endospora sahip, açık havada spor oluşturabilen, gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bir bakteridir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlarla bağlı mezo-diamino pimelik asitten oluşur. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleri de vardır. Bakteriyel hücreleri içeren *Bacillus* sporları Şekil 3.4.'de gösterilmektedir. *Bacillus*'lar tek veya çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücreler parabazal kısım ve protein kristalleri içerebilir.



Şekil 3.3. Bakterilerin çeşitli şekil ve dizilişleri (a; Diplokok ve kok, b; Streptokok, c; Stafilokok, d; Kokobasil, e; Basil, f; Streptobasil, g; Difteroid basil, h; Fuziform basil, i; Treponema, j; Spiroket, j; Leptospira).



Şekil 3.4. Bakteriyel hücreleri içeren *Bacillus* sporları

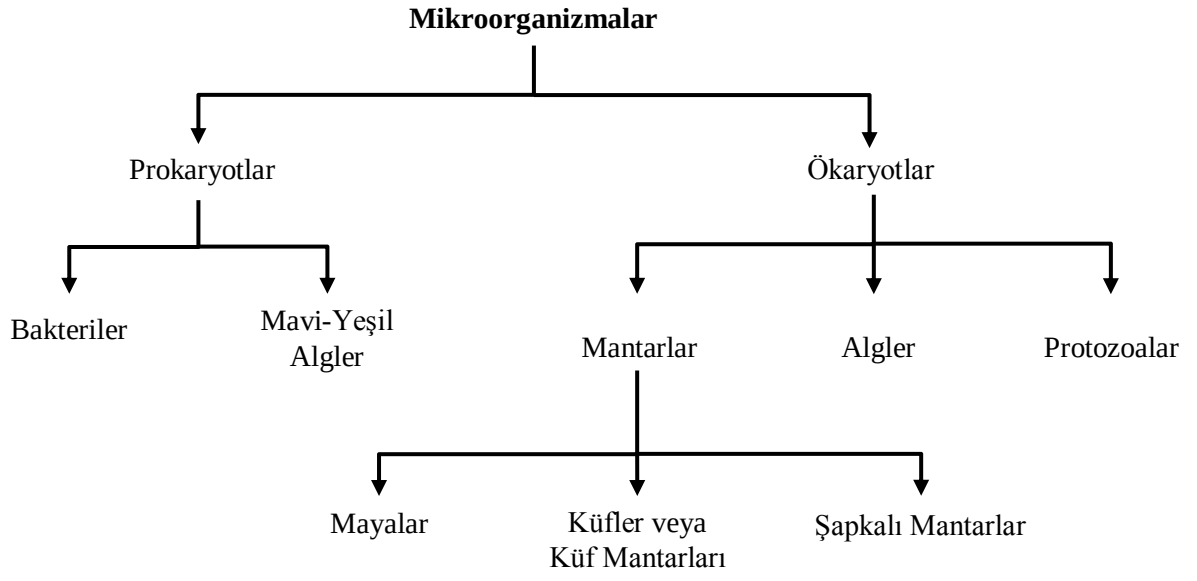
Ana hücrede bulunan sporun şekli ve sporogoniumun yeri *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik bir özellik gösterir. *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için spor ve sporogonium morfolojileri temel alınabilir. *Bacillus* suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü, genellikle çevresel faktörlerle değişmektedir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün bulunduğu besi yerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel faktörlerin yanı sıra besiyeri bileşimine bağlı olarak koloni çapı değişebilir (Lennete vd., 1985).

3.4.3. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens çoğunlukla α -amilaz ve proteaz üretiminde kullanılan bir mikroorganizmadır. 1943 yılında Fukumoto isimli bir Japon araştırmacı tarafından topraktan izole edilmiştir. Bakteriye ismi sıvılaştıran bir amilaz üretmesi sebebiyle verilmiştir. *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 ve Çırakoğlu, 2001).

Literatürde yeralan mikroorganizmaların sınıflandırılması Şekil 3.5.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması (Telefoncu,1995).

4. AMİLAZLAR

Amilazlar en önemli endüstriyel enzimlerden biridir. Amilazlar nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize ederek maltoz, glikoz, maltotrioz ve dekstrin birimlerini meydana getirebilen ekstraselüler enzimlerdir. Günümüzde amilaz enzimi gıda, tekstil, kağıt, deri gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılmaktadır. Endüstriyel alanlarda kullanılan amilaz enzimi hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen amilaz enzimi istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, ucuz ve bol miktarda elde edilebilmeleri, katalitik aktivitelerinin yüksek olması gibi avantajlara sahip olduğundan dolayı endüstriyel uygulamalarda tercih konusu olmuştur. Amilazların toplam enzim pazarının % 25' ini oluşturduğu bilinmektedir.

Amilazlar, glikoz birimlerinden oluşan nişasta ve benzer molekülleri parçalayan “glikozid hidrolaz” olarak da bilinen enzimlerdir. Amilazlar amilopektin, amiloz ve glikojeni oluşturan glikoz birimleri arasındaki glikozidik bağları parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Nişastanın enzimatik dönüşümü çirşlenme (jelatinizasyon), sıvılaşma ve şekerlenme (sakkarifikasyon) olmak üzere üç aşamada meydana gelir. Jelatinizasyon nişasta moleküllerinin çözünerek viskoz bir süspansiyonun meydana gelmesi olayıdır. Sıvılaşma nişastanın kısmi hidrolizi sonucunda viskozitesinin azalması olayıdır. Şekerlenme ise nişastadan glikoz ve fruktoz oluşmasıdır. Nişastanın su ile ısıtılması sonucu jelatinizasyon meydana gelir ve nişasta yalnızca yüksek sıcaklıkta suda çözünebilir. Jelatinizasyon işleminden sonra nişastanın hidrolizinin hızlı bir şekilde olabilmesi için kullanılacak amilazın termostabil özellikte olması gerekmektedir (Van Der Maarel vd., 2002).

Amilazların tarihi 1811 yılında Kirchhoff tarafından nişastayı parçalayıcı enzimlerin bulunmasına dayanmaktadır. Bu tarihten itibaren malt amilazları ve sindirim amilazları üzerine çalışmalar yapılmış ve 1930 yılında Ohlsson reaksiyonda ürettikleri şeker tipine göre maltta nişastayı parçalayan enzimleri α ve β amilazlar olmak üzere iki gruba ayırmıştır.

Bakteriyel α -amilazlar, anomerik karbon atomunun α konfigürasyon yeteneğinin olması sayesinde nişastanın iç bölgelerinin hidrolizinde görev yapar. Genellikle bu enzimler yüksek sıcaklığa dayanıklıdır. *Bacillus* türleri, endüstriyel öneme sahip ekstraselüler amilaz ve proteaz enzimlerini üretebilir. *B.amyloliquefaciens* ve *B.subtilis*

mikroorganizmaları birbirine benzer α -amilaz enzimi üretmelerine rağmen immünolojik reaksiyonları farklıdır. *B.amyloliquefaciens*, öncelikle maltoheksoz üretirken *B.licheniformis* ise önce maltopentoz ve maltoz oluşturur. Ancak glikoz ise bu ürünlere kıyasla daha az miktarda elde edilmektedir (Meer, 1972).

α -amilaz enzimi aktif merkezlerindeki karboksil ve histidin gruplarının birlikte etkisi ile substratı parçalarlar. α -amilaz enziminin sentezi ortamda nişasta veya daha düşük molekül ağırlığına sahip olisakkaritlerin bulunmasına bağlıdır. Ayrıca enzim aktivite gösterebilmek için (Ca^{+2}) iyonlarına ihtiyaç duyduğundan dolayı metalloprotein yapısına sahiptir. Enzimin yapısında bulunan kalsiyum, ekstrem sıcaklık ve pH'larda papain, tripsin, pepsin gibi proteazlara karşı enzimin dayanıklılığını sağlamaktadır (Manning ve Campell, 1961; Stein ve Fischer, 1958). Bazı amilazların kalsiyum iyonu gereksinimleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Bakteriyel β -amilazlar, amilosakkarit zincirlerindeki α -1,4 glukan bağlarını hidrolize eder ve β -anomerik konfigürasyon ve β -limit dekstrinlerden maltoz oluşumunu sağlar. Bu enzim 65 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda herhangi bir aktivite göstermez. β -amilaz enzimi maltoz üretimi ile yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılmaktadır.

Amilazlar endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmını rastgele noktalardan parçalar ve değişik zincir uzunluğuna sahip düz ve dallanmış yapıdaki olisakkaritleri meydana getirir. Ekzoamilazlar ise nişasta molekülünü indirgen olmayan uçlarından parçalayan enzimlerdir. Son yıllarda nişasta ve benzeri polisakkaritleri parçalayan birçok yeni enzimler tespit edilmiştir. Amilazlar asidik ve bazik şartlar altındaki etkinliklerine göre asidik ve bazik karakterli amilazlar olmak üzere iki kısma ayrılır. Bunlardan bazik ortamda aktivite gösteren amilazlar deterjan endüstrisinde büyük bir öneme sahiptir.

Tablo 4.1. Bazı amilazların Ca^{2+} iyonu gereksinimleri (Haki ve Rakshit, 2003).

Enzim	Mikroorganizma	Uygulama pH'sı	Minumum Ca^{2+} Miktarı (ppm)
Bakteriyel mezofilik α -amilaz	<i>Bacillus subtilis</i>	6.0 - 7.0	150
Bakteriyel termofilik α -amilaz	<i>Bacillus licheniformis</i>	6.0 - 7.0	20
Fungal α -amilaz	<i>Aspergillus oryzae</i>	4.0 - 5.0	50
Amiloglikozidaz	<i>Aspergillus niger</i>	3.5 - 5.0	0
Pullulanaz	<i>Bacillus acidopolluticus</i>	3.5 - 5.0	0

Endüstriyel proseslerde örneğin dekstroz üretiminde pH 4-5 aralığında etkili olabilen asidik amilazlar kullanılmaktadır. Farklı kaynaklardan izole edilen bakteri endoamilazlarının optimum pH 3.5-4.5 aralığında aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Buonocore vd., 1976).

4.1. Amilazların Sınıflandırılması

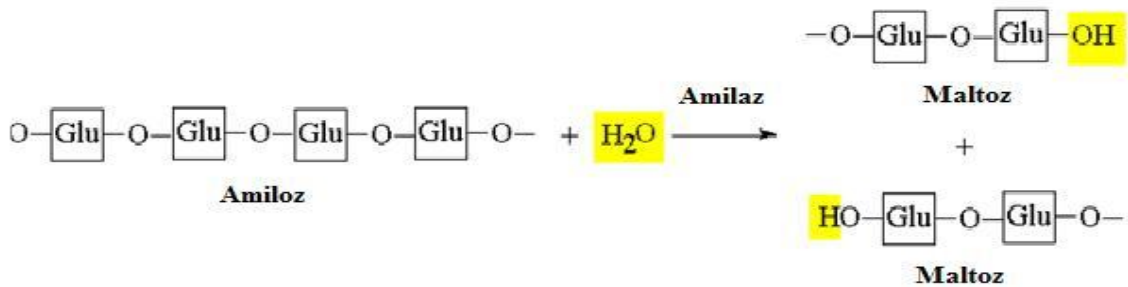
Amilazlar nişastayı parçalama mekanizmalarına göre sınıflandırılır;

- **α -Amilazlar;** α -amilazlar nişasta molekülündeki amiloz zincirinin α -1,4 bağlarına gelişigüzel etki ederek son ürün olarak 1/10'u glikoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışım meydana getirir. Amilopektinin hidrolizi sonucunda maltoz ve glikozun yanı sıra bir dizi dallı sınır dekstrinler meydana gelir. Dört ya da daha fazla glikoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glikoz bağlarını içermektedir. Bu dekstrinlere belirli sayıda glikoz kaldığında amilazlar dallanma noktasına etki edemediğinden sınır dekstrin (limit dekstrin) adı verilir. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu meydana gelen ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden dolayı bu enzimlere α -amilazlar denilmektedir. Amilaz enzimi katalizörlüğünde meydana gelen reaksiyon Şekil 4.1.'de verilmiştir.

- **β -amilazlar;** Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucunda açığa çıkan ürünler β -optik konformasyonu gösterdiğinden dolayı bu enzimlere β -amilaz adı verilir.

- **Glikoamilazlar (Amiloglikozidazlar);** Nişasta zincirinin ucundaki indirgen olmayan kısımdan ardışık olarak glikoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Glikoamilazların ürün olarak sadece glikoz oluşturması bu enzimleri α ve β amilazlardan ayırmaktadır. Hem α -1,4 bağlarını etkiler hem de yavaş bir hızla da olsa α -1,6 bağlarını hidrolize eder.

- **α -Glikozidazlar;** Amiloz ve amilopektinin parçalanma ürünleri olan kısa zincirli oligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarını hidrolize ederek serbest glikoz birimlerini oluşturan enzimler olarak tanımlanır.



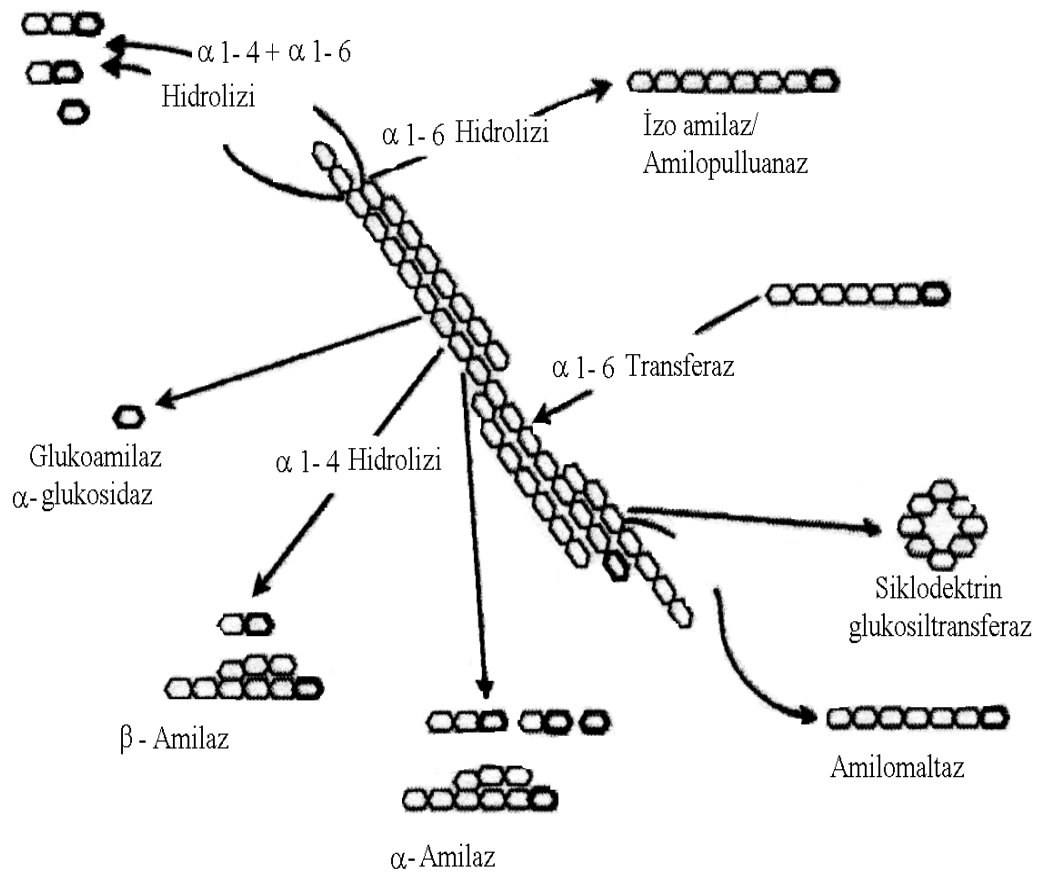
Şekil 4.1. Amilaz enziminin katalizlediği reaksiyon

- **Pullulanazlar;** Substrat molekülü üzerindeki yalnızca α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterirler. Bundan dolayı pullulanazlara sınır deksranazlar da denir.

- **CGTazlar;** Nişastayı siklodekstrin denilen ve 6,7 veya 8 glikoz ünitesinden meydana gelen siklik D-glikozil birimleri oluşturan enzimlerdir. *Bacillus macerans* mikroorganizmasından elde edilen amilazlar buna örnek olarak verilebilir (Aiyer, 2005). Şekil 4.2.'de amilazların nişastayı hidrolize şekilleri ve meydana getirdikleri ürünler gösterilmektedir.

4.1.1. Asidik Amilazlar

pH 4-5 civarında yüksek aktivite gösteren 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 α -amilaz karakterleri üzerine çalışmalara yol açmıştır. Bu enzim katı kültürden izole edilip karakterize edilmiştir (Ingle ve Erickson, 1978).



Şekil 4.2. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler

4.1.2. Termofilik Amilazlar

Termofilik mikroorganizmalar termotolerant veya termofil, hiper termofil veya ekstrem termofil olmak üzere üç grup içerisinde sınıflandırılmaktadırlar. 60–115 °C arasında yaşayan mikroorganizmalar genel olarak termofil olarak adlandırılır. 50-60 °C arasında yaşayan organizmalar termofil veya termotolerant olarak tanımlanırken, 60-80 °C arası hiper termofil, 80 °C veya daha yüksek sıcaklıklarda yaşayan organizmalar ekstrem termofil olarak adlandırılır. *Bacillus*'lar ve diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler içerisinde özellikle sıcaklığa dirençli olanlar özel bir öneme sahiptir. Sıcaklığa dirençli enzimler genellikle termofilik organizmalar tarafından üretilmekte olup bu enzimlerin sıcaklığa karşı olan doğal dirençlilikleri endüstriyel alanda önem kazanmalarının başlıca nedeni olmuştur. Termofilik enzimler çevreyi kirletici ajanları azaltarak biyodegradasyon yoluyla prosesleri ekonomikleştirmek ve daha verimli hale getirmek amacıyla kullanılır. Bazı *Bacillus* türlerine ait olan termostabil enzimler ve kaynaklar Tablo 4.2.'de verilmiştir. En geniş kullanım alanına sahip termostabil enzim α -amilazdır. Termostabil α -amilaz kullanımı ile yüksek sıcaklıklardaki bakteriyel ve viral kontaminasyon riski en aza iner (Fujiwara, 2002).

α -amilaz enziminin yüksek sıcaklıklara adapte olma özelliği genetik olarak kodlanmıştır. Biyofiziksel ve yapısal çalışmaların ortaya koyduğu modeller gösterir ki; bu adaptasyon bir dizi modifikasyon neticesinde ortaya çıkmıştır. Bunun sonucunda termal stabilite artmakla birlikte proteinlerin rijit ve dayanıklı yapısı denatürasyona karşı dayanıklı hale gelir (Eichler, 2001).

Termostabil α -amilazlar çok önceleri *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens*'den ve 60 °C'ye kadar katalitik aktiviteye sahip olan β -amilazlar çeşitli *Bacillus* türlerinden izole edilmişlerdir. Bu enzimler saf maltoz şuruplarını elde etmek için pullulanazlarla birlikte gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Ayrıca *Bacillus licheniformis*, *Myceliophthora thermophila*, *Pyrococcus wosei*, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus aggregans* mikroorganizmalarından üretilen α -amilazlar, termofilik α -amilazlardır ve optimum sıcaklıkları 100 °C'dir.

4.1.3. Alkalik Amilazlar

Yüksek pH'da aktivite gösteren enzimlerin araştırılması deterjanlarda enzimlerin kullanılması ile başlamıştır. Robyt ve Ackerman (1971) *Pseudomonas stutzeri*'den elde edilen amilazın optimum pH'sını 8 olarak tanımlamıştır.

Tablo 4.2. Bazı *Bacillus* türlerine ait nişastayı hidrolize eden termostabil enzimler ve kaynakları (Haki ve Rakshit, 2003).

Enzimler	Mikroorganizma	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH
α -amilaz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7.0
	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	6.0 – 6.5
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5.0 – 6.0
	<i>Bacillus subtilis</i>	70	7.0
β -amilaz	<i>Bacillus circulans</i>	60	-
	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	50	-
	<i>Bacillus</i> sp.	50	7.5
Pullulanaz	<i>Bacillus</i> sp.	60	-

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 etmişlerdir. Bu enzim bir endoamilazdır ve şelatlaştırıcı maddelere karşı duyarlı değildir. Şelatlayıcı maddelere duyarlı olmaması tripolifosfat içeren deterjanlarda kullanımı için temel avantajı olarak düşünülür.

Yamamoto ve Umeki (1972) alkolojik 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 alkalofilik bakterilerin tümü alkalofilik ekstraselüler enzimler üretir.

4.2. α -Amilaz Enziminin Özellikleri

Endoamilaz ailesinden olan α -amilazlar (E.C.3.2.1.1) hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunan monomerik enzimlerdir.

α -amilazın molekül ağırlığı 55200 Da dolayındadır ve sıcaklığa karşı önemli derecede direnç göstermektedir. Bu enzimin dikkate değer termostabilite özelliği artan iyonik etkileşimler, azalan yüzey alanından ileri gelebilir. α -amilaz molekülü 478 amino asit artığı (9 adet triptofan) ve 294 su molekülü içermektedir (Switf vd., 1991). Ayrıca α -amilazın kalsiyum ve klorür iyonlarını bağlama özelliği vardır. α -amilazın aktif formda olmaları için mutlaka kalsiyum iyonu gereklidir. α -amilaz en az bir kalsiyum iyonu içeren bir metaloenzimdir. Kalsiyum iyonunun afinitesi diğer iyonlardan daha kuvvetlidir. Kalsiyum bağlarının sayısı ise 1-10 arasında değişir. Kalsiyum iyonunun varlığındaki α -amilazlar kalsiyum iyonunun bulunmadığı α -amilazlara göre daha termostabildir. Ayrıca kalsiyum

iyonunun mikromolar seviyelerinin α -amilazın yapısını stabilize etmeye yaradığı bilinmektedir (Gupta vd., 2003; Declerck vd., 2000; Bush vd., 1989).

Amilaz bünyesindeki glutamat 233, aspartat 197 ve aspartat 300 birlikte çalışarak iki şeker molekülü arasındaki glikozid bağını kırmaktadır. Kalsiyum iyonu enzimde protein yapının yakınında bulunmaktadır ve enzimin yapısını stabilize etmektedir. Klor iyonu ise çoğu amilazda aktif bölgenin altından bağlanmıştır ve bu klor iyonu reaksiyonun oluşmasına yardımcı olmaktadır.

α -amilazların optimum pH değerleri genellikle 5-9 arasındadır. Enzimin kaynağına göre optimum pH aralığı değişmektedir. Saflaştırılmış α -amilazlar 50 °C' nin üzerinde aktivitelerini hızlı bir şekilde kaybetmektedirler. Ancak bu inaktivasyon durumu, kalsiyum ve substrat etkisiyle azaltılabilir. α -amilazların etkili oldukları sıcaklık aralığı ise 20-40 °C' dir.

4.3. Amilazların Endüstriyel Uygulama Alanları

α -amilazlar tekstil endüstrisinde haşılama işleminde kullanılır. İpliğin kırılmasını önlemek için sonradan giderimi kolay koruyucu bir tabaka uygulaması yapılır. Bu amaçla nişasta ile muamele edilmesine “sizing”, nişastanın ortamdan uzaklaştırılmasına ise “desizing” (haşılama) adı verilir. Haşılama işlemi, dokuma esnasında ürüne direnç kazandırır. Dokuma işleminden sonra nişastanın uzaklaştırılmasının ardından yumuşatma ve boyama işlemi başlar. Nişastanın giderilmesi ise genellikle α -amilaz enzimi uygulaması ile gerçekleştirilir (Aiyer, 2005).

α -amilazların kağıt endüstrisinde kullanımı kağıt kaplama işlemi sırasında nişastanın modifikasyonu ile yapılır. Tekstilde olduğu gibi kağıdın nişasta ile kaplanması kağıdı mekanik hasarlara karşı korumaktadır. Diğer bir ifadeyle kağıdın nişasta ile kaplanması son ürün halindeki kağıdın direncini, sertliğini ve kalitesini arttırmaktadır. Ayrıca doğal nişastanın viskozitesi, kağıda uygulanacak işlemler için çok yüksektir. Nişastanın istenilen yoğunluğa ulaşması amilaz enzimi kullanılarak nişastanın belirli düzeyde hidrolizasyonu sonucu elde edilir.

Özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilen amilazlar tahıla dayalı bir beslenmenin son derece yaygın olduğu ülkemizde kişi başına tüketilen enerjinin %58' inin tahıllardan, bununda %44' lük kısmının ekmekten karşılanmasıyla ekmek üretiminde büyük bir öneme sahiptir. Son yıllarda özellikle ekmek ve unlu mamüllerde daha iyi kabarma, renk ve daha yumuşak ürün elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca ortama amilaz ilavesiyle

hamur viskozitesi azalmakta, ürün hacmi ve hamurda şeker miktarı yükseltilerek ekmek kalitesinin artırılması amaçlanmaktadır.

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

Amilazlar son zamanlarda bazı gıda ürünlerinde raf ömrünü uzatıcı olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca alkolsüz içecek endüstrisinde de tatlandırıcı özelliğe sahip olmasından dolayı amilazlar çok büyük oranlarda kullanılmaktadır. İçecek endüstrisinde alkol fermantasyonu için nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi işlemlerinde de amilazlar kullanılmaktadır.

Deterjan endüstrisinde ise nişasta esaslı kirliliklerin giderilmesi amacı ile α -amilaz enzimi deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle sıvı deterjanların %90'ından fazlasında amilaz enzimi bulunmaktadır. Ticari olarak piyasada yer alan amilazlar ve kullanım amaçları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Bununla beraber son yıllarda bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanlara her geçen gün daha fazla miktarda amilaz enzimi katılmaya başlanmıştır. Deterjanlardaki enzim ilavelerinin en büyük faydası enzimsiz deterjanlara kıyasla daha iyi temizleme sağlaması ve ortam şartlarını yumuşatmasıdır.

Medikal ve klinik kimya analizleri ile biyoteknoloji uygulamalarında da amilaz enzimi kullanılmaktadır. Amilaz uzun zincirli polisakkaritlerin belirlenmesinde gümüş nitrat testinden daha başarılı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda elektrolit, izolator ve yarı iletken kapasitörlü biyosensörlerde de amilaz enzimi kullanılmaktadır (Giri vd., 1998).

4.4. Türkiye' de Amilaz Enzimi Üretimi

Amilaz üretimi ile ilgili teknik bilgiler geniş boyutlarda araştırılmış olmasına rağmen üretim teknolojisi çoğunlukla patent altına alındığından yeterince açıklanamamıştır. Ülkemizde giderek gelişmekte olan gıda endüstrisi amilaz enzimine olan ilginin artmasına neden olmuştur. Dış ticaret müsteşarlığı verilerine göre Türkiye'de ithalat yoluyla sağlanan çeşitli enzimlerin toplam miktarları ve dolar cinsinden değerleri Tablo 4.4.'de verilmiştir. Amilaz enzimleri de bu enzimler arasında yer almakla birlikte, bu enzimlerle ilgili yeterli bilgi edinilememiştir.

Tablo 4.3. Ticari olarak piyasada yer alan amilazlar (URL-2; URL-3; URL-4).

Enzim Adı	Kullanım Amacı
Amiloglikosidaz	Dekstrinleri glikoza çevirir.
Bakteriyel amilaz	İki aşamalı likitleştirme işleminde nişastayı dekstrine çevirir.
Dekstranaz	Ham şekerli sudaki dekstranları parçalar.
Fungal Amilaz	Yüksek maltoz içerikli dekstrin şurubu yapar . Ekmek yapımı ve ham nişastanın işlenmesinde kullanılır.
Termostabil Amilaz	Termostabil alfa amilaz olup tek aşamalı likitleştirme işlemi için kullanılır.
Maltogenaz	Özel glukoz şurupları ve maltoz içeriği yüksek şurupların yapımında kullanılır.
Fungal Amilaz 800	Alkol yapımında fermentasyon zamanını kısaltmak için kullanılır.

Tablo 4.4. Türkiye’ de ithalat yoluyla sağlanan toplam enzim miktarları ve ödenen para değerleri (Fukara, 2007) .

Yıl	Miktar (kg)	Değeri
2004	6.749.850	55.909.914 \$
2005	8.006.471	62.372.989 \$
2006 (Ocak-Mart)	1.604.874	11.891.902 \$

Hacmi giderek artan enzim tüketimine karşılık ülkemizde enzim üretimi yapan sadece bir tane kuruluş vardır (ORBA A.Ş). Kuruluş, orta ölçekli bir işletme olup tümüyle araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucunda tasarımlanmış ve faaliyete geçirilmiştir. Bu kuruluşun gıda ve tekstil endüstrisi için amilaz enzimi ürettiği bilinmektedir.

Dünyada amilaz ve diğer mikrobiyal enzimlerin üretimini yapan yüzlerce kuruluş bulunmakla birlikte, her ülke kendi ihtiyaçlarının en az belirli bir bölümünü üretmeye çalışmakta ve bu ithal edilen enzime göre daha ekonomik olmaktadır.

4.5. α -Amilaz Üretimi ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden α -amilaz enzimi kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilebilmesi nedeniyle genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bu mikroorganizmalar içerisinde de *Aspergillus niger*, *A.oryzae*, *A.candidus*, *Pseudomonas saccharophila* ve en önemlisi de geniş bir habitatta bulunabilen *Bacillus* türleri gelmektedir (Pandey vd., 2000). Endüstriyel alanlarda kullanılan 10’den fazla mikrobiyal kökenli enzimin *Bacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. *Bacillus*’lar tarafından üretilen amilazların endüstriyel uygulamalardaki

kullanım alanları Tablo 4.5.'de gösterilmektedir. *Bacillus*'lar proteolitik enzimler ve karbonhidratazların önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan bu bakterilerin büyük bir bölümü kemoorganotrof olduğu için besin istekleri azdır, kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik yoktur. Bunun gibi birçok önemli özellikleri sayesinde endüstriyel alanlarda tercih edilmektedirler. Ayrıca yapılan birçok araştırma sayesinde *Bacillus* türlerinin diğer bakteriyel kaynaklara göre daha fazla α -amilaz enzimi sentezlediği bilinmektedir (Priest, 1977).

Fungal α -amilazlar, sıcaklığa karşı bakteriyel α -amilazlardan daha az stabil olduğundan dolayı üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilen amilazlar oluşturmaktadır. Bu cinsin sentezlediği α -amilaz enzimi çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

Bunlar *B.subtilis* (Coleman ve Elliott, 1962; Pazur ve Okada, 1966; Matsuzaki vd., 1974), *B.amyloliquefaciens* (Borgia ve Campell, 1978), *B.caldolyticus* (Grootegoed vd., 1973), *B.coagulans*, *B.licheniformis* (Meer, 1972; ve *B.subtilis* var.*amylosachariticus* (Matsuzaki vd., 1974)'dur. *Bacillus* türleri arasında da endüstriyel amaçla α -amilaz enzimi üretiminde kullanılanlar *B.subtilis*, *B.stearothermophilus*, *B.licheniformis* ve *B.amyloliquefaciens* türleridir (Pandey vd., 2000).

Bakteriyel α -amilazlar farklı substratlar ve fermantasyon teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Enzim üretim proseslerinin maliyeti açısından enzim üretiminde kullanılacak karbon kaynakları son derece önem arz etmektedir. Enzim üretim proses maliyetini minimize etmek için karbon kaynağı olarak ucuz substratların kullanılması gerekmektedir. Günümüzde endüstriyel biyoteknolojinin gelişimine paralel olarak buğday kepeği, soya küspesi, ayçiçeği küspesi, pirinç kabuğu, mısır proteini, muz atıkları gibi tarımsal ve endüstriyel atıklar ile tarımsal yan ürünlerin katı substrat fermantasyon proseslerinde ucuz substratlar olarak kullanılmaları giderek yaygınlaşmaktadır. Katı substrat fermantasyonu basit bir teknik olması, daha iyi ürün elde edilebilmesi, yatırım maliyetlerinin düşük olması gibi avantajlarından dolayı biyoteknolojik proseslerde tercih konusu olmaktadır (Baysal vd., 2003; Pandey, 2000).

Bacillus megatarium 16M (Ramesh ve Lonsane, 1989), *Bacillus licheniformis* M 27 (Ramesh ve Lonsane, 1989), *Aspergillus oryzae* (Francis vd., 2003), *Bacillus subtilis* (Baysal vd., 2003), *Bacillus cereus* MTCC 1305 (Anto vd., 2006), *Penicillium chrysogenum* ve *Penicillium griseofulvum* 'dan (Balkan ve Ertan, 2007), tarımsal yanürünler

Tablo 4.5. Amilazların uygulama alanları (Atlas, 1994).

Kullanılan Endüstri	Kaynak		Uygulaması
	<i>Bacillus</i>	<i>Aspergillus</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 üretimsizin nişastanın sıvılaştırılması
Tekstil	+		Yüksek sıcaklıklarda sürekli haşıllama
Şeker	+		Glikoz, fruktoz ve maltoz üretiminde özsuda bulunan nişastayı parçalayarak filtrasyonu geliştirmek

kullanarak katı substrat fermantasyonu ile α -amilaz enzimi üretimini incelemişlerdir.

Katı substrat fermantasyonu ve derin kültür fermantasyonu arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda katı substrat fermantasyon tekniği ile daha yüksek ürün elde edildiği farklı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Pandey vd. (1999) *Pycnoporus sanguineus*' un sentezlediği α -amilazın katı substrat fermantasyonu kültürlerinde derin kültür fermantasyon kültürlerine göre 4 kat fazla olduğu, benzer şekilde *Aspergillus kawachi* IFO 4308'in katı substrat fermantasyon ortamında derin kültür fermantasyona nazaran daha fazla α -amilaz ürettiği belirtmiştir. Dey vd. (2001) katı substrat fermantasyonu ile üretilen *Streptomyces megasporus*'un sentezlediği α -amilazın derin kültür fermantasyonuna göre 3-4 kat ve Krishna (1999) *Bacillus subtilis*' den üretilen selülazın 12 kat daha fazla olduğunu belirtmiştir.

Tanyıldızı vd. (2007) *Bacillus amyloliquefaciens* kullanarak α -amilaz enzimi üretimini katı substrat fermantasyonu ile incelemişler ve maksimum α -amilaz üretimini 30 g/l mısır proteini (gluten), 10 g/l yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamında 150 rpm çalkalama hızında ve 33 °C fermantasyon sıcaklığında elde etmişlerdir. Ayrıca MgSO₄ ve CaCl₂ gibi kimyasalların ortama ilave edilmesiyle maksimum enzim üretiminde bir değişimin olmadığını belirtmişlerdir.

Helow ve Gazerly (1996) farklı nütrientleri içeren üç değişik ortamdan α -amilaz üretimini karşılaştırmışlar ve farklı substratlar kullanarak (pancar küspesi, mısır koçanı,

pirinç kabuğu, buğday kepeği ve saman) farklı fermantasyon ortamında α -amilaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada maksimum α -amilaz üretiminin buğday kepeği ve mısır koçanı içeren fermantasyon ortamında gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Haq vd. (2003) buğday kepeği, soya unu, pirinç unu, ayçiçeği atıkları gibi tarımsal yan ürünler ile *Bacillus licheniformis* kullanarak α -amilaz enzimi üretimini incelemişler ve bu tarımsal yan ürünler arasında buğday kepeğinin en iyi substrat olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim üretimi için optimum fermantasyon ortamının (%w/v) 1.25 buğday kepeği, 0.5 nütrient broth, 0.5 laktaz ve 0.5 NaCl olduğunu belirtmişlerdir.

Sodhi vd. (2005) substrat olarak buğday kepeği kullanarak *B. subtilis* ile α -amilaz üretimini incelemişler ve 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 fermantasyon ortamında maksimum enzim üretiminin elde edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca elde edilen enzimin etanol üretimi için nişasta hidrolizinde amiloglikoksidaz ile birlikte eşzamanlı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini de ifade etmişlerdir.

Anto vd. (2006) *Bacillus cereus* MTCC 1305 mikroorganizmasıyla substrat olarak buğday kepeği ve pirinç unu kullanarak α -amilaz üretimini incelemişler ve buğday kepeği içeren fermantasyon ortamında maksimum enzim üretimini elde etmişlerdir. Daha sonra ilave karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla fermantasyon ortamına glikoz, nişasta, maltoz, sakkaroz gibi karbon kaynaklarını ayrı ayrı ilave ederek enzim üretiminin arttığını ve en yüksek enzim üretiminin glikoz içeren ortamda elde edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca fermantasyon ortamına kazein, amonyum klorür, yeast ekstrakt ve üre gibi azot kaynağı ilavesinin α -amilaz üretimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Gangadharan vd. (2006) hindistan cevizi küspesi, fıstık küspesi, susam küspesi ve buğday kepeği gibi dört farklı tarımsal yan ürünleri kullanarak *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 mikroorganizması ile α -amilaz üretimini incelemişler ve maksimum α -amilaz üretimini 37 °C fermantasyon sıcaklığı, %85 başlangıç nem içeriğinde buğday kepeği ve fıstık küspesi içeren fermantasyon ortamında 72 saat sonunda elde etmişlerdir.

Kıran vd. (2005) *Bacillus sp* K-12 mikroorganizmasıyla amilaz üretimi üzerine karbon kaynakları ve çeşitli kimyasalların etkisini incelemişler ve pH 4.5–10.5 aralıklarında amilaz sentezinde değişimler olduğunu belirterek maksimum enzim üretimini pH 6–8

aralığında elde etmişlerdir. Karbon kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla nişasta, sakkaroz, laktaz bileşenlerini içeren fermantasyon ortamında yaptıkları deneylerde maksimum enzim üretimine 60. saat sonunda ulaşmışlardır. Ayrıca $MnSO_4$, $ZnSO_4$ ve EDTA gibi çeşitli kimyasalların α -amilaz üretimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Ramachandra vd. (2004) hindistan cevizi yağ kekini (HYK) kullanarak *A. oryzae* ile α -amilaz üretimini inceledikleri çalışmalarında, HYK'nin %68 nem içeren ortamda mikroorganizmanın gelişmesi ve enzim üretimi için uygun olduğunu ve maksimum α -amilaz üretimine 30 °C fermantasyon sıcaklığında, 72 saat sonunda ulaşıldığını belirtmişlerdir. Ortama glikoz ve nişasta ilavesi enzim üretimini daha da arttırmış maltoz ilavesi ise inhibasyona neden olmuştur. Ayrıca fermantasyon ortamına %1 konsantrasyonunda pepton ilave edildiğinde enzim üretiminin 1.7 kat arttığını, enzim üretiminin hücre gelişimiyle birlikte gerçekleştiğini ve biomasın pik verdiği noktada enzim üretiminin de maksimum olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan birçok çalışmada α -amilaz üretimi için yeast ekstraktın önemli bir parametre olduğu belirtilmiştir. *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 bastırdığı belirtilmektedir (Santos vd., 2003; Alam vd., 1989).

Bajpai vd. (1992) *B. licheniformis* kullanılarak farklı azot kaynaklarının etkisini inceledikleri çalışmalarında maksimum enzim üretimi için en iyi azot kaynağının pepton ve bunu takiben et ekstrakt ve yeast ekstrakt olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca maksimum α -amilaz üretiminin %1 pepton konsantrasyonuna sahip fermantasyon ortamında gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Teodoro ve Martins, (2000) *B. subtilis* ile α -amilaz üretimine ortam bileşenlerinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, yeast ekstraktın ve peptonun eklendiği deneylerde lag fazının kısalacağını ve hem hücre konsantrasyonunun hem de enzim üretiminin arttığını belirtmişlerdir.

Bacillus stearothermophilus NCA 26 α -amilaz üretiminde $CaCl_2$ ve EDTA'nın herhangi bir etkiye sahip olmadığı Hg^{+2} , Ag^+ , Cu^{+2} ve Zn^{+2} , nin *Cryptococcus sp.* S-2

mikroorganizması kullanılarak üretilen α -amilazı sırası ile %25, 51, 52 ve 87.6 oranında inhibe ettiğini, Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve EDTA' nın α -amilaz üretimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Dettori-Campus vd., 1992).

Vidyalakshmi vd. (2009) *Bacillus* suşlarından ekstraselüler amilaz üretimi için optimum fermentasyon şartlarını incelemişler ve maksimum enzim üretimini pH'nın 7 ve inkübasyon sıcaklığının 35 °C olduğu şartlarda elde etmişlerdir.

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 üretimine ulaşılabileceğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde aynı mikroorganizma ile oksijen transfer şartlarının enzim üretimine etkisini inceleyen Milner vd. (1996) yüksek havalandırma hızının enzim üretimini artırdığını, ancak deneylerinde köpük probleminin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Antifoam konsantrasyonunun artırılmasının ise çözünmüş oksijen konsantrasyonunu azalttığını belirttiği çalışmada bu problemten dolayı enzim üretiminin daha fazla artırılamadığını ifade etmiştir.

Literatürde farklı mikroorganizma ve karbon kaynağı kullanılarak α -amilaz üretiminin değişimi ve elde edilen enzimin özellikleri hakkında yapılan çalışmaların bir kısmı Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Bu çalışmada üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla doğal bir substrat olan soya küspesine ilaveten farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak α -amilaz üretiminin katı substrat fermentasyonu ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 4.6. Farklı türden mikroorganizma kullanarak değişik C ve N kaynaklarıyla α -amilaz üretimi üzerine yapılan çalışmalar.

M.O Türü	Kullanılan C Kaynağı	Kullanılan Diğer Bileşenler	Referans
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Mısır proteini (Gluten)	Yeast ekstrakt, MgSO ₄ , CaCl ₂	Tanyıldızı vd., 2007.
<i>Bacillus cereus</i> MTCC 1305	Buğday kepeği, Pirinç unu, Maltoz, Nişasta, Glikoz, Sakkaroz	Kazein, Yeast ekstrakt, üre, Amonyum klorür	Anto vd., 2006.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	Hindistan cevizi küspesi, Buğday kepeği, Fıstık küspesi	Pepton, Yeast ekstrakt	Gangadharan vd., 2006.
<i>Bacillus sp. K-12</i>	Nişasta, Sakkaroz, Laktoz	MnSO ₄ , ZnSO ₄ , EDTA	Kıran vd., 2005.
<i>Bacillus subtilis</i>	Buğday kepeği	MgSO ₄ , B vitamini, Musluk suyu	Sodhi vd., 2005.

5. MATERYAL ve METOT

5.1. Mikroorganizma

Deneylerde kullanılan *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 türü bakteri NRRL (National Center for Agricultural Utilization Research, USA) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

5.2. Bakteri Üretim Besi Yerleri ve Koşulları

Deneylerde kullanılan bakterinin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin saptanması amacıyla farklı besi yerleri kullanılmıştır. α -amilaz üretiminde kullanılan bakterilerin saklanması ve geliştirilmesi için gerekli olan besi yeri bileşimi Tablo 5.1.'de verilmiştir. Stok kültürler Tablo 5.1.'de verilen kültür saklama besi yerine ekilerek inkübasyon sonrasında buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir. Kültürler 30 günde bir yeniden hazırlanan agarlı besi yerine aşılacak suretiyle yenilenmiştir. Enzim üretiminde kullanılan bakteriler iki aşamada ekilmiştir. İlk olarak kültür saklama ortamından bakteri geliştirme ortamına ve daha sonra da 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 çözeltileri kullanarak ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besi yeri 121 °C'de ve 1.2 bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda (Prior Clave 129) sterillemiştir.

Sterillenen besi yerleri laminar flow'da ortam sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Yatık agarda bulunan bakteri kültürleri steril bir öze yardımıyla 50 ml bakteri gelişme ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere ekim yapılmıştır. Erlenlere aşılacak kültür 37 °C'de 150 rpm çalkalama hızına sahip orbital inkübatörlü çalkalayıcıda (Selecta Rotabit) 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Sterillenmiş enzim üretim besi yeri içeren erlenlere % 1 (v/v) oranında bakteri gelişim ortamından aşılacaktır. Enzim üretiminde izlenen yol Şekil 5.1.'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Bakterinin saklanması ve geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri

Bileşen	Kültür Saklama Besiyeri (g/l)	Bakteri Gelişim Besiyeri (g/l)
Glikoz	4.0	10.0
Nişasta		
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
Fermantasyon ortamı		37
Sıcaklık (°C)		

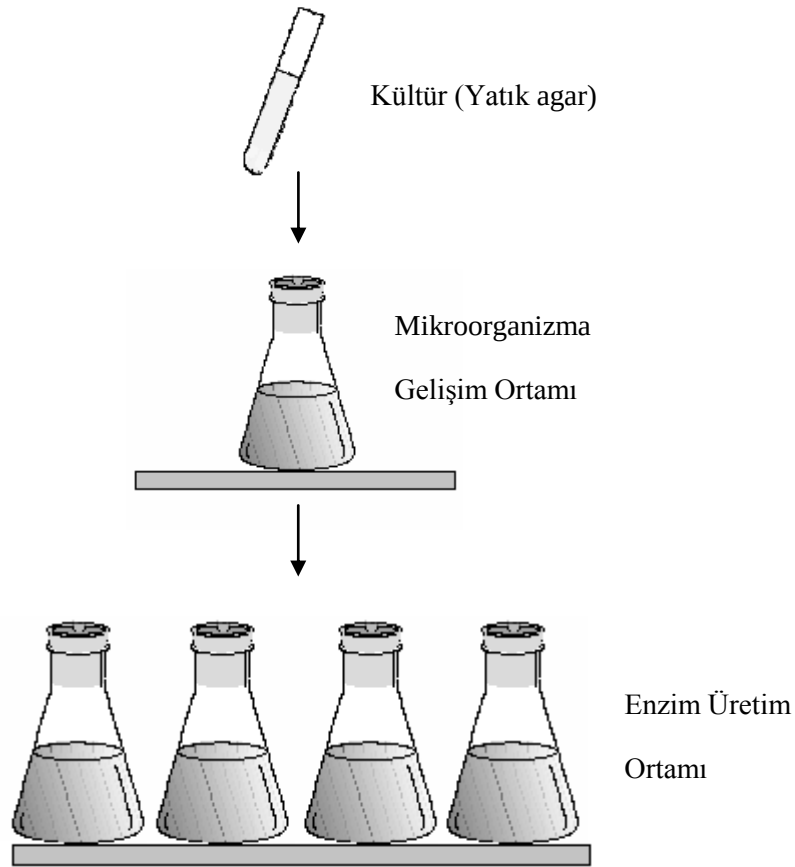
5.3. Doğal Substrat İçeren Fermantasyon Ortamı

Bu çalışmada, Ordu Yağ Sanayi A.Ş. Fabrikasından temin edilen soya küspesi ve fındık küspesi, Adana Sunar Mısır Yağ A.Ş. Fabrikasından temin edilen mısır proteini, Elazığ Kekliktepe Un Fabrikasından temin edilen buğday kepeği ve Elazığ'daki yerel bir süt işleme sanayinden temin edilen peynir altı suyu doğal substrat olarak kullanılmıştır. Kullanılan doğal substratların bazı özellikleri Ek.1'de verilmiştir. Tüm doğal katı substratlar öğütülerek ASTM standart eleklerde elenerek -100 mesh, -50+100 mesh, -30+50 mesh ve -16+30 mesh boyutlarında farklı fraksiyonları elde edilmiştir. 70 °C'de 24 saat süreyle etüvde kurutulmuş ve kapalı kaplarda muhafaza edilerek -50+100 mesh fraksiyonu deneylerde kullanılmıştır. Enzim üretim ortamında musluk suyu kullanılmıştır. 250 ml'lik erlenlere 50 ml enzim üretim ortamı konulmuş, sterilizasyondan sonra % 1 (v/v) oranında bakteri gelişme ortamından aşılanmış ve 72 ile 96 saat süresince inkübasyona tabi tutulmuştur.

5.4. Yapılan Analizler

5.4.1. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bakteri kültürlerinde α -amilaz aktivitesi tayininden önce hücrelerin ve diğer katı kısımların ayrılması amacıyla 5000 rpm'de 5 dakika süreyle fermantasyon ortamı santrifüjlendi (Hettich Eba21) ve daha sonra kültür sıvısı (süpernatant) kullanılarak enzim aktivitesinin tayini yapıldı. α -amilaz aktivitesinin tayininde Yoo vd. (1987)'in kullandıkları dekstrinojik bir yöntem olan iyodometrik yöntemden faydalanılmıştır. Bu yöntemin temeli iyodun nişasta ile verdiği renk esasına dayanmaktadır. Parçalanmamış nişasta iyot ile muamele edildiğinde mavi bir renk vermektedir. Nişasta α -amilaz enzimi tarafından parçalandığında kısa zincirli dekstrinler oluşur ki bu da mavi renk yerine sarı renk meydana getirmektedir. Böylece, ortamda bulunan enzimin miktarına bağlı olarak, ortamın rengi mavi ile sarı arasında değişmekte ve bunun derecesi de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. İyot metodu kolaylığı ve iyi sonuç vermesinden dolayı aktivite ölçümlerinde kullanılmıştır.



Şekil 5.1. Enzim üretiminde takip edilen yol

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 reaksiyonu durdurmak için 1 M 0.9 ml HCl çözeltisi eklenmiştir. Kontrol tüpüne 0.5 ml enzim çözeltisi konduktan sonra renk oluşumunu gözlemek için 0.1 ml iyot ayırıcı (% 0.3 I, % 3 KI) ilave edilmiştir. 4 ml distile suyla hacim tamamlandıktan sonra vorteks'de karıştırılarak absorbanların 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 Unite (U) olarak hesaplanmıştır. Bir unite 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.

6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda, potansiyel bir α -amilaz enzimi üreticisi olduğu tespit edilen *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 mikroorganizması kullanılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar mikroorganizmanın farklı ortamlarda değişik oranlarda α -amilaz enzimi ürettiğini göstermiştir. Doğal fermantasyon ortamında yapılan deneylerde *Bacillus amyloliquefaciens*'den α -amilaz enzimi üretimi için ortam bileşimi ve fiziksel parametreler optimize edilmiştir.

6.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Fermantasyon ile enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri ortam bileşenidir. Ortam bileşenleri içerisinde karbon kaynağı ortam maliyetinin yaklaşık % 60–80'nini oluşturmaktadır (Rehm vd., 1987).

Anaerobik metabolizmada biyoproses ortamındaki karbonun yaklaşık % 10'u, aerobik metabolizmada ise %50-55'i hücre yapısını oluşturmak üzere kullanılır. Genel olarak ortama katılan karbonlu bileşikler mikroorganizmalar tarafından aynı zamanda enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Karbon kaynağı olarak en sık kullanılan bileşikler karbonhidratlardır. Özellikle kompleks ortamı oluşturan melas, nişasta, selüloz vb. karbonhidratların kullanılması ekonomik açıdan da yararlıdır. Ayrıca hidrokarbonlar, alkoller, yağ ve yağ asitleri de karbon kaynağı olarak kullanılabilir.

Bazı mikroorganizmalar, karbon kaynaklarını seçimli olarak kullanabilir. Yani ortamda birden fazla karbon kaynağı varsa mikroorganizma önce en az enerji harcayarak metabolize edilecek kaynaktan başlamak üzere sıra ile karbon kaynaklarını kullanır.

Birçok proseste karbon kaynakları ürün oluşumunu hızlandırdığı halde bunların fazlası katabolit gerilettiği etkisi göstererek ürün oluşumunu yavaşlatabilir. Bu tür proseslerde çoğalmayı hızlandıran karbon kaynağının fazlasından kaçınılmalı ve buna ek olarak ürün oluşum hızına olumsuz etki etmeyen ya da bu olayı hızlandıran karbon kaynağı ile ortamdaki karbon eksikliği giderilmelidir (Pekin, 1983).

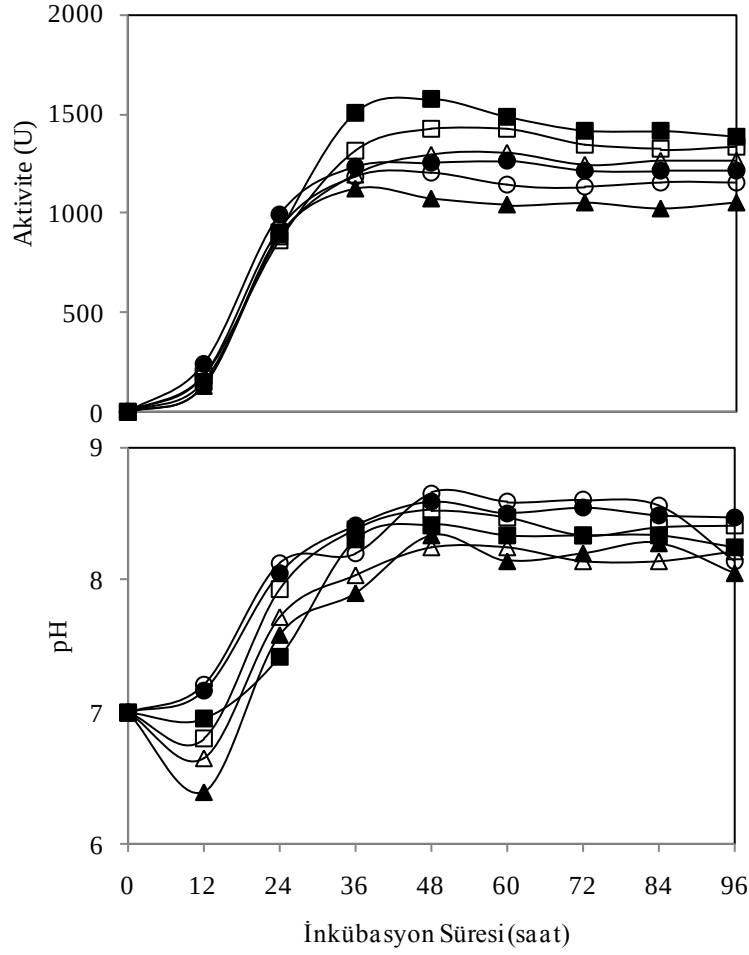
Çalışmanın bu kısmında karbon kaynağı olarak soya küspesinin kullanıldığı fermantasyon ortamında mısır proteini, buğday kepeği, fındık küspesi ve peynir altı suyu gibi ilave karbon kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

6.1.1. Soya Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi

Biyoteknolojik proseslerde ürün verimi ortamda bulunan substrat miktarından önemli derecede etkilenmektedir. Mikroorganizmalar mevcut substratı çoğalma, üretim, yaşamlarının devamı gibi bazı gereksinimler için kullanırlar. Ancak ortamda fazla veya az substrat bulunması her zaman için üretim mekanizması ile doğru orantılı olarak değişmez. Bunu incelemek amacıyla sadece musluk suyu ve farklı soya küspesi konsantrasyonları (5, 10, 15, 20, 30, 50 g/l) içeren fermantasyon ortamında yapılan deneyler sonucu elde edilen enzim üretiminin zamanla değişimi Şekil 6.1.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 20 g/l'ye kadar ortama soya küspesinin ilavesiyle enzim üretimi artarken, daha yüksek soya küspesi konsantrasyonlarında ise enzim üretiminin azaldığı görülmüştür. Katı substrat fermantasyonunda ortamın nem içeriği enzim salgılanmasını ve biyosentezini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Yüksek nem içeriği, porlu yapıya sahip olan katı substratların gözeneklerini tıkar, gaz hacmini azaltır, yapışkanlık özelliğini artırır ve oksijen transferini kısıtlarken, düşük nem içeriği katı haldeki nutrienlerin ortama geçebilmesi için yeterli olmayabilir (Sodhi vd., 2005; Ellaiah vd., 2002). Ayrıca ortam pH'sının 12. saate kadar azaldığı ve daha sonra artarak bütün deneylerde hemen hemen aynı noktaya geldiği grafikten net bir şekilde görülmektedir. 5, 10, 15, 20, 30 ve 50 g/l soya küspesi içeren ortamlardaki enzim üretimleri sırasıyla 1206 U, 1261 U, 1423 U, 1572 U, 1305 U ve 1079 U olarak elde edilmiştir. En yüksek enzim üretimine 20 g/l soya küspesi konsantrasyonuna sahip fermantasyon ortamında ulaşılması nedeniyle çalışmanın geriye kalan kısmında bu konsantrasyon değerinde devam edilmiştir.

6.1.2. Mısır Proteini Konsantrasyonunun Etkisi

İlave karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla musluk suyu ve 20 g/l soya küspesi içeren fermantasyon ortamına beş farklı (5, 10, 15, 20, 30 g/l) konsantrasyonlarda mısır proteini ilave edilmiş ve elde edilen deney sonucu Şekil 6.2.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretiminin 10 g/l mısır proteini konsantrasyonuna kadar artarken, daha yüksek mısır proteini içeren ortamlarda azaldığı gözlenmiştir. Soya küspesi ve mısır proteininin kullanıldığı fermantasyon ortamlarında yüksek substrat konsantrasyonlarında gözlenen bu azalmaya ortamda kullanılan substrat konsantrasyonunun artmasıyla bakterilerin ihtiyaç duyduğu serbest su miktarının azalmasının neden olduğu düşünülebilir. Düşük substrat konsantrasyonları ise enzim

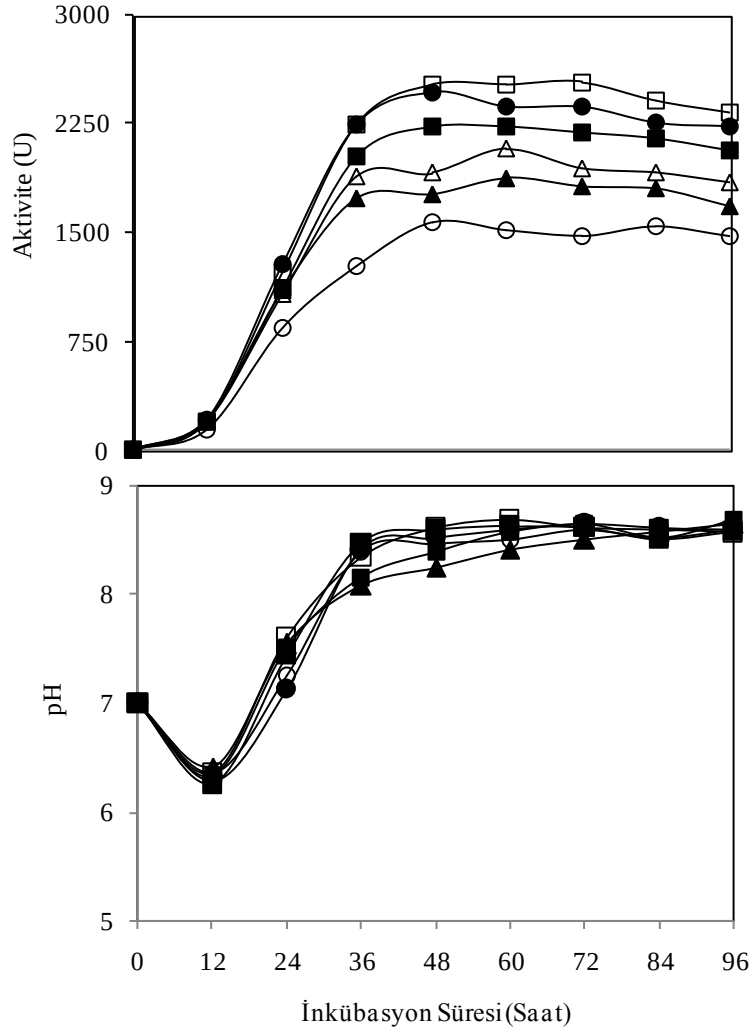


Şekil 6.1. Soya küspesi konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 5 g/l, ● 10 g/l, □ 15 g/l, ■ 20 g/l, △ 30 g/l, ▲ 50 g/l soya küspesi, KH:150 rpm, T:37 °C, pH₀:7.0).

üretimi ve mikroorganizmanın gelişmesi için yetersiz kalmaktadır. Ayrıca mısır proteininin yapısında bulunan yüksek protein içeriğinin (%60) ve protein içerisinde bulunan amino asitlerin, vitaminlerin veya iyonların enzim üretimini daha fazla arttıramadığını göstermektedir (Tanyıldızı, 2005). En yüksek enzim üretimi, 20 g/l buğday kepeği ve 10 g/l mısır proteini içeren ortamda 2540 U olarak elde edilmiştir.

6.1.3. Buğday Kepeği Konsantrasyonunun Etkisi

Musluk suyu ve 20 g/l soya küspesi bileşimine sahip fermantasyon ortamına enzim üretimini arttırmak amacıyla ilave karbon kaynağı olarak kullanılan beş farklı buğday kepeği konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 30 g/l) etkisinin incelendiği deney sonucu Şekil 6.3.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimi 5 g/l buğday kepeği konsantrasyonunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Soya küspesi ve buğday kepeğinin kullanıldığı fermantasyon ortamındaki enzim üretiminin soya küspesi ve mısır proteini

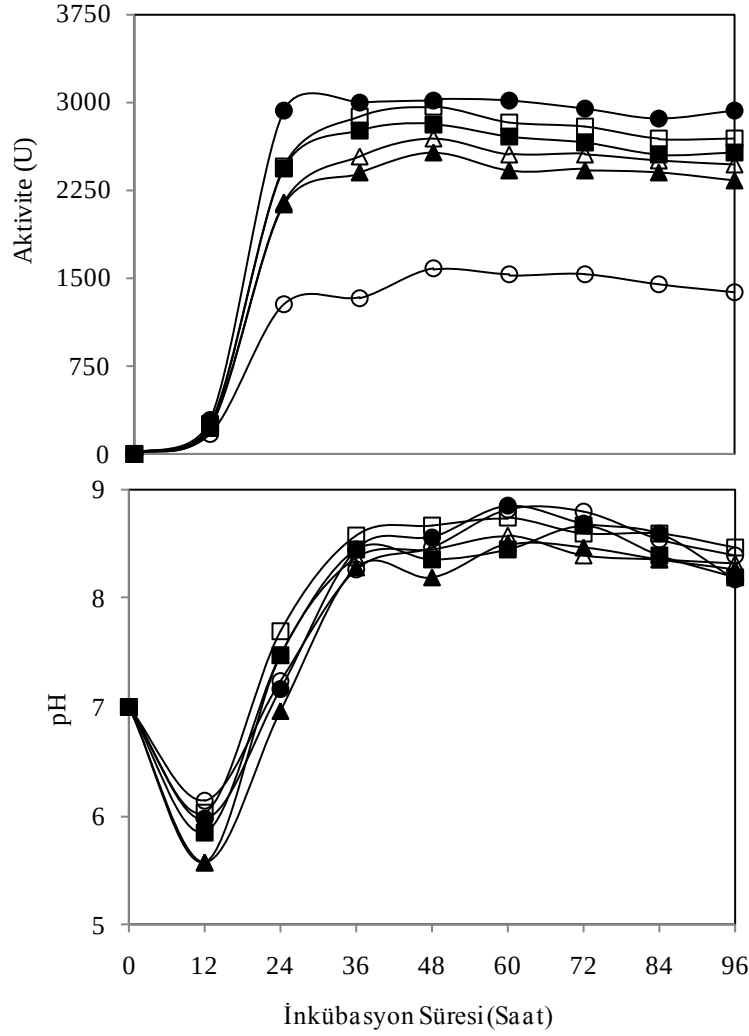


Şekil 6.2. Mısır proteini konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi ($\circ$ 0 g/l, $\bullet$ 5 g/l, $\square$ 10 g/l, $\blacksquare$ 15 g/l, $\triangle$ 20 g/l, $\blacktriangle$ 30 g/l mısır proteini, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

kullanılan ortama göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin buğday kepeği içeren ortamda mikroorganizmaların gelişmesi ve enzim üretebilmesi için gerekli nutrienlerin mısır proteini içeren fermentasyon ortamına nazaran daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yüksek buğday kepeği konsantrasyonlarında ortamdaki mikroorganizmanın kullanabileceği serbest suyun azalmasından dolayı enzim üretiminde düşüş olduğu görülmüştür. En yüksek enzim üretimine 5 g/l (3018 U) buğday kepeği içeren fermentasyon ortamında ulaşılmıştır.

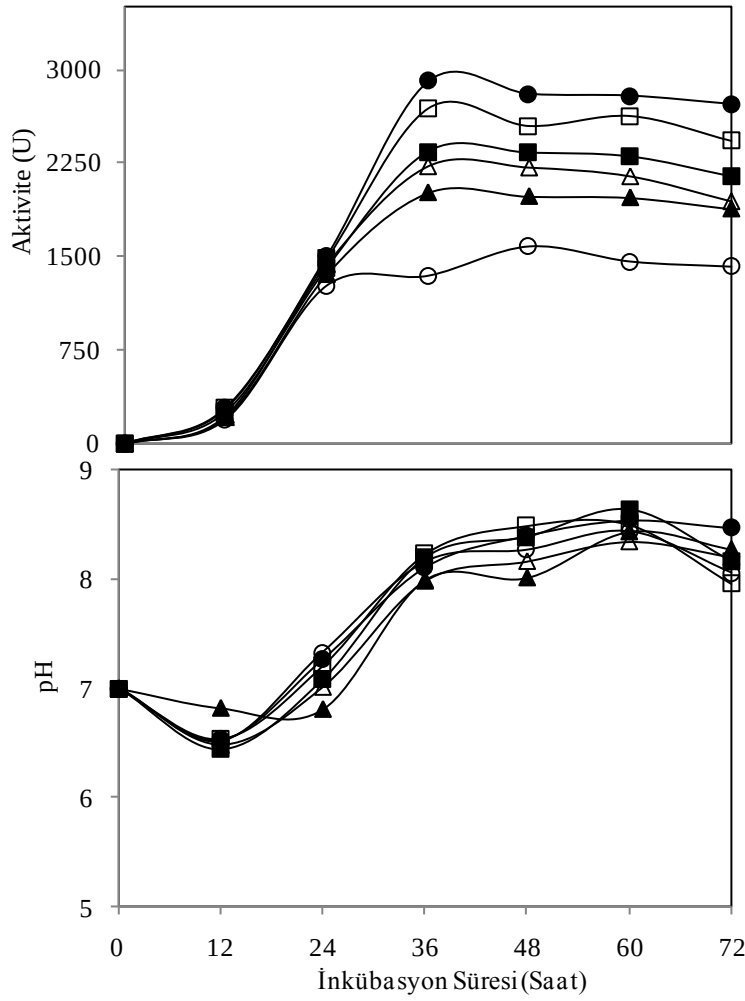
6.1.4. Fındık Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi

İlave karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla sadece musluk suyu ve karbon kaynağı olarak kullanılan 20 g/l soya küspesinin bulunduğu fermentasyon ortamında fındık küspesinin farklı konsantrasyonlarında (5, 10, 15, 20, 30



Şekil 6.3. Buğday kepeği konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l, ● 5 g/l, □ 10 g/l, ■ 15 g/l, △ 20 g/l, ▲ 30 g/l buğday kepeği, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

g/l) yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.4’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 5 g/l konsantrasyonuna sahip fındık küspesinin bulunduğu fermantasyon ortamında enzim üretimi en yüksek (2905 U) seviyeye ulaşmıştır. Daha yüksek fındık küspesi konsantrasyonlarında ise enzim üretiminde bir düşüş olduğu görülmüştür. Enzim aktiviteleri arasındaki bu fark düşük substrat konsantrasyonunun enzim üretimi ve mikroorganizma gelişimi için yetersiz kalması, yüksek substrat konsantrasyonunun ise mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu serbest su miktarını karşılayamaması ile açıklanabilir. Enzim üretiminde 20 g/l soya küspesi ve 5 g/l buğday kepeği içeren (3018 U) fermantasyon ortamına kıyasla belirli bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.



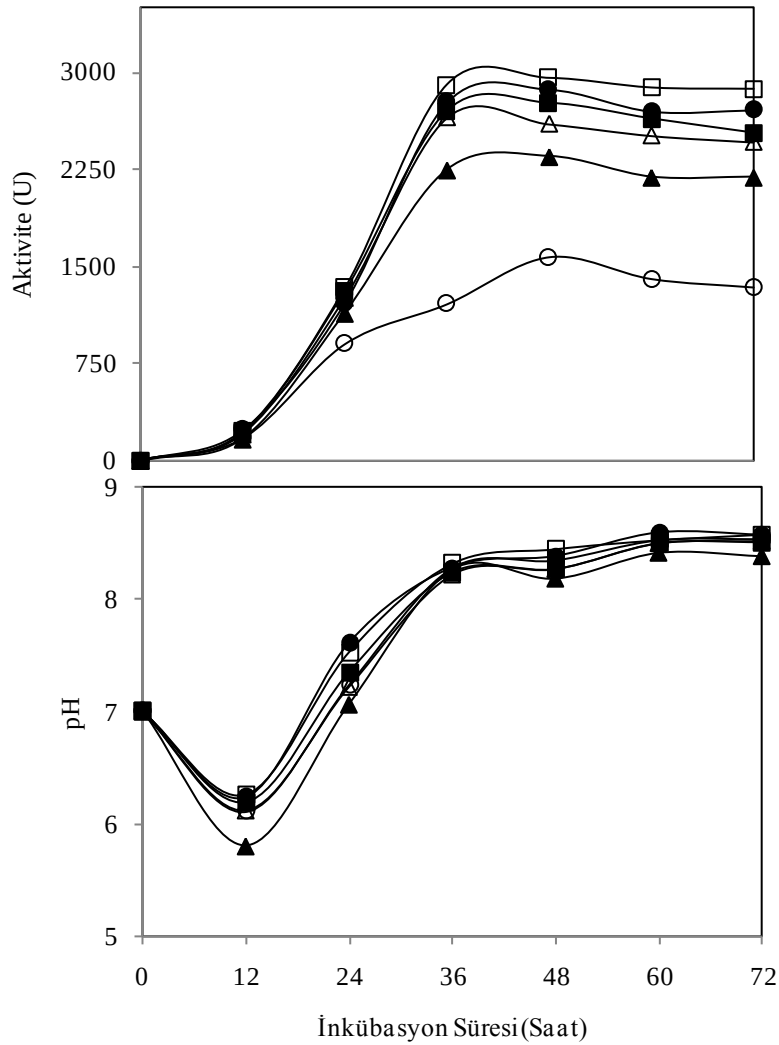
Şekil 6.4. Fındık küspesi konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l , ● 5 g/l, □ 10 g/l, ■ 15 g/l, △ 20 g/l, ▲ 30 g/l fındık küspesi , KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

6.1.5. Peynir Altı Suyu Konsantrasyonunun Etkisi

Peynir altı suyu önemli miktarda protein, yağ, laktoz gibi organik maddeleri içerir. Peynir altı suyunun içerdiği bu organik maddeler mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılabilir (Cledera-Olivera vd., 2004). Bu nedenle 20 g/l soya küspesi içeren fermantasyon ortamında karbon kaynaklarından peynir altı suyunun enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla dört farklı peynir altı suyu konsantrasyonlarında ((% v/v) 2.5, 5, 7.5, 10) yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.5.'de verilmiştir. Deneylerde kullanılan peynir altı suyunun bileşimi Ek Tablo 1.3'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi kullanılan peynir altı suyu konsantrasyonlarının tamamında enzim üretiminde bir artış olduğu ve %5 (v/v) peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamında en yüksek enzim üretimine ulaşıldığı görülmüştür. Bu artışın peynir altı suyunun içerdiği organik maddelerin büyük bir kısmının besin maddesi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek peynir altı suyu konsantrasyonlarında ise düşük peynir altı suyu konsantrasyonlarına nazaran enzim

üretiminde bir düşüşün olduğu görülmektedir. Peynir altı suyu çok yüksek oranda (%93) su içerdiğinden kısa sürede bozulmakta ve hızlı bir şekilde asitleşmektedir. Bu esnada peynir altı suyunun içeriğinde bulunan laktoz, mikroorganizmaların faaliyetine bağlı olarak büyük ölçüde laktik aside dönüşmektedir (Demirhan, 2007). Bu durum fermantasyon ortamının nem içeriğinin azalmasına ve yüksek peynir altı suyu konsantrasyonlarında enzim üretiminde düşüşün meydana gelmesine neden olabilmektedir.

Karbon kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı doğal substratlarla yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo 6.1.'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi katı substrat olarak sadece soya küspesinin kullanıldığı fermantasyon ortamında, enzim üretiminin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 6.5. Peynir altı suyu konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (% (v/v) ○ % 0, ● %2.5, □ %5, ■ %7.5, △ %10, ▲ %20 peynir altı suyu, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

Tablo 6.1. Karbon kaynaklarının α -amilaz aktivitesine etkisi.

Karbon Kaynağı	Bileşen	Maksimum Aktivite (U)
Soya Küspesi	20 g/l	1572
Soya Küspesi + Mısır proteini	20 g/l + 10 g/l	2540
Soya Küspesi + Buğday kepeği	20 g/l + 5 g/l	3018
Soya Küspesi + Fındık küspesi	20 g/l + 5 g/l	2905
Soya Küspesi + Peynir altı suyu	20 g/l + %5(v/v)	2954

Katı substrat fermantasyonunda kullanılan ideal bir substratın mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu tüm nutrijentleri içermesi istenmektedir (Sodhi vd., 2005). Ancak çoğu substratlar optimum enzim üretimi için gerekli olan bileşenleri içermediğinden enzim üretimini arttırmak amacıyla fermantasyon ortamına karbon kaynağı olarak çeşitli doğal substratlar (mısır proteini, buğday kepeği, fındık küspesi, peynir altı suyu) ilave edilmiştir. En yüksek enzim üretimi 20 g/l soya küspesi ve 5 g/l buğday kepeği içeren fermantasyon ortamında (3018 U) elde edilmiş ve çalışmanın geriye kalan kısmında bu konsantrasyon değerlerinde devam edilmiştir.

6.2. 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 (Ülger ve Çirakoğlu., 2001; Farez vd., 1992). Mikrobiyal enzim üretiminde kullanılan azot basit inorganik kaynaklardan (amonyak, nitrat ve amonyum tuzları gibi) kompleks karışımlara (maya ekstraktı, pepton, pamuk çekirdeği unu gibi) kadar geniş bir alandan sağlanabilir. Çoğunlukla amonyak, amonyum sülfat yada amonyum fosfattan yararlanılır. Bazı mikroorganizmalar ise yalnız organik asit kullanırlar. Saf organik azot bileşikleri oldukça pahalıdır. Soya, kazein, mısır altı şurubu, balık unu, maya unu, peynir altı suyu gibi kompleks azot kaynaklarının kullanımı ise oldukça ekonomiktir. Azotlu maddelerin de fazlası üretime olumsuz yönde etki edebilir. Azot kaynakları da bazı durumlarda enerji kaynağı yerine geçebilmektedir (Pekin, 1983).

Deneylerde azot kaynaklarının enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla peynir altı suyu, pepton, yeast ekstrakt, üre gibi organik azot kaynakları ve amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat gibi inorganik azot kaynakları kullanılmıştır.

6.2.1. Peynir Altı Suyu Konsantrasyonunun Etkisi

Literatürde peynir altı suyunun karbon ve azot kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Barrett vd., 2004; Ahn vd., 2000). Çalışmanın bu kısmında peynir altı suyunun karbon kaynağının yanı sıra azot kaynağı olarak da kullanılabilirliğini incelemek ve en yüksek enzim üretimini elde etmek amacıyla 20 g/l soya küspesi ve 5 g/l buğday kepeği içeren fermantasyon ortamına dört farklı peynir altı suyu konsantrasyonları ((% v/v) 2.5, 5, 7.5, 10 g/l) ilave edilerek yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.6.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi ilave edilen peynir altı suyu konsantrasyonlarının tamamında enzim üretiminde bir artışın olduğu ve en yüksek enzim üretiminin %5 (v/v) peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamında 3450 U olarak elde edildiği görülmektedir. %5 peynir altı suyu içeren ortamdaki enzim üretiminin peynir altı suyu içermeyen (20 g/l soya küspesi ve 5 g/l buğday kepeği) fermantasyon ortamındaki enzim üretimine nazaran yaklaşık %15 daha fazla olduğu görülmektedir. Sonuç olarak peynir altı suyunun α -amilaz üretiminde karbon kaynağının yanı sıra azot kaynağı olarak da kullanılabileceği düşünülebilir.

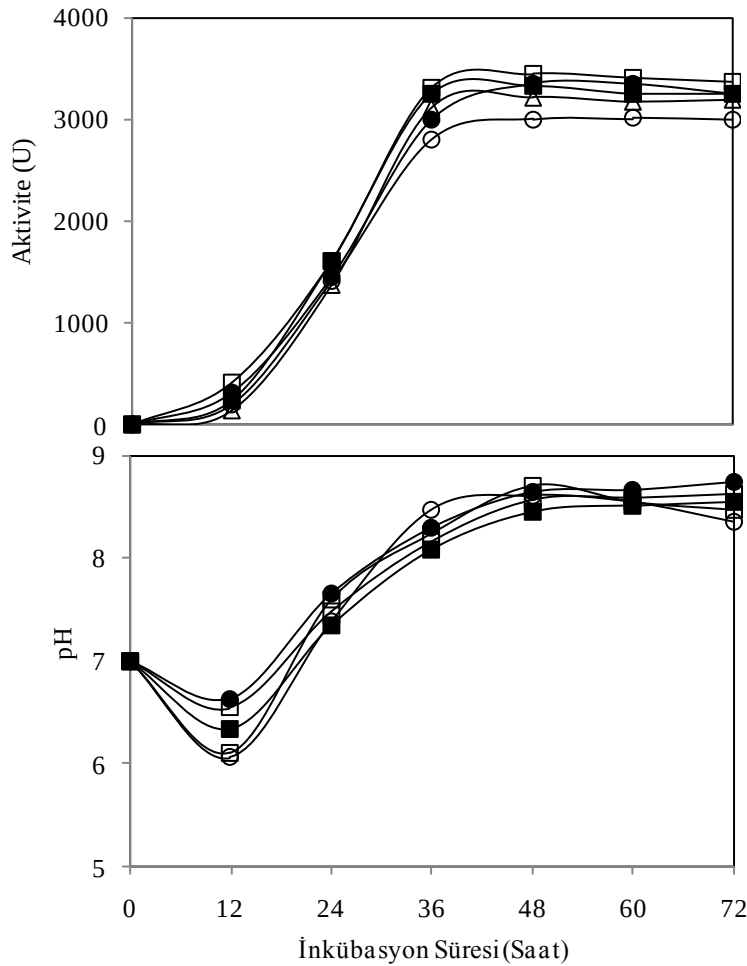
6.2.2. Pepton Konsantrasyonunun Etkisi

20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği ve %5 (v/v) peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamına organik azot kaynaklarından peptonun enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla üç farklı pepton konsantrasyonlarında (1, 2.5, 5 g/l) yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.7.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 1 g/l pepton ilavesi ile enzim üretimi artarken daha yüksek pepton konsantrasyonlarında enzim üretiminin azaldığı görülmüştür. Bu durum fermantasyon ortamındaki yüksek pepton konsantrasyonlarının enzim üretimini inhibe etmesiyle açıklanabilir. En yüksek enzim üretimi (3607 U) 1 g/l pepton kullanılan fermantasyon ortamında elde edilmiştir ve organik azot kaynaklarının enzim üretimine etkisinin araştırılması amacıyla yapılan deneylerde pepton konsantrasyonu 1 g/l olarak alınmıştır.

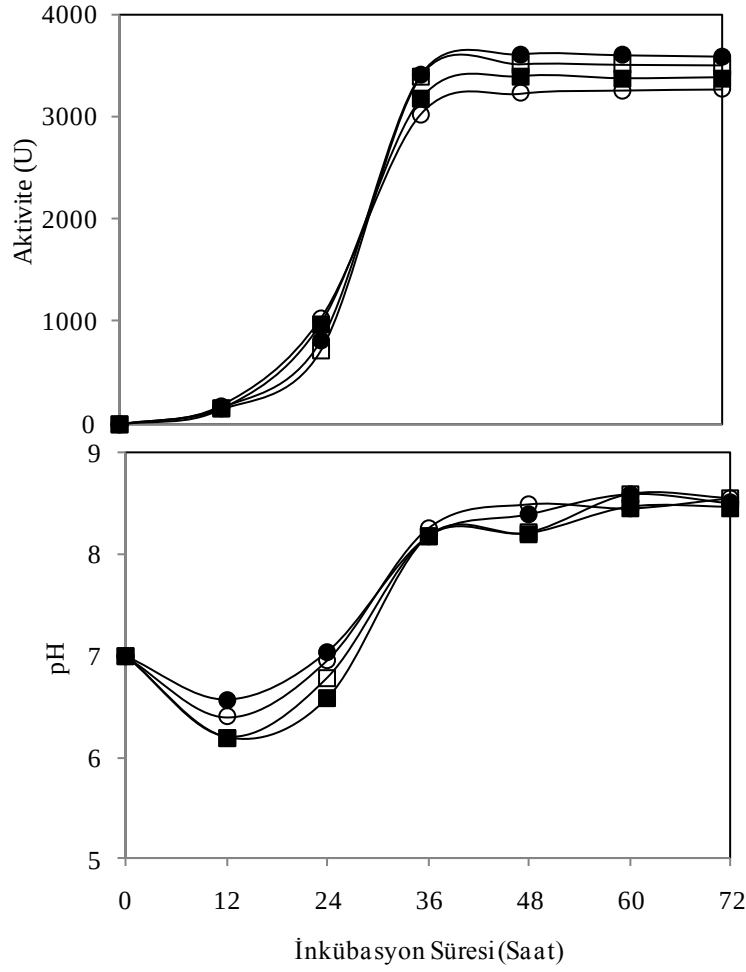
6.2.3. Yeast Ekstrakt Konsantrasyonunun Etkisi

Fermantasyon ortamına (20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, %5 (v/v) peynir altı suyu ve 1 g/l pepton) enzim üretimine organik azot kaynaklarından yeast ekstrakt'ın etkisini incelemek amacıyla dört farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında (0.5, 1, 2.5, 5 g/l) deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.8.'de verilmiştir. 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). En yüksek enzim üretimi 0.5 g/l yeast ekstrakt konsantrasyonunda elde edilmiştir. Yeast ekstraktın konsantrasyonu artarken enzim üretiminde ise bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Buna fermantasyon ortamındaki kompleks yapıya sahip doğal substratların (soya küspesi, buğday kepeği ve peynir altı suyu) içerisinde bulunan azot kaynaklarının neden olduğu düşünülmektedir (Pederson ve Nielsen, 2000). Maksimum enzim üretimine 0.5 g/l yeast ekstrakt konsantrasyonundaki ortamda ulaşılması nedeniyle çalışmanın geriye kalan kısmında 20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, %5 (v/v) peynir altı suyu, 1 g/l pepton ve 0.5 g/l yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamında devam edilmiştir.



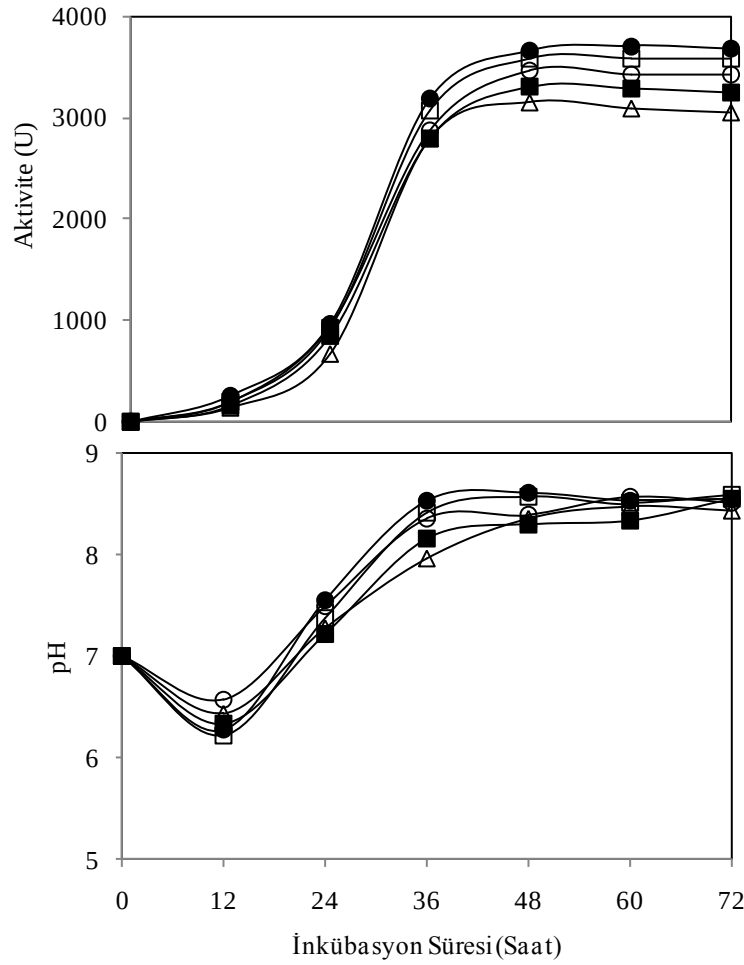
Şekil 6.6. Peynir altı suyu konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (% (v/v) ○ % 0, ● %2.5, □ %5, ■ %7.5, Δ %10 peynir altı suyu, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).



Şekil 6.7. Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l , ● 1 g/l, □ 2.5 g/l, ■ 5 g/l pepton, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

6.2.4. Üre Konsantrasyonunun Etkisi

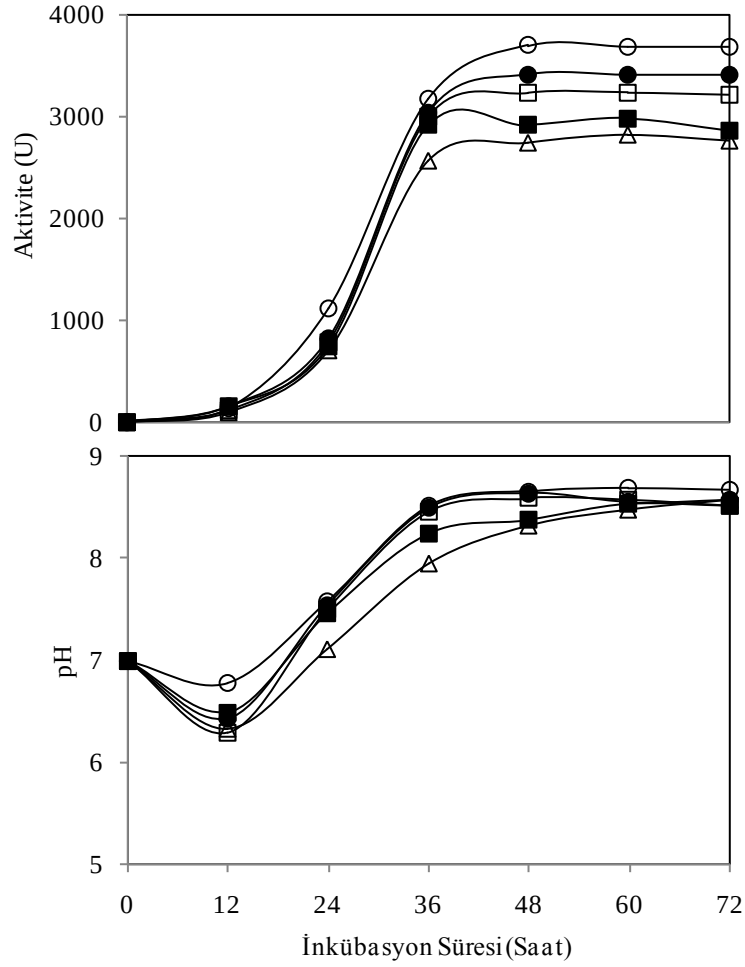
Enzim aktivitesinin 3710 U olduğu fermantasyon ortamında (20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, %5 (v/v) peynir altı suyu, 1 g/l pepton ve 0.5 g/l yeast ekstrakt) enzim üretimi üzerine organik azot kaynağı olarak ürenin etkisini incelemek amacıyla dört farklı üre konsantrasyonlarında (0.5, 1, 2.5, 5 g/l) yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.9.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi fermantasyon ortamında üre konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretiminde bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. En yüksek enzim üretimi 0.5 g/l üre içeren fermantasyon ortamında 3412 U olarak elde edilmiştir. Organik azot kaynağı olarak kullanılan ürenin enzim üretimini inhibe ettiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Mehrabadi ve Bandani (2009) α -amilaz üretimine ortam bileşenlerinin etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada ortama üre ilave edilmesiyle α -amilaz üretiminin azaldığını belirtmişlerdir. Deneylerde kullanılan pepton (3607 U), yeast ekstrakt (3710 U) gibi diğer organik azot kaynaklarıyla kıyaslandığında, üre kullanılan ortamda daha düşük (3412 U) enzim üretiminin elde edildiği görülmektedir.



Şekil 6.8. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l , ● 0.5 g/l, □ 1 g/l, ■ 2.5 g/l, Δ 5 g/l yeast ekstrakt, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

6.2.5. Amonyum Sülfat ((NH₄)₂SO₄) Konsantrasyonunun Etkisi

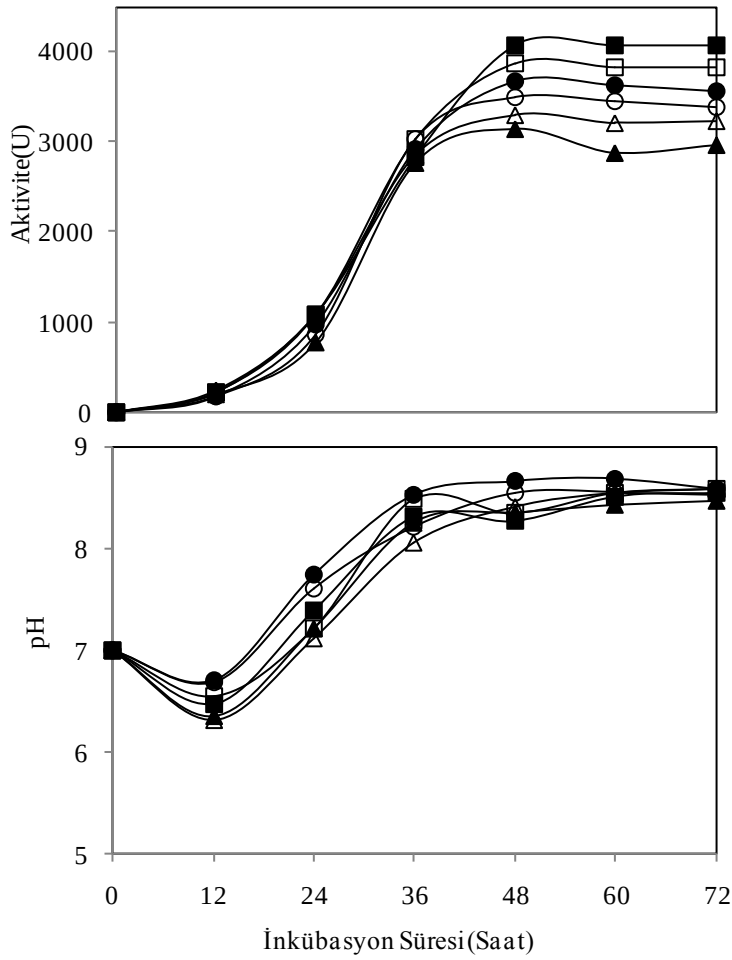
20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, % 5 (v/v) peynir altı suyu, 1 g/l pepton ve 0.5 g/l yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamına inorganik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla beş farklı (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonlarında (0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 g/l) yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.10.'da verilmiştir. Enzim üretiminin 2.5 g/l (NH₄)₂SO₄ içeren fermantasyon ortamına kadar arttığı ve daha yüksek (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonlarında enzim üretiminde bir azalmanın olduğu net bir şekilde görülmektedir. En yüksek enzim üretimi 2.5 g/l (NH₄)₂SO₄ içeren fermantasyon ortamında 4078 U olarak elde edilmiştir. (NH₄)₂SO₄ içermeyen fermantasyon ortamına (3710 U) kıyasla enzim üretiminde %10'luk bir artışın olduğu görülmektedir. Benzer şekilde *Bacillus* sp. ile yapılan daha önceki çalışmalarda (NH₄)₂SO₄' ın enzim üretimini arttırdığı belirtilmiştir (Haq vd., 2003).



Şekil 6.9. Üre konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l , ● 0.5 g/l, □ 1 g/l, ■ 2.5 g/l, △ 5 g/l üre, KH:150 rpm, T:37 °C, pH₀:7.0).

6.2.6. Sodyum Nitrat (NaNO₃) Konsantrasyonunun Etkisi

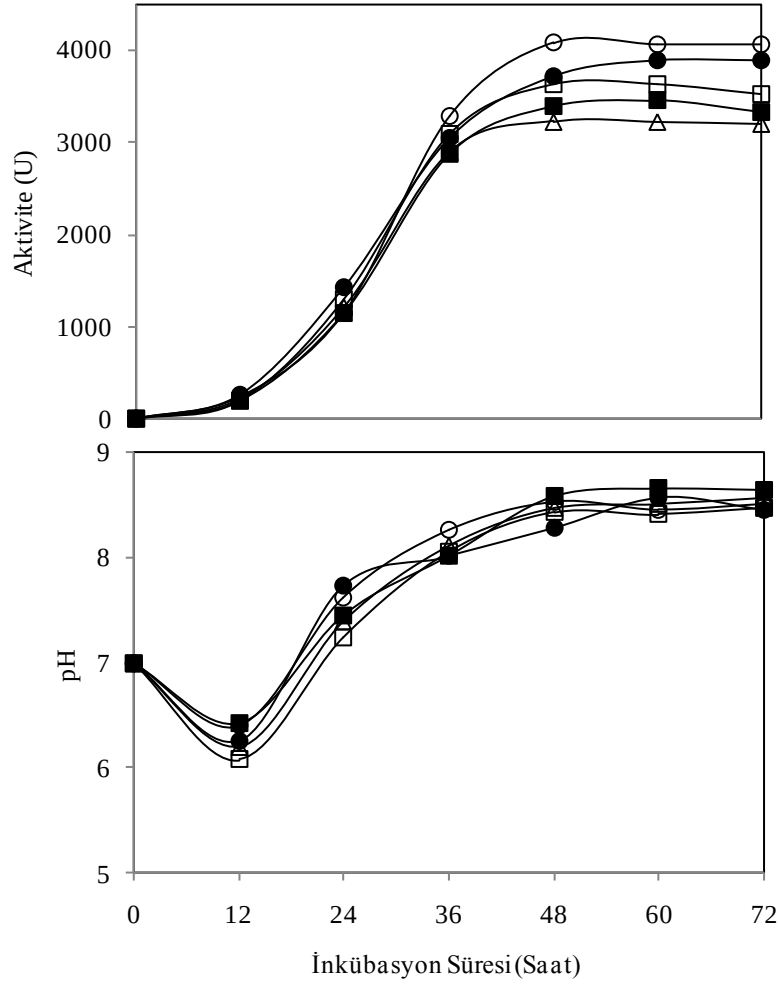
Enzim aktivitesinin 4078 U olarak elde edildiği fermantasyon ortamına inorganik azot kaynaklarından NaNO₃'ın enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla (20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, % 5 (v/v) peynir altı suyu, 1 g/l pepton, 0.5 g/l yeast ekstrakt ve 2.5 g/l (NH₄)₂SO₄) dört farklı NaNO₃ konsantrasyonlarında (0.5, 1, 2.5, 5 g/l) yapılan deneylerin sonuçları Şekil 6.11.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi NaNO₃ konsantrasyonunun artmasıyla birlikte enzim üretiminde bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin mikroorganizmanın gelişmesi ve enzim üretebilmesi için ihtiyaç duyduğu nutrijentleri kullanılan doğal substratlardan (soya küspesi, buğday kepeği ve peynir altı suyu) ve musluk suyundan karşıladığı ve buna bağlı olarak ortama NaNO₃ ilavesinin enzim üretimini inhibe ettiği düşünülebilir. En yüksek enzim üretimi 0.5 g/l NaNO₃ içeren fermantasyon ortamında elde edilmiştir.



Şekil 6.10. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi ($\circ$ 0 g/l, $\bullet$ 0.5 g/l, $\square$ 1 g/l, $\blacksquare$ 2.5 g/l, $\triangle$ 5 g/l, $\blacktriangle$ 7.5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH:150 rpm, T:37 °C, pH₀:7.0).

6.2.7. Amonyum Nitrat (NH_4NO_3) Konsantrasyonunun Etkisi

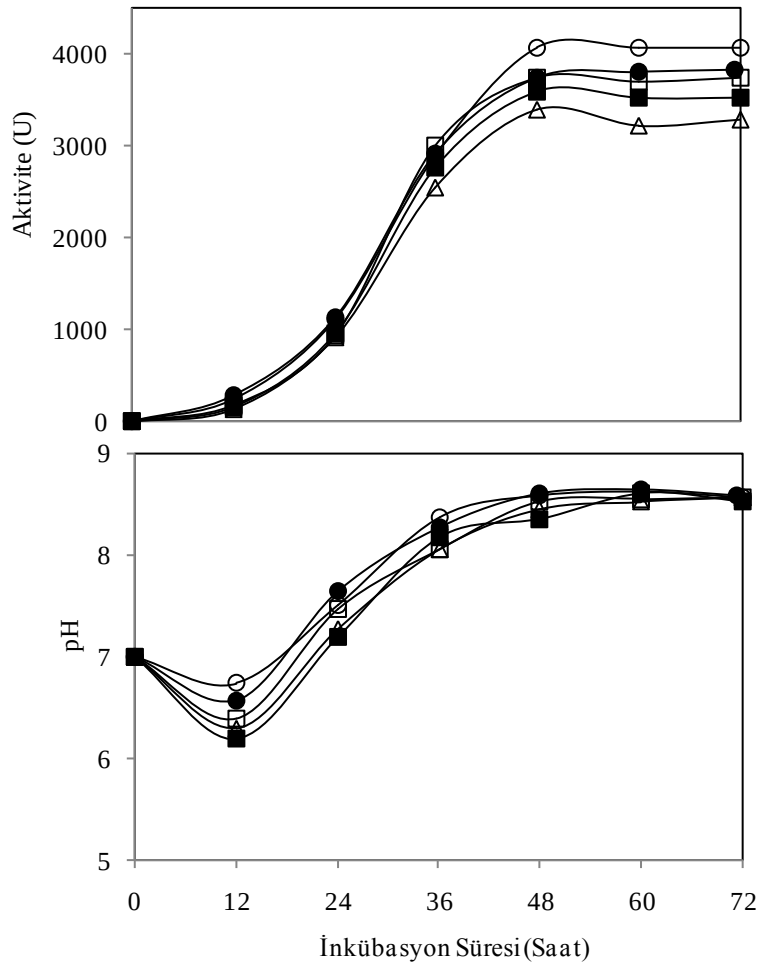
20 g/l soya küspesi, 5 g/l buğday kepeği, % 5 (v/v) peynir altı suyu, 1 g/l pepton, 0.5 g/l yeast ekstrakt ve 2.5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren fermentasyon ortamına, inorganik azot kaynaklarından NH_4NO_3 'ın enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla üç farklı konsantrasyonda (0.5, 1, 2.5, 5 g/l) NH_4NO_3 eklenerek yapılan deney sonuçları sırasıyla Şekil 6.12.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, NH_4NO_3 konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretiminde azalmanın olduğu net bir şekilde görülmektedir. Bu azalmaya NH_4NO_3 ilavesiyle α -amilaz üretiminde önemli bir parametre olan ortamın C/N oranının değişmesinin neden olabileceği düşünülebilir. Ayrıca ortama ilave edilen NH_4NO_3 fermentasyon ortamının nem içeriğini azaltarak enzim üretimini inhibe ettiği düşünülebilir. En yüksek enzim üretimine 0.5 g/l NH_4NO_3 içeren fermentasyon ortamında ulaşılmıştır. Azot kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı azot kaynaklarıyla yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo 6.2.'de verilmiştir.



Şekil 6.11. NaNO₃ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l, ● 0.5 g/l, □ 1 g/l, ■ 2.5 g/l, △ 5 g/l NaNO₃, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

6.3. NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

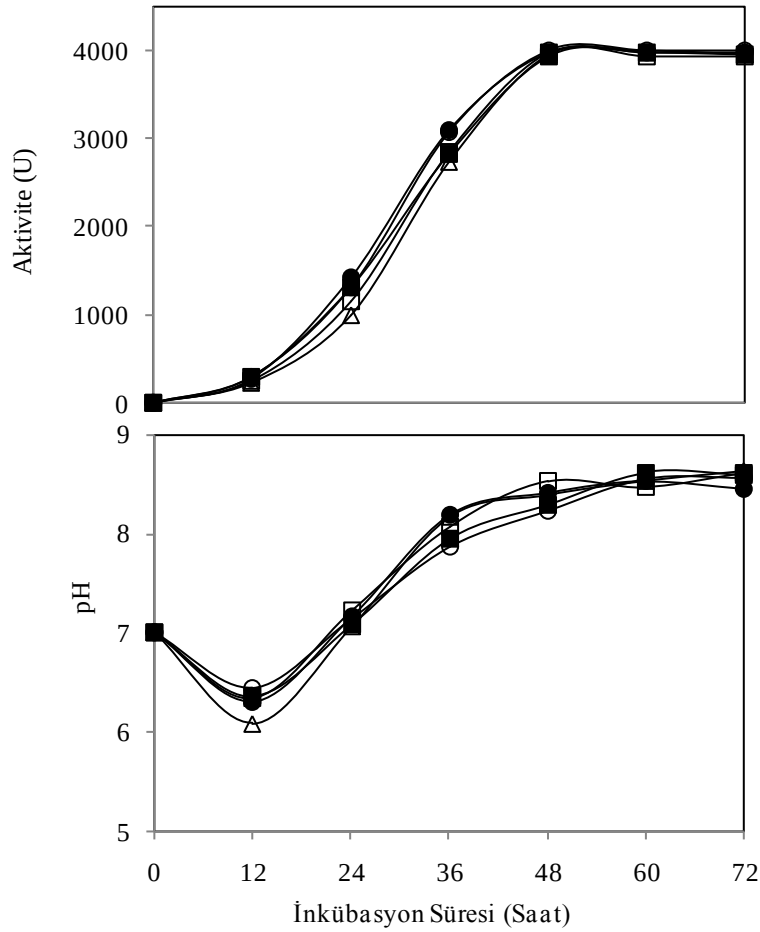
Ortamın iyonik gücünü dengelemesi açısından önemli olan NaCl'in etkisini incelemek amacıyla dört farklı NaCl konsantrasyonlarında (0.5, 1, 2.5, 5 g/l) deneyler yapılmış ve deney sonuçları Şekil 6.13.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi doğal substratların kullanıldığı katı substrat fermantasyonunda ortama eklenen sodyum iyonlarının enzim üretimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak mikroorganizmanın enzim üretiminde ihtiyaç duyduğu Na⁺ iyonunu kullanılan musluk suyundan karşıladığı düşünülmektedir. Bu sonuç enzim üretim maliyetinin düşürülmesi bakımından da önem arz etmektedir.



Şekil 6.12. NH_4NO_3 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi ($\circ$ 0 g/l, $\bullet$ 0.5 g/l, $\square$ 1 g/l, $\blacksquare$ 2.5 g/l, $\triangle$ 5 g/l NH_4NO_3 , KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

Tablo 6.2. : Azot kaynaklarının α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi.

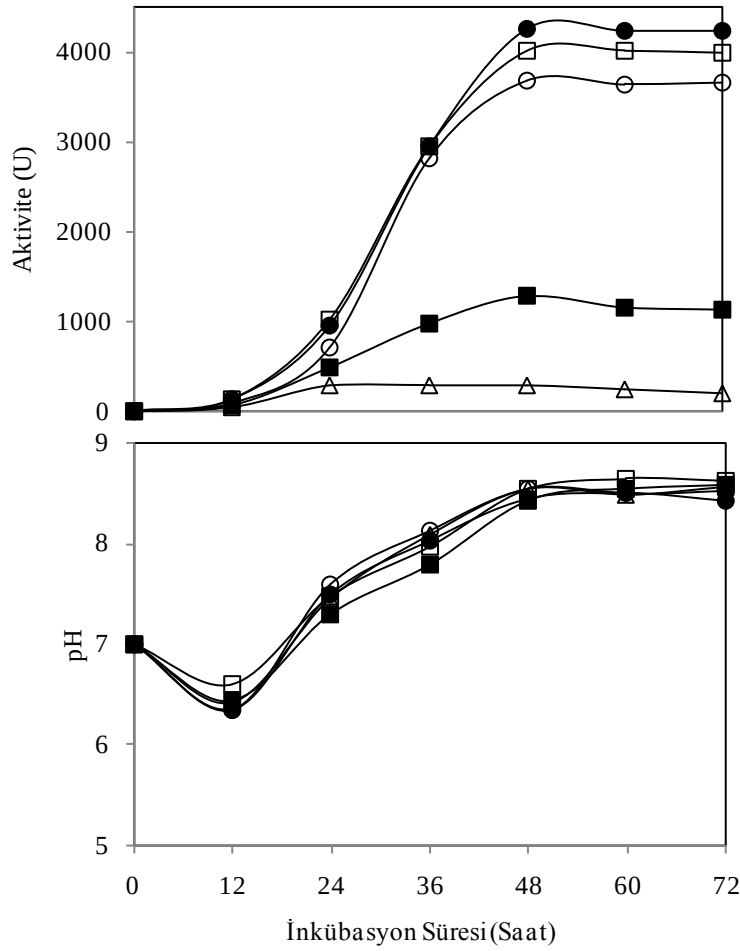
Azot Kaynakları	Konsantrasyon (g/l)	Maksimum Aktivite (U)
Kontrol (Azot Kaynağı İlavesi Yok)		3018
Peynir altı suyu	5 % (v/v)	3450
Peynir altı suyu + Pepton	5 % (v/v) + 1	3607
Peynir altı suyu + Pepton + Yeast ekstrakt	5 % (v/v) + 1 + 0.5	3710
Peynir altı suyu + Pepton + Yeast ekstrakt + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 % (v/v) + 1 + 0.5 + 2.5	4078
Peynir altı suyu + Pepton + Yeast ekstrakt + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Üre	5 % (v/v) + 1 + 0.5 + 2.5 + 0.5	3407
Peynir altı suyu + Pepton + YE + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + NaNO_3	5 % (v/v) + 1 + 0.5 + 2.5 + 0.5 + 0.5	3893
Peynir altı suyu + Pepton + YE + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + NH_4NO_3	5 % (v/v) + 1 + 0.5 + 2.5 + 0.5 + 0.5	3810



Şekil 6.13. NaCl konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ 0 g/l, ● 0.5 g/l, □ 1 g/l, ■ 2.5 g/l, △ 5 g/l NaCl, KH:150 rpm, T:37 °C, pH_b:7.0).

6.4.Sıcaklığının Etkisi

Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.14’de verilmiştir. Bu amaçla beş farklı ortam sıcaklığında (30, 33, 37, 40, 45 °C) deneyler yapılmıştır. Katı susbtrat fermantasyonunda sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın gelişebilmesi, enzim yada metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığıyla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sodhi vd., 2005). Özellikle katı substratların kullanıldığı proseslerde oluşan viskoz ortam ısı transfeini güçleştirdiğinden sıcaklık kontrolü daha bir önem kazanmaktadır (Pandey vd., 2000). 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, 1999). 30, 33 ve 37 °C’de yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim üretimleri oldukça yakın olmalarına rağmen en yüksek enzim üretimi 33 °C’de yapılan deneylerde elde edilmiştir ve bu sıcaklık literatürde

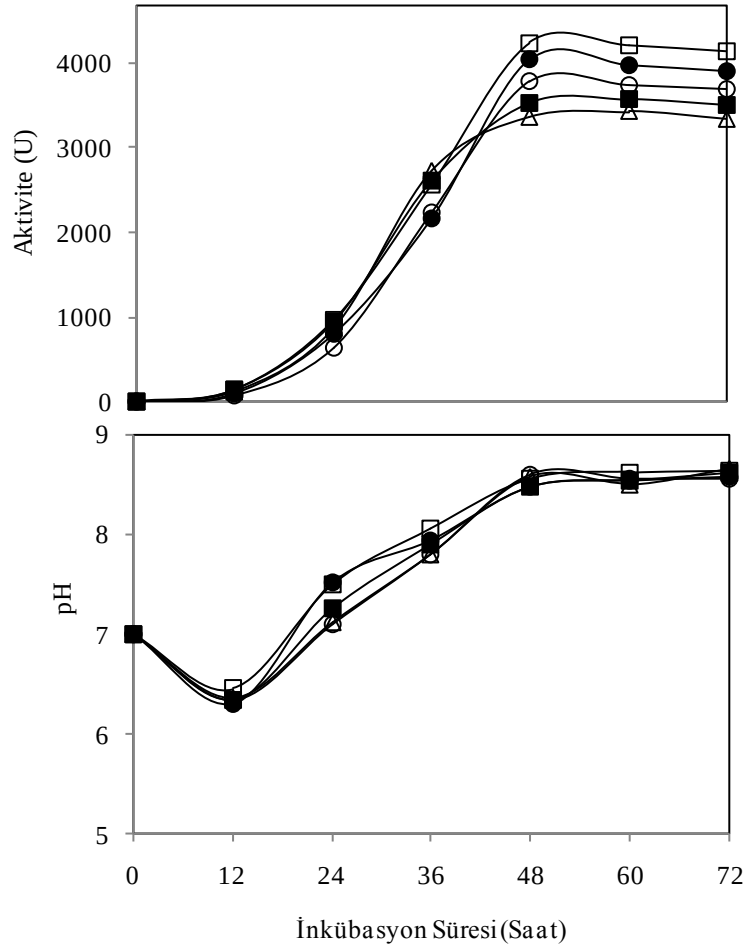


Şekil 6.14. Farklı ortam sıcaklıklarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (○ 30 °C, ● 33 °C, □ 37 °C, ■ 40 °C, △ 45 °C, KH:150 rpm, pH_b:7.0).

belirtilen sıcaklık değerlerine oldukça yakındır. Ortam sıcaklığının 37 °C'den 33 °C'ye düşürülmesiyle enzim üretiminde bir artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca fermantasyon sıcaklığındaki bu azalma ortamın buharlaşma hızını düşürmesi açısından da avantaj sağlamaktadır. Sıcaklığın 37 °C'den 45 °C ye çıkarılmasıyla da enzim üretiminde yaklaşık olarak % 93'lük bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.

6.5. Çalkalama Hızının Etkisi

Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanısıra ortam şartlarının da etkin olduğu bilinmektedir. Aerobik ortamda gelişen mikroorganizmalar ihtiyaç duydukları oksijeni ancak optimum şartlardaki karıştırma ile temin ederler. Ayrıca sentetik ortama göre doğal substratların kullanıldığı ortamlarda oksijen transferinin daha yavaş olduğu bilinmektedir. Özellikle küçük ölçekli erlenmayer deneylerinde iyi bir kütle transferi için en iyi karıştırma hızının belirlenmesi gerekir. Bu nedenle oksijen transferini önemli oranda etkileyen

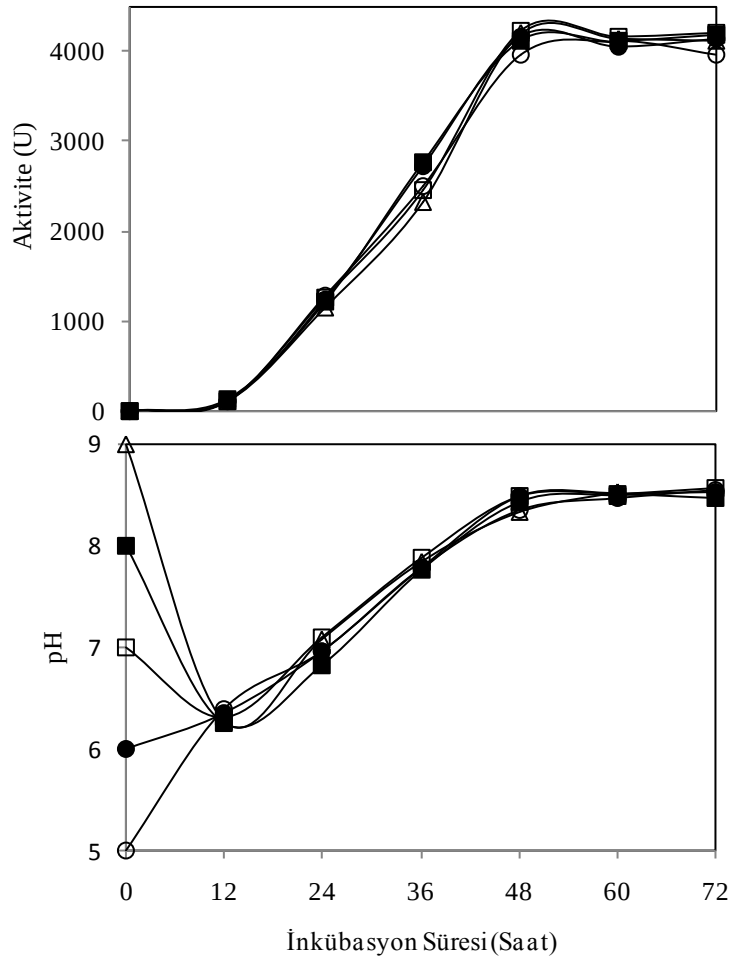


Şekil 6.15. Çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine etkisi (○ 100 rpm, ● 125 rpm, □ 150 rpm, ■ 175 rpm, △ 200 rpm, T:33 °C, pH₀:7.0).

çalkalama hızının incelendiği deney sonuçları Şekil 6.15.'de verilmiştir. Düşük karıştırma hızlarında (100 rpm ve 125 rpm) enzim üretiminde gözlenen azalma katı substratların kullanıldığı viskoz doğal ortamda mikroorganizma ile substratın temas edememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yüksek karıştırma hızlarında (175 rpm ve 200 rpm) ise fermantasyon ortamında meydana gelebilecek olan gerilmelerin mikroorganizmanın morfolojisini olumsuz yönde etkileyerek enzim üretiminde azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir. Maksimum enzim üretimi 150 rpm karıştırma hızında yapılan deneyde elde edilmiştir.

6.6. Başlangıç pH'sının Etkisi

Başlangıç pH'sının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı başlangıç pH'larında (5, 6, 7, 8, 9) yapılan deney sonuçları Şekil 6.16'da verilmiştir. Başlangıç pH'sının değişmesiyle enzim üretiminde bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Ortam pH'sının kısa süre sonra tüm deneylerde aynı noktaya geldiği görülmüştür. pH'daki bu



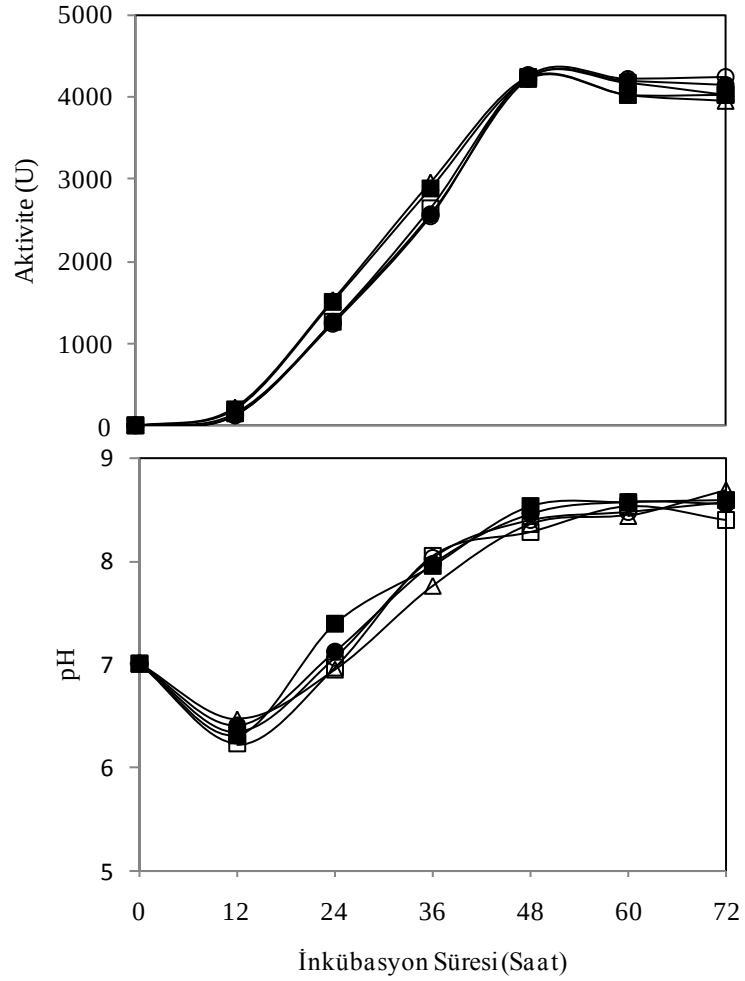
Şekil 6.16. Başlangıç pH'sının enzim aktivitesine etkisi (○ 5, ● 6, □ 7, ■ 8, Δ 9, T:33 °C, KH:150 rpm).

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 en fazla olduğu zaman dilimlerinde ortam pH'sında benzer bir eğilim izlediği görülmektedir.

6.7. Ekim Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı ekim konsantrasyonlarında (% (v/v) 1, 2.5, 5, 10, 20) yapılan deney sonuçları Şekil 6.17.'de verilmiştir. Ekim konsantrasyonu mikroorganizmaların lag fazının kontrolünde etkilidir. Düşük ekim konsantrasyonlarında lag fazın uzun olduğu, yüksek ekim konsantrasyonlarında ise nem içeriğinin artmasıyla yine lag fazın önemli miktarda uzayacağı belirtilmektedir (Krishna, 1999). Yapılan deneyler neticesinde lag fazının oldukça uzun olduğu ve ekim konsantrasyonunun bu evreyi azaltmada pozitif bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin daha geç belirlenmesi kullanılan doğal katı substratların ortama geçmesi ve bu substratları mikroorganizmanın kullanacak forma getirmesi gibi ara kademelerin meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Şekil 6.17'den

de görüldüğü gibi ekim konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 6.17. Ekim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (○ % (v/v) 1, ● %2.5, □ %5, ■ %10, Δ %20, T:33 °C, KH: 150 rpm, pH_b:7.0).

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

1. Musluk suyu ve karbon kaynağı olarak soya küspesinin kullanıldığı fermantasyon ortamında mikroorganizmanın enzim üretebildiği ancak enzim aktivitesinin düşük olduğu ve maksimum enzim üretimine ulaşabilmek için ortama ilave karbon ve azot kaynaklarının eklenmesi gerektiği belirlenmiştir.

2. Yapılan deneylerde soya küspesinin yanı sıra ilave karbon kaynağı olarak kullanılan mısır proteini (gluten), buğday kepeği, fındık küspesi ve peynir altı suyunun enzim üretimini arttırdığı ve buğday kepeği içeren ortamda maksimum enzim üretimine ulaşıldığı belirlenmiştir.

3. Organik azot kaynaklarından peynir altı suyu, pepton ve yeast ekstrakt'ın inorganik azot kaynaklarından ise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın enzim üretimini arttırdığı belirlenmiştir.

4. α -amilaz üretimi için peynir altı suyunun hem karbon hemde azot kaynağı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

5. Yapılan çalışmada NH_4NO_3 , NaNO_3 , üre gibi azotlu bileşiklerin enzim üretimini azalttığı ve fermantasyon ortamının iyonik yükünü dengelemesi açısından önemli olan NaCl tuzunun enzim üretimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu bileşenlerin pozitif bir etkiye sahip olmaması kullanılan doğal substratların bünyesinde bu bileşenlerin bulunmasıyla açıklanabilir. Ayrıca α -amilaz üretimi için bu maddelere ihtiyaç duyulmaması ortam maliyetini azaltmak yönünden önemlidir.

6. Ortamda ilave karbon ve azot kaynaklarının bulunmadığı deneyde enzim üretiminin düşük olduğu ve mikroorganizmanın da enzim üretebilmesi için ilave karbon ve azot kaynaklarına ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda 20 g/l soya küspesinin yanı sıra fermantasyon ortamına ilave edilen buğday kepeği (5 g/l), peynir altı suyu %5 (v/v), pepton (1 g/l), yeast ekstrakt (0.5 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.5 g/l) gibi ilave karbon ve azot kaynaklarıyla maksimum enzim üretimine ulaşılmıştır.

7. Fermantasyon sıcaklığının enzim üretimini değiştiren en önemli parametrelerden biri olduğu ve fermantasyon sıcaklığının 37 °C'den 33 °C'ye düşürülmesi ile enzim üretiminde önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir.

8. Soya küspesinin yanı sıra buğday kepeği ve peynir altı suyu gibi doğal substratların endüstriyel α -amilaz üretiminde etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

9. 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.

7. ÖNERİLER

1. Doğal substratlar kullanılarak erlenlerde incelenen α -amilaz üretimi aşırı köpük oluşumunun önlenmesi durumunda karıştırmalı fermantörlerde de incelenebilir. Farklı fermantör tiplerini kullanmak suretiyle enzim üretimi arttırılırken süreyi kısaltmak mümkün olabilir.

2. Daha sonraki çalışmalarda üretilen enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılabilir.

3. Mikroorganizmanın genetik yapısı düzenlenerek, enzim üretimini arttırma çalışmaları yapılabilir

4. Enzim üretim maliyetini azaltmak amacıyla daha ekonomik olan farklı karbon kaynakları araştırılarak enzim üretimi gerçekleştirilebilir.

5. Fermantasyon sonrasında ortamda kalan protein içeriği ve besin değeri bakımından zengin olan katı materyal hayvan yemi olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Ahn, S.W., Park, J.S., Lee, Y.S., 2000. Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (8),3624-3627.
- Aiyer, P.V., 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, **4** (13), 1525-1529.
- 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.
- Anto, H., Trivedi U., Patel K., 2006. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation, *Food Technology and Biotechnology*, **44** (2), 241-245.
- Atlas, R.M., 1994. Microorganisms in our World, Mosby, 724-726.
- 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.
- Balkan, B. and Ertan, F., 2007. Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid-state fermentation bu using some agricultural by-products, *Food Technol. Biotechnol.*, **45**(4), 439-442.
- Barrett, E., Stanton, C., Zelder, O., Fitzgerald, G., Ross, R.P., 2004. Heterologous expression of lactose and galactose utlizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of lysine in whey, *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (5), 2861-2866.
- Baysal Z., Uyar F., Aytakin Ç., 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water, *Process Biochemistry*, **38**, 1665-1668.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnolgy Advances*, **18**, 355-383.
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S. and Soccol, R.C., 2000. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system, *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 127-133.
- Borgia, P.T. and L.L. Campbell., 1978. α -amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: evidence for identical primary structures. *J. Bacteriology* **134** (2), 389-393.
- Boyer, E.W. and Ingle, M.B., 1972. Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species, *Journal of Bacteriology*, **110**(3), 992-1000.
- Buonocore, V., C. Caporale, M.D. Rosa and A.Gambacorta., 1976. Stable, inducible thermoacidophilic alpha-amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriology*. **128** (2), 515–521.
- Bush, S.D., Siticher, L., Huystee, R.V., Wagner, D. and Jones, R.L., 1989. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone α -amylase, *The Journal of Biological Chemistry*, **264** (32).
- Cledera-Olivera, F., Caron, G.R. and Brandelli, A., 2004. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, **21**, 53-58.

- Coleman, G. and Ellhott, W.H.**, 1962. Studies on α -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **83**, 256-263.
- Couto, S.R. and Sanroman, M.A.**, 2005. Application of solid state fermentation to food industry-A review, *Journal of Food Engineering*.
- Çetin, E.T.**, 1983. Endüstriyel mikrobiyoloji, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Bayda Yayın, I. baskı, 145-146.
- Decklerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. and Gaillardin, C.**, 2000. Probing Structural Determinants Specifying High Thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase, *J. Mol. Biol.* **301**, 1041-1057.
- Demirhan, E.**, 2007. Peynir altı suyundan elde edilen laktozun enzimatik hidrolizinin incelenmesi ve modellenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R. and Maiti, B.R.**, 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, **7**, 227-231.
- Eichler, J.**, 2001. Biotechnological uses of archaeal extramozyme. *Biotechnology Advances*, **19**, 261-278.
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P. and 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.
- 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, M.E., Fernandez-Vivas, A. and Arias, J.M.**, 1992. *Journal of Applied Bacteriology*, **213**, 148-156.
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S. and Ghosh, S.** 2003. Use of surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Bicemical Engineering Journal*, **15**, 107-115.
- Fujiwara, S.**, 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94(6)**, 518-525.
- Fukara, Gülay.**, 2007. Bazı Ekstrem Termofil Bakterilerin Amilazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Madhavan, K. and Pandey, A.**, 2006. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production, *Food Technol. Biotechnol.*, **44(2)**, 269-274.
- Giri, A.P, and Manvendra, K.S.**, 1998. Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus Cajan*) seeds, *Phyrochemistry Journal*, **47(2)**, 197-202.
- Gomez, J., Pazos, M., Couto, S.R. and Sanroman, M.A.**, 2005. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions, *Journal of Food Engineering*, **68**, 315-319.
- Gomez, J., Solar, D.R., Pazos, M. and Sanroman, M.A.**, 2006. Applicability of *Coriolopsis rigida* for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1013–1017.

- Grooteoged, J.E., A.M. Lauwers. and Heinen, W., 1973. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Arch. Microbiol.* **90**, 223-232.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* **38**, 1599-1616.
- Haki, G.D. and Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* **89**, 17-34.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T. and Fogarty, W.M., 1999. Production and properties of the raw starch digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435, *Process Biochemistry*, **35**, 27-31.
- Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J. and Qadeer, M.A., 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an econimal medium, *Bioresource Technology*, **87**, 57-61.
- Helow, E.R. and Gazerly, M.A., 1996. *Bacillus subtilis* α -amylase, lichenase, β -mannanase and xylanase: screening for their induction by agro-industrial by products and precipitation by organic solvents, *J. Basic Microbiol.* **36**, 75-81.
- Henrissat, B. and A. Baïroch., 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
- Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 175-186.
- Ingle, M.R. and Erickson, R.J., 1978. Bacterial alpha-amylases, *Adv. Applied Microbiol.* **24**, 257-278.
- Kıran, O., Çomlekcioglu, U. and Arıkan, B., 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. K-12, *Turk J. Biol.*, **29**, 99-103.
- Krishna, C., 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes, *Bioresource Technology*, **69**, 231-239.
- Kuru, F., 2007. Katı Substrat Fermantasyonu İle Lakkaz Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Lenette, E.H., Ballows, A., Hausler, J.W. Jr. and Shadomy, J.H., 1985. *Manuel of Clinical Microbiology*. **4**, 1149.
- Macgregor, E.A., 2005. An overview of clan GH-H and distantly-related families, *Biologia (Bratislava)*, **60(16)**, 5-12.
- Manning, G.B. and Campbell, L.L., 1961. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* **236 (11)**, 2952-2957.
- Matsuzaki, H., Yamane, K., Yamaguchi, K., Nagata, K. and Marou, B., 1974. Hybrid α -amylases produced by transformants of *Bacillus subtilis*. I Purification and Characterization of extracellular α -amylases produced by the parental strains and transformants, *Biochim. Biophys. Acta.* **365**, 235-247.
- Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H. and Luccio, M.D., 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate, *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 56-59.
- Meer, J.L., 1972. The Regulation Of alpha-Amylase Production in *Bacillus licheniformis*. Antonie van Leeuwenhoek, *J. Microb. Serol.* **38**, 570-585.

- Mehrabadi, M., and Bandani, A.R.,** 2009. Assessing of α -amylase activity of midgut in wheat bug *Eurygaster maura*, *American Journal of Applied Sciences*, **6(3)**, 478-483.
- Milagres, A.M.F., Santos, E., Piovan, T. and Roberto, I.C.,** 2004. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor, *Process Biochemistry*, **39**, 1387-1391.
- 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.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P.,** 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Bioresource Technology*, **77**, 149-162.
- Pandey, A., Soccol, C.R. and Mitchell, D.,** 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Process Biochemistry Journal*, **35**, 1153-1169.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R.,** 2000. Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 135-152.
- Pandey, A.,** 2003. Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 81.
- Pazur, J.H. and Okada, S.,** 1966. A novel method for the action patterns and the differentiation of α -1,4-glucan hydrolases, *The journal of biological chemistry*, **241(18)**, 4146-4151.
- Pederson, H. and Nielsen, J.,** 2000. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 278-281.
- Pekin, B.,** 1983. Biyokimya Mühendisliği, Birinci Kitap İkinci Kısım, Ege Üniv., İzmir.
- Perez-Guerra, N., Tornado-Agrasar, A., Lopez-Macias, C. and Pastrana, L.,** 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* , **2(3)**, 343-350.
- Polaina, J. and A.P. Maccabe.,** 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer, Netherlands.
- Priest, G.P.,** 1977. Extracellular enzymes synthesis in the genus *Bacillus*, *J. Biological Reviews*, **41**, 711-753.
- Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G.,** 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 127-135.
- Raimbault, M.,** 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 717-725.
- Ramachandran, S., Patel, A.,K., Nampoothiri K.,M., Francis, F. and Nagy, V.,** 2004. Coconut oil cake, a potential raw material for the production of α -amylase, *Bioresource Technology*, **93**, 169-174.
- Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K.,** 1989. Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable alpha amylase with two peaks for ph optima by *Bacillus licheniformis* M 27, *Biotechnology Letters*, **1**, 49-52.
- Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F.,** 1987. Biotechnology, 7a, 5-100, New York.
- Sağıroğlu, A.K.,** 1999. Bilim ve Teknik, No:383, 74-80.
- Santos, E., O., Meire Leis 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 Üniversitesi, Ankara.
- Segel, I.H., 1975. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems, *Wiley-Interscience Publication*, New York.
- Shankar, S.K. and Mulimani, V.H., 2006. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, *Bioresource Technology*.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T. and Gupta, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme. Microb. Technol.* **21**, 525-530.
- Sodhi, H. K., Sharma K., Gupta, J.K. and Soni, S.K., 2005. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus sp.* PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, *Process Biochemistry*, **40**, 525-534.
- Stein, E.A. and E.H. Fischer., 1958. The resistance of α -amylases to words proteolytic attach. *J. Biol. Chem.* **232**, 867-869.
- Swift, H.J., Brady, L., Defwenda, Z.S., Dodson, J. and Turkenburg, J.P., 1991. Acta Crystallogr., Sct. B V. **47**, 535.
- Tanyıldızı, M.Ş., 2005. Çeşitli bakteri türleriyle farklı ortam ve çalışma şartlarında α -amilaz üretiminin incelenmesi, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Tanyıldızı, M.Ş., Özer, D. and Elibol, M., 2007. Production of bacterial α -amylase by *B.amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, **37**, 294-297.
- Tatar, F., 1997. *Aspergillus niger* kullanarak alfa-amilaz enzimi üretimi üzerinde araştırmalar, *Yüksek Lisans Semineri*, Uludağ Üniversitesi., Bursa.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Telefoncu, A., 1995. Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Teodoro, C.E.S. and Martins, M.L.L., 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.*, *Brazilian Journal of Microbiology*, **31**, 298-302.
- Topal, S., 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye Rennin'in yeri, *Gıda*, **10(1)**, 25-37.
- Üçüncü, M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Ülger, C. and Çırakoğlu, Ç., 2001. A-amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus amyloliquefaciens*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **17**, 553-555.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.* **94**, 137-155.
- Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., and Indhumathi, J., 2009. Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus spp*, *World Journal of Chemistry*, **4(1)**, 89-91.
- Yamamoto T. and Umeki, K., 1972. Structures of branched dextrins produced by saccharifying α -amylase of *Bacillus subtilis*, *J Biochem*, **72**, 1219-1226.

Yoo, Y.J., Hong, J. and Hatch, R.T., 1987. Comparison of α -amylase activities from different assay methods. *Biotech. Bioengn.* **30**, 147-151.

URL-1, www.cygm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/enzimlerin_ozellikleri.pdf.27 Mart 2010

URL-2, www.freepatentsonline.com.11 Mart 2010

URL-3, www.delphion.com. 04 Mart 2010

URL-4, www.inventions-patents.net.22 Mart 2010

EKLER

Ek.1.

Ek Tablo 1.1. Soya küspesi, buğday kepeği ve mısır proteini bileşimleri (Ergün vd., 2004).

	Soya Küspesi	Buğday Kepeği	Mısır Proteini (Gluten)
Nem	%15	%10.9	%13
Ham Protein	%44	%17.3	%60
Ham Yağ	%0.9	%4.3	%3 maksimum
Kül	%6	%6.3	%4.5
Ham Selüloz	%7	-	%15
Diğer	%27.1	61.2	4.5
Metabolik Enerji (ME)	2400 kcal/kg	2550 kcal/kg	3300 kcal/kg

Ek Tablo 1.2. Fındık küspesi bileşimi (Ergün vd., 2004).

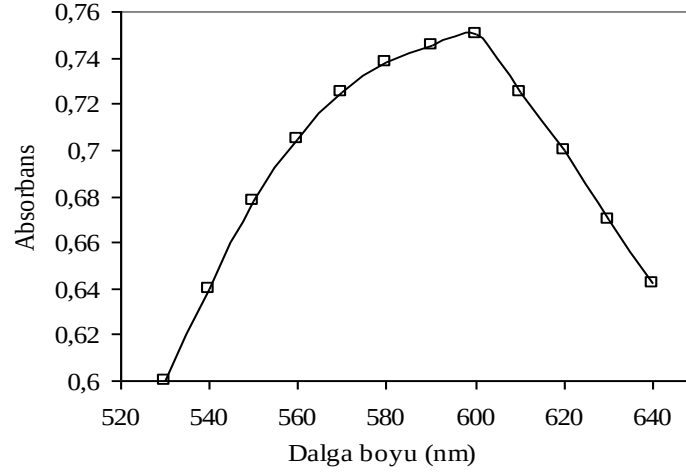
	Yapılan Analiz Sonuçları				
	Kuru Madde	Ham Protein	Ham Yağ	Ham Selüloz	Diğer
Fındık Küspesi	95.54	22.43	7.79	7.95	57.37

Ek Tablo 1.3. Peynir altı suyu bileşimi (Üçüncü, 2004).

Bileşenler	Değer
Su	%93 – 94
Kuru madde	%6 – 7
Yağ	%0.3 – 0.8
Laktoz	%4.5 – 4.7
pH	6.4 - 6

Ek Tablo 1.4. %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	0.70	0.67	0.64



Ek Şekil 1.1. Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri.

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).

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 01.01.1984
Doğum Yeri : Adana
Lise : 1998 – 2002 Adana Erkek Lisesi (YDA)
Lisans : 2003 – 2007 Fırat Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans : 2007 – 2010 Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı