

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ BAKTERİ TÜRLERİYLE FARKLI ORTAM VE
ÇALIŞMA ŞARTLARINDA α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN
İNCELENMESİ**

Muhammet Şaban TANYILDIZI

DOKTORA TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2005

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ BAKTERİ TÜRLERİYLE FARKLI ORTAM VE ÇALIŞMA ŞARTLARINDA
 α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Muhammet Şaban TANYILDIZI

Doktora Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu tez, 10/02/2005 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Dursun ÖZER

Üye: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye: Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye: Yrd. Doç. Dr. Arzu Yadigar DURSUN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Cevdet AKOSMAN

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.02.2005 tarih ve 6/2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Doktora Tezi

ÇEŞİTLİ BAKTERİ TÜRLERİYLE FARKLI ORTAM VE ÇALIŞMA ŞARTLARINDA α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Muhammet Şaban TANYILDIZI

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

2005, Sayfa : 119

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* IMG2, ve *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 ile α -amilaz üretimi için ortam parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Çalışmanın ilk basamağında, sentetik ortamda her iki mikroorganizma için karbon kaynakları, azot kaynakları ve iz elementleri değiştirilerek enzim üretimi incelenmiştir. Her iki mikroorganizmada da karbon kaynağı olarak nişasta kullanılmasının enzim üretimini artırdığı belirlenmiştir. Gliserin *B. amyloliquefaciens* kullanılan ortamda enzim üretimini azaltmasına karşın, *B. subtilis* ile enzim üretiminde artışa neden olduğu gözlenmiştir. İnorganik azot kaynaklarının mikroorganizmalar tarafından kullanılamadığı, buna karşılık organik azot kaynaklarıyla enzim üretiminin arttığı görülmüştür. Bir metalo enzim olan α -amilaz üretiminde kalsiyum iyonunun gerekli olduğu belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda *B. amyloliquefaciens* ile enzim üretiminin *B. subtilis*'e göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* ile maksimum enzim üretimi (1333 IU) 15 g/l nişasta, 2.5 g/l pepton, 1 g/l yeast ekstrakt, 1g KH_2PO_4 , 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l CaCl_2 içeren ortamda elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise katı hal fermantasyonu için substrat olarak melas, şeker pancarı küspesi, ayçekirdeği küspesi, buğday kepeği, keçi boynuzu, mısır kepeği ve mısır proteini kullanılmıştır. Katı hal fermantasyonunda sentetik ortamda maksimum enzim üretimi sağlayan mikroorganizma olan *B. amyloliquefaciens* kullanılmıştır. Kullanılan substratlar arasından mısır kepeği ve mısır proteininde yüksek α -amilaz üretimi elde edilmiştir. Bu iki substrat kullanılarak diğer ortam parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Enzim üretimini en fazla ortam sıcaklığının etkilediği belirlenmiştir. Doğal substratlarla elde edilen enzim aktivitesinin sentetik ortam kullanılarak yapılan deneylere göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Mısır kepeği ile yapılan deney sonucunda maksimum enzim üretimi (8929 IU) 10

g/l yeast ekstrakt, 25 g/l mısır kepeği, 1 g/l KH_2PO_4 içeren ortamda 33°C ve 150 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Mısır proteiniyle yapılan deneyler sonucunda ise maksimum enzim retimi (8388 IU) 30 g/l mısır proteini ile 10 g/l yeast ekstraktın birlikte kullanıldığı 33°C ve 150 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Doğal substratlarda diğer ortam bileşenlerinin enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durum sentetik ortamda enzim üretimi için gerekli olan bu elementlerin doğal substratlardan ve musluk suyundan karşılandığını göstermektedir.

Anahatar Kelimeler : α -Amilaz, Mikrobiyal enzim retimi, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, Katı hal fermentasyonu.

ABSTRACT

PhD Thesis

**INVESTIGATION OF α -AMYLASE PRODUCTION WITH VARIOUS BACTERIA STRAINS
AT DIFFERENT PROCESS AND MEDIUM CONDITIONS****Muhammet Şaban TANYILDIZI**Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

2005, Page: 119

In this study, the effect of medium conditions on production of α -amylase by *Bacillus subtilis* IMG22 and *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 were studied. In the first part of the study, the effects of carbon, nitrogen sources and other medium components on production α -amylase were investigated in synthetic media for both microorganisms. It was found that the production of α -amylase was increased with the use of starch as carbon source for both of microorganisms. Although the production of enzyme with *B. subtilis* was increased by using glycerol, the production of enzymes decreased with using *B. amyloliquefaciens* with glycerol. It was observed that inorganic nitrogen sources could not be used by microorganisms. However, enzyme production increased by using organic nitrogen sources by both microorganisms. The results showed that the calcium ions were required in the production of α -amylase called metalloenzyme. From the results of optimization experiments, it was concluded that the maximum enzyme activity value obtained using *B. amyloliquefaciens* was higher than that obtained with *B. subtilis*. Maximum enzyme activity (1333 IU) was obtained in the medium containing 15 g/l starch, 2.5 g/l pepton, 1 g/l yeast extract, 1g KH_2PO_4 , 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l CaCl_2 .

In the second part of the work, molasses, sugar beet pulp, sunflower pulp, wheat bran, carob, corn bran, corn protein were used as substrates for solid state fermentation. *B. amyloliquefaciens* which provides the highest enzyme activity in synthetic medium was used as microorganism in the solid state fermentation. The highest production of α -amylase was obtained in the experiments conducted with corn protein and corn bran. The effects of other medium parameters were investigated by using these substrates. Medium temperature was determined as most influencing parameter on production of α -amylase in solid state fermentation. It was determined that enzyme activities obtained by using natural substrates were

higher than those obtained in synthetic medium. Maximum enzyme production was obtained as 8829 IU in fermentation medium containing 10 g/l yeast extract, 25 g/l corn bran, 1 g/l KH_2PO_4 at 33°C and 150 rpm. However, this value was found to be 8388 IU in medium containing 10g/l yeast extract and 30 g/l corn protein at 33°C, 150 rpm. There was not significant effect of the other medium components on α -amylase production in solid state fermentation. This shows that other medium components which are necessary for α -amylase production in synthetic medium exist in natural substrates and tap water.

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



TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, planlamasında, deneysel çalışmalarım için gerekli kimyasal ve teçhizatların sağlanmasında ve tezin yazımında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Dursun ÖZER, Prof. Dr. Murat ELİBOL ve Doç. Dr. Ayla ÖZER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm Arş. Gör. Dr. Hasan TOĞRUL'a ve Arş. Gör. Şule BULUT'a teşekkür ederim. Tez süresince en büyük desteği gördüğüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

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



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	III
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ	XIV
SİMGELER	XV
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMLER	3
2. 1. Enzim Teknolojisinin Tarihi	3
2.2. Enzimin Yapısı ve Fonksiyonu	6
2.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	8
2.4. Enzim Kaynakları	10
2.4.1. Hayvansal Enzimler	10
2.4.2. Bitkisel Enzimler	10
2.4.3. Mikrobiyal Enzimler	12
2.4.4. Enzim Kaynaklarının Karşılaştırılması	12
3. MİKROBİYAL ENZİM ÜRETİMİ	14
3.1. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar	15
3.1.1. Bakteriler	17
3.2. Fermantasyonla Enzim Üretim Yöntemleri	18
3.2.1. Enzim Üretimine Uygun Türlerin Seçimi	19
3.2.2. Mikroorganizmaları Çoğaltılması ve Enzim Üretim için Optimum Şartların Düzenlenmesi	21
3.3. Fermantasyon Prosesi ve Ekipmanları	23
3.3.1. Katı Hal Fermantasyonu	24
3.3.1.1. Katı Hal Fermantasyonunda Kullanılan Mikroorganizmalar	26
3.3.1.2. Katı Hal Fermantasyonunda Kullanılan Substratlar	27
3.3.2. Daldırmalı Fermantasyon Yöntemi	31
3.3.2.1. Daldırmalı Fermantasyonda Enzim Üretimi Üzerine Ortam Şartlarının Etkisi	34
3.4. Enzim İzolasyonu, Saflaştırma ve Standartizasyonu	36
3.5. Türkiye'de Enzim Üretimi	37
4. AMİLAZLAR	38
4.1. Amilazların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizması	39
4.1.1. Termofilik amilazlar	41
4.1.2. Alkalik amilazlar	42
4.1.3. Asidik amilazlar	42

4.2.	Amilazların Endüstriyel Kullanımları	42
4.3.	α -Amilaz Üretimi ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar	44
5.	MATERYAL VE METOTLAR	50
5.1.	Mikroorganizmalar	50
5.2.	Bakteri Üretim Besiyerleri ve Koşulları	50
5.3.	Doğal Substrat İçeren Fermantasyon Ortamı	51
5.4.	Yapılan Analizler	51
5.4.1.	Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	51
5.4.2.	Bakteri Üremesinin Ölçümü	53
5.4.3.	Nişasta Analizi	53
5.4.4.	Glukoz Tayini	53
6.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	54
6.1.	<i>B. subtilis</i> ile Bulunan Sonuçlar	54
6.1.1.	Karbon Kaynaklarının Etkisi	54
6.1.2.	Azot Kaynaklarının Etkisi	60
6.1.3.	Diğer Ortam Bileşenlerinin Etkisi	63
6.2.	<i>B. amyloliquefaciens</i> ile Bulunan Sonuçlar	66
6.2.1.	Karbon Kaynaklarının Etkisi	66
6.2.2.	Azot Kaynaklarının Etkisi	70
6.2.3.	Diğer Ortam Bileşenlerinin Etkisi	74
6.3.	Doğal Ortamda Yapılan Deneyler	80
6.3.1.	Substrat Olarak Mısır Kepeğinin Kullanıldığı Deneyler	82
6.3.1.1	Tanecik Boyutunun Etkisi	82
6.3.1.2.	Azot Kaynaklarının Etkisi	83
6.3.1.3.	Kepek Konsantrasyonunun Etkisi	85
6.3.1.4.	Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi	86
6.3.1.5.	MgSO ₄ Konsantrasyonunun Etkisi	87
6.3.1.6.	Ca ⁺⁺ Konsantrasyonunun Etkisi	88
6.3.1.7.	Çalkalama Hızının Etkisi	89
6.3.1.8.	Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi	90
6.3.1.9.	Başlangıç pH'sı ve Ekim Konsantrasyonunun Etkisi	91
6.3.2.	Mısır Proteininin Substrat Olarak Kullanıldığı Deneyler	93
6.3.2.1.	Tanecik Boyutunun Etkisi	93
6.3.2.2.	Azot Kaynaklarının Etkisi	94
6.3.2.3.	Mısır Proteini Konsantrasyonunun Etkisi	96
6.3.2.4.	Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi	97
6.3.2.5.	MgSO ₄ ve Ca ⁺⁺ Konsantrasyonunun Etkisi	98
6.3.2.6.	Karıştırma Hızının Etkisi	99
6.3.2.7.	Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi	100

6.3.2.8. Başlangıç pH'sının Etkisi	101
6.3.2.9. Ekim Konsantrasyonunun Etkisi	102
7. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER	103
8. KAYNAKLAR	105
9. EKLER	117



ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil.3.1 Endüstriyel enzimlerin dünya pazarındaki dağılımı	15
Şekil 3.2. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması	16
Şekil 3.3. Nişastanın yapıtaşı amiloz (a) ve amilo pektinin (b) yapısı.	30
Şekil 3.4 (a.b.c) Fermantasyon ortamındaki mikroorganizma, substrat ve enzim üretiminin zamanla değişimi	34
Şekil 3.5. Mikroorganizma büyüme hızının sıcaklıkla değişimi	35
Şekil 4.1. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler	40
Şekil5.1. Deneylerin yapılışında takip edilen sıra	52
Şekil 6. 1. Farklı glukoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, glukoz konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	55
Şekil 6. 2. Farklı nişasta konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	56
Şekil 6. 3. Farklı gliserin konsantrasyonlarında ortam parametrelerinin zamanla değişimi.	57
Şekil 6. 4. Nişasta ve glukozun birlikte kullanıldığı deneylerde enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	59
Şekil 6. 5. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve biyomasın zamanla değişimi	60
Şekil 6. 6. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	61
Şekil 6. 7. Farklı sodyum nitrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	62
Şekil 6.8. Pepton ve yeast ekstraktın birlikte kullanıldığı deneylerde enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	63
Şekil 6.9 a. Farklı kalsiyum konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	
b. Farklı NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	64
Şekil 6.10. Farklı glukoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, glukoz konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	66
Şekil 6.11. Farklı nişasta konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	68
Şekil 6.12 a. Farklı gliserin konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	
b. Farklı gliserin konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, pH ve bakteri	

büyümesinin zamanla değişimi	69
Şekil 6.13. Nişasta ve glukozun birlikte kullanıldığı deneylerde enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	70
Şekil 6.14. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	71
Şekil 6.15. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	72
Şekil 6.16.a. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi b. Farklı sodyum nitrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	73
Şekil 6.17. Peptona ilaveten farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	74
Şekil 6.18 . Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi.	75
Şekil 6.19 . Farklı $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	76
Şekil 6.20. Farklı $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin, nişasta konsantrasyonun, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	77
Şekil 6.21a. Farklı $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi b. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi	78
Şekil 6. 22. Farklı substratların kullanıldığı ortamlarda enzim aktivitesinin zamanla değişimi.	81
Şekil 6. 23. Doğal substratlara azot ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	82
Şekil 6. 24. Kepek boyutunun enzim üretimi üzerine etkisi	83
Şekil 6. 25 Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	84
Şekil 6. 26. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	85
Şekil 6. 27. Mısır kepeği konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	86
Şekil 6. 28 KH_2PO_4 konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi	87
Şekil 6. 29. Farklı MgSO_4 konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	88
Şekil 6. 30 Farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	89
Şekil 6.31. Çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	90
Şekil 6.32. Farklı ortam sıcaklıklarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	91
Şekil 6.33.a. Farklı başlangıç pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi. b. Farklı mikroorganizma ekim konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	92
Şekil 6. 34. Tanecik boyutunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	93

Şekil 6. 35 Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	94
Şekil 6.36. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	95
Şekil 6.37. Mısır proteini konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	96
Şekil 6. 38. Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi.	97
Şekil 6. 39 a) Farklı MgSO_4 konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	
b) Farklı konsantrasyonlarda $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'un enzim aktivitesi üzerine etkisi	98
Şekil 6.40. Farklı çalkalama hızlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	99
Şekil 6.41. Farklı ortam sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	100
Şekil 6.42. Farklı başlangıç pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	101
Şekil 6.43. Farklı ekim konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	102
Şekil.E2.1. Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri.	118
Şekil.E2.2. 600 nm'de nişasta kalibrasyon grafiği.	118
Şekil.E2.3. Glikoz kalibrasyon grafiği	119



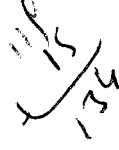
TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1 Bazı önemli enzimler, kaynakları ve kaynaklarına göre kullanım alanları	11
Tablo 2.2 Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar	13
Tablo 3.1. Fermantasyon için gerekli hammaddeler	14
Tablo.3.2.Ticari olarak önemli olan bazı enzimlerin organizmaları	20
Tablo.3.3 Ticari bazı enzimlerde kullanılan indüktörler	22
Tablo 3.4 Katı hal proseslerinde kullanılan temel mikroorganizma grupları	26
Tablo 4.1. α -Amilaz kaynakları ve aktivite için optimum değerleri	41
Tablo 4.2. Amilazların uygulama alanları	44
Tablo 4.3. Farklı türden mikroorganizma kullanarak değişik C ve N kaynaklarıyla α -amilaz üretimi üzerine yapılan çalışmalar.	49
Tablo 5.1. Deneylerde kullanılan bakterilerin saklanma, geliştirilme ve enzim üretiminde kullanılan besiyerleri	50
Tablo 5.2. Doğal substratlarla yapılan deneylerde kullanılan musluk suyunun mineral içeriği	52
Tablo 6.1. Farklı ortamlarda <i>B. subtilis</i> ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite değerleri	65
Tablo 6.2. Farklı ortamlarda <i>B. amyloliquefaciens</i> ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite	79
Tablo E 1.1. Doğal substratların spesifikasyonları	117
Tablo E.2.1. %5'lik nişasta çözeltisinin dalga boyu taraması.	118
Tablo E.2.2. Nişasta çözeltisinin kalibrasyon verileri	118
Tablo E.2.3. Glukoz kalibrasyon verileri	119

SİMGELER

μ	Özgöl üreme hız sabiti
A	Arrhenius sabiti
E	Aktivasyon enerjisi
R	İdeal gaz sabiti
T	Sıcaklık
KH	Karıştırma hızı
pH _b	Başlangıç pH'sı
MP	Mısır proteini
MK	Mısır kepeği
MO	Mikroorganizma



1. GİRİŞ

Canlı için yaşamsal rolü olan pek çok fonksiyonu kontrol eden enzimler, çok uzun zamanlardan beri insanlar tarafından kullanılmıştır. Ancak fonksiyonlarının tam anlaşılması ve endüstriyel anlamda kullanılması 19. yüzyılda başlamıştır. Bugün ise artık günlük ve ekonomik hayatta çok önemli rolleri vardır. Yıllık satış değerleri milyar dolarları bulan enzimler, ekmek, bira, maya gibi ekonomik sahalarda temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve tıpta teşhis ve tedavide büyük rol oynamaktadır. Enzimlerin kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde ve hatta biyolojik savaşta pek çok kullanım alanları vardır. Bugün yazılı olarak 2500'den fazla enzim bilinmesine rağmen bunların sadece 150 kadarı ticari bakımdan önem taşımaktadır (Gözükara1997, Telefoncu,1986, Gonzalez,2003).

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

Üretim proseslerinde giderek artan enzim tüketimi, enzim üretim maliyetlerini azaltmaya yönelik araştırmaların artmasına neden olmuştur. Enzim üretim maliyeti ya genetik manipulasyonlar ile yada ortam mühendisliği yardımıyla düşürülebilir. Genetik düzenlemeler üzerine yoğun araştırmalar yapılmakta olup önemli oranda enzim üretiminin artışı sağlanabilmektedir. Ancak metabolik ürünlerin salgılanması mikroorganizmaların belirli ortamlarda hayatta kalma stratejilerinin bir gereği olduğundan genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalar kararlı olmayabilir (Dey,2001). Mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmek amacıyla sentezledikleri enzim veya diğer metabolitlerin üretim hızları çevresel faktörler değiştirilerek de artırılabilir. Özellikle ekstraselüler enzim sentezleri indüksiyon ve represyon etkileri tarafından yönetilmektedir. İndüksiyon ve represyon etkileri incelenerek istenen ürünün daha fazla üremesi sağlanabilir. Bu şekilde ortam manipülasyonu ile enzim üretiminin artırılmasının daha iyi bir strateji olduğu düşünülebilir (Haq,2003, Yoo,1987).

Maliyetlerinin azaltılması amacıyla ortam optimizasyonunda beraber ekonomik değeri daha düşük olan endüstriyel ve tarımsal yan ürünlerin ortam bileşeni olarak kullanılmasına yönelik araştırmalarda yoğun bir artış gözlenmektedir. Bakteriyel α -amilaz hem derin fermantasyon hem de katı hal fermantasyonu ile üretilmektedir. Katı hal fermantasyonunda daha ucuz substratların kullanılabilmesi yanında basit olması, düşük sabit yatırım gerektirmesi, katabolit represyonunun daha düşük seviyede olması ve geri kazanmanın kolay olması gibi bir çok avantajı vardır. Katı hal fermantasyonunda buğday kepeği, soya fasulyesi gibi tarımsal ve endüstriyel yan ürünler sadece nütriye olarak kullanılmaz ayrıca mikroorganizma için tutuklama maddesi olarak da kullanılırlar (Baysal, 2003).

Bu çalışmanın amacı, α -amilaz ürettiği bilinen *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* suşlarının seçilen sentetik ortamlarda enzim üretiminin optimizasyonu yapılarak ortamlardaki davranışları hakkında bilgi edinmek ve en yüksek enzim üretimi sağlayan mikroorganizma ile doğal ortamda α -amilaz üretimini araştırmaktır.



2. ENZİMLER

2.1. Enzim Teknolojisinin Tarihi

Bugünkü modern enzim teknolojisi 1874’de Danimarkalı kimyager Christian Hansenin, kurutulmuş sığır midelerinden renet enzimini tuz ekstraksiyonu ile elde etmesiyle başlamıştır. Bu preparat, endüstriyel amaçla üretilmiş ve nispeten saf olan ilk enzimdir. Aslında bu önemli buluşa daha önceden yapılmış uzun evrimsel işlemler sonucu ulaşılmıştır. Enzimler, ya enzim açısından zengin sebzeler olarak, ya da ekmek ve bira yapımı gibi çeşitli amaçlarla kullanılan mikroorganizmalar olarak, insanoğlu tarafından yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Hatta enzimlerin antik çağlarda peynir yapımında kullanıldığına ilişkin ipuçları da vardır. M.Ö. 800 yılı civarında yazılmış olan ünlü İlyada ve Odessi epik şiirinden, oğlak ya da koyun midelerinin, ki bunlarda sığır midesinde bulunan enzimin aynısı bulunmakta, peynir yapımında kullanıldığı anlaşılmaktadır.

Enzimlerin işlevleri anlaşılmış ve tarih boyunca kullanılmışlarsa da, bunların gerçek özelliklerinin anlaşılması yakın geçmişte olmuştur. Enzimatik işlemler, özellikle fermentasyon, ondokuzuncu yüzyılın en gözde ilgi alanıydı ve bu dönemde çok değerli buluşlar yapıldı. Özellikle önemli olan bir deney, 1833’de Payen ve Persoz tarafından yapılan ve çimlendirilmiş arpadan (malt) bir enzim kompleksinin saflaştırılması olmuştur. Tıpkı maltın kendisi gibi, jelatinleşmiş nişastayı şekere, özellikle de maltoza, çeviren bu madde “diyastaz” olarak adlandırılmış. Bu terim Fransızca konuşulan ülkelerde bütün enzim izolatları için hala kullanılmaktadır. Bundan sonra diyastaz ve bunun gibi aktivitesi olan maddelere “ferment” denilmiştir.

1876’da Kühne, canlı organizmalardan elde edilen bu fermentlere “enzim” denilmesini önermiştir. Bu kelime, yunanca da mayanın içinde anlamına gelen “en” (içinde) ve “zyme” (maya yada hamur mayası) kelimelerinden türetilmiştir. Bu yüzyılın başlarında enzim teknolojisi Avrupa dışında da yavaş yavaş gelişmekteydi. Uzak doğuda yüz yıllık bir gelenek hakimdi ve bazı yiyeceklerin (soya bazlı tatlandırıcıların ve bazı içkilerin yapımında) üretiminde ‘koji’ denen bir küf mantarı kullanılıyordu. Bu proses günümüzde hala daha kullanılmaktadır. Koji, buharda tutulmuş pirincin içine bir küf mantarı karışımının katılmasıyla hazırlanıyordu. Bu karışımın içeriğiye nesilden nesile aktarılıyordu. Bu işlem, Japon bilim adamı Takamine’nin küf kaynaklı amilaz enziminin endüstriyel boyutlarda üretimi için bir fermentasyon işlemi geliştirmesine kaynak olmuştur. İşlem, nemlendirilmiş pirinç ya da buğdayın üzerinde *Aspergillus oryzae*’nin üretilmesini içeriyor. Takadiastaz olarak adlandırılan ürün günümüzde sindirime yardım etmek amacıyla kullanılmaktadır. Takamine tarafından

önerilen fermentasyon tekniği (yüzey kültürü ya da yarı-katı kültür) bazı enzimlerin üretilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ancak günümüzde bu yöntem yerine daha çok “daldırmalı kültür” yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde fermentasyon, enzimin üretileceği hammaddenin bulunduğu ve karıştırıldığı kapalı bir reaktörde gerçekleşmektedir.

Takamine'nin yeni fermentasyon yöntemini geliştirdiği sıralarda, enzimlerin kullanımlarıyla ilgili yeni bir alan ortaya çıkmıştır. Haşılama (desizing) dokuma işlemi sırasında ipliklerin kıvrılıp kırılmasını önlemek için güçlendirici olarak kullanılan nişasta pastasının kumaştan arındırılması işlemidir. Daha önceleri kumaşlar, asit, baz ya da oksitleyici ajanlarla işlenir, ya da günlerce suya yatırılır ve böylece ortamda doğal olarak bulunan mikroorganizmalar nişastayı parçalardı. Ancak, her ikisi de kontrol edilmesi zor yöntemlerdi ve bazen malzeme hasar görüyor ya da rengini kaybediyordu. Nişastanın uzaklaştırılması amacıyla malttan çıkarılan enzimlerin kullanılması büyük bir adım sayıldı. Daha sonra bu amaçla bakteriyel kaynaklı amilaz kullanıldı. Bakteri amilazı ilk olarak 1917’de Boidin ve Effront tarafından kullanılmıştı; ancak II. Dünya Savaşı’nın sonuna kadar bu enzimi büyük miktarlarda üretmek mümkün olmamıştır.

Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarının gelişmesine bir katkı da, I. Dünya Savaşı’ndan önce, Alman kimya ve endüstri ileri gelenlerinden Otto Röhm’den geldi. Diğer işleri yanında Röhm, derilerin tabaklanmadan önce hazırlanmalarını içeren çalışmalar yapıyordu. Uyguladığı bu işlemle, derinin sağlamlığı için gerekmeyen bazı proteinler temizleniyordu. Eğer işlem yapılmazsa deri, pek çok ürün için gerekli olan yumuşaklık ve esnekliği kazanamıyordu. Yapılan işlemle, derinin kalitesi de kontrol edilebiliyordu; örneğin, ayakkabı için kullanılacak deriye bu işlem çok az yapılırken, yumuşaklığın istendiği eldiven gibi ürünler için işlem daha çok yapılıyordu. Geleneksel olarak bu işlem için köpek ve domuz dışkısı gerekmekteydi. Bu, kötü kokulu ve pis bir işti. Röhm’ün teorisine göre, dışkıları etkilerini gösteriyorlardı, çünkü bunlar hayvanın sindirim enzimlerinden bir miktar içeriyorlardı. Eğer durum böyleyse, bu işlem için doğrudan pankreastan elde edilecek enzimler kullanılabilirdi. Bu enzimler üretilmeye çalışıldı ve beklenen etki görüldü. Doğal olarak Röhm de bu sonucu, kuramının doğruluğunun ispatı olarak algıladı. Ama daha sonraki deneyler gösterdi ki, işi gerçekleştiren pankreas enzimleri değil, bağırsaklarda yaşayan bakterilerin enzimleriydi.

Bunun yanında Röhm, enzimlerin endüstri için ne kadar değerli olduklarını gösteren başka araştırmalar da yapmıştı. Ne var ki yaptığı çalışmalar 50 yıl sonrasına değin hakkettiği değeri görememiştir. Röhm, protein lekeli olan giysilerin, içinde enzim bulunan deterjanla yıkanarak temizlenmesi yöntemini bulmuş ve bu işi gerçekten yapabilen ilk enzimli deterjanı üretmeyi başarmıştı. 1913’te Röhm’ün firması, deterjanlara az miktarda enzim katılması yöntemi için patent almış ve bu deterjan 1960’lı yıllara kadar Burnus adı altında satılmıştır.

Kullanılan enzim pankreastan elde edilen pankreatin preparatıydı ve içerdiği enzim de tripsin'di. Ancak Burnus, beklendiği kadar etkiyi hiç gösterememiştir; çünkü suda çözöldüğünde enzim, oluşın alkali ortamda yeterince etkili olamıyordu. Burnusun bileşiminde ana madde olarak çamaşır sodası bulunuyordu. Sodanın yaptığı iş çok önemliydi; çünkü soda, suyu yumuşatarak kirlerin daha kolay çözölmelerini sağlıyordu. Ancak sodanın varlığında da tripsin yeterince iyi çalışmıyordu.

İki Dünya Savaşı arasında, enzim teknolojisi alanında, yavaş da olsa, ilerleme kaydedildi. Bitki ve hayvan hammaddelerinden enzim ayrıştırılması yöntemleri geliştirilerek ayrıştırılan enzimlerin saflaştırılması alanında da gelişmeler olmuştur. Ekmek ve meyve suyu endüstrileri gibi enzimlerin kullanılabileceği yeni endüstri alanları keşfedilmiştir.

Willstatter ve arkadaşlarının 1920-1928 yılları arasında yaptıkları araştırmalar, bu teknolojiyi bir adım daha ileriye taşımıştır. Çalışmalarında, bir enzimi çok saf bir biçimde elde etmeyi başardılar. Hemen hemen aynı zamanlarda (1926) Amerikalı biyokimyacı James B. Summer, üreaz enzimini kristal formda elde etmeyi başarmıştı. Dört yıl sonra da, yine Amerikalı bir biyokimyacı olan John H. Northrop, pepsin ve tripsin enzimlerini kristal formda elde etmiştir.

Endüstriyel fermentasyon yöntemlerinin geliştirilmesi düşüncesi, penisilinin keşfedilmesiyle filizlenmiştir. Aslında penisilin 1928 yılından beri ihmal edilmişti. Savaşın başlamasından kısa bir süre sonra penisiline duyulan ilgi inanılmayacak ölçüde artması, araştırmacıları penisilini endüstriyel boyutlarda üretebilecekleri yöntemlere yönlendirmiştir. Bir süre sonra ticari üretimi başarılmış; ama üretim için yüzey kültürü yöntemi kullanıldığı için çok büyük miktarlarda bir üretim sağlanamamıştır. Sıvı kültür (Submerged) yönteminin geliştirilmesine yönelik çalışmalar savaş boyunca devam etmiş ve savaştan sonra iyice hız kazanmıştır. Böylece penisilin çok miktarlarda ve ekonomik yollarla üretilmeye başlanmıştır. Bu yöntemin geliştirilmesi sadece penisilin üretimine değil, enzim üretimine de büyük katkı sağlamıştır. 1950'lerde bu yöntem kullanılarak, Novo'nun (Dünyadaki enzim üretiminin yaklaşık ¼'ünü gerçekleştiren Danimarka'da bulunan şirket) laboratuvarlarında, tekstil endüstrisinde kullanılmak üzere, bakteriyel amilaz üretilmeye başlamıştır.

1959'da deterjan endüstrisinde önemli bir gelişme yaşanmıştır. İsviçreli kimyager Dr. Jaag, Bio4O adı verilen ve bakteriyel proteaz içeren bir ürün geliştirdi. Her ne kadar bu yeni ürün tripsinden daha iyi çalışıyor olsa da, yine de ideal bir ürün değildi. Daha sonra 1962'de bütün ihtiyaçlara cevap veren yeni bir ürün geliştirildi. Bu alkali proteazı, deterjanın içinde bulunan diğer maddelerden pek etkilenmiyordu ve istenilen sıcaklıkta çalışabiliyordu. Enzimlerin endüstriyel amaçla kullanılmaları 1965'ten sonra iyice yaygınlaştı (Sağıroğlu,1999).

2.2. Enzimin Yapısı ve Fonksiyonu

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

Biyolojik sistemlerde meydana gelen reaksiyonlar laboratuvar koşullarında oluşturulmak istendiğinde çok yüksek sıcaklık ve basınç gibi ağır fizikokimyasal işlemlerin uygulanması gerekir. Bu koşullar altında bile reaksiyonların bir çoğu izlenemeyecek derecede yavaştır. Karbonhidrat, lipid ve proteinler ancak derişik asit ve katevi çözeltilerde kaynatılarak hidroliz edilebilmesine karşın enzimler yardımıyla sindirim sisteminde çok daha ılımlı koşullarda (örneğin 37 °C'de) hidroliz edebilirler (Pekin,1979).

Enzimlerin birer protein olduğundan dolayı amino asit denen temel yapı taşlarından oluşmaktadırlar. Peki, bir enzimin hangi amino asitlerden oluşacağını nasıl belirleniyor? 100 amino asitten oluşan bir proteini düşünelim. Doğada 20 çeşit amino asit bulunduğuna göre, bunlardan 100'ü, 100²⁰ farklı şekilde doğrusal olarak sıralanabilir. Ancak bu dizilimlerden yalnızca biri işlevsel enzimi oluşturacaktır. O zaman, bu diziyi belirleyen şey nedir? Her iki sorunun da cevabı aynıdır, genler. İster hücrenin yapısında görev alacak olsun, isterse enzim aktivitesi gösterecek olsun bütün proteinler, genler tarafından kodlanır. Genlerde 4 nükleotidlik alfabeyle yazılan bilgiler, hücre içinde ribozomlarda okunarak, 20 amino asitlik alfabeyle yazılan protein bilgisine çevrilir. Oluşan proteinler de, taşıdıkları bu bilgiler ışığında görevlerini yerine getirirler.

Böyle bir molekülün kimyasal tepkimelere katılıp onları milyonlarca kez hızlandırabilmesi amino asitlerin kimyasal yapısında gizlidir. Amino asitler bir tane karbon atomuna (C) bağlanmış bir amino grubu (-NH₂), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu (-COOH) ve bir de değişken yan gruptan (-R) oluşurlar. Yirmi amino asidin hepsi de bu temel yapıya sahiptir. Onları farklı yapan tek şey, taşıdıkları yan grupların büyüklük, şekil, elektrik yükü, suya duyulan ilgi ve aktiflik açısından farklı olmalarıdır. İşte enzimi oluşturan bu amino asitler birbirleriyle etkileşerek, zincirin kıvrılıp bükülmesine ve sonuçta da üç boyutlu bir yapı kazanmasına neden olurlar. Ayrıca, bu yapıdaki bazı amino asitlerin taşıdıkları yan gruplar,

su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalayabilir. Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak üç önemli özelliğe sahiptirler (Sağıroğlu, 1999, Gözükara, 1997).

- Enzimler son derece hızlı çalışmaktadır,
- Enzimler reaksiyonları spesifik olarak katalize eder. Protein zincirinin katalitik etkisinden sorumlu olan aktif merkezin üç boyutlu ölçüleri ve substrat bağlayan grupların uzaydaki düzenleri ile sınırlandırılan bir spesifiklik söz konusudur ki buna substrat spesifikliği denir. Enzimler yalnız reaksiyona girecek substratı seçmekle kalmayıp, teorik olarak ortaya çıkması mümkün ürünlerden yalnız birinin oluşmasını sağlar ki buna da etki spesifikliği denir.
- Enzimler biyokimyasal reaksiyonları az enerji ve vücut ısısında başarırlar; normal laboratuvar şartlarında çok yüksek sıcaklıklarda ve fazla enerji gerektiren reaksiyonlar enzimler sayesinde daha az enerji ve vücut ısısında yapılmaktadır.

2.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

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

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

Yukarıda belirtildiği gibi her enzimin bir sistematik adı ve dört kısımdan oluşan bir kod numarası vardır. Enzimlerin sistematik isimlendirilmesinde genel olarak şu sıra izlenir;

dönüşüme uğratılan substratın adı + katalizlenen reaksiyon tipi + az eki. Sistematik isimler çok uzun olduğundan çoğu kez geleneksel isimler tercih edilmektedir.

Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında uyulacak kuralları tespit etmek üzere oluşturulan uluslar arası komisyon katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır.

1. **Oksidoreduktazlar** : Redoks reaksiyonları katalizleyen bu enzimler dehidrogenaz veya reduktaz çerçeve isimleriyle tanınırlar. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidaz adı ile anılırlar. Örnekler: Alkol dehidrogenaz, reduktaz, peroksidaz, glikoz oksidaz, sitokromoksidaz vb.
2. **Transferazlar**: Donör (verici) üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcısı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Örnekler: Formil-transferazlar (transaminazlar), fosfotransferazlar (kinazlar) , CoA transferazlar v.b
3. **Hidrolazlar**: Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, glikozid, peptid, C-N, asitanhidridi, C-C, C-X veya P-N bağlarını parçalarlar. Örnekler: lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar, vb.
4. **Liyazlar**: Çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Etkiledikleri substrattan ya bir kimyasal bir grubu ayırır yada ilave ederler. Önemli örnekler: dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar (fumaraz, akonitaz), karboksilazlar, amonyak-liyazlar.
5. **İzomerazlar**: Molekül içini 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)
6. **Ligazlar**: Enzimin etkilediği iki maddenin birleşmesini katalize ederler. Amino asitleri aktive eden enzimler, piruvat karboksilazlar, açılaz CoA sentazlar.

Her enzimin kod numarası 4 rakam ile tarif edilmektedir. 1. rakam grup no, 2. rakam sınıf no, 3. rakam alt sınıf no, 4. rakam enzim seri numarasını gösterir. Örneğin nişastanın hidrolizinde kullanılan α -amilaz enzimi, 3 (hidrolaz), 2 (glikoz bileşiklerine etki yapan sınıf), 1 (glikozit hidrolaz), 1 (alt sınıftaki enzimlerin arasındaki yeri), 3.2.1.1. rakamları ile tarif edilir (Arslan,1999).

2.4. Enzim Kaynakları

Doğada bulunan enzim kaynaklarını başlıca 3 grupta toplayabiliriz. Tablo 2.1.'de bazı önemli enzimler, kaynakları ve kaynaklarına göre kullanım alanları görülmektedir. Tablo 2.1.'de görüldüğü gibi farklı kaynaklardan elde edilen aynı enzimlerin kullanım alanları da farklılıklar göstermektedir.

2.4.1. Hayvansal Enzimler

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

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

2.4.2. Bitkisel Enzimler

Bitkiler de bir çok enzime kaynak olmuştur. Tropik bölgelerde uzun zamandan beri kullanılan eti yumuşatma etkisine sahip ve çok yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan papaya bitkisi proteaz ailesinden papain enzimi üretimi için yetiştirilmektedir. Ayrıca, fisin enzimi incir ağacı sütünden, bromealin enzimi ananas meyvesinden ve diğer bazı bitkilerin öz suyundan bol miktarda enzim izole edilmektedir. Bu bitkilerin en önemli avantajı içerdikleri öz suların kolaylıkla alınabilmesidir. Bitkisel enzimlere örnek olarak özellikle maltın içerdiği enzimler verilebilir. Maltta , β -amilaz, proteaz, sitaz, hemiselülaz, fosfataz ve nükleaz gibi enzimler bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Bazı önemli enzimler, kaynakları ve kaynaklarına göre kullanım alanları (www.lsbu.ac.uk).

Enzim ^a	EC numarası ^b	Kaynak	Hücre içi/dışı ^c	Üretim ölçeği ^d	Endüstriyel Kullanımı
Hayvansal Enzimler					
Katalaz	1.11.1.6	Ciğer	I	-	Yiyecek
Kimotripsin	3.4.21.1	Pankreas	E	-	Deri
Lipaz ^e	3.1.1.3	Pankreas	E	-	Yiyecek
Rennet ^f	3.4.23.4	mide	E	+	Peynir
Tripsin	3.4.21.4	Pankreas	E	-	Deri
Bitkisel enzimler					
Aktinitin	3.4.22.14	Kivi suyu	E	-	Yiyecek
α -Amilaz	3.2.1.1	Malt arpa	E	+++	İçki
β -Amilaz	3.2.1.2	Malt arpa	E	+++	İçki
Bromelain	3.4.22.4	Ananas özsuğu	E	-	İçki
β -Glukanaz ^g	3.2.1.6	arpa	E	++	İçki
Fisin	3.4.22.3	İncir özsuğu	E	-	Yiyecek
Lipoksigenaz	1.13.11.12	Soya fasulyesi	I	-	Yiyecek
Papain	3.4.22.2	Papaya özsuğu	E	++	Et
Bakteriyel enzimler					
α -Amilaz	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	E	+++	Niştasta
β -Amilaz	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	E	+	Niştasta
Asparaginaz	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	I	-	Sağlık
Glikoz izomeraz ^h	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	I	++	Fruktoz Şurubu
Penisilin amidaz	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	-	Farmakoloji
Proteaz ⁱ	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	E	+++	Deterjan
Pullulanaz ^j	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	E	-	Niştasta
Mantar Enzimleri					
α -Amilaz	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	E	++	Piştirme
Aminoasilaz	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	I	-	Farmakoloji
Glukoamilaz ^k	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	E	+++	Niştasta
Katalaz	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	I	-	Yiyecek
Selulaz	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	E	-	Atık
Dekstranaz	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	E	-	Yiyecek
Glikoz oksidaz	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	I	-	Yiyecek
Laktaz ^l	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	E	-	Süt
Lipaz ^e	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	E	-	Yiyecek
Rennet ^m	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	E	++	Peynir
Pektinaz ⁿ	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	E	++	İçecekler
Pektin liyaz	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	E	-	İçecekler
Proteaz ^m	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	E	+	Piştirme
Rafinaz ^o	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	-	Yiyecek
Maya enzimleri					
İnvertaz ^p	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	I/E	-	Tatlıcılık
Laktaz ^l	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	-	Süt
Lipaz ^e	3.1.1.3	<i>Candida</i>	E	-	Yiyecek

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

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

^e triasilgliserol lipaz ⁱ subtilisin ^m mikrobiyal aspartik proteinaz

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

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

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

2.4.3. Mikrobiyal Enzimler

Mikrobiyal hücreler enzim kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve onlar bir çok avantaj sağlarlar. Büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca mikroorganizmaların ikilenme süreleri çok kısa olduğundan üretim prosesleri kolaylıkla pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir. Kesikli bir fermantasyonda üretim 1,5 ile 10 gün arasında olurken bu daha yüksek organizmalarda 2 ay ile birkaç yıl arasında olmaktadır (Telefoncu,1986).

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

2.4.4. Enzim Kaynaklarının Karşılaştırılması

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

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

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

Bir fermantasyon işletmesi talebin seviyesine göre uygun ölçekte dizayn edilebilir. Bu işletmeler çeşitli ürünler için kullanılabilir ve taleplerin değişmesiyle başka ürünler üretilebilir.

1970'lerin başında temizlikte kullanılan proteinaza olan talep aniden düşüp ve aynı zamanlarda nişasta proseslerinde kullanılan enzime olan talep artmıştır. Böylece proteinaz üretiminde kullanılan işletmeler amilolitikoksidaz üretecek şekilde düzenlenmiştir.

Benzer reaksiyonları katalizleyen farklı kaynaklardan elde edilen enzimler genellikle farklı özellikler gösterirler. Bu farklılıktan dolayı bazı kaynaklar tercih edilebilir. Örneğin, tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde 3 tip α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Bunlar pankreas, bakteri ve maldan elde edilen amilazlardır. Tablo 2.2.'den yararlanarak bakteriyel kaynaklı enzimlerin kullanılma nedenlerini şöyle açıklayabiliriz (Sarıkaya,1995) ;

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

Tablo 2.2. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar.

α -Amilazın cinsi	En uygun pH	En uygun sic.	Etkili olduğu pH	Etkili olduğu sic.
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

3. MİKROBİYAL ENZİM ÜRETİMİ

Enerji bakımından zengin organik maddelerin, mikroorganizmalar tarafından enzimatik yolla başlangıç substratına göre enerjice fakir organik maddelere parçalanmaları “Fermantasyon” olarak adlandırılır. Tipik bir fermantasyon prosesinde kullanılan substratlar Tablo 3.1.’de verilmiştir. Burada açığa çıkan enerji miktarı tam oksidasyonun 1/3’ü kadardır. Enerjinin geri kalan kısmı, son ve ara ürünlerin bünyesinde tutulmaktadır.

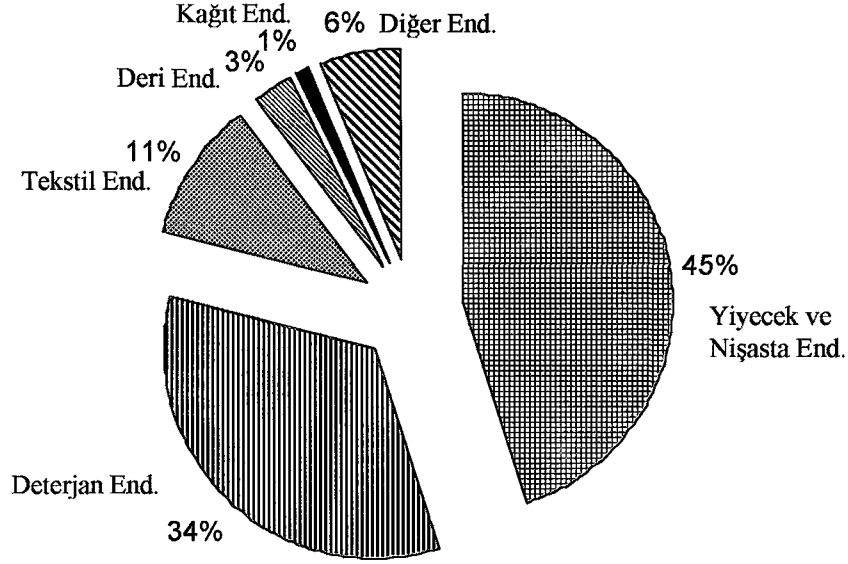
Fermantasyon ile ürün üretiminde ürün kalitesinin aynı tutulabilmesi üretim mikroorganizması türünün genetik stabilizesinin korunmasından daha zordur. Bu sebeple prosesin sıkı kontrol altında tutulması gerekir.

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

Fermantasyonla elde edilen enzimler yaklaşık olarak toplam üretimin % 80’nini oluşturmaktadır. Fermantasyon dışı üretilen enzimler sığır reneti, arpa β -amilazı, pankreatik proteinaz ve küçük hacimlerde üretilen eczacılık ve analitik enzimler oluşturmaktadır. Enzim pazarında en büyük oran deterjanlarda kullanılan alkalın proteazdır. Hidrolitik enzimler toplam enzim pazarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Hidrolitik olmayan enzimler içerisinde en büyük oran % 6 ile glikozizomeraza aittir. Toplam üretilen enzim miktarını ve maliyetini belirlemek güçtür. Çünkü üretimin önemli bir kısmı küçük ölçekli olarak yapılabilmektedir. Özellikle kendi amilolitik glikoizomeraz enzimini üreten nişasta işleyen işletmeler ve sentetik penisilin yapımı için kendi penisilin asilazını yapan antibiyotik üreticileri vardır. Enzim üretimi son 15 yılda 5 kat artmıştır. Şekil 3.1.’de 2000 yılında 3.5 milyar dolar olan endüstriyel enzim pazarındaki endüstrilerin oranları verilmiştir (Saha, 2000).

Tablo 3.1. Fermantasyon için gerekli hammaddeler .

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



Şekil.3.1. Endüstriyel enzimlerin dünya pazarındaki dağılımı (Saha,2000, www.pnpi.com).

Ticari enzim kullanıcılarının dörtte üçü Amerika ve Avrupa’da bulunmaktadır. Toplam enzim üretiminin ise üçte ikisi Avrupa’da yapılmaktadır. Danimarka’da Novo (%40) ve Hollanda’da Gist-Brocades şirketleri dünyada üretilen enzimin yarıdan fazlasını sağlamaktadır (www.novo.com).

3.1. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermantasyon teknolojisinde ve buna bağımlı olarak da biyokimya mühendisliğinde kullanılan ana maddelerden biri kuşkusuz mikroplardır. Mikropların yetiştirilmesi, geliştirilmesi, fonksiyonlarının aydınlatılması, işlem için uygun mutantların seçilmesi mikrobiyal genetikle uğraşan araştırmacıları ilgilendirir.

Çok eskilerde canlılar, bitki ve hayvan olmak üzere iki kısım altında toplanıyordu. Ancak, 1866 yılında ünlü Alman biyologu Ernest Hackel, mikroskop altında gözlenebilen, ancak bitkisel yada hayvansal özellikte oldukları kestirilemeyen üçüncü tür canlıların varlığından söz etmiş ve bunlara “protista” adını vermiştir. Hücresel yapıların daha iyi anlaşılmasından sonra bazı organizmalarda hücresel farklılıklar (örneğin çekirdek zarının olmayışı gibi.) gözlenmiş ve bunlar da “monera” grubu altında toplanmıştır. Canlılar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

1. Monera

- a) Bakteriler, virüsler, bakteriyofajlar (Schizophyta)
- b) Mavi-yeşil algler (Cyanophyta)

2. Protista

- a) Su yosunları (Algler)
- b) Mantarlar (Fungi yada funguslar), Mayalar ve aktinomisetler de bu gruba girer.
- c) Küfler (Myxomycetes)
- d) Tek hücreli hayvanlar (Protozoa)

3. Bitkiler (Metaphyto)

Protistaların dışında kalan tüm bitkisel canlılar bu gruba girer.

4. Hayvanlar (Metazoa)

Protistaların dışında kalan tüm hayvansal canlılar da bu sınıfa girer.

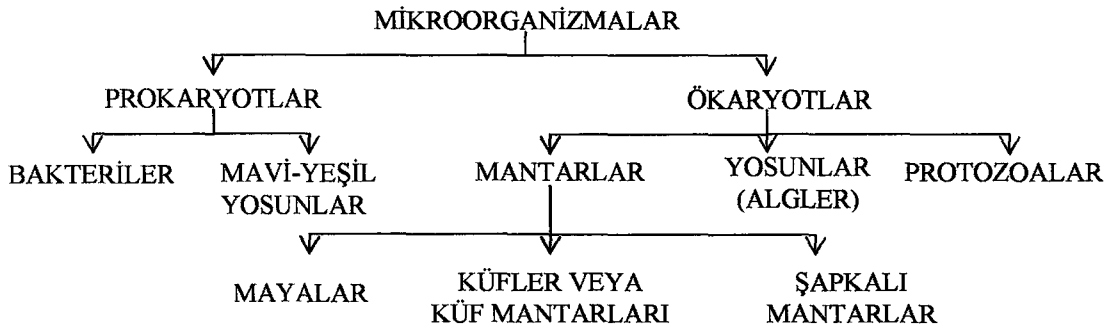
Kullandıkları besin yönünden de organizmalar iki gruba ayrılır.

1. Ototroflar; Bu canlılar inorganik hammadde kullanarak organik maddeleri oluştururlar. Örneğin, alg ve yeşil bitkilerde olduğu gibi fotosentez yolu ile CO_2 ve H_2O dan yararlanma.

2. Heterotroflar; Hayvanlar, birçok bakteriler, mantarlar, protozoalar gibi daha önce oluşmuş organik maddelere gereksinme duyan canlılar bu sınıfa girerler.

Enerji kaynağı olarak güneş ışığını yada kimyasal maddeleri kullanmaları yönünden de canlılar fototrof ve kemotrof şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre inorganik madde kullananlarda kelime arasına “litho”, organik madde kullananlarda ise “organo” ekleri getirilir (Pekin,1980).

Fermantasyon ve atık suların arıtılmasında rol oynayan mikroorganizmalar Şekil.3.2.'ye göre sınıflandırılmaktadır.



Şekil 3.2. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması

3.1.1. Bakteriler

Bakterilerin tanımlanması tam olarak güçtür. Prokaryotlar sınıfından olup boyutları genel olarak 0.5 - 20 μ uzunluk ve 0.2 - 4 μ çapındadır. Prokaryotik bir yapı gösterdiğinden ökaryotik hücrelerden farklı olarak çekirdeklerinin çevresinde zar bulunmamaktadır. İnce ipliksi zar görünümünde olan çekirdeği doğrudan doğruya stoplazma ile sınırlandırılmıştır.

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

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

- Diplokoklar
- Streptokok biçimi
- Stafilokok biçimi

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

III) Çok kıvrıma sahip halde bulunabilirler. Bunları iki gruba ayırmak mümkündür.

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

Bir çok bakteri üretildikleri ortamdaki besin maddelerinden faydalanmak için ekstrasellüler enzim salgırlarlar. Çoğunu hidrolaz ve proteazların oluşturduğu bu enzimler besi yerinde bulunan substratı bakterinin kullanacağı forma katalizlerler (Tolan,1987). *Bacillus*'un farklı türleriyle hücre dışı enzim üretimi endüstriyel ölçüde oldukça önemlidir (Andersson vd.,1988). Endüstride, geniş kullanım alanı bulan 10'dan fazla mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsinin türleri ve alt türleri tarafından sentezlendiği görülmüştür. Ayrıca bu bakteri türlerinin

kemoorganotrof olması, kültüre alınabilmesi ve yapılarında heterojenlik olmaması nedeniyle ilgili endüstride tercih edilmektedir. Yapılan araştırmalar *Bacillus*'un türlerinin diğer bakteriyel kaynaklara göre daha fazla amilaz sentezlediği saptanmıştır (Priest,1977, Ülger,1997).

- ***Bacillus subtilis***

Bacillus subtilis (saman basili) *Bacilliance* ailesinin *Bacillus* genusunun bir üyesidir. Boyu 2 - 8 µm arasındadır. Eni 0.5 -0.8 µm olup tek tek, bazen zincirler yapan, çubuk şeklinde bir bakteridir. Peritriş flagelları bulunduğundan hareketli olup sporları oval şekilde ve subterminaldir. Sporları bakterinin kalınlığını aşmaz ve hücre şekillerini bozmazlar. Kapsülü bulunmaz ancak bazı kapsüllü, hareketsiz ve uzun zincirler yapan alt çeşitleri bulunmaktadır. Gram (+) dir ve kesin olarak aerobik bir prokaryottur. *B. subtilis*'in spor formu sıcaklık ve antibiyotiklere dirençlidir (Buchanan vd.,1974, Ülger,1997).

Basit besi yerlerinde oda sıcaklığında bile üreyebilir. Sıvı besi yerlerinde hafif bulanıklık oluşturarak, yüzeyde kalın ve yumuşak bir zar yaparak üremesi karakteristiktir. Agardaki kolonileri kirli beyaz, gri renkte mat olup, kenarları pürüklü, yüzeyi bol granüllü ve R tipindedir. Bakteri aslında saprofit olmakla beraber, doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içerisine girmesi sonucu panoftalmi, iridoksilit gibi göz yangıları meydana getirebilir (Bilgehan,1987, Ülger,1997).

- ***Bacillus amyloliquefaciens***

B. amyloliquefaciens, çoğunlukla α-amilaz ve proteaz üretiminde kullanılan bir mikroorganizmadır. Toprakta izole edilmiştir. *B. subtilis*'e benzemesinden dolayı uzun süre '*Bacillus subtilis* subs. *Amyloliquefaciens*' olarak bir alt tür 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. Peritriş 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(Priest vd., 1987, Ülger,1997).

3.2. Fermantasyonla Enzim Üretim Yöntemleri

Endüstriyel enzim üretiminde kullanılan mikroorganizmalar bakteri, maya, mantar ve küf olabilir. Seçilen bir tek organizma 1000'den fazla farklı enzim çeşidine sahiptir. Enzim

üretimi kısaca şu şekilde özetlenebilir; laboratuvar ölçekli çalışmalarda istenen enzimi üreten mikroorganizma bulunduktan sonra bu organizmanın genetiği enzimi daha fazla üretecek şekilde değiştirilir. Daha sonra mikroorganizma endüstriyel büyüklükteki fermantörlerde büyütülerek istenen enzim üretilir. Fermantasyon sonucu oluşan atıklar ise gübre olarak kullanılmaktadır (Sağıroğlu,1999, Tatar,1997).

Buna göre mikrobiyal fermantasyonla enzimlerin üretim sürecindeki işleyiş basamaklarını aşağıdaki şekilde düzenlenebilir.

1. Enzim üretimine uygun türlerin seçimi,
2. Enzim üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların çoğaltılması ve üretimi için optimum şartların düzenlenmesi,
 - Yüzey kültür yöntemi
 - Derin kültür yöntemi
3. Enzim izolasyonu, saflaştırma ve standardizasyonu.

3.2.1. Enzim Üretimine Uygun Türlerin Seçimi

Ticari olarak kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kaynaklardan üretilir. Bunların bazıları Tablo 3.2’de verilmiştir. Tablo 3.2’den de görüleceği gibi burada iki grup vardır, bakteriler ve mantarlar (Rehm,1987).

Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel üretimlerinde, uygun suşun seçimi en önemli basamak olup, büyük bir özen göstererek belli bir sistem dahilinde yapılmalıdır. Potansiyel enzim üreticileri çok sayıda faktörü göz önüne alarak düşünülmelidir. Bunlar;

1. Enzim intraselüleri, ekstraselüleri olmaktadır. Enzimlerin çoğu ya intraselüler yada ekstraselülerdir, her iki yerde olan enzim sayısı çok azdır. Mikroorganizmanın seçiminde üretilecek enzimin kararlılığı, yüksek verimle kaliteli ürün vermesi, yan ürünlerinin az olması, ortam kompleksliği ve hücrenin parçalanma kolaylığı gibi faktörler göz önüne alınır.

2. Üretici organizmanın emniyet yönü hayati önem taşır. Burada ilgilenilen iki konu vardır. Birincisi ürünlerin üretici organizmaya olan potansiyel zararları ki bunlar metabolizma ürünleriyle kısa veya uzun süreli temas sonucunda olabilir. İkincisi ise enzim hazırlanan türlerin patojenik olma veya toksik ürünleri üretme tehlikesidir. Yiyecek sektöründe çalışılan enzimlerde bu son düşüncenin daha önem taşıdığı görülmektedir. İnsan yiyeceklerinde sıklıkla geleneksel olarak maya ve mantar gibi organizmalar kullanılır. Ticari olarak çoğu enzimler genel olarak zararsız mikroorganizma olarak bilinen *Bacillus* ve *Aspergillus* suşlarından üretilir.

Tablo .3.2. Ticari olarak önemli olan bazı enzimlerin organizmaları (Rehm,1987).

Bakteriyel enzimler		Mantar enzimleri	
Enzim	Kaynağı	Enzim	Kaynağı
α -amilaz	<i>Bacillus sp.</i>	α -Amilaz	<i>Aspergillus oryzae</i>
β -amilaz	<i>Bacillus cereus.</i>	Amiloglikoksidaz	<i>Aspergillus niger</i>
Deksransukraz	<i>Leuconostoc mesenteroids</i>	Katalaz	<i>Aspergillus niger</i>
β -1,3-Gluconaz	<i>Bacillus subtilis.</i>	Selülaz	<i>Tricoderma reesei,</i> <i>Penicillium funiculosum</i>
Glikoz izomeraz	<i>Arthobacter globiformis,</i> <i>Bacillus coagulans,</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i>	Dekstranaz	<i>Penicillium spp.</i>
		Glikoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>
		İnvertaz	<i>Saccharomyces spp.</i>
		Laktaz	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Aspergillus niger</i>
Penisilin asilaz	<i>Bacillus megaterinium</i>	Lipaz	<i>Candida lipolytica</i> <i>Rhizopus delemar</i>
Proteinaz	<i>Escherichia coli,</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Mikrobiyal renin	<i>Mucor meiehei</i>
		Pektinaz	<i>Aspergillus niger</i>
		Proteinaz	<i>Aspergillus oryzae</i>
Pullulanaz	<i>Klebsiella aerogenes.</i>	Rafinaz	<i>Mortierella vinacea</i>

3. Pahalı promotorlara ihtiyaç duymayan basit ve ucuz ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalar tercih nedenidir. Genetik özellikleri kararlı olmalı, istenen enzimi yüksek verimle üretmeli, fermentasyon sonunda ortamdan kolayca ayrılabilmesi ve (intraselüler enzimler için) kolayca parçalanabilmelidir (Rehm,1987).

Türlerin izolasyonunda pis sular ve toprak kullanılabilir. Seçilecek mikroorganizmalarda istenen özellikler bakımından güçlü amilaz teşekkülü ise nişasta endüstrisi atık sularında, pektinaz teşekkülü ise çürük meyveler üzerinde, selülaz teşekkülü ise çürümüş ağaç ve kereste üzerinde bulunabilir. Ancak bu ortamlardan izole edilen mikroorganizmalarla enzim üretimi, proseslerinin kabul edilebilir ekonomik değerlerinin çok altındadır. Seçilen organizmaların geliştirilmesi üretim prosesinin gelişiminde temel basamak olacaktır. Suş geliştirme programı esnasında aşağıdaki noktalar incelenir (Tatar,1997).

1. İstenen enzimin verimliliğini ve/veya verimini artırmak,
2. Özel uygulamalarda istenmeyen yan reaksiyonlara neden olabilen kontaminant enzimleri indirgemek veya elimine etmek,
3. Pahalı indüktörlerin etkisindense arzulanan ürünü sürekli üretmek için üretici organizma metabolizmasında değişiklikler yapmak,
4. Organizmaya son ürün inhibisyonu veya katabolit represyon koşullarında enzim üretimine imkan sağlamak.

Suş geliştirmek için 3 adet prensip yaklaşım vardır. İlki bir çok makalede incelenen ve endüstriyel mikrobiyoloji alanında büyük bir başarıyla kullanılan mutasyon geliştirmedir. İkincisi hücreye başka bir türden DNA transferiyle genetik bilgilerin modifikasyonu sağlayan hibridizasyondur. Üçüncüsü ise rekombinant DNA teknolojisidir.

Tipik mutasyon kaynak suşun elektromanyetik dalgalara (UV, x-ışını veya g-irritasyonu) yada etil metan sülfonat, nitrozometil guanin, yada nitroz asidi gibi kimyasal mutajenlere maruz bırakılmasıyla yapılır. Yapılan deneylerde popülasyonun önemli bir kısmı ölür ancak canlı popülasyonda tek tek genetik olarak modifiye edilmiş hücreler vardır. Canlı hücreler izole edilir ve gelişmiş olan karakterleri için taranır. Bu aşamada istenmeyen karakterli binlerce hücreden, birkaç mutanlığı etkin bir şekilde taramak için yetenek ve sezgi gerekmektedir. Katı ortam bu tarama için en etkin yöntemdir. Sürekli kültür teknikleri de bu amaç için kullanılır (Rehm,1987).

3.2.2. Mikroorganizmaların Çoğaltılması ve Enzim Üretimi için Optimum Şartların Düzenlenmesi

Enzim üretimi için fermentasyon kültür ortamına gereken kimyasallar diğer fermentasyon prosesleriyle çoğu yönden benzerdir. Ortam karbon, azot, oksijen, magnezyum, kalsiyum, fosfor gibi elementlerinin yanında çinko, mangan, molibden gibi iz elementleri sağlayacak şekilde dizayn edilmelidir.

Karbon kaynağı olarak genellikle karbonhidratlar kullanılır. Genel olarak ortama katılan karbon kaynakları mikroorganizmalar tarafından hücre yapısını oluşturmak ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Sentetik ortamlar teknik olarak tercih edilebilmesine rağmen çoğu durumda bu ortamlardaki büyüme hızı ve verim, kompleks ortamlara göre daha düşük olabilmektedir. Ayrıca son zamanlarda çok yaygın, ucuz ve bol olduklarından hidrokarbonların kullanımı önem kazanmaktadır. Literatürde, şeker pancarı, şeker kamışı melasları, mısır şurubu, mısır veya mısır nişastası, hububat (buğday, arpa) gibi doğal kompleks ortamlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Pekin,1980).

Azot, basit inorganik kaynaklardan (amonyak, nitrat ve amonyum tuzları gibi) kompleks karışımlara (maya ekstraktı, pepton, pamuk çekirdeği unu gibi) kadar geniş bir alandan sağlanabilir. Saf azot kaynaklarının kullanımı oldukça pahalıdır. Soya, kazein, mısır altı şurubu, balık unu, maya unu, maya suyu, peynir altı suyu gibi kompleks azot kaynaklarının kullanımı ise oldukça ekonomiktir. Hem karbon hem de azot kaynaklarının fazlası üretimi olumsuz yönde etkileyebilir. Bu kaynakların fazlası bazen metabolik yolu değiştirerek başka ürünlerin oluşumunu artırabilir. Bu tür durumlarda, enzim üretimini azaltan kaynaklardan kaçınılmalı ve ürün oluşum hızını etkilemeyen veya artıran kaynaklar tercih edilmelidir. Fosfor, sülfür ve esansiyel katyonlar genellikle inorganik tuzlardan sağlanır. İz elementler bazen özellikle ortama eklenir, fakat sıklıkla su veya diğer ortam bileşenlerindeki safsızlık olarak bulunur. Bazı durumlarda mikroorganizmaların büyümeleri için ortamda vitamin (tiamin, biyotin) gibi büyüme faktörüne de ihtiyaç vardır (Rehm, 1987, Pekin, 1980).

Enzim üretimi için uygun ortam dizaynında enzimlerin bazı özellikleri göz önüne alınır. Bunlar indüksiyon olayı, katabolitik represyon, ürün inhibisyonu ve ekstraselüler enzimler için protein salgılama mekanizmalarıyla olan ilişkilerdir. Çoğu enzimler sadece spesifik indüktörlerin varlığında sentezlenir. Bazı ticari yaygın enzimler için örnek indüktörler Tablo 3.3'te verilmiştir. Bazı durumlarda ana karbon substratı da indüktör etkisi gösterebilmektedir. Genellikle endüstriyel ölçekli enzim üreten işletmelerde kullanılan indüktörler çok pahalıdır.

Sıklıkla indüktör ilavesini elimine etmek için kromozom üzerindeki düzenleyici bölgede ya represör molekülünün oluşumunu elimine etmek yada represör molekülüne bağlanan operatör genini elimine etmek için mutasyon gereklidir. Böyle mutantlar kurucu olarak adlandırılır ve indüktörün yokluğunda normalde indüklenebilir enzimleri sentezleyebilir (Frost, 1987).

Katabolik represyonda kolayca metabolize olan karbon kaynağı bulunduğunda metabolik sırada anahtar enzimlerin sentezi bastırılır. Örneğin, glikoz katabolitik enzimlerin oluşumunu yaygın olarak bastırır buna glikoz etkisi denir. Bu tür represyonlar ortam dizaynında represif karbon kaynaklarından kaçınılarak bunların yerine daha az kolayca metabolize edilen yapıda (glikozdansa laktoz yada nişasta) karbon kaynakları sağlanarak önlenabilir. Alternatif bir yaklaşımda potansiyel represif substrat fermentasyon ortamına yavaşça beslenir, böylece fermentasyon esnasında konsantrasyon represif olmayan düşük seviyede tutulur. Enzim sentezi son ürün represyonu tarafından bastırılabilir. Örneğin bakteriyel proteaz üretimi amino asitler tarafından bastırılır.

Tablo .3.3 Ticari bazı enzimlerde kullanılan indüktörler (Frost, 1987).

Enzim	İndüktör
Amiloglukoksidaz	Nişasta veya maltoz
α -Amilaz	Nişasta veya maltodekstrinler
Katalaz	Hidrojen peroksit
Selülaz	Selüloz, Sellobioz
Glikoz oksidaz	Glikoz
İnvertaz	Sakaroza
Laktaz	Laktoz
Lipaz	Lipitler veya yağ asitleri
Pektinaz	Pektin
Pullulanaz	Pullulan veya maltoz
Glikoz izomeraz	Glikoz veya ksilen

Ortam bileşimiyle enzim veriminin etkilendiği bir diğer durum ise yüzey aktif maddelerle temas halinde bulunan mikrobiyal hücrelerden ekstraselüler enzimlerin salgılanımının artırılmasıdır. Enzim verimi iyonik olmayan deterjanların varlığında artmaktadır. Bunun sebebi surfaktanlar tarafından hücre duvarını geçirgenliğinin artırılması ve enzimlerin sızması için hücre duvarındaki modifikasyonlardan ileri gelebilir. Hücre ise enzim seviyesini korumak için kaybolan bu enzimi sağlamaya çalışır ve enzim üretiminin arttığı gözlenir. Bu konuda başka bir öneri ise enzimin inaktif olmasını surfaktanların koruduğu yönündedir (Rehm,1987).

Ortam bileşiminin etkileri yanında ortam sterilizasyonu gibi fermantasyon öncesi işlemlerde dikkatlice düşünülmelidir. Sıvı kültür enzim fermantasyonları normalde tekbir mikroorganizma kullanarak yürütülür ve bu sebeple tüm mono kültür fermantasyonlarında seçilen organizma ekilmeden önce ortam bir şekilde sterilize edilmelidir. Büyük ölçekli enzim üretim proseslerinde hem sürekli hem de kesikli sistemler için yüksek sıcaklıkta kısa süreli (HTST) sterilizasyon teknikleri kullanılır. Sistem sterilizasyonu 120-140°C sıcaklığında 10 - 40 dak. tutularak yapılır. Soğutma öncesi ortam sıcaklığı geri kazanılır. Bu teknik katı substrat içeren proseslerde bazı problemlere neden olur.

Genellikle ekonomik bir proses gelişimi için ortam optimizasyonu ve tür gelişimi aynı anda ilerler. Ortam optimizasyonu çalışmaları başlangıçta 250-1000 ml erlen kültürlerinde laboratuvar ölçekli çalışmalarla etkin bir şekilde sürdürülür. Bu şekilde çalışma düşük maliyetin yanı sıra bir çok faktörün incelenmesini sağlar. Bu kabul edilebilir bir ortamın hazırlanması için oldukça hızlı bir metottur. Erlenlerin potansiyel oksijen transferi karıştırmalı reaktörlerden daha az olduğundan, erlen kültürleri enzim üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan karıştırmalı fermantör şartlarını yansıtmaz. Bunun sonucu olarak proses geliştirmede bir sonraki aşama laboratuvar fermantörlerine (10-20 L) ölçek büyümektir. Bu sistem tam ölçekli bir üretim prosesini tanımlamada çok daha iyi bir model sağlayacaktır. Bu aşamada proses parametrelerinin etkileri daha detaylı bir şekilde incelenebilir. Sıcaklık ve pH profili, çeşitli havalandırma ve karıştırma etkileri ve optimum değerler belirlenebilmektedir (Rehm,1987).

3.3. Fermantasyon Prosesi ve Ekipmanları

Ticari enzim üretiminde kullanılan iki ana proses vardır. Bunlar derin fermantasyon ve katı hal fermantasyonudur. Halen birinci proses çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak yine de ticari ekstraselüler enzimlerin bir çoğu ikinci proseste üretilir.

Dünya çapında, fermantasyonla üretilen ürünlerin yaklaşık %5'inin katı hal fermantasyonuyla üretildiği tahmin edilmektedir. Ticari ürünlerin çoğunun üretiminde

daldırmalı fermantasyon tercih edilmektedir. Bu sistemlerde prosesin kontrolü ve sterilizasyonu mühendislik açısından daha kolaydır. Çeşitli anyonlar ve kasyonlar (Na^+ , K^+ , NH^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , NO_3^- , Cl^-) gibi diğer türler iyon seçici elektrotlar kullanılarak ölçülebilir. Ancak bu iyonlar genellikle biyomas 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.

Modern olarak üretim fermantörlerinde maksimum enzim verimi elde etmek ve optimum şartlarda kültür ortamını sürdürmek için genellikle yüksek teçhizatlı reaktörler ve karmaşık kontrol sistemleri kullanılır.

3.3.1. Katı Hal Fermantasyonu

Katı hal fermantasyonu (KHF) düşük nem seviyesi veya su aktivitelerinde katı substratların fermantasyonudur. Tipik bir daldırma fermantasyonun su içeriği % 95'den fazladır. KHF'nda katı lapanın su içeriği % 40 ile % 80 arasında değişir. Bu yöntemle üretilen enzimlere örnek olarak proteaz, amilaz, laktaz, pektinaz, amiloglikozidaz ve renin verilebilir.

KHF biyokimya ve mikrobiyoloji prensipleri tam olarak anlaşılmadan önce fermente edilen yiyecekler hazırlanmasında (koji prosesiyle), ayrıca mavi damarlı peynirlerin olgunlaşmasında kullanılmıştır. KHF'nun temelini oluşturan geleneksel koji prosesi, 25-30 °C'de havalandırılmalı bir ortamda tabakalarca istiflenmiş bambu sepetlerde yüksek nemlilikle aşılınmış substratın fermantasyonuyla meydana gelmektedir. Substrat olarak pirinç, buğday veya soya fasulyesi gibi nemli karışık maddeler kullanılmaktadır. Bu substratlar üzerinde *Aspergillus oryzae* gibi filamentli mantarların gelişmesiyle proteolitik ve amilolitik ekstraselüler enzim karışımı üretilir ve besinlerin tadı değiştirilir. Bu tür endüstriyel proseslerin kontrolü çok güçtür. Bu proseslerde hedeflenen modifikasyonlar, sıcaklık, pH ve nemlilik gibi çevresel koşulların kontrolünü kolaylaştırmak ve bu kontrolleri fermantasyon yığınının tümünü etkileyecek şekilde geliştirmektir. Yakın zamanlarda yem olarak kullanılan tarımsal yan ürünlerde protein zenginleştirmede, enzim, organik asit ve diğer metabolitlerin üretiminde kullanımı yaygınlaşmıştır (Ooijkaas, 2000, Orhan, 2001).

KHF'nun özelliği küf gibi miselli organizmaların büyümesi için seçici ortamı sağlayan düşük nem seviyesinde işletilmesidir. Ortamın minimum nem içeriği %12'nin altına düştüğünde mikrobiyal aktivite durur. Katı substrat fermantasyonunda nem seviyesi % 30 - 80 arasında olabilir. KHF'nun çoğu küf fermantasyonu olmasına rağmen, bakteri ve maya proseslerine dayanan katı hal fermantasyonu nispeten yüksek nem seviyelerinde (% 75 - 90) kullanılır.

KHF kullanılan katı substratın yapısına bağlı olarak iki kısma ayrılabilir. Birincisi, yaygın olarak kullanılan ve KHF denilince genelde anlaşılan sistem ekimin doğal ortama

yapıldığı fermentasyon şeklidir. Burada kullanılan katı madde hem destek materyali hem de nütriyent kaynağı olarak işlem görmektedir. Substrat olarak genellikle tarımsal ve endüstriyel yan ürünler kullanılmaktadır. İkincisi ise (çok fazla kullanılmayan) sıvı ortamla doyurulan katı destek malzemesi üzerine ekimin yapıldığı sistemdir. Buradaki katı sadece mikroorganizmanın tutuklamasına yardımcı olur. Bu fermentasyonda tipik olarak kendir tohumu, perlit, poliüretan köpükler, şeker kamışı küspesi ve vermikulit (Mg, Al, Fe, Si, H, O içeren mineral) kullanılmaktadır (Ooijkaas, 2000).

Çoğu ticari ürün üretimi için baskın maliyet karbon kaynağıdır. Bu ortamın toplam maliyetinin yaklaşık % 80'ini oluşturmaktadır. Bundan dolayı karbon maliyetinin minimize edilmesi istenir. Bu amaçla hububat, soya unu gibi katılar veya melas gibi sıvı kompleks kaynaklar ve bunların fermentasyonuna uygun katı hal fermentasyonu üzerinde çalışılmaktadır (Rehm,1987). Sıklıkla çalışılan ortam, nemli buğday kepeği veya bazı tuzları içeren buğday kepeğidir. Katı hal fermentasyon ortamının sterilizasyonu düşük pH'larda buharla, kimyasal yöntemlerle yada her ikisinin kombinasyonu ile yapılır. Sterilizasyon sonrası soğutulan nemli kepek kütlesi seçilen spor süspansiyonuyla aşılanır. 25-40 °C arasında tutulan sıcaklıkta genellikle 1-10 gün süresince büyümesi sağlanır. Metabolik ısı ve kültürden yüksek su kaybından dolayı fermentasyon kepek sıcaklığının ve nem içeriğinin kontrolü güçtür. Katı hal fermentasyonu homojen olmamasından dolayı fermentasyonun gelişimini takip etmek derin fermentasyon sistemlerinden daha zordur. Pektinaz gibi tamamlayıcı enzimlerin kompleks bir karışımını içeren bir ürüne ihtiyaç duyulduğu zaman, bu yöntem oldukça kullanışlıdır. Katı hal fermentasyonunun avantajlarını ise aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür (Raimbault, 1998).

1. Genel olarak birkaç inorganik tuzun ilave edildiği buharla muamele edilmiş hububat gibi çok basit ortamlar kullanılmakta ve kullanılan ekipmanlar düşük güç harcamaktadır.
2. Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için çoğu kontaminant bakteri türlerinin üremesi inhibe olmaktadır ve teferruatlı sterilizasyon proseslerine olan ihtiyaç azalmaktadır.
3. Nem miktarı düşük olduğundan substratın birim ağırlığı başına olan hacmi düşük olacağından, kepekteki enzim aktivitesi çok yüksek olabilir. Böylece verilen fermentör hacmindeki enzim verimi derin fermentör sistemlerinden çok daha büyük olabilmektedir. Ayrıca atıkların işleme gereksinimleri azalabilir.
4. Aşılama basamakları gereksizdir, genelde sporlarla yapılan ekim yeterli olmaktadır.
5. Küçük hacimli suyla fermentasyon kepeğinden nispeten konsantre enzim çözeltileri elde edilebilir.

Katı hal fermantasyonuyla enzim üretiminin dezavantajları aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

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

Enzimlerin mikrobiyal yolla üretimlerinin yanı sıra ortamdan izole edilmeleri oldukça pahalı işlemler gerektirir. Bu nedenle bazı proseslerde eğer enzim çözeltileri daha az saflık derecelerinde kullanılabiliriyorsa işlemleri kolaylaştırmak ve maliyeti düşürmek amacıyla saflaştırma işlemlerine geçilmeden kullanılabilir. Bu durumda enzim özütünün pH'sı ayarlanır, bir kısım yabancı maddeler çöktürülür sıvı kısım ayrılır ve içerisine koruyucu maddeler konularak teknolojiye rahatlıkla kullanılabilir.

3.3.1.1. Katı Hal Fermantasyonunda Kullanılan Mikroorganizmalar

Bakteri, maya ve mantarlar katı substratlarda gelişebilir. KHF'na en iyi adaptasyon filamentli mantarlarla sağlanır ve araştırmalarda da bu tür mikroorganizmalar daha baskındır. Katı hal fermantasyonunda kullanılan bazı mikroorganizmalar ve kullanım alanları Tablo 3.4'de görülmektedir.

Tablo 3.4 Katı hal proseslerinde kullanılan temel mikroorganizma grupları (Raimbault, 1998).

Mikroorganizmalar	Kullanılan prosesler
<i>Bacillus sp.</i>	Amilaz, Organik maddelerin bozunması
<i>Pseudomonas sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Serratia sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Streptococcus sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Lactobacillus sp.</i>	Gıda, silolama
<i>Clostridium sp.</i>	Gıda, silolama
<i>Endomycopsis burtonii</i>	Kassava, pirinç
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gıda, Etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, Amilaz
<i>Altemaria sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Aspergillus sp.</i>	Organik maddelerin bozunması, Gıda
<i>Fusarium sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Monilia sp.</i>	Organik maddelerin bozunması,
<i>Mucor sp.</i>	Organik maddelerin bozunması, Gıda, Enzim
<i>Rhizopus sp.</i>	Gıda, Enzim, Organik Asitler
<i>Trichoderma sp.</i>	Organik maddelerin biyolojik kontrolü, Biyointekstid
<i>Amylomyces rouxii</i>	Koji, Gıda, Sitrik asit
<i>Aspergillus niger</i>	Proteinler, Amilaz, Sitrik asit
<i>Lentinus edodes</i>	Shii-take mantar
<i>Penicillium notatum</i>	Penisilin, Peynir
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Tempeh, Soya , Amilaz, sitrik asit

Bakteriler genellikle silolamada ve bazı yiyecek proseslerinde kullanılır. Mayalar yiyecek, gıda ve etanol üretimi için kullanılabilir. Fizyolojik, enzimolojik ve biyokimyasal özellikleri yüzünden KHF proseslerinde kullanılan en önemli mikroorganizma grubu filamentli mantarlardır. Mantarların düşük su aktivitelerinde ve yüksek ozmotik basınç koşullarında iyi toleransa sahip olması, katı substratların biyodönüşümü için kullanımı yaygınlaştırmaktadır.

3.3.1.2. Katı Hal Fermantasyonunda Kullanılan Substratlar

Genellikle, KHF substratları tarımsal veya tarımsal artıklarının kompozit ve heterojen yan ürünleridir. Bu substratlar karbon ve enerji kaynağı içeren (şekerler, yağlar, organik asitler) inert bir madde (şeker kamışı bagası, inert fiberler, reçineler) yapısındadır.

Katı substrat mikrobiyal aktivitelere inhibitör olarak etki etmemelidir. Ayrıca selüloz, nişasta, şeker gibi karbonhidratları, peptid, üre, amonyak gibi azot kaynaklarını ve mineral tuzları absorblamamalıdır. KHF’unda kullanılan substratların tipik özelliği aşağıdaki şekilde tanımlanabilir (Raimbault, 1998).

- Birim hacimde büyük yüzey alanına sahip, mikrobiyal büyümeye müsait bir yapıda olmalı.
- Substrat, kuru ağırlığa göre bir veya birkaç kat su absorblayabilmeli. Biyokimyasal proseslerin yüksek hızlarına imkan sağlamak için gaz-katı ara yüzeyinde nispeten yüksek su aktivitelerine sahip olmalı.
- Nispeten düşük basınç ve fermantasyon karıştırma koşulları altında oksijenle birlikte diğer gazları içeren hava ortamda akabilmeli.
- Küf, maya yada bakterilerin saf yada karışık kültürlerinin hızlı gelişimi için iyi bir katı – gaz ara yüzeyi sağlamalı.
- Katı substrat, fermantasyon proseslerindeki karıştırma sonucu oluşan mekanik bozulmalara dayanıklı olmalı.
- Katı substrat mikrobiyal aktiviteyi inhibe eden maddeleri içermemeli ve ayrıca karbonhidratlar (selüloz, nişasta, şekerler..), azot kaynakları (amonyak, üre, peptidler..) ve mineraller gibi mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu nütriyentleri absorblamamalıdır.

Ham substratları uygun formda kullanmak için gerekli olan hazırlama ve ön işlem basamakları şu şekilde sıralanabilir,

- Öğüterek yada keserek boyut küçültme,

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

KHF'ndaki en önemli problem yüksek heterojen yapıdır. Bu yapı prosesleri bir kategoride toplanmasını zorlaştırır ve modelleme çalışmalarını güçleştirir. Bu heterojenlik bazı problemlere neden olabilmektedir. Bunlar;

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

Katı substratların yapısında bulunan makromoleküler yapılar farklı özellikler göstermektedir. Bunları tek tek inceleyelim;

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

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

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

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

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

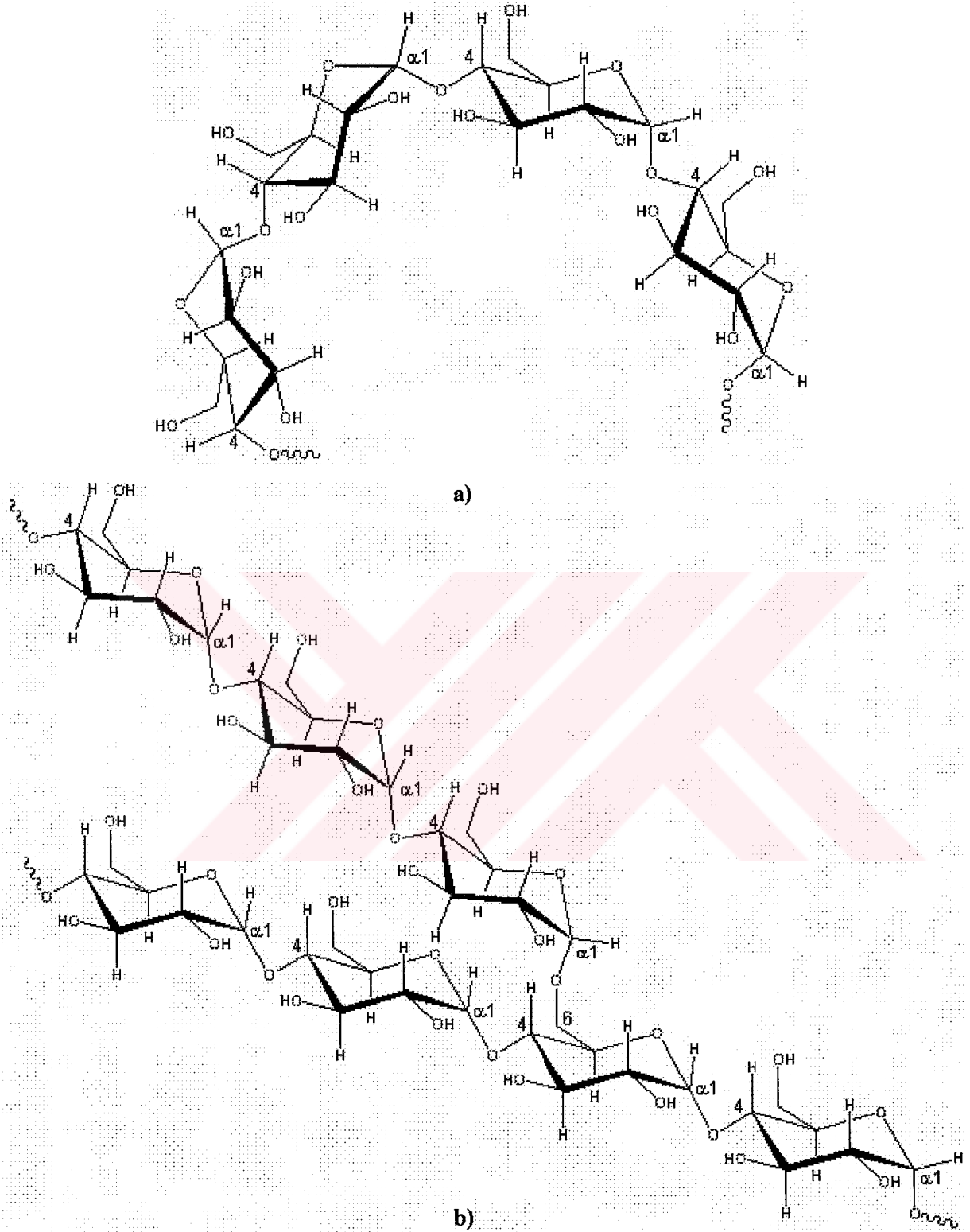
Nişasta: Bir başka çok önemli ve bol miktarda bulunan doğal katı substrat nişastadır. Nişasta içeren ürünlerin doğrudan tüketilmesinin yanında, kimyasal ve enzimatik yolla glikoz,

fruktoz şurupları, nişasta ve maltodekstrin türevleri ve siklodekstrinler gibi bir çok ürüne de dönüştürülmektedir. Nişasta esaslı ürünler insanlar tarafından tüketilen yiyecekler içerisinde önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Çok sayıda bitki tarafından nişasta üretilmesine rağmen endüstriyel nişasta proseslerinde birkaç bitki önemlidir. Endüstride kullanılan kaynaklar mısır, patates, tapyoka ve buğdaydır. 1998 yılında Avrupa birliğinde 3.6 milyon ton mısır nişastası, 2 milyon ton buğday nişastası ve 1.8 milyon ton patates nişastası üretilmiştir (Maarel,2002).

Nişastanın kimyasal yapısı lignoselüloz substratlarına göre nispeten daha basittir. Nişasta kaynağına bağlı olarak farklı oranlarda iki yakın yapıli polimerlerden oluşur. Bunlar amiloz (% 16-30) ve amilopektin (% 65-85)dir. Amiloz temelde düz zincirli α -1,4 bağıyla bağıli glikoz polimeridir. Amilopektin dalları α -1,6 bağıyla bağıli çok dallanmış glikoz polimeridir (Şekil.3.3).

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

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



Şekil 3.3. Nişastanın yapıtaşı amiloz (a) ve amilopektinin (b) yapısı.

3.3.2. Daldırmalı Fermantasyon Yöntemi

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 nütriyentleri kullanarak süspanse haldeki mikroorganizmaların gelişmesiyle oluşur. Daldırmalı fermantasyon için bir çok reaktör sistemi vardır.

- 1) Mekanik karıştırmalı sistemler
- 2) Dıştan sirkülasyonlu sistemler
- 3) Kabarcık kolonlar
- 4) Hava kaldırmalı reaktörler

Mevcut sistemlerin çeşitliliğine rağmen pratikte ticari enzim fermentörleri ağırlıklı olarak 1. türden karıştırmalı reaktörlerde yapılır. Bu yöntemde uygun büyüklükteki (10-15 lt) karıştırmalı bir tanka gerekli bileşimde hazırlanan hammaddeler beslenir. Burada istenen pH değerine ayarlanır ve sürekli HTST (yüksek sıcaklık kısa süreli) sterilizasyon birimi yardımıyla daha önceden buharla sterilize edilmiş fermentöre beslenir. Eğer gerekirse bazı ısı stabil ilaveler, köpük kırıcı maddeler ve viskozite ve çözünübilirliğini ayarlayan maddeler steril ortama ayrıca ilave edilir (Topal,1985). Diğer koldan mikroorganizma fermantasyon prosesi üretim tankına gelmeden önce birkaç aşı hazırlama safhasından geçer. Kullanılan tanklar fermantasyon ortamının korozif özelliklerine uygun bir paslanmaz çelikten geniş bir basınç aralığında (tipik olarak vakumdan 20 kPa basıncına kadar) çalışacak şekilde dizayn edilir. Tipik enzim üretim sistemlerinde kullanılan tankların hacmi ise 0.1-250 m³ arasında değişmektedir. Endüstriyel enzimler aerobik mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Bu nedenle 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,1987).

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

Aerobik mikrobiyal büyüme ekzotermik bir prosestir ve ısı üretilir. Havalandırma ve karıştırma prosesleriyle ısı dağılımına ilave olarak 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 değer iki katı olabilir. Büyümenin ve enzim üretiminin kontrol edildiği bir ortamda sürekliliği sağlayabilmek için

çeşitli parametreler hem aşı geliştirme, hem de fermentasyonla üretim aşamasında dikkatlice takip edilmelidir. Fermentasyon ortamının sıcaklığını, soğutma suyunun sıcaklığını, sıvı hacmini, karıştırıcı hızını, gücünü veya torkunu, hava ve sıvı besleme hızını kültür ortamındaki köpük varlığı gibi fiziksel parametreleri izlemek için çeşitli cihazlar kullanılır. Fermentasyon analizinde online ve offline ölçümlerden yararlanılır. Online olarak takip edilen parametreler pH, çözülmüş oksijen ve karbondioksit, redoks potansiyeli, fermentörü terk eden gaz içerisindeki oksijen ve karbon dioksit 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 biomass konsantrasyonu, karbon azot substrat seviyesi ve enzim ürün aktivitesi gibi parametrelerle birlikte offline olarak belirlenirler. Bu parametreler mikrobiyal büyümenin doğrudan ve dolaylı olarak belirlenmesinde kullanılabilir.

Modern enzim üretim fermentörlerinde maksimum enzim verimi elde etmek ve optimum şartlarda kültür ortamını sürdürmek için, genellikle yüksek teçhizatlı reaktörler ve karmaşık kontrol sistemleri kullanılır.

Fermentasyon kesikli, yarı kesikli ve sürekli yöntemlerden biriyle yapılabilir. Kesikli fermentasyonda başlangıçta gerekli olan tüm bileşenler (nütriyentler ve hücreler) fermentöre konur. Fermentasyon ortamında büyüme ilerledikçe nütriyentler harcanır, mikrobiyal kütle ve ürünler artar.

Fermentasyon ortamında enzim üretimi, şartların kötüleşmesinden önce enzim verimi ve aktivitesi maksimum bir seviyededir.

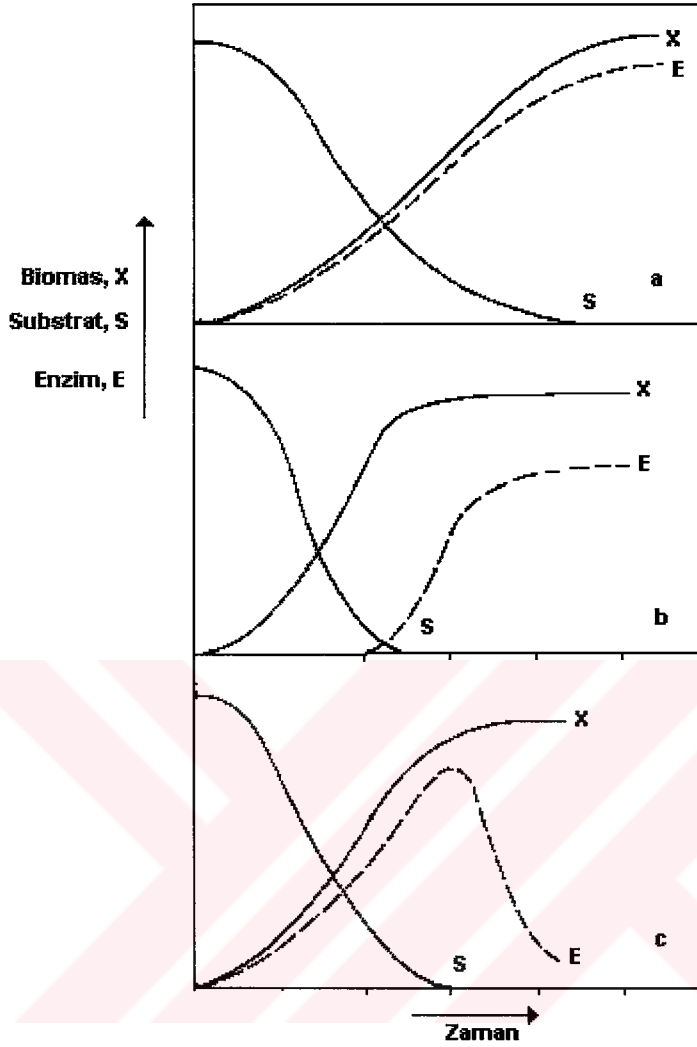
Fermentasyon ortamının doğrudan veya dolaylı olarak takip edilmesinde kullanılan başlıca parametreler Şekil 3.4.'de verilmiştir. Enzim üretimi bazı durumlarda biyomass gelişmesiyle birlikte olur (Şekil 3.4.a). Bu durum için *Aspergillus niger*'den glukoksidaz üretimi yada *Kluyveromyces fragilis*'de laktaz üretimi örnek olarak verilebilir. Şekil 3.4.b'de görüldüğü gibi bazı enzimler hücre büyümesi tamamlandıktan sonra üretilir. Bu türe tipik bir örnek *Trichoderma reesei*'den selüloz üretimidir. Enzim fermentasyonlarının çoğunda enzim aktivitesi birkaç saat süren bir zaman aralığında maksimum bir değerde seyrederek. Daha sonra büyümeye karşı inhibitör veya toksik etki gösteren ürünlerin oluşmasından yada bazı esansiyel nütriyentlerin tükenmesinden dolayı enzimin inaktivasyonu gözlenir. Bu gibi durumlarda enzim aktivitesinin zamanla değişimi takip edildiğinde bir pik gözlenir (Şekil 3.4.c). Burada ürünün ortamdaki alınması için kriter fermentasyonun maksimum enzim aktivitesine ulaşmadığının belirlenmesidir. Hatta diğer iki durumda da (Şekil 3.4.a,b) enzim uzun süre fermentasyon ortamında kaldığında ortamda meydana gelen değişimler sonucu aktivitenin azaldığı gözlenir. Fermentasyon tamamlanması genellikle çözülmüş oksijen, pH ve CO_2 çıktılarındaki değişimlerle gözlenebilir. Tipik bir enzim üretimi proses şartlarına bağlı olarak 18

- 180 saat arasında değişebilir. Bu süre sonunda fermentör ortamı çeşitli ayırma yöntemleriyle ayrılır. Üretilen enzim hücre içi enzim ise biokütle, hücre dışı enzim ise kültür sıvısı alınarak ürün kazanımı amacıyla alt akım işlemleri uygulanır.

Kesikli fermentasyon ticari çoğu enzimlerin üretiminde tercih edilen bir metot olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Bununla birlikte substrat tarafından katabolit represyon meydana geldiği zaman sınırlı karbon koşullarında çalışabilmek için alternatif olarak yarı kesikli fermentasyon kullanılabilir. Bu yöntem enzim sentezi represyonunu engeller. Bu tür proseslerin esas özeliği, daha aktif enzim üretim periyodunu uzatmak için ilave nütrientlerin fermentasyon ortamına beslenmesidir.

Alternatif bir operasyon şekli sürekli proseslerdir. Burada sürekli olarak reaktöre steril taze nütrient beslenirken aynı zamanda ortamdan eşit hacimde ürün çekilir. Bu yöntemle fermentasyon çok uzun süre kararlı halde çalıştırılır. Fermentörü terk eden biokütle ile hücre büyümesi dengededir. Sürekli fermentasyon sisteminin en yaygın kullanılan tipi kemostattır. Besi ortamına mikroorganizma üremesi için gerekli olan temel besinlerden (üremeyi sınırlandıran) birinin fazlası, ötekilerin ise yeterli miktarları sürekli olarak gönderilerek giriş ve çıkış debileri ayarlanır. Bu koşullar altında kararlı halde kültürün spesifik büyüme hızı (μ), seyrelme oranı olarak adlandırılan besleme hacminin (Q) kültür hacmine (V) oranı yardımı ile belirlenir. Fermentördeki biokütle konsantrasyonu besleme ortamındaki sınırlayıcı komponentin konsantrasyonu ayarlanarak sürekli sabit tutulabilmektedir (Pekin,1980). Sürekli kültür, klasik kesikli fermentasyon kültüründen daha yüksek verimlilik ve spesifik nütrientin sınırlandırılmasıyla represyon mekanizmalarının etkilerini hafifletebilmesine rağmen, ticari enzim üretimi proseslerinde oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebini dört başlık altında incelenebilir.

- a) Sürekli proseslerin uzun sürelerinden dolayı ürünlerin kontaminasyon riski vardır.
- b) Mutasyona uğrayan mikroorganizmaların sürekli üretim esnasında ilk yapılarına dönerek ürün kalitesini ve üretim hızını azaltabilir.
- c) Sürekli proseslerde çoğu hücre dışı enzim üretim verimi kesikli sistemlerden daha azdır. Sürekli sistemler daha kompleks kontrol sistemleri ve teçhizat gerektirmesine rağmen toplam verimlilik daha fazla artırılamamaktadır.
- d) Ticari enzim üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan, kompleks ortamda büyümeyi sınırlayan nütrientin yapısının kesin olarak belirlenebilmesindeki güçlüklerdir.



Şekil 3.4. (a.b.c) Fermantasyon ortamındaki mikroorganizma, substrat ve enzim üretiminin zamanla değişimi (Frost,1987).

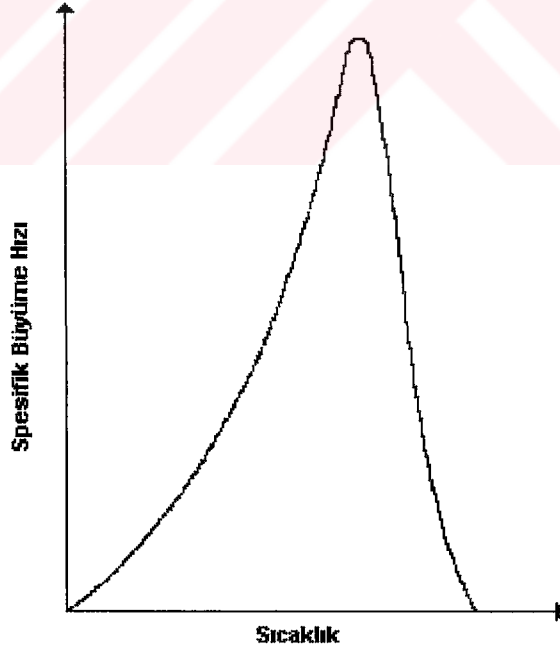
3.3.2.1. Daldırmalı Fermantasyonda Enzim Üretimi Üzerine Ortam Şartlarının Etkisi

İşletim sistemine bakılmaksızın (kesikli, yarı kesikli yada sürekli) havalandırma hızı, karıştırma hızı, çözülmüş oksijen, pH ve kültür sıcaklığı enzim fermantasyonunu etkileyebilen faktörlerdir.

- **Sıcaklık:** Mikroorganizmalar genel olarak üç gruba ayrılabilirler. 20 °C veya daha düşük sıcaklıklarda optimum büyüme gösteren psikrofiller, 35 °C civarında optimum gösteren mezofiller, büyüme sıcaklığı 50 °C'den fazla olan termofillerdir. Her bir sınıf içinde optimum değere doğru sıcaklık artarken spesifik büyüme hızı Arrhenius eşitliğindeki ($\mu = Ae^{-E_a/RT}$) gibidir. Her mikroorganizmanın maksimum büyümeye ulaştığı bir sıcaklık aralığı vardır. Ancak

optimum değerin ötesinde sıcaklık daha fazla artmasına rağmen, büyüme hızlı bir şekilde azalmaktadır (Şekil 3.5). Büyüme zamanlarını minimize etmek için kültür sıcaklığı mümkün olduğunca optimum sıcaklığa yakın olmalıdır. Ayrıca enzim oluşumu da sıcaklık tarafından etkilenir fakat enzimlerin sentezi için gerekli olan optimum sıcaklık büyüme için gerekli olan optimum sıcaklıktan farklı olabilir. Özel sustratlara karşı olan enzim aktivitesi de sıcaklıkla değişmektedir. Sonuç olarak enzim aktivitesi, mikrobiyal büyüme ve enzim üretimi için optimum sıcaklığın farklı olabileceği tesbit edilmiştir (Frost,1987).

Fermantasyon proseslerinde enzim üretimi genellikle uygun bir sıcaklıkta yapılmalıdır ve optimum fermantasyon sıcaklığı deneysel olarak belirlenmelidir. Ortamda sıcaklık esasen üç açıdan önem taşır. Bunlar; organik üretimin artışı (çoğalma yönünden), üretilcek olan enzim miktarı ve enzimin aktivasyonudur. Burada enzim üretimi ile çoğalma birbiriyle rekabet halindedirler. İlk olarak biyokütle madde üretimine gereken optimum sıcaklıkla başlanır. Yeterli biyokütle oluşturulduktan sonra optimum sıcaklık enzim üretimi için yönlendirilir. Öte yandan sıcaklık enzim aktivasyonu üzerine de etkindir. Bu nedenle sıcaklık kontrolüne büyük özen gösterilmelidir. Sıcaklık kontrolü daldırmalı fermantasyon tanklarında nispeten kolay olmasına rağmen, katı hal fermantasyonunda zordur (Tatar,1997).



Şekil 3.5. Mikroorganizma büyüme hızının sıcaklıkla değişimi (Frost,1987).

- **pH:** Protein olan enzimler, iyonlaşabilen gruplar içerirler ve kültür ortamı pH'sı onların yapısını ve fonksiyonunu etkiler. Mikrobiyal hücrelerin büyümesi de pH tarafından etkilenir. Çoğu durumda organizmanın maksimum büyümeye ulaştığı optimum pH değeri, ekstraselüler enzimlerin stabilitesi için gerekli olan optimum değerden farklıdır. Örneğin, *Trichoderma reesei*'de büyüme ve selüloz üretimi optimum pH değeri sırasıyla 5 ve 3'dür. Alternatif olarak *Aspergillus niger*'den lipaz üretiminde hem büyüme hem de enzim üretimi için optimum pH değeri 7.0'dir. Bazı durumlarda optimizasyon yapılarak hücre büyüme ve enzim üretim aşamalarında farklı optimizasyon koşulları için fermentasyonun pH profili belirlenmelidir (Frost,1987).

- **Çözünmüş Oksijen İsteği :** Aerobik kültürlerin büyümesi için yeterince oksijen sağlanması temel bir gereksinimdir. Enzim fermentasyonunun verimi ve verimliliği oksijen sınırlandırılmasının önlenmesindeki başarıya bağlıdır. Fermentasyon ortamında maksimum çözünmüş oksijen konsantrasyonu nispeten düşüktür (10 ppm). Yavaş gelişen mantarlar ve hızlı gelişen organizmalar için spesifik oksijen talebi genellikle sırasıyla 0.1-0.25 kg/kg.hücre.saat civarındadır. Fermantör dizaynında gaz fazdan sıvı faza büyük miktardaki oksijen transferi önemli bir problemidir (Frost,1987).

3.4. Enzim İzolasyonu, Saflaştırma ve Standartizasyonu

Enzimin izolasyonu ve saflaştırılmasındaki temel düşünce dayanıklılığın artırılması ve amaç ürünün kazanılmasıdır. Sistemde genel olarak yapılan filtrasyondan sonra ekstraselüler enzimler ile çalışılıyorsa, sıvı kısım alınır. İntraselüler enzimle çalışılıyorsa filtrat CaCl_2 ve $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ ile suda ekstrakte edilir. Çünkü enzim hücreler içinde lokalize olmuştur ve bu yolla otolize tabi tutulacaklardır. Ya da mekanik olarak hücrelerin parçalanması yolu seçilecektir. Saflaştırma ise enzim solüsyonunun, ortamdaki materyalin ihtiva ettiği katı maddelerden, mikroorganizma hücrelerinden ve misellerden ayrılması için çeşitli maddeler kullanarak (genellikle % 1 veya daha az oranlarda katılması ile) yapılır. Bu saflaştırma maddeleri ortama konulduktan sonra, ekstraktın temizlenmesi filtrasyon veya santrifüj ile yapılır. Enzim ekstraktında kullanılan saflaştırma maddeleri şunlardır: Amonyum fosfat (mono- ve dibazik), askorbik asit, kalsiyum tuzları (klorit, format; sulfat ve fosfat), selüloz lifleri, sistem diatome toprağı, jelatin, gum arabik, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum tuzları (sitrat, glukonat, monobazit, fosfat, sodyum sulfat) dır. Ancak bu sırada düşük sıcaklıkla çalışmak gerekmektedir. Ayrıca, ortamda bulunabilecek ve enzim aktivitesini azaltıcı maddelerin giderilmesi amacıyla ince arıtma işlemi uygulanır ki, genellikle çok değerli enzimlerin eldesinde

kullanılan bu işlem için kromatografik metotlar (adsorbsiyon, iyon değiştiricisi ve akışkan kromatografisi ile jel filtrasyonu) ile dağıtıcı yöntemi olarak tanımlanan elektroforez tekniğine başvurulur (Topal 1985).

Saflaştırma yapılarak elde edilen ticari enzimlerin aktivite kontrolleri yapılması gerekir. Standart aktivite değerleri saptanmış enzimler ticari önem taşırlar. Bunlar (kepek enzimi) tam yapılmış toz enzimler halindedirler. Kristal halde ve tam anlamı ile saf enzim üretmek uygulamada ekonomik değildir. Çünkü saflaştırma işlemleri üretimdeki düşük maliyeti yüzlerce kat artırabilmektedir. Eğer uygulamada koruyucu madde kullanmak gerekiyorsa toluen, organik asitler ve onların tuzları, fenolik bileşikler, kuaterner amonyum bileşikleri ve sodyum florit kullanılabilir. Ayrıca sıvı olarak saklanacak enzim aktivitesinin kaybolmasını önlemek amacıyla stabilizörler katılabilir. Bu maddeler arasında sodyum-benzoat, prohidroxy benzoik asit esteleri, glycerol, sonibitol ve sodyum klorür sayılabilir. Katı ürünler ise nişasta, laktoz, dekstrozu, sakkaroz, un, tuz, jelatin ve kazein katılarak standart kapasiteye ayarlanır (Topal 1985).

3.5. Türkiye'de Enzim Üretimi

Ülkemizde enzim üretimini geręekleřtiren ORBA A.ř. adındaki kuruluş orta ölçekli bir işletme olup hiçbir know-how almayıp tümüyle araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucu tasarlanmış ve faaliyete geçmiştir. Gıda ve tekstil sektörü için amilaz enzimi üretmektedir. Kuruluşta son zamanlarda deri ve deterjan sektörü için alkalen fosfataz üretimini kapsayan bir araştırma projesi tamamlanmış ve bu enzimin üretimine de başlanmıştır (Tüba,1996).

4. AMİLAZLAR

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

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

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

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

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

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

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

4.1. Amilazların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizması

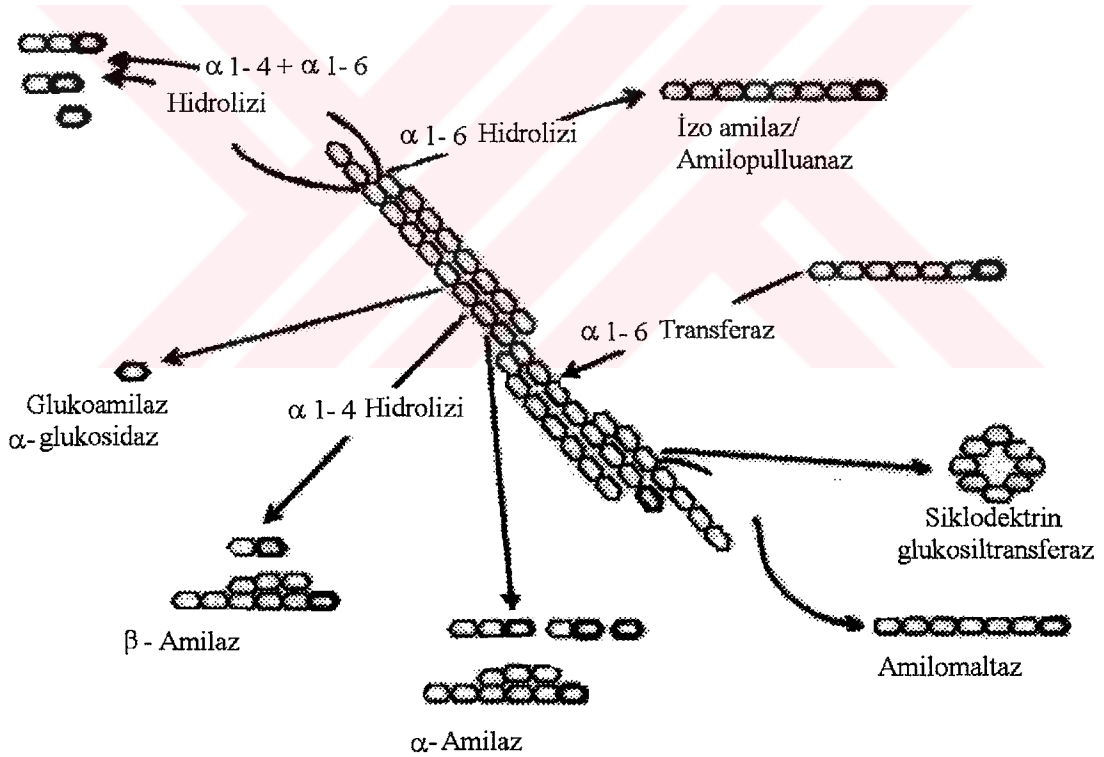
1930 yılında Ohlsson'un malttan elde ettiği nişasta parçalayıcı enzimler, parçalama ürünlerinin anomerik tiplerine göre α -(alfa) yada β -(beta) amilazlar olarak adlandırılmıştır. Mybrach ve Neamuler (1950) ise amilazlar için endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere başka bir adlandırma sistemi önermişlerdir. Amilazlar; amiloz, amilopektin ve glikojen gibi polisakkaritlerde ve bunların yıkım ürünlerinde yer alan α -1-4-glikozitik bağlarını katalizler. Bir endo amilaz olan α -amilaz polisakkaritlerdeki α -1-4 bağına gelişi güzel kırar. Amilopektin ve glikojenin dallanma noktalarındaki α -(1.6) bağlarına etki etmezler (Windish ve Mhatre, 1965). Bir çok mikroorganizma tarafından sentezlenen α -amilazın etki mekanizması ve özellikleri enzimin kaynağına göre farklıdır. α -Amilaz tarafından amilozun hidroliziyle maltotrioz ve maltoz oluşur. Bunu takip eden ikinci reaksiyon ise, küçük bir molekül olan maltotriozun hidrolizidir. Amilopektinin hidrolizi ise bir dizi dallı α -limit dekstrinlere ilave olarak glikoz ve maltoz gibi ürünler verir (Fogarty,1983).

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

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

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

Bakteriyel α -amilaz kullanımındaki artıştan dolayı endüstriyel kullanımına daha uygun karakteristiklerdeki enzim üretimi ve daha yüksek üretim sağlayan suşların elde edilmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmalardan, onları üreten mikroorganizmanın çeşitliliği kadar alfa amilaz karakteristiklerinin de farklı olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). Amilazlar ayrıca termofilik, asidik ve alkalın amilazlar olmak üzere 3 grup halinde incelenebilir (Ingle and Erickson, 1978)



Şekil 4.1. Farklı amilazların nişasta molekülünü hidrolizi ve oluşan ürünler (Maareal, 2002).

4.1.1. Termofilik amilazlar

Pratikte çoğu bakteriyel α -amilazlar nispeten yüksek sıcaklıkta (80 - 90°C) kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli mikroorganizmalardan alternatif enzimlerin izolasyonu ve bu enzimlerin termofilik özelliklerin geliştirilmesiyle ilgilenilmektedir. Ayrıca *Bacillus* türü amilazların, ısıya karşı dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bu termostabil özelliğin, kofaktörden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu mikroorganizmalar ve enzimlerini karakteristikleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir (Schaiffer, 1969).

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

Tablo 4.1 α -Amilaz kaynakları ve aktivite için optimum değerleri (Ingle and Erickson, 1978).

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

4.1.2. Alkalın amilazlar

Yüksek pH'da aktivite gösteren enzimlerin araştırılması deterjanlarda enzimlerin kullanılması ile başlamıştır. Sonradan çok sayıda patentler ve yayınlar görülmüştür. Robyt ve Ackerman (1971) *Psuedomonas stutzeri*'den elde edilen amilazın optimum pH'sı 8 olarak tanımlamıştır. Bazı *Bacillus* türlerinin 10 veya daha yüksek pH'larda optimum olan alkalın amilazlar ürettiği belirtilmiştir (Kenkyusho, 1970).

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

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

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

4.1.3. Asidik amilazlar

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

4.2. Amilazların Endüstriyel Kullanımları

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

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

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

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

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

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

α -Amilazın giderek artan bir kullanım alanı da çamaşır ve bulaşık deterjanlarıdır. Tüketiciler arasındaki modern eğilim bulaşık ve çamaşır makinelerini daha düşük sıcaklıklarda kullanmaktır. Bu düşük sıcaklıklarda elbiselerden ve bulaşıklardan nişastayı uzaklaştırmak problem olmaktadır. α -amilaz içeren deterjanlar uygun sıcaklık ve pH da bu problemi çözmeye

yardımcı olmaktadır. Hayvan yemlerinde sindirimi kolaylaştırmak amacıyla da α -amilaz enzimi kullanım alanı bulmaktadır (Maarel 2002).

Günümüze kadar gerek ülkemizde ve gerekse dünyada enzimler konusunda ve özellikle amilaz enzimi konusunda üretimi, uygulanması ve niteliklerinin belirlenmesi konusunda pek çok araştırma yapılmıştır. Giderek artan kullanım alanları sayesinde enzim üretiminin yaklaşık % 30'unu amilazlar oluşturmaktadır (Maarel 2002). Tablo.4.2.'te Amilazların uygulama alanları görülmektedir.

Tablo 4.2. Amilazların uygulama alanları (Atlas 1994).

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

4.3. α -Amilaz Üretimi ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar

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

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

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

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

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

enzim üretimini bir çok fermantasyon prosesinde olduğu gibi bastırdığını tespit etmişlerdir (Yoo vd., 1988).

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

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

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

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

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

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

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

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

Ramachandra vd. (2003) hindistancevizi yağ kekini (HYK) kullanarak *A. oryzae* ile α -amilaz üretimini incelediği çalışmada, HYK'nin % 68 nem içeren ortamda mikroorganizmanın gelişmesi ve enzim üretimi için uygun olduğunu belirtmiştir. Glikozun ve nişastanın enzim üretimini artırırken, maltozun inhibisyona neden olduğunu ifade ettiği çalışmada, maksimum enzim üretimine denenen azot kaynaklarından peptonun % 1 konsantrasyonunda ulaşmıştır. Enzim üretiminin hücre gelişimiyle birlikte gerçekleştiğini ve biomasın pik verdiği noktada aktivitenin de maksimum olduğu belirtmiştir.

Sodhi vd. (2005) substrat olarak buğday kepeği kullanarak *B. subtilis* ile α -amilaz üretimini incelenmişlerdir. Buğday kepeğiyle birlikte gliserin (% 1 w/w), soya fasulyesi (% 1

w/w), L-prolin (% 0.1), B vitamin kompleksi (% 0.01), Tween-40, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ile musluk suyu bulunan ortamda maksimum enzim üretiminin elde edildiği belirtilmiştir. Elde edilen enzimin etanol üretimi için nişasta hidrolizinde amiloglikosidaz ile birlikte eşzamanlı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Bajpai vd. (1992) ve Omidiji vd. (1997) α -amilaz üretimi için soya fasulyesi, mısır ıslatma şurubu ve peynir altı suyu kullanarak basit ve ucuz ortamlar geliştirmiş ve endüstriyel α -amilaz üretimi için bu ortamların kullanılabileceğini belirtilmiştir.

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

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

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

Literatürde farklı mikroorganizma ve karbon kaynağı kullanılarak α -amilaz üretiminin değişimi ve elde edilen enzimin özellikleri hakkında yapılan çalışmaların bir kısmı Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Bu çalışmada üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla literatürde çalışılmamış doğal substratlar kullanılarak α -amilaz üretimi incelenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 4.3. Farklı türden mikroorganizma kullanarak değişik C ve N kaynaklarıyla α -amilaz üretimi üzerine yapılan çalışmalar.

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

5. MATERYAL VE METOTLAR

5.1. Mikroorganizmalar

Deneylerde Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden temin edilen *Bacillus subtilis* IMG22 ve NRRL kültür koleksiyonundan temin edilen *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 kullanılmıştır.

5.2. Bakteri üretim besiyerleri ve koşulları

α -Amilaz üretiminde kullanılan bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin saptanması amacıyla kullanılan farklı besiyerleri Tablo 5.1.'de verilmiştir. Stok kültürler Tablo 5.1.'de verilen kültür saklama besiyerine ekilerek inkübasyon sonrasında buzdolabında (+ 4°C) muhafaza edilmiştir. Kültürler 30 günde bir yenilenmiştir. Enzim üretiminde kullanılan bakteriler iki aşamada ekilmiştir, ilk olarak kültür saklama ortamından bakteri geliştirme ortamına ve daha sonra bakteri gelişme ortamından alınan mikroorganizmalar enzim üretim ortamına ekilmiştir. Böylece farklı besiyerlerinden dolayı oluşacak bakteri kültürleri arasındaki farklılaşmayı minimize etmek amaçlanmıştır.

Tablo 5.1. Deneylerde kullanılan bakterilerin saklanmasında, geliştirilmesinde ve enzim üretiminde kullanılan besiyerleri.

	Kültür saklama besiyeri (g/l) (Yıldız,1993)	<i>Bacillus subtilis</i> , (g/l) (Anderson vd.,1985)		<i>B.Amyloliquefaciens</i> (g/l) (Shu,1997)	
		Bakteri gelişim besiyeri	Enzim üretim besiyeri	Bakteri gelişim besiyeri	Enzim üretim besiyeri
Glikoz	4.0	10.0		10.0	
Nişasta			10.0		10.0
Gliserin		% 15 v/v	% 15 v/v		
Bakto Pepton		5.0	5.0	1	1
Yeast ekstrakt	0.5	2.0	2.0	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O		0.5	0.5	0.5	0.5
NaCl	2.0	1.5	1.5		
CaCl ₂ .2H ₂ O		0.1	0.1	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄		0.5	0.5	1	1
Et peptonu	8.0				
Kazein peptonu	2.0				
Agar-agar	18.0				
MnSO ₄ .7H ₂ O				0.01	0.01
FeSO ₄ .7H ₂ O				0.01	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄				5	5
Başlangıç pH'sı	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Karıştırma hızı (rpm)		150	150	150	150
Ferm. ortam sic. (°C)		37	37	37	37

Hazırlanan besiyerlerinden 50 ml alınarak 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Başlangıç pH'ları 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanarak ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 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 soğutulmuştur. Eğik slantlarda bulunan bakteri kültürleri steril bir öze yardımıyla 50 ml bakteri gelişme ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere aşılanmıştır. Erlenler 37 °C'de 150 devir/dak. çalkalama hızına sahip rotasyonel inkübatörde (Selecta Rotabit) 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Sterillenmiş enzim üretim besiyeri içeren erlenlere 0.5 ml bakteri gelişme ortamından aşılanmıştır. Bakteri çeşidine ve üretim ortamına göre farklı sürelerde inkübe edilmiştir (Şekil 5.1).

5.3. Doğal Substrat İçeren Fermantasyon Ortamı

Bu çalışmada, Elazığ Şeker Fabrikasından temin edilen şeker pancarı küspesi ve melas, Karadeniz Birlik Yağ Fabrikasından temin edilen ayçekirdeği küspesi, Cargill İşletmesinden temin edilen mısır proteini ve mısır kepeği, Kekliktepe Un Fabrikasından temin edilen buğday kepeği ve keçi boynuzu doğal substrat olarak kullanılmıştır. Kullanılan doğal substratların bazı özellikleri Ek.1'de verilmiştir. Tüm doğal substratlar 70 °C de 24 saat süreyle etüvde kurutulmuş ve kapalı kaplarda muhafaza edilmiştir. Enzim üretim ortamında mineral içeriği Tablo 5.2'de verilen musluk suyu kullanılmıştır. 250 ml'lik erlenlere 50 ml enzim üretim ortamı konulmuş, sterilizasyondan sonra 0.5 ml bakteri gelişme ortamından aşılanmış ve inkübasyona tabi tutulmuştur.

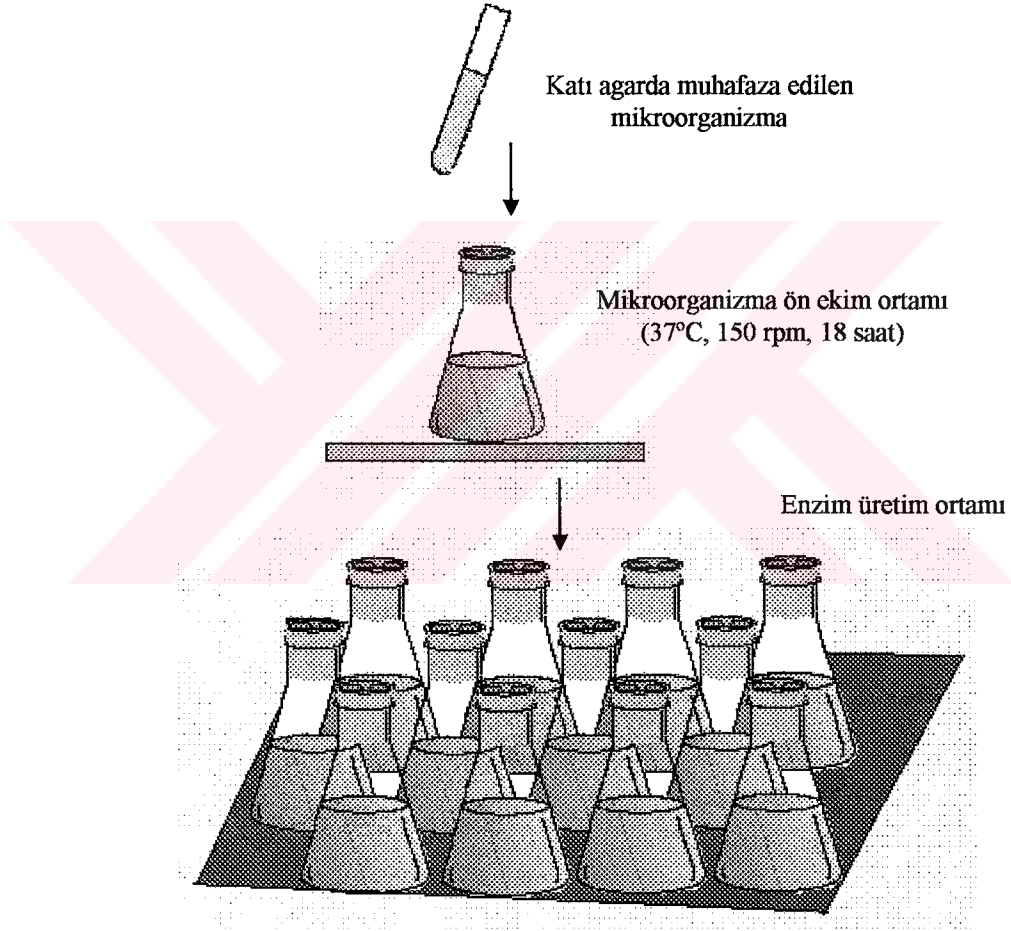
5.4. Yapılan Analizler

5.4.1. Enzim Aktivitesin Ölçülmesi

Bakteri kültürlerinde α -amilaz aktiviteleri, hücrelerin 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj yardımıyla (Hettich Eba21) ortamdan ayrılmasından sonra kültür sıvısı kullanılarak yapıldı. Deneylerde aktivite tayini için Pfueller ve Elliotun (1969) dekstrinojenik yöntemi kullanıldı. α -amilaz aktivitesinin tayini dekstrinojenik yöntem ile iyot'un nişastayla verdiği renk esasına dayanılarak ölçüldü. Bu yöntemde nişasta parçalandıkça iyotla verdiği (mavi) renk açılmaktadır. Nişasta α -amilaz tarafından adım adım parçalandığında, kısa zincirli dekstrinler üretilir ve renk mavi-mor-kırmızı-turuncu yolundan sarıya dönüşür. İyot metodu kolaylığı ve iyi sonuç vermesinden dolayı aktivite ölçümünde kullanılmıştır.

Tablo 5.2. Doğal substratlarla yapılan deneylerde kullanılan musluk suyunun mineral içeriği

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

**Şekil 5.1.** Deneylerin yapılışında takip edilen sıra

Aktivite ölçümlerinde, % 3 lük 2.3 ml çözünür nişasta, 1 ml 0.1 M CaCl_2 , 250 ml 0.1 M potasyum fosfat tamponuna (0.025 M NaCl içeren, pH=6.2) 200 ml distile su eklenerek elde edilen substrat çözeltisi kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde, bir kontrol ve üçü de numune olmak üzere toplam dört tüp kullanılmıştır. Tüplere 4.5 ml substrat çözeltileri eklendikten sonra 37 °C’de su banyosunda 5 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra numune tüplerine 0.5 ml

enzim ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında hem örnek tüplerine hem de kontrol tüplerine 1 M 0.9 ml HCl çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Kontrol tüpüne 0.5 ml enzim çözeltisi konduktan sonra renk oluşumunu gözlemek için 0.1 ml iyot ayırıcı (% 0.3 I, %3 KI) eklenmiştir. 4 ml distile suyla hacim tamamlandıktan sonra vortex'te karıştırılarak absorbansların okunmasına geçilmiştir. Örnekler ve kontrol tüpleri 9 ml distile su, 0.9 ml 1 N HCl ve 0.1 ml iyot ayırıcı içeren kör numuneye karşı 620 nm'de spektrofotometre (Jenway 6105) yardımıyla ölçülmüştür. Kontrol tüpünün verdiği değerden, örnek tüpünün verdiği değer çıkarılarak, aralarındaki fark yardımıyla enzim aktivitesi International Unite (IU/ml) olarak hesaplanmıştır. Bir ünite enzim, 37 °C'de yukarıda tanımlanan deney koşullarında 0.0284 optik densite (OD) azalmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Sarıkaya.1995). Yüksek enzim aktivitelerinde, uygun oranlarda fosfat tamponuyla enzim çözeltisi seyreltilmiş ve sonuç seyrelme faktörüyle çarpılmıştır.

5.4.2. Bakteri üremesinin ölçümü

Besiyerindeki hücre kütlelerinin değişimi spektrofotometrik (600nm) olarak tayin edilmiştir. Kör olarak santrifüjle hücrelerin uzaklaştırıldığı kültür sıvısı kullanılmıştır. Yüksek mikroorganizma konsantrasyonlarında uygun oranda distile suyla seyreltmeler yapılmıştır.

5.4.3. Nişasta analizi

5 ml 0.1 N KI-I₂ çözeltisi ve 5 ml 1 N HCl çözeltisi distile suyla 100 ml ye tamamlanmıştır. 0.1 ml hücre içermeyen fermentasyon ortamı 1 ml KI-I₂-HCl içeren çözeltiye eklenmiş ve 10 ml ye distile suyla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti fermentasyon ortamı içermeyen kör numuneye karşı maksimum absorbansın görüldüğü 600 nm'de spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür (Syu, 1997). Hazırlanan kalibrasyon grafiği yardımıyla nişasta içeriği g/ l olarak tayin edilmiştir. Kalibrasyon ile ilgili grafikler Ek.2'deki tabloda verilmiştir.

5.4.4. Glikoz tayini

Karbon kaynağı olarak glikoz kullanılan ortamlarda, harcanmadan ortamda kalan glikoz miktarlarını bulmak için yine HPLC cihazı kullanılmıştır. Ortamdan alınan her bir numune mavi-bant süzgeç kağıdından geçirilmiştir. Süzülen numuneler 15 dk santrifüjlenmiştir. Üst kısımdaki berrak çözeltiden alınan belli hacimdeki numune, belirli oranlarda seyreltilerek, 0.25 µ gözenekli sterilizasyonu sağlayan membran filtreden geçirilmiştir. Bu şekilde ön işlemlerden geçirilen numuneler, HPLC cihazına 20 µl miktarda enjekte edilerek içindeki glikoz miktarı, daha önceden hazırlanmış çalışma doğrusundan (Ek.2.) faydalanarak hesaplanmıştır.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

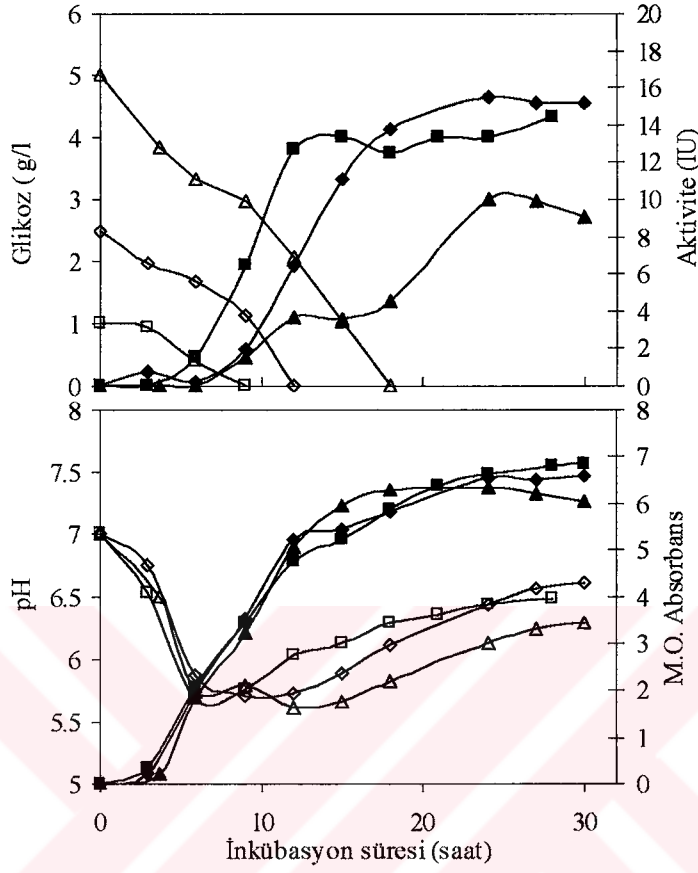
6.1. *B. subtilis* ile Bulunan Sonuçlar

6.1.1. Karbon kaynaklarının etkisi

Bacillus türüne ait bir çok bakteri kültür ortamına çok sayıda enzim salgılamaktadır. Endüstriyel olarak önemli olan amilaz ve proteaz gibi enzimleri endüstriyel boyutta üretebilen mikroorganizmalardan biri de bu türe ait *Bacillus subtilis*'dür (Kole,1988). *Bacillus subtilis* ile α -amilaz üretiminin araştırıldığı deneylerde Andersson ve arkadaşlarının (1985) önerdiği Tablo 5.1.'de verilen değerler kullanılmıştır. Bu amaçla, Tablo 5.1.'de bulunan bileşenlerden biri değiştirilirken diğer ortam bileşenleri sabit tutularak, değişimin uygulandığı parametrenin enzim üretimi üzerine olan etkisi incelenmiştir. İncelen komponent konsantrasyonlarında en yüksek enzim üretiminin elde edildiği değer, diğer bileşenlerin etkisinin incelendiği deneylerde Tablo 5.1.'de verilen değer yerine kullanılmıştır. Anlatılan işlem sırası, diğer ortam bileşenleri için yinelenerek ortam optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon ile enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri ortam bileşenidir. Ortam bileşenleri içerisinde karbon kaynağı ortam maliyetinin yaklaşık % 60-80'nini oluşturmaktadır (Rehm,1987). Karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda glikoz, nişasta ve gliserin kullanılmıştır. Glikoz etkisini incelemek için üç farklı (1, 2.5, 5 g/l) başlangıç konsantrasyonunda deneyler yapılmış ve sonuçlar Şekil 6.1.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi nispeten yüksek (5 g/l) glikoz konsantrasyonunda enzim üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda da glikoz gibi kolay metabolize edilebilen karbon kaynaklarının yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı fermantasyon deneylerinde, *Bacillus* türü mikroorganizmaların salgıladıkları ekzoenzimlerin azaldığı ifade edilmektedir (Prudence vd.,1989, Ünsaçarer,1988, Bulut 2001).

1 ve 2.5 g/l glikoz konsantrasyonlarında ulaşılan maksimum enzim üretiminin birbirine oldukça yakın olduğu görülmüştür. Enzim üretiminin maksimum olduğu evrelerin glikoz konsantrasyonu ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. 1 g/l glikoz kullanılan ortamda maksimum enzim üretimi logaritmik evrenin sonlarına rastlarken (12. saat), 5 g/l glikoz kullanılan fermantasyon ortamında enzim üretiminin durağan evrenin sonlarına doğru (24. saat) maksimum olduğu görülmüştür.



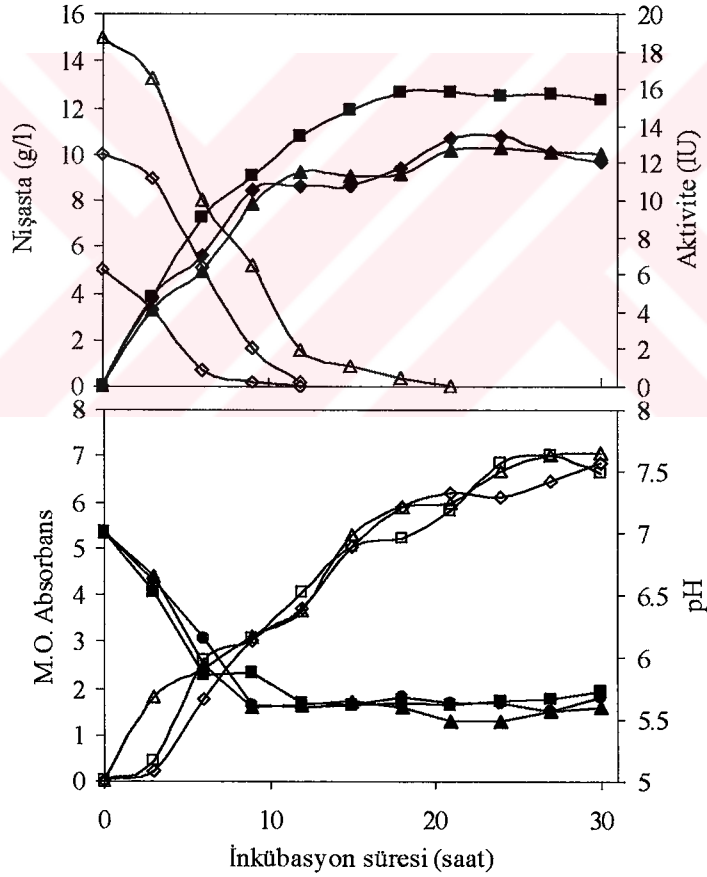
Şekil 6.1. Farklı glukoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, glukoz konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi (□ 1 g/l, ◇ 2.5 g/l, △ 5 g/l glukoz., siyah işaretler 2. eksene aittir).

Niştastanın bakteri üremesi ve α -amilaz üretimi için çok önemli olduğu ve belli niştasta konsantrasyonu ile hem bakteri büyümesinin hem de enzim üretiminin artırılabilceği belirtilmektedir. Bu konsantrasyonun üzerine çıkıldığında bakteri gelişimi ve enzim üretiminin inhibisyona uğrayacağı belirtilmektedir (Srivastana,1987, Agüloğlu,1996).

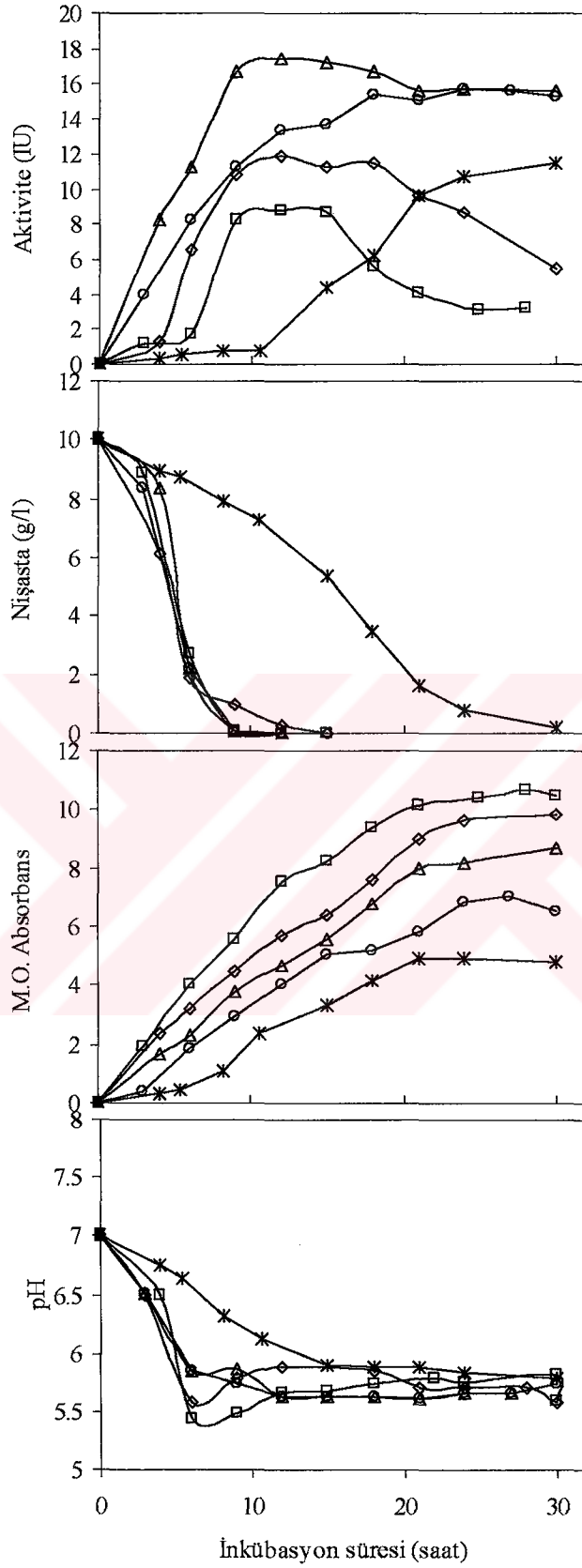
Farklı niştasta konsantrasyonunda (5, 10 ve 15 g/l) yapılan deneyler sonucunda, maksimum enzim aktivitesi 10 g/l niştasta içeren fermantasyon ortamında yaklaşık 15.7 IU olarak belirlenmiştir (Şekil 6.2.). Düşük niştasta konsantrasyonunda bu değer karbon kaynağının yeterli olmamasından dolayı nispeten daha düşüktür. Yüksek niştasta konsantrasyonunda ise oluşan α -amilaz ortamda aşırı miktarda bulunan niştastayı parçalayarak ortamda indirgen şekerlerin birikmesine neden olmaktadır. Şeker konsantrasyonundaki bu artış enzim üretiminin represyonu ile sonuçlanmaktadır (Pimpa, 2003).

α -amilaz enziminin indüklenebilen bir enzim olduğu ve genellikle nişasta ve nişastanın hidrolizi sonucu oluşan maltoz varlığında üretiminin arttığı belirtilmektedir (Morkeberg,1995, Srivastana,1987). Glikoz konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite değeri dikkate alınır, enzimin substratı da olan nişastanın karbon kaynağı olarak kullanılması enzim üretimini önemli oranda değiştirmemektedir. Ayrıca, glikozun kullanıldığı deney sonuçlarına göre maksimum enzim aktivitesine ve durağan evreye daha geç ulaşılmıştır. Nişastanın zor metabolize edilebilen bir karbon kaynağı olması dolayısıyla bu beklenen bir sonuçtur. Yüksek karbon tüketim hızlarında amilaz inhibisyonunun daha fazla olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtmişlerdir (Winish,1965). Bu durum hem glikoz hem de nişasta ile yapılan deneylerde gözlenmiştir.

Karbon kaynağı olarak 10 g/l nişasta ile birlikte farklı oranlarda gliserin ilave edilen fermantasyon ortamında yapılan deney sonuçları Şekil 6.3.'te verilmiştir.



Şekil 6.2. Farklı nişasta konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (◇ 5 g/l, □ 10 g/l, Δ 15 g/l nişasta., siyah işaretler 2. eksene aittir)

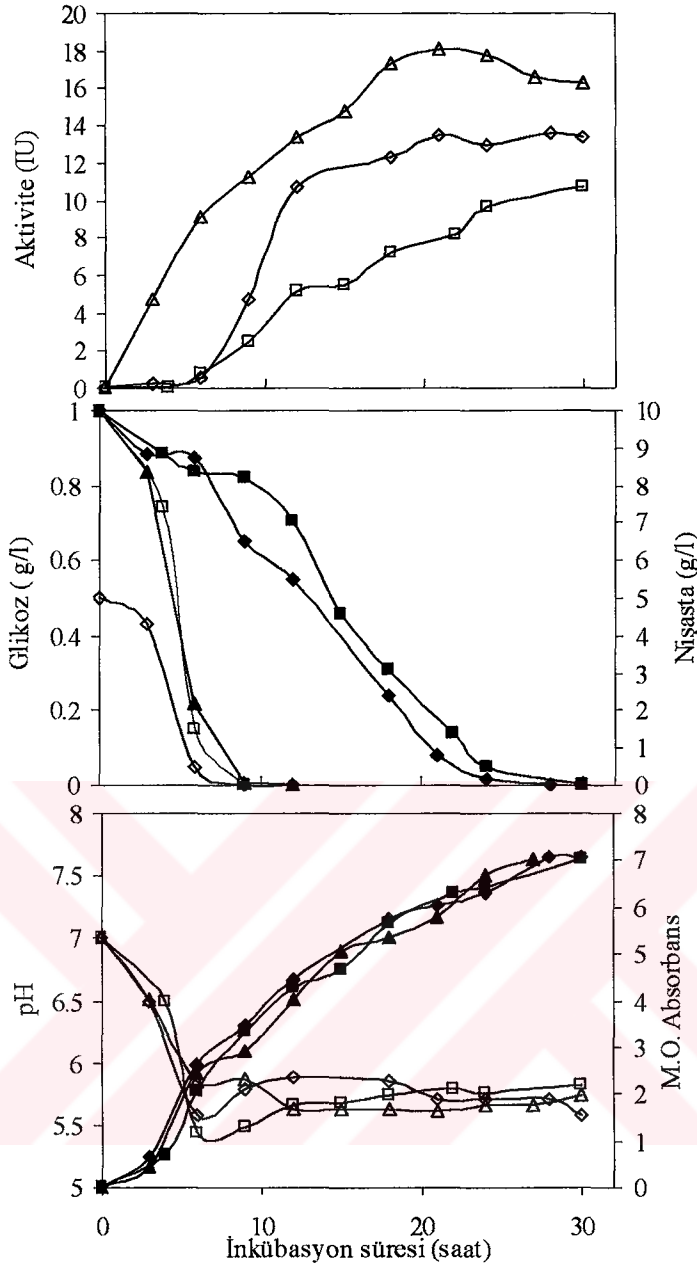


Şekil 6. 3. Farklı gliserin konsantrasyonlarında ortam parametrelerinin zamanla değişimi. (□ % 0 v/v, ◇ %5 v/v, Δ %10 v/v, ○ %15 v/v, * %20 v/v gliserin)

Gliserinin bulunmadığı veya % 5 (v/v) gibi düşük oranda bulunduğu ortamda yapılan deneylerde enzim üretiminin azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte yüksek gliserin konsantrasyonlarında (%20 v/v) ise enzim üretiminin ve bakteri büyümesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, ortama ilave edilen düşük oranda gliserinin enzim üretimini artırmak için yeterli olmamasından, yüksek oranda gliserin içeren ortam da ise ortam viskozitesinin artmasından kaynaklanabilir. Düşük gliserin içeren fermantasyon ortamlarında bakteri büyümesinin maksimum olduğu ve gliserin konsantrasyonunun artmasıyla hücre büyümesinin azaldığı görülmüştür. Düşük gliserin içeren fermantasyon ortam pH'sının çok düşük olması mikroorganizmanın enzim üretiminden ziyade organik asit üretimine yöneldiğini göstermektedir. Maksimum enzim üretimi %10 gliserin içeren fermantasyon ortamında olduğu belirlenmiştir. Bu fermantasyon ortamında maksimum enzim üretimine daha kısa sürede ulaşılmıştır. Karbon kaynağı olarak nişasta ve glikoza ilaveten % 15 gliserin içeren ortamlarda maksimum enzim üretimi logaritmik evrenin sonlarına rastlarken, gliserinin %10 kullanıldığı ortamda logaritmik evrenin ortalarına gelmiştir. Gliserin konsantrasyonunun artmasıyla ortam yapısının daha viskoz olması sonucunda, fermantasyonun daha yavaş geliştiği, pH, substrat tüketimi ve bakteri büyümesi grafiklerinden de görülmektedir. Bulunan bu sonuç Sarıkaya'nın 1988'de yaptığı çalışma ile uyum içerisindedir. Kullanılan tüm karbon kaynaklarında maksimum enzim üretimine substrat tamamen tükendikten sonra ulaştığı görülmüştür.

Karbon kaynağı olarak glikoz ve nişastanın beraber kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.4.'de görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi glikoz konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretimi bastırılmaktadır. Semets vd. 1973'te yapmış olduğu çalışmada ortamda karbon kaynağı olarak glikoz, maltoz ve nişastanın bulunduğu durumda, bakterinin ilk olarak glikozu kullandığını belirtmiştir. Ortamda glikoz ve nişastanın bulunduğu deneylerde, nişasta tüketim hızının oldukça azaldığı ve ortamda glikoz tükendikten sonra nişastanın harcanabildiği görülmüştür. Ancak glikoz tükendikten sonra mikroorganizmanın enzim salgıladığı gözlenmiştir. Glikoz ve nişastanın tek kullanıldığı ortamlara göre represif etkinin bu deneylerde çok daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Walker ve Campell (1963) bakteri gelişimiyle enzim üretimi arasında ters bir ilişkinin var olduğunu ifade etmişse de denenen karbon kaynaklarından böyle bir genel sonuca ulaşamamıştır. Nişastanın doğal bir substrat olması, ucuz olması ve doğada bol bulunması dolayısıyla deneylerin kalan kısmında nişasta kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda 10 g/l nişasta ve %10 gliserin kullanılan ortamın maksimum enzim üretimi sağladığı görülmüş ve daha sonraki deneylerde bu bileşim kullanılmıştır.



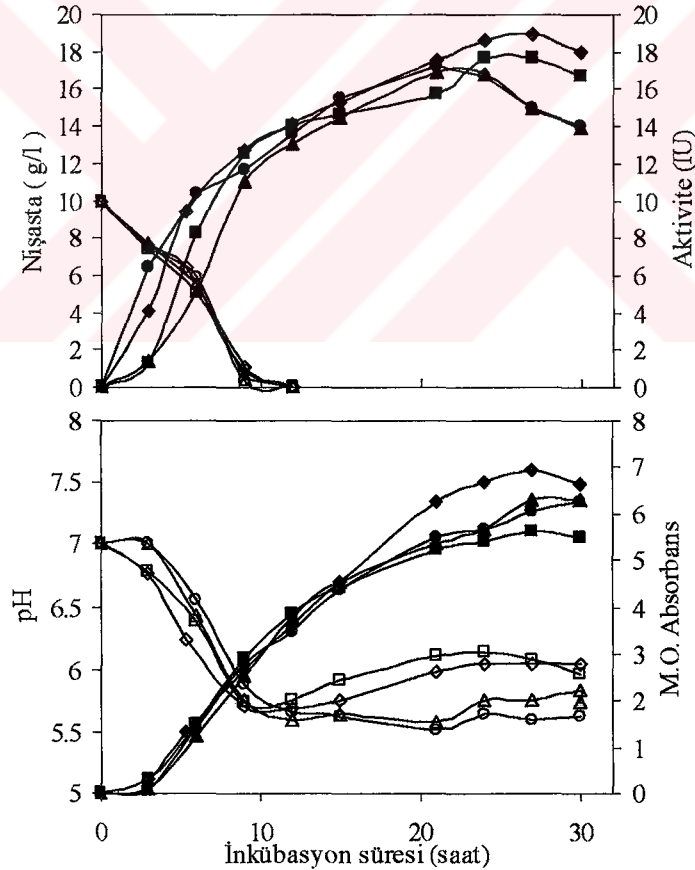
Şekil 6. 4. Nişasta ve glikozun birlikte kullanıldığı deneylerde enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, glikoz konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (Δ 0 g/l glikoz +10 g/l nişasta, $\diamond$ 0.5 g/l glikoz+10 g/l nişasta, $\square$ 1 glikoz+10 g/l nişasta, siyah işaretler 2. eksene aittir).

Karbon kaynaklarının birlikte ve ayrı kullanıldığı deneylerde mikroorganizmaların gelişme evrelerinin de önemli bir şekilde değiştiği görülmüştür. Glikoz kullanılan ortamda durağan evreye yaklaşık 15-18. saatte, nişasta kullanılan ortamda yaklaşık 18-21. saatte ulaşılmıştır. Nişasta ile gliserinin birlikte kullanıldığı ortamlarda ise bu evreye 21. saatten sonra ulaşıldığı görülmüştür. Priestin (1977) *Bacillus* türü mikroorganizmaları incelediği review makalesinde, ortam bileşenlerinin değişmesi sonucu durağan evrenin 12-36 saat arasında değişebileceğini vurgulamıştır. Endüstriyel boyutta bu sürenin düşürülmesinin enzim üretimini artırmak kadar önemli olduğu düşünülmektedir.

6.1.2. Azot kaynaklarının etkisi

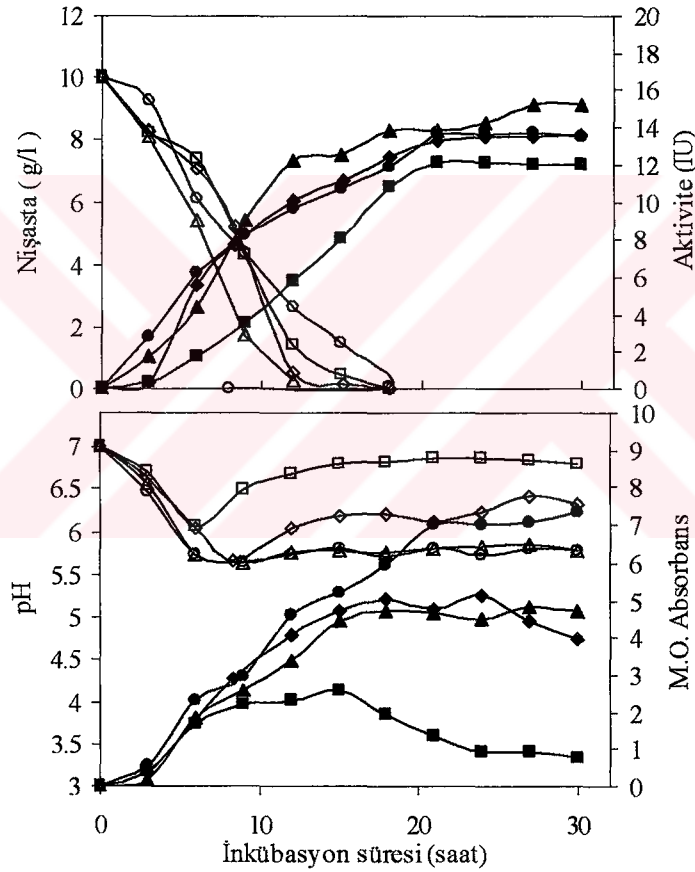
Yapılan çalışmalarda C/N oranının α -amilaz üretiminde önemli olduğu bildirilmektedir. C/N oranı optimum olduğunda, α -amilaz üretiminin maksimum değere ulaştığı belirtilmektedir (Farez,1992, Ülger,1992). Azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yeast ekstrakt, pepton ve sodyum nitrat kullanılmıştır. Organik azot kaynaklarından peptonun etkisinin araştırması amacıyla dört farklı pepton konsantrasyonunda (2.5, 5, 7.5, 10 g/l) yapılan deney sonuçları Şekil 6.5.'de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda pepton kullanılmasının enzim üretimine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Maksimum enzim üretimi (18.89 IU) ve bakteri üremesi 5 g/l pepton kullanılan deneylerde elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda pepton kullanılan deneylerde enzim üretiminde nispeten bir azalma gözlenmektedir.

Enzim üretimine yeast ekstraktın etkisini araştırmak için dört farklı (1, 2, 3, 4 g/l) yeast ekstrakt konsantrasyonunda deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.6.'da verilmiştir.



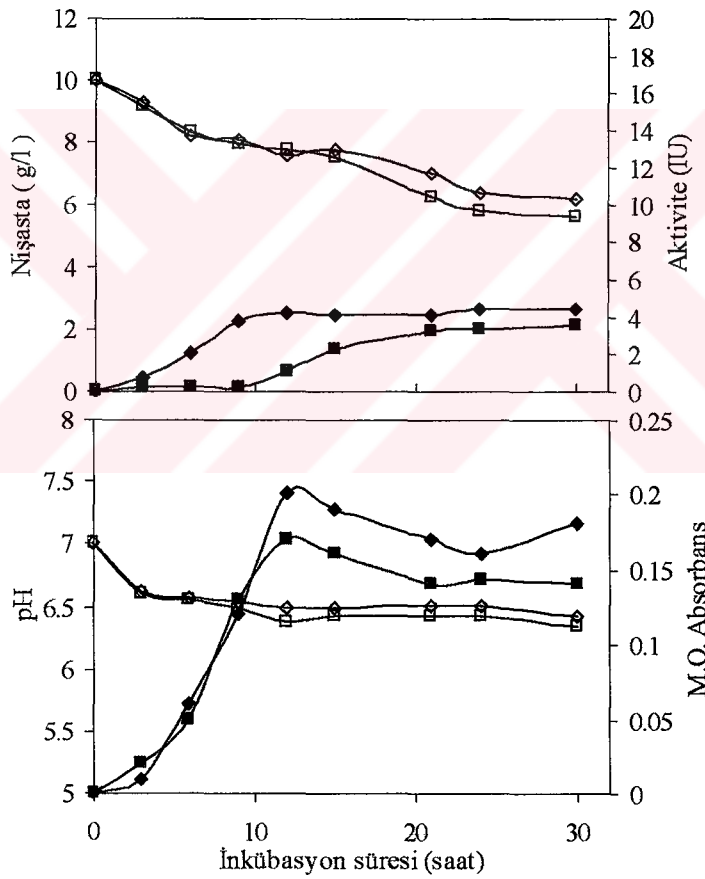
Şekil 6. 5. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve biyomasın zamanla değişimi (□ 2.5 g/l, ◇ 5 g/l, △ 7.5 g/l, ○ 10 g/l pepton, siyah işaretler 2. eksene aittir).

Bakteri gelişiminin, 1 g/l yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamında oldukça az olduğu ve çok hızlı bir şekilde ölüm fazına geçtiği belirlenmiştir. Fermantasyon ortamında yeast ekstrakt konsantrasyonunun artmasıyla mikroorganizma konsantrasyonunun lineer bir şekilde arttığı görülmektedir. Mikroorganizma gelişimindeki bu trend enzim üretiminde görülmemektedir. 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, 1999). Maksimum enzim üretimi (15.14 IU) 3 g/l yeast ekstrakt kullanılan deneylerde elde edilmiştir. Azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve peptonu mukayese edersek maksimum enzim üretimi bakımından peptonun daha kullanışlı olduğu Şekil 6.5. ve 6.6.'da görülmektedir.



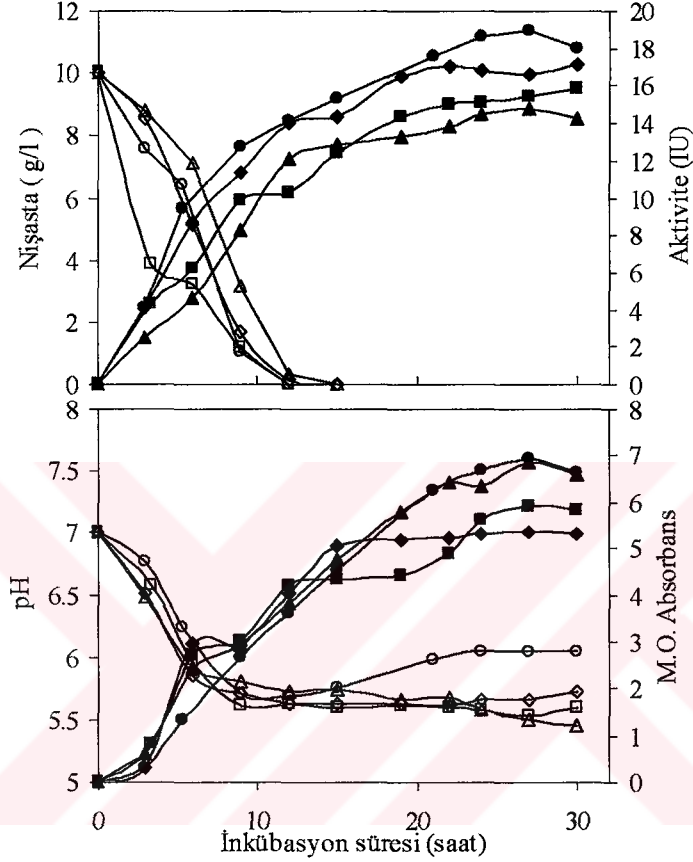
Şekil 6. 6. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi (□ 1 g/l., ◇ 2 g/l, Δ 3 g/l, ○ 4 g/l yeast ekstrakt, siyah işaretler 2. eksene aittir).

İnorganik azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.7.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimi organik azot kaynaklarına göre çok düşüktür. Bakteri üremesi de yok denecek kadar azdır. Bu sonuçlara göre bakterinin inorganik azot kaynağını kullanamadığı söylenebilir. *Bacillus* sp. ile daha önce yapılan çalışmalarda amonyum fosfatın (Coleman ve Elliot,1962), amonyum sülfatın (Dercova,1992, Imai, 1993) enzim üretimini arttırdığı belirtilmiştir. İnorganik azot kaynaklarından sodyum sitratın kullanıldığı deneylerde elde edilen sonuçlarla bu araştırmacıların sonuçlarının çakışması her bir suşun farklı azot kaynaklarında farklı enzim üretim kapasitesine sahip olduğu bilgisini güçlendirmektedir. Ancak organik azot kaynaklarının (yeast ekstrakt, pepton, beef ekstrakt, mısır ıslatma şurubu gibi.) bakteriyel suşlarda maksimum enzim üretimi sağladığı yapılan bir çok çalışmada ifade edilmektedir (Jin vd.1990, Cheng,1989).



Şekil 6. 7. Farklı sodyum nitrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'sı ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 2 g/, ◇ 4 g/l Na₂NO₃, siyah işaretler 2. eksene aittir).

Pepton ve yeast ekstraktın beraber kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.8.'de verilmiştir. 5 g/l peptona ilaveten farklı konsantrasyonlarda yeast ekstraktın kullanılmasının enzim üretimi ve bakteri büyümesini artırmadığı gözlenmiştir. Anderson ve arkadaşlarının önerdiği ortamda, 2 g/l konsantrasyonunda bulunan yeast ekstrakt sonraki deneylerde kullanılmamıştır.



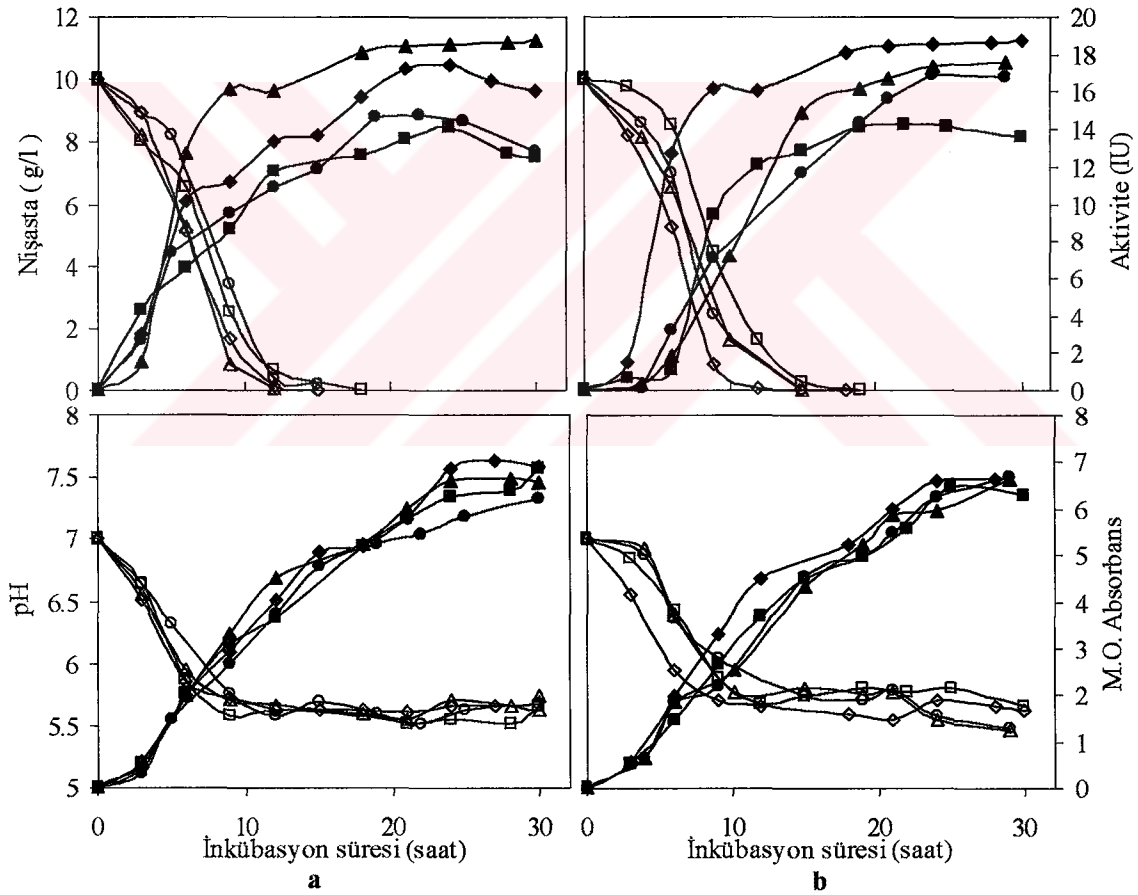
Şekil 6.8. Pepton ve yeast ekstraktın birlikte kullanıldığı deneylerde enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (○ 5 g/l pepton + 0 g/l Yeast ekstrakt, ◇ 5g/ pepton + 1 g/l Yeast ekstrakt, □ 5 g/l pepton + 2 g/l Yeast ekstrakt, △ 5 g/l pepton + 3 g/l Yeast ekstrakt, siyah işaretler 2. eksene aittir).

6.1.3. Diğer Ortam Bileşenlerinin Etkisi

Enzim stabilizasyonu ve proteolitik etkilere karşı korunması için mutlaka ortamda etkili metal iyonlarının bulunması gerekmektedir (Manning and Campel,1961). Bir metalo enzim olan α -amilaz, aktivite gösterebilmesi için ortamda özellikle kalsiyum iyonuna ihtiyaç duymaktadır (Fogarty,1983). Farklı kaynaklardan saflaştırılan α -amilazların mol başına 1 mol kalsiyum iyonu bağladıkları belirtilmektedir (Fischer, 1961). Bu bilgilerden hareketle, iz elementlerin enzim üretimine etkisini belirlemek için Anderson vd.(1985) tarafından önerilen ortamında da bulunan

Ca^{++} iyonun etkisi ve enzim salgılanmasını etkileyeceğini düşünülen NaCl'in etkisi incelenmiştir.

Farklı kalsiyum konsantrasyonu (0, 0.1, 0.2, 0.3 g/l) içeren ortamlarda yapılan deney sonuçları Şekil 6.9.a.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimi ortamda bulunan kalsiyum iyonuyla yakından ilişkilidir. Maksimum enzim üretimi 0.2 g/l kalsiyum iyonu içeren ortamda elde edilmiştir. Kalsiyum iyonunun kullanılmadığı ortamda en düşük enzim üretimi gerçekleşmiştir. Bulunan bu sonuçların daha önce yapılan çalışmalarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür (Fischer,1961, Ramesh,1989). Farklı NaCl konsantrasyonlarında yapılan deney sonuçları Şekil 6.9.b.'de verilmiştir. Maksimum enzim üretimi 1.5 g/l NaCl konsantrasyonu içeren ortamda elde edilmiştir. Ortamın iyonik gücünü dengelemesi açısından önemli olan NaCl'in yüksek konsantrasyonlarda bulunması veya ortamda hiç bulunmaması durumunda enzim üretiminin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.9.a. Farklı kalsiyum konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 0 g/l, ◇ 0.1 g/l, △ 0.2 g/l, ○ 0.3 g/l Ca^{++})

b. Farklı NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (○ 0 g/l, ◇ 1.5 g/l, △ 3 g/l, □ 5 g/l NaCl, siyah işaretler 2. eksene aittir)

B.subtilis ile yapılan deney sonucunda denenen ortamlarda elde edilen maksimum enzim aktiviteleri ve optimizasyon sonucu elde edilen ortam Tablo 6.1.'de verilmiştir. Optimizasyon sonucunda maksimum enzim aktivitesinde Tablo 5.1'de verilen temel ortama göre yaklaşık olarak % 18' lik bir artış belirlenmiştir.

Tablo 6.1. Farklı ortamlarda *B. subtilis* ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite değerleri (KH:150 rpm, pHb:7.0, T:37°C).

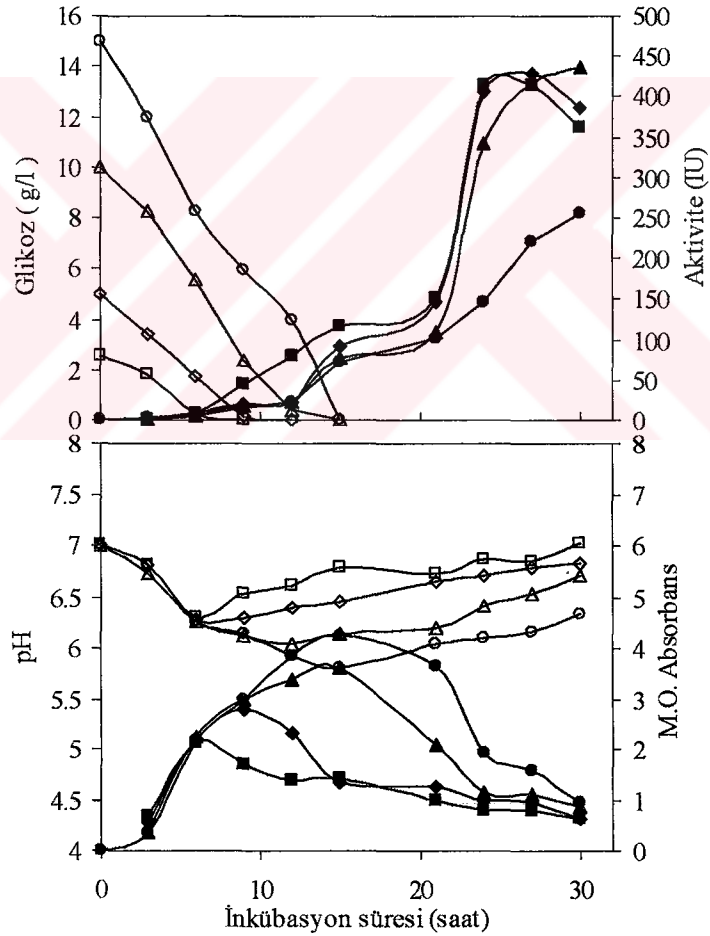
	Diğer Bileşenler	Substrat	Konsantrasyonlar	Maksimum enzim aktivitesi (IU)
Karbon kaynaklarının etkisi	5 g/l Pepton, 2 g/l YE, 0.5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O, 1.5 g/l NaCl, 0.1 g/l CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.5 g/l KH ₂ PO ₄	Glikoz	1 (g/l)	14.577
			2.5 (g/l)	15.475
			5 (g/l)	10.01
		Nişasta	5 (g/l)	13.468
			10 (g/l)	15.792
			15 (g/l)	12.799
		Gliserin	0 (v/v)	8.732
			5 (v/v)	11.884
			10 (v/v)	17.430
			15 (v/v)	15.775
			20 (v/v)	11.408
		Nişasta + Glikoz	10 + 0 (g/l)	17.746
			10 + 0.5 (g/l)	13.556
			10 + 1 (g/l)	10.739
Azot kaynaklarının etkisi	10 g/l nişasta, % (v/v) gliserin, 0.5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O, 1.5 g/l NaCl, 0.1 g/l CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.5 g/l KH ₂ PO ₄	Pepton	2.5 (g/l)	17.693
			5 (g/l)	18.63
			7.5 (g/l)	16.901
			10 (g/l)	17.253
		Yeast ekstrakt	1 (g/l)	12.095
			2 (g/l)	13.556
			3 (g/l)	15.176
			4 (g/l)	13.662
		Sodyum nitrat	2 (g/l)	3.521
			4 (g/l)	4.049
		Pepton + YE	5 + 1 (g/l)	15.810
			5 + 2 (g/l)	17.042
Elementlerin etkisi	10 g/l nişasta, % (v/v) gliserin, 5 g/l pepton, 0.5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.5 g/l KH ₂ PO ₄	Ca ⁺⁺ iyonu	5 + 3 (g/l)	14.718
			0 (g/l)	14.155
			0.1 (g/l)	17.394
			0.2 (g/l)	18.697
		NaCl	0.3 (g/l)	14.718
			0 (g/l)	14.261
			1.5 (g/l)	18.697
			3 (g/l)	18.697
Optimum ortam	0.5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.5 g/l KH ₂ PO ₄	Nişasta	10 (g/l)	18.697
		Gliserin	10 (v/v)	
		Pepton	5 (g/l)	
		Ca ⁺⁺ iyonu	0.2 (g/l)	
		NaCl	1.5 (g/l)	

6.2. *B. amyloliquefaciens* ile Bulunan Sonuçlar

B. amyloliquefaciens ile yapılan deneylerde Anderson vd. tarafından önerilen ortamda enzim aktivitesi belirlenemediğinden Syu ve Chen (1997) tarafından önerilen (Tablo 5.1.) ortam parametrelerinin etkisi incelenmiştir.

6.2.1. Karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynağının enzim üretimi üzerine etkisi farklı konsantrasyonlarda glikoz, nişasta ve gliserinin kullanılarak incelenmiştir. Fermantasyon ortamında bulunan farklı glikoz konsantrasyonunun (2.5, 5, 10, 15 g/l) enzim üretimine etkisinin araştırıldığı deney sonuçları Şekil 6.10.'da verilmiştir.



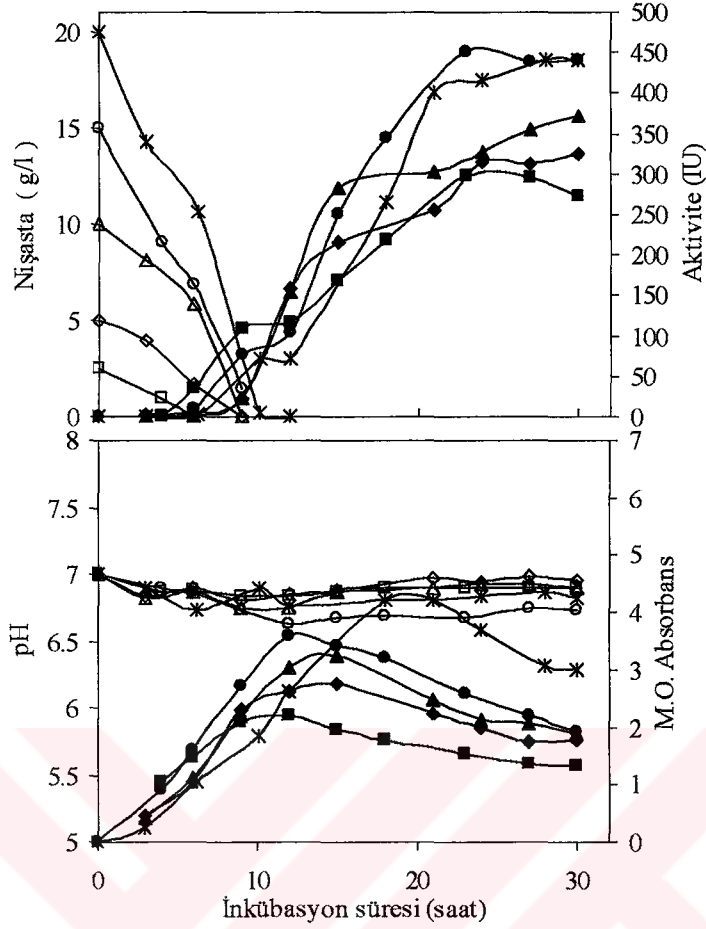
Şekil 6.10. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, glikoz konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 2.5 g/l, ◇ 5 g/l, Δ 10 g/l, ○ 15 g/l glikoz, siyah işaretler 2. eksene aittir).

Şekilden de görüldüğü gibi ortama ilave edilen glikozun artmasıyla biyomas konsantrasyonu artarken, yüksek glikoz konsantrasyonlarında enzim üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. α -amilaz üretiminde, yüksek glikoz konsantrasyonlarının oldukça yüksek represif etkiye sahip olduğu ve düşük glikoz konsantrasyonlarında ise enzim üretiminin etkilenmediği daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Windish,1965). Glikoz konsantrasyonunun 2.5 g/l'den 5 g/l'ye yükseltilmesiyle enzim aktivitesinin önemli oranda değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca grafikten çıkarılacak bir başka sonuç ta ortamda bulunan glikoz tamamen tükendikten sonra enzim salgılanmaya başlamıştır. Glikoz tükendikten sonra gözlenen mikroorganizma konsantrasyonundaki azalma lysis olayı ile açıklanabilir. Yüksek glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sını daha fazla düşmesi metabolik asitlerin daha fazla salgılandığını göstermektedir (Pekin 1980).

Farklı nişasta konsantrasyonlarında (2.5, 5, 10, 15, 20 g/l) yapılan deney sonuçları Şekil 6.11.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, düşük nişasta konsantrasyonlarında ortamda bulunan karbon kaynağı yetersiz kalmakta, sonuç olarak ta biyomas ve enzim üretimi düşük olmaktadır. Maksimum enzim üretimi (449 IU) 15 g/l nişasta kullanılan fermantasyon ortamında elde edilmiştir. Daha yüksek nişasta konsantrasyonu içeren ortamda ise maksimum enzim üretiminde önemli bir değişim olmazken, biyomas konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir.

Nişasta konsantrasyonunun fermantasyon süresince düşmesi, fermantasyonun ilk aşamasından itibaren α -amilaz üretiminin olduğunu göstermektedir. Ancak aktivitenin ölçüldüğü yöntem göz önüne alınınca, fermantasyon ortamında yüksek konsantrasyonda nişasta içeren ortamlarda düşük enzim aktiviteleri belirlenememektedir. Nişasta tamamen tükendikten sonra enzim üretiminde önemli bir artış dikkati çekmektedir. Burada, nişasta mikroorganizma tarafından salgılanan α -amilaz ile hidrolizlenerek daha düşük moleküllere dönüştürülmüştür. Bu aşamayı takip eden analizde (15-18. saatlerde) enzim üretimindeki artış, oluşan bu ürünlerin enzim oluşumunda indüktör olarak davranmasıyla açıklanabilir (Sarıkaya,1995). Durağan evrede maksimuma ulaşan enzim üretimi bu noktadan sonra sabit kaldığı görülmüştür. Yüksek nişasta konsantrasyonlarında (15, 20 g/l) yapılan ilk analizde nişasta konsantrasyonlarında gözlenen hızlı düşüşe ise nişastanın fermantasyon ortamında tamamen çözünmemesi ve sterilizasyon sonrası oluşan sıcaklık farkından dolayı çökmesiyle açıklanabilir.

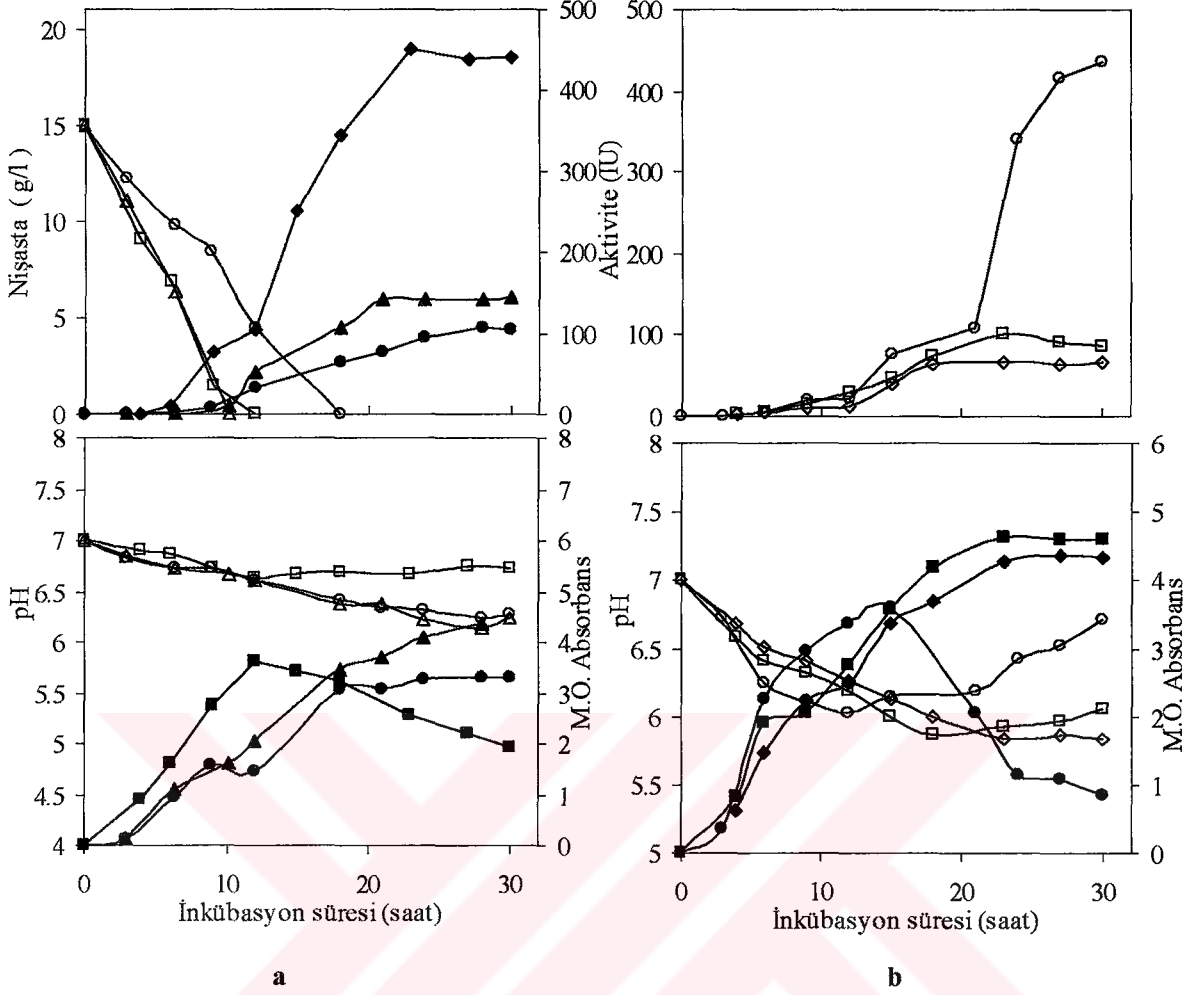
Sarıkaya (1988) ve Yıldız (1993) yapmış oldukları çalışmada maksimum enzim üretiminin logaritmik evrenin sonlarında ve durağan evrenin başlarında olduğu belirtilmektedir. Karbon kaynağı olarak hem glikoz hem de nişastanın kullanıldığı ortamlarda maksimum enzim üretimine durağan evrenin sonlarında ulaşılmaktadır. Bu sonuç kullanılan ortamın farklılığından kaynaklanabilir.



Şekil 6.11. Farklı nişasta konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 2.5 g/l, ◇ 5 g/l, △ 10 g/l, ○ 15 g/l, * 20 g/l nişasta, siyah işaretler 2. eksene aittir).

Nişasta veya glikoz ile birlikte farklı hacimsel oranlarda (0, %5, %10 v/v) gliserinin kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.12.a. ve b.'de verilmiştir. Gliserinin kullanıldığı tüm ortamlarda, bu bileşenlerin kullanılmadığı ortamlara göre enzim üretiminin önemli miktarda azaldığı ve bu azalma oranlarının gliserin konsantrasyonundaki artışa paralel bir eğilim gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte mikroorganizma konsantrasyonunun arttığı ve durağan evrenin, glikoz veya nişastanın yalnız kullanıldığı ortama göre çok daha uzadığı tespit edilmiştir.

Kontrol ortamına göre gliserinin varlığı mikroorganizma konsantrasyonunu arttırırken, gliserin konsantrasyonundaki artış ise bu artışı azaltmaktadır. Gliserinin bakteri büyümesi için enerji, kaynağı olarak kullanıldığı, enzim sentezine katılmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Welker and Campell, 1963). Gliserin konsantrasyonundaki artışla mikroorganizma konsantrasyonundaki azalma, ortam yapısının daha viskoz olması sonucu substrat ve oksijen taşınımının yetersiz olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, Palit vd. (2001) üretilen α -amilazın fermantasyon ortamından ekstraksiyonu amacıyla gliserin kullanmıştır.

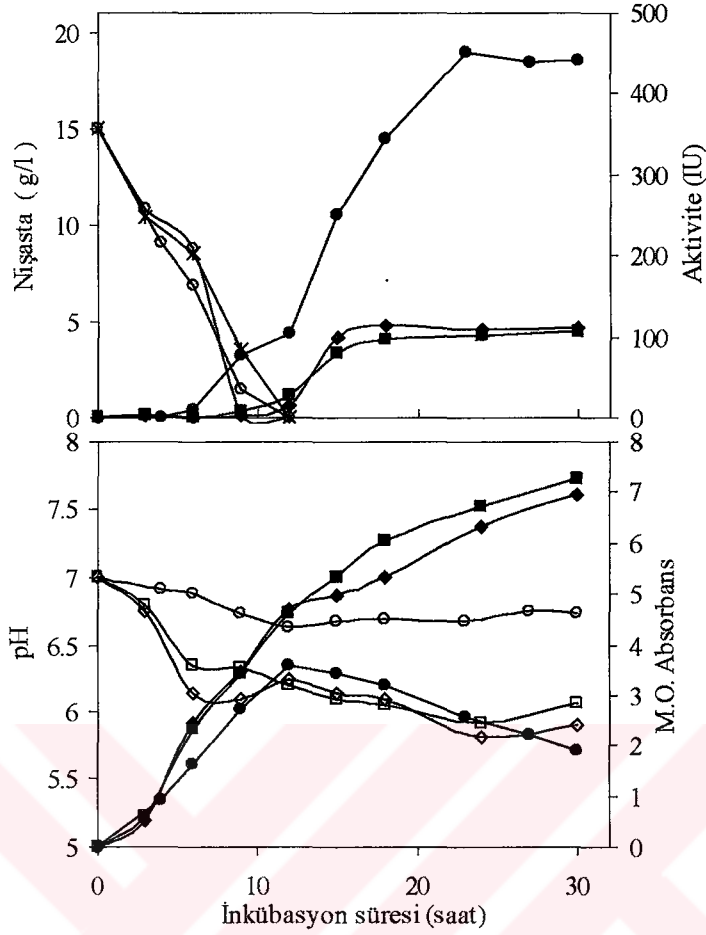


Şekil 6.12. a. Farklı gliserin konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi (15 g/l nişasta + □ 0 gliserin, Δ v/v 5 v/v gliserin, ○ v/v 10 gliserin)

b. Farklı gliserin konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi (10 g/l glikoz +, ○ 0 gliserin, □ 5 v/v gliserin, ◇ 0 v/v gliserin, siyah işaretler 2. eksene aittir)

Ortamda fazla miktarda gliserin kullanılmasının enzim yapısını bozduğunu ve inhibisyona neden olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçların ışığında daha sonra yapılan deneylerde gliserin kullanılmamıştır.

Nişasta ile birlikte glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.13.'de verilmiştir. *B. subtilis* kullanılarak α-amilaz enziminin incelendiği deneylerde olduğu gibi, *B. amyloliquefaciens* ile yapılan deneylerde de katabolitik represyonundan dolayı enzim üretiminin önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. 15 g/l nişasta içeren ortama glikoz ilavesi sonucunda maksimum enzim aktivitesi yaklaşık olarak 1/4 oranında düştüğü görülmüştür. Nişastaya ilaveten glikoz kullanılan fermantasyon ortamında bakteri konsantrasyonu artarken ortam pH'sının azaldığı gözlenmiştir. Karbon kaynakları içerisinde en yüksek enzim üretimi (449 IU) 15 g/l nişasta kullanılan fermantasyon ortamında elde edilmiştir. Daha sonraki deneylerde karbon kaynağı olarak 15 g/l konsantrasyonunda nişasta kullanılmıştır.



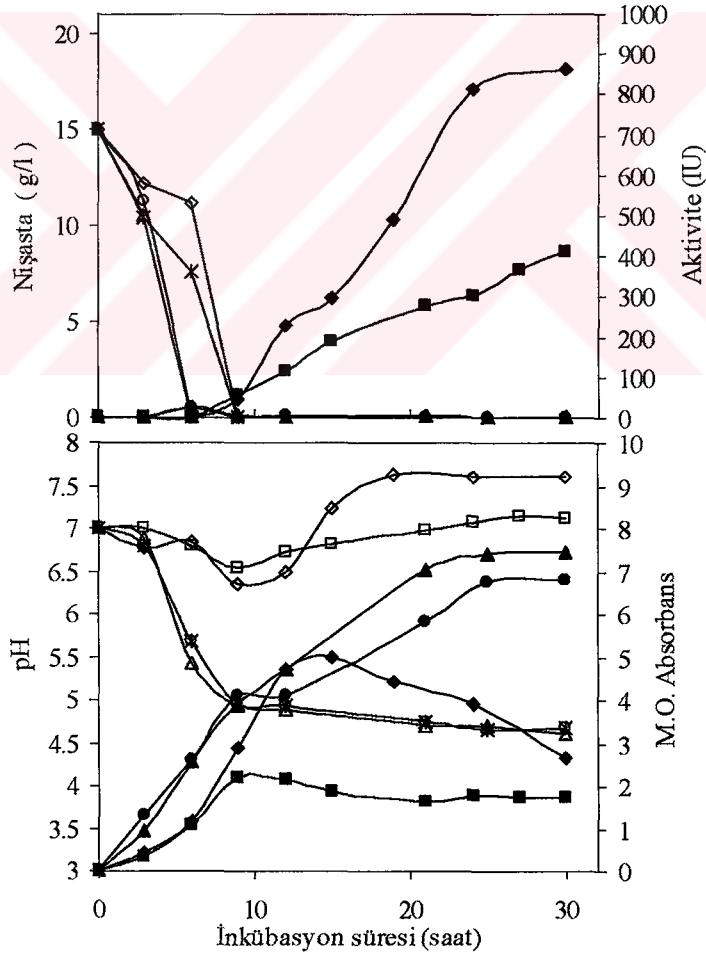
Şekil 6.13. Nişasta ve glikozun birlikte kullanıldığı deneylerde enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (○ 15 g/l nişasta + 0 g/l glikoz, ◇ 15 g/l nişasta + 2.5 g/l glikoz, □ 15 g/l nişasta + 5 g/l glikoz, siyah işaretler 2. eksene aittir).

6.2.2. Azot kaynaklarının etkisi

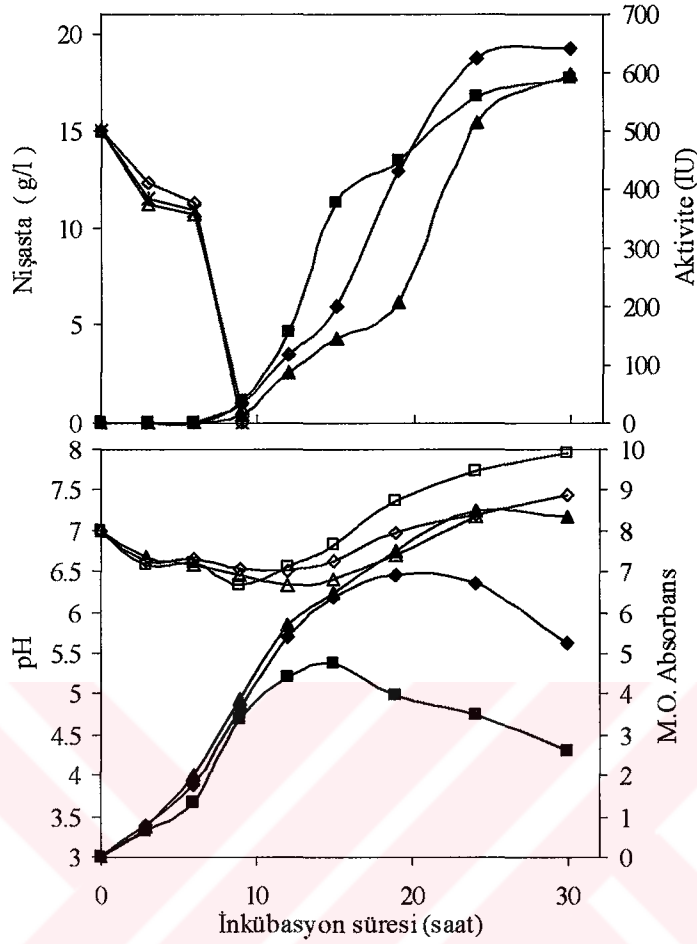
Azot kaynaklarının enzim üretimine etkisini görmek için pepton, yeast ekstrakt, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılmıştır. Dört farklı (1, 2.5, 5, 10 g/l) pepton konsantrasyonunda enzim üretimi ve ortam parametrelerinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.14.'de verilmiştir. Maksimum enzim üretimi (859 IU) 2.5 g/l pepton kullanılan besiyerinde elde edilmiştir. 1 g/l pepton kullanılan ortamda hem enzim üretiminin hem de biyomas konsantrasyonunun düşük olduğu belirlenmiştir. Ortama eklenen bu miktar azot kaynağı mikroorganizmanın gelişmesi ve enzim üretimi için yeterli olmamaktadır. 5 g/l ve 10 g/l pepton kullanılan fermentasyon ortamında enzim üretimi yok denecek kadar azdır. Ortam pH'sı değişimine bakıldığında düşük pepton konsantrasyonlarında (1, 2.5 g/l) nötral pH'larda olmasına karşın, yüksek pepton konsantrasyonlarında (5, 10 g/l) asidik pH'lara kaydığı görülmüştür. Ortam pH'sındaki bu aşırı düşüş α -amilaz üretimini bastırdığı düşünülebilir. Alam (1989) yüksek azot konsantrasyonlarda azot içeren ortamlarda enzim üretiminin artırılması için

ortam pH'sının kontrol edilmesi gerektiğini ve düşük pH değerlerinin enzim üretimini bastırdığını belirtmiştir. C/N oranındaki değişimin enzim üretimi üzerinde önemli olduğu deney sonuçlarından görülmektedir. Bu oranın yüksek olduğu değerlerde mikroorganizmanın α -amilaz üretimi yerine ortamı daha asidik yapan metabolik asitlerin üretimine yöneldiği gözlenmiştir.

Azot kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10 g/l) yeast ekstraktın kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.15.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum enzim üretimi 5 g/l yeast ekstrakt içeren fermentasyon ortamında elde edilmiştir. Ortam pH'sının daha önce incelenen ortam bileşenlerine göre oldukça yüksek değerlerde olduğu, biyomas konsantrasyonunun yeast ekstrakt konsantrasyonunun artırılmasıyla önemli oranda arttığı şekilden görülmektedir. Mikroorganizma konsantrasyonunda belirlenen bu artış enzim üretiminde gözlenmemiştir. En yüksek biyomas 10 g/l yeast ekstrakt içeren ortamda oluşurken, enzim üretiminin bu ortamda azaldığı belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak peptonun kullanımının yeast ekstrakt kullanımına göre daha yüksek enzim üretimi sağladığı Şekil 6.14. ve Şekil 6.15.'den görülmektedir.



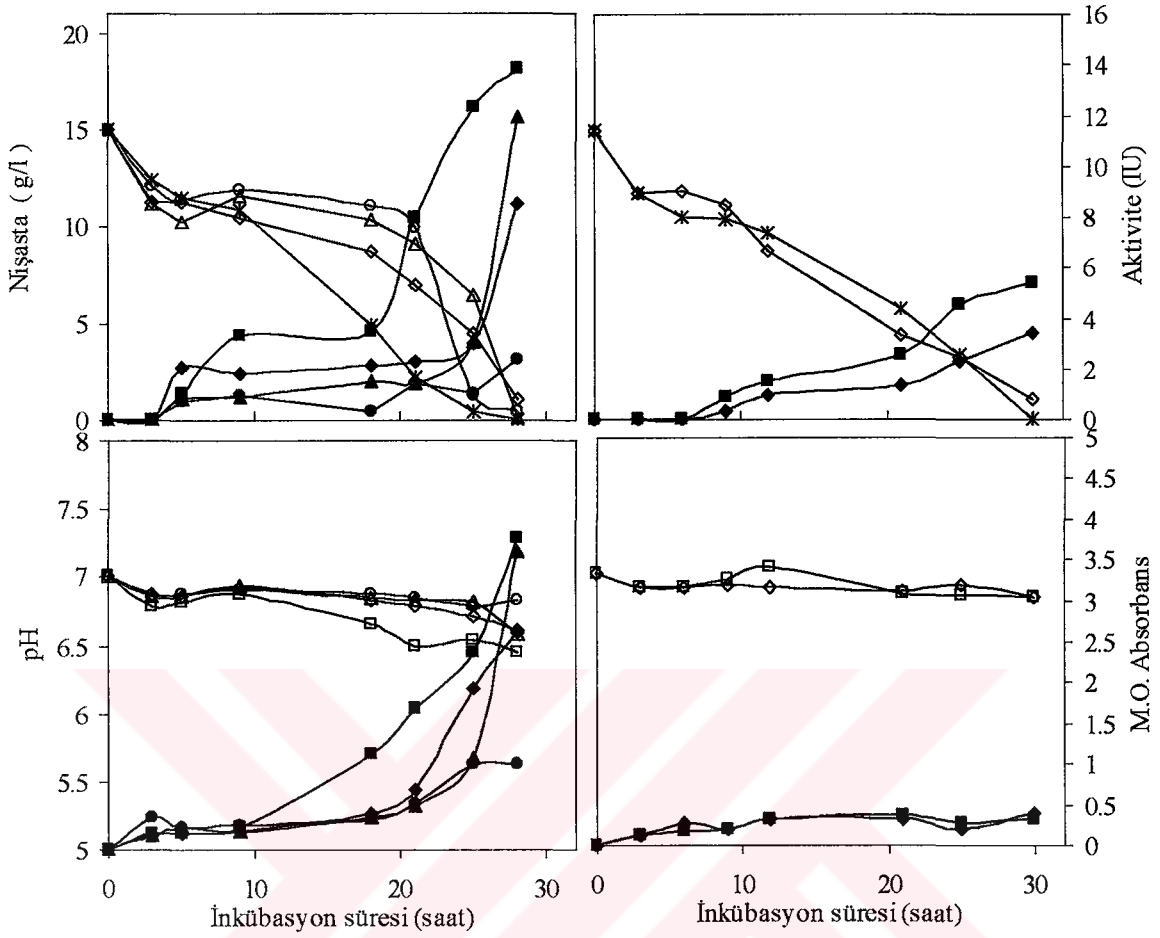
Şekil 6.14. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 1 g/l, ◇ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, ○ 10 g/l pepton, siyah işaretler 2. eksene aittir).



Şekil 6.15. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 2.5 g/l, ◇ 5 g/l, △ 10 g/l g/l yeast ekstrakt, siyah işaretler 2. eksene aittir).

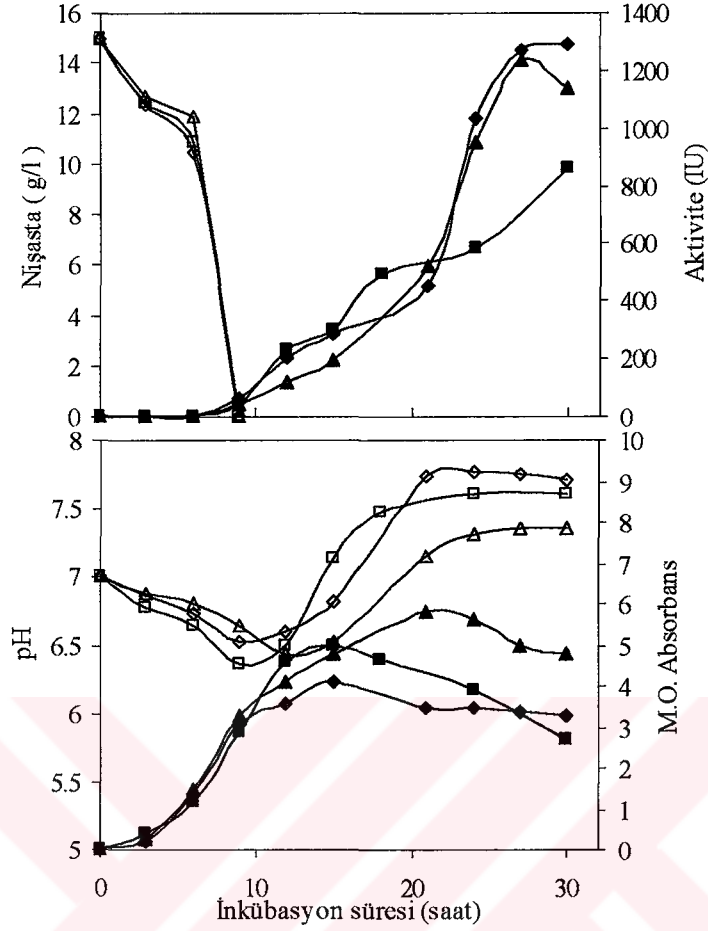
Farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 7.5, 10 g/l) amonyum sülfat kullanılan deney sonuçları Şekil 6.16.a.'da verilmiştir. Enzim üretiminin ve bakteri konsantrasyonunun çok düşük olduğu şekilden görülmektedir. 30. saate kadar ortamda nişasta bulunması enzim üretiminin yok denecek kadar az olduğunu göstermektedir.

Sodyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı deney sonuçları Şekil 6.16.b.'de verilmiştir. Nişasta konsantrasyonu fermentasyon boyunca tükenmediği, biyomasın yok denecek kadar az üredığı ve ortam pH'sının değişmediği görülmektedir. Amonyum sülfat kullanılan ortamda enzim üretimi ve mikroorganizma konsantrasyonu nispeten yüksek olmasına rağmen, *B. subtilis* ile yapılan deneylerde olduğu gibi *B. amyloliquefaciens* ile yapılan deneylerde de inorganik azot kaynaklarının kullanılamadığı Şekil 6.16.a. ve 6.16.b.'de görülmektedir.



Şekil 6.16.a. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 2.5 g/l, ◇ 5 g/l, △ 7.5 g/l, ○ 10 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,)
b. Farklı sodyum nitrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi (□ 2 g/l, ◇ 4 g/l $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, siyah işaretler 2. eksene aittir)

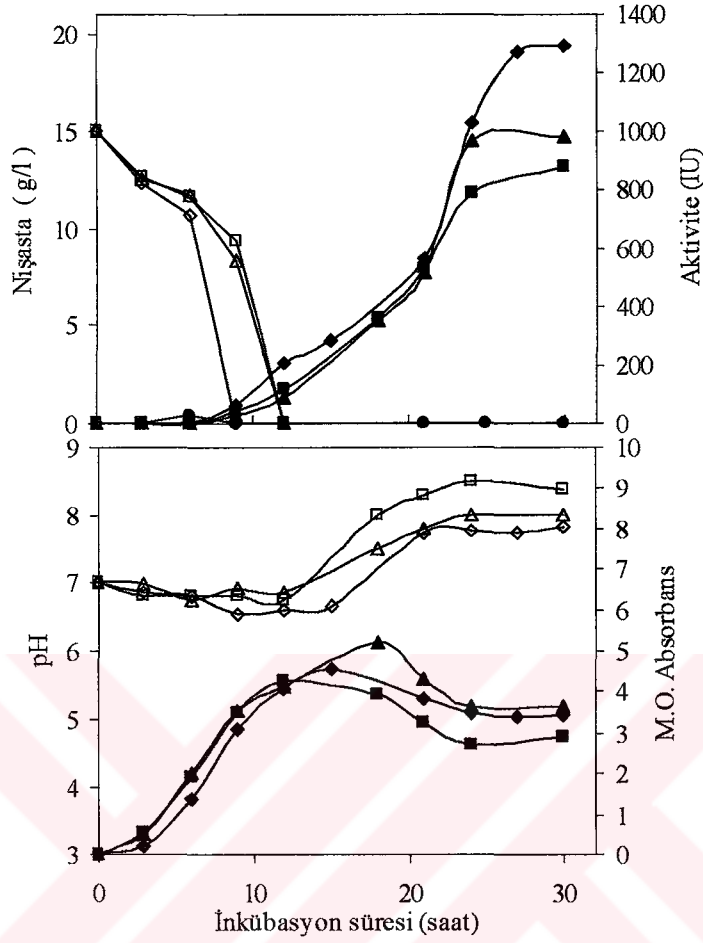
Azot kaynağı olarak peptona (2.5 g/l) ilaveten ortama farklı konsantrasyonlarda yeast ekstrakt (0, 1, 2.5 g/l) kullanılan deney sonuçları Şekil 6.17.'de verilmiştir. Azot kaynağı olarak peptonla birlikte yeast ekstrakt'ın kullanılmasının enzim üretimini arttırdığı görülmüştür. Maksimum enzim üretimi (1316 IU) 2.5 g/l pepton ve 1 g/l yeast ekstrakt içeren fermentasyon ortamında elde edilmiştir. Yeast ekstrakt konsantrasyonu 2.5 g/l'ye çıkarılan ortamda bakteri konsantrasyonu artmasına rağmen, enzim üretiminde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Maksimum enzim üretimi ortam pH'sının yüksek olduğu değerlerde elde edilmiştir. Yapılan deneylerde genel olarak enzim aktivitesinin düşük olduğu noktalara paralel olarak ortam pH'sıda düşük olduğu gözlenmektedir. Fermentasyon ortam pH'sı ile α -amilaz üretimi arasında yakın bir ilişkinin olduğu gözlenmektedir. Daha sonra yapılacak deneylerde azot kaynağı olarak maksimum enzim üretiminin sağlandığı 2.5 pepton ve 1 g/l yeast ekstrakt kullanılmıştır.



Şekil 6.17. Peptona ilaveten farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 2.5 g/l pepton + 0 g/l Yeast ekstrakt, ◇ 2.5 g/l pepton + 1 g/l Yeast ekstrakt, Δ 2.5 g/l + 2.5 g/l Yeast ekstrakt, siyah işaretler 2. eksene aittir).

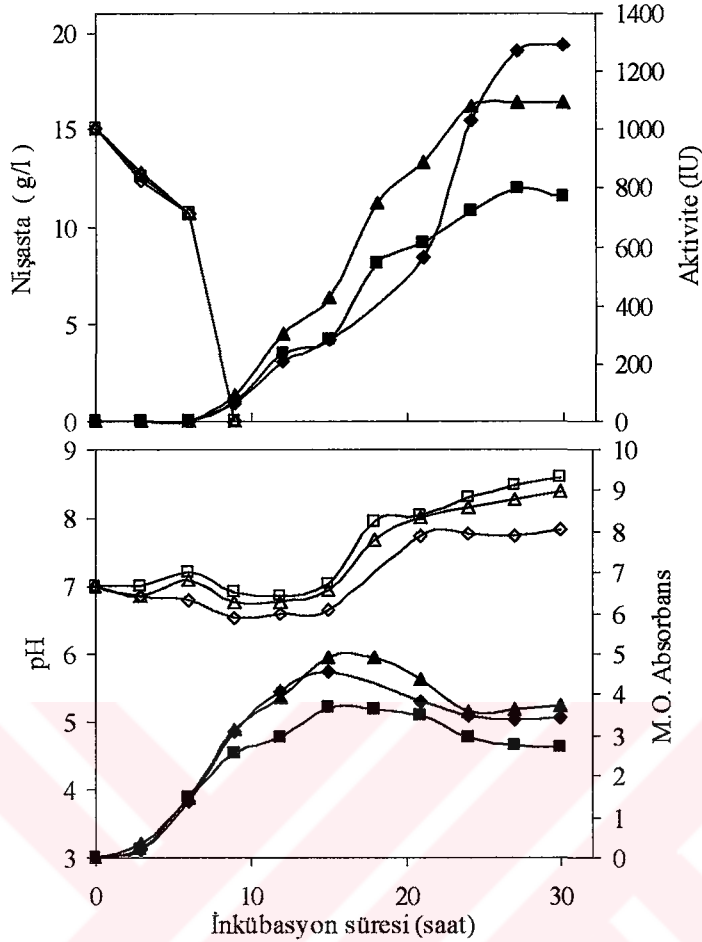
6.2.3. Diğer Ortam Bileşenlerinin Etkisi

Literatürde fosfatın α -amilaz üretimi için etkin bir promotor olduğu belirtilmektedir. α -Amilaz üretimi için optimum fosfat konsantrasyonu Fukomoto ve arkadaşları tarafından 0.1 M olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon mikroorganizmanın gelişmek için ihtiyaç duyduğu değerin çok üzerindedir (Fukomoto vd.,1958). Farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2 g/l) KH_2PO_4 kullanılan deney sonuçları Şekil 6.18.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum enzim üretimi (1316 IU) 1 g/l KH_2PO_4 kullanılan fermentasyon ortamında elde edilmiştir. 2 g/l konsantrasyonundaki bu düşüş, ortamda fazla miktarda bulunan fosfatın ortam bileşenleri ve ürünlerle kompleks oluşturmamasından kaynaklanabilir (Yağız, 2000, Pekin, 1980).



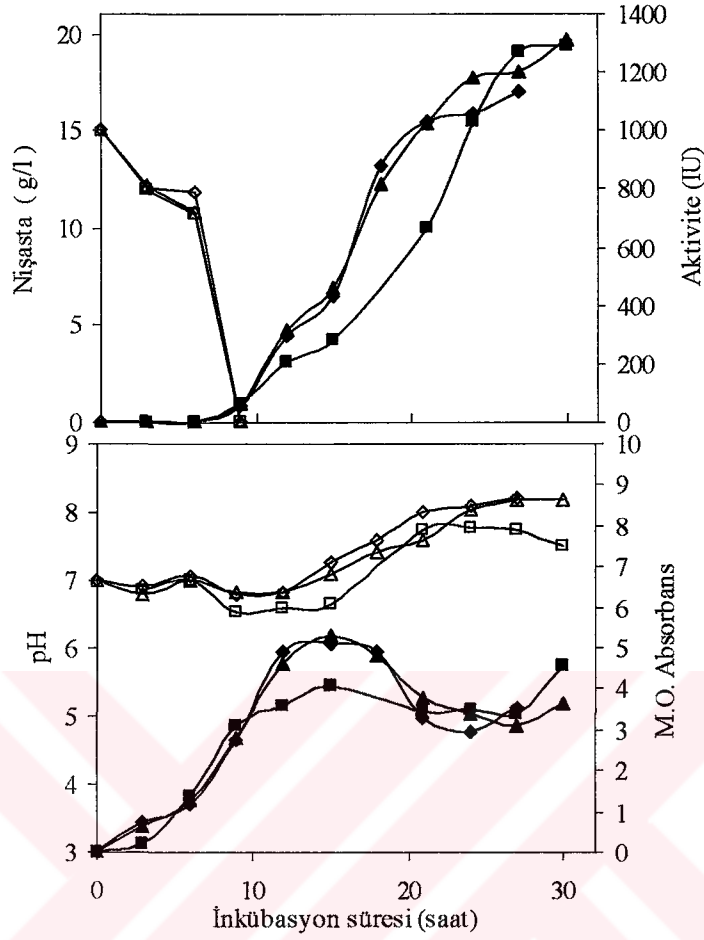
Şekil 6.18 . Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 0 g/l, ◇ 1 g/l, Δ 2 g/l, KH_2PO_4 , siyah işaretler 2. eksene aittir).

Magnezyum sülfatın enzim üretimine etkisinin araştırıldığı deney sonucu Şekil 6.19.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum enzim üretimi (1316 IU) 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilmiştir. 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında enzim üretimini artırırken, mikroorganizma gelişiminde önemli bir etkiye neden olmamıştır. Wu ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada ortamda bulunan magnezyumun, enzim üretiminde çok önemli olduğu ve ortamdan çıkarıldığı zaman enzim üretiminde % 50' ye yakın bir azalmanın olduğunu belirlemişlerdir. MgSO_4 'ın enzim üretimi üzerine olan etkisinin incelendiği deney sonuçlarının literatürle uyum içerisinde olduğu görülmektedir.



Şekil 6.19. Farklı $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi ($\square$ 0 g/l, $\diamond$ 0.5 g/l, Δ 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ siyah işaretler 2. eksene aittir)

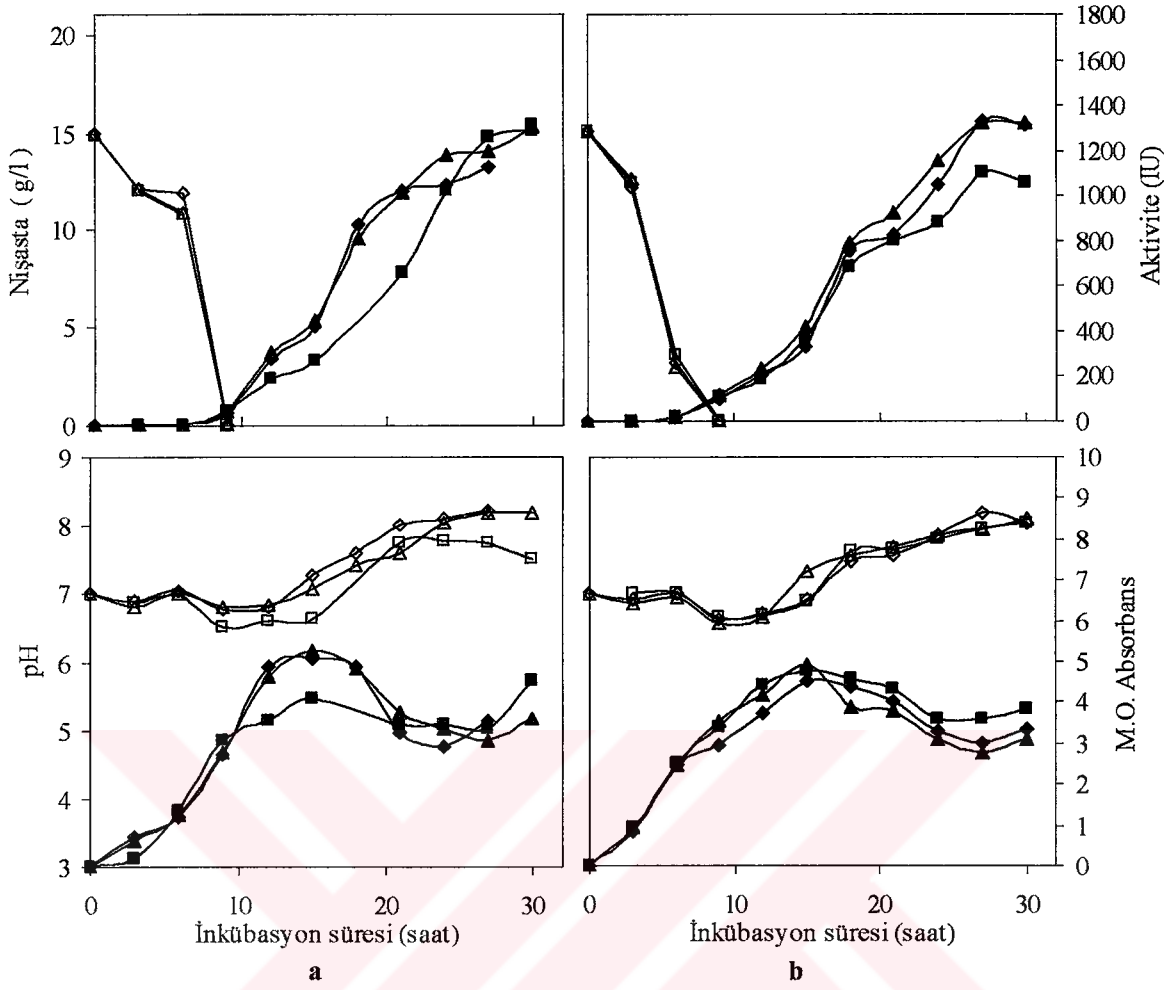
Farklı $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.01, 0.02 g/l) konsantrasyonlarında yapılan deney sonuçları Şekil 6.20.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimi üzerine manganın önemli bir etkisi yoktur. Daha sonra yapılan deneylerde mangan sülfat kullanılmamıştır. Mn^{++} , Zn^{++} , Na^+ ve Fe^{+++} gibi çeşitli elementlerin α -amilaz üretiminde stimülatör etkisi yaptığı yapılan araştırmalarda belirtilmiştir (Fukomoto,1958, Coleman ve Eliot,1962). Ancak çoğu besiyerinde ve endüstriyel ölçekli enzim üretim ortamlarında bu iyonların ortama eklenmesine gerek olmadığı belirtilmektedir. Çünkü, bu elementleri diğer ortam bileşenleri yeterli miktarda içermektedir (Windish,1965).



Şekil 6.20. Farklı $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin, nişasta konsantrasyonunun, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. ($\square$ 0 g/l, $\diamond$ 0.01 g/l, Δ 0.02 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, siyah işaretler 2. eksene aittir).

Farklı $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.01, 0.02 g/l) ve Ca^{++} (0, 0.1, 0.2 g/l) konsantrasyonlarında yapılan deney sonuçları sırasıyla Şekil 6.21.a. ve 6.21.b.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, enzim üretimi ve diğer ortam değişkenleri üzerine demir iyonlarının önemli bir etkisi yoktur.

Kalsiyum iyonunun α -amilazın yapısal bütünlüğünü sürdürebilmesi için gerekli bir iyon olduğu bilinmektedir (Vallee, 1959). Ortamda kalsiyum iyonun uzaklaştırıldığı durumda enzim termostabilitesinin ve/veya enzimatik aktivitenin azaldığı yapılan bir çok araştırmada belirtilmiştir (Sabory, 2000, Machinus, 1995). *B. subtilis* ile yapılan deney sonuçlarına benzer olarak, ilave Ca^{++} iyonu içermeyen fermentasyon ortamında üretilen enzim miktarının, Ca^{++} iyonu içeren ortama göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Ca^{++} konsantrasyonunun 0.2 g/l olduğu deneyde 0.1 g/l olan ortama göre enzim üretiminde önemli bir değişim görülmemektedir.



Şekil 6.21.a. Farklı $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 0 g/l, ◇ 0.01 g/l, Δ 0.02 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

b. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, nişasta konsantrasyonu, pH ve bakteri büyümesinin zamanla değişimi. (□ 0 g/l, ◇ 0.1 g/l, Δ 0.2 g/l Ca^{++} , siyah işaretler 2. eksene aittir).

B.amyloliquefaciens ile yapılan deney sonucunda denenen ortamlarda elde edilen maksimum enzim aktiviteleri ve optimizasyon sonucu elde edilen ortam Tablo 6.2.'de verilmiştir. Optimizasyon sonucunda maksimum enzim aktivitesinde başlangıçta incelenen fermentasyon ortamına göre yaklaşık olarak 3 katlık bir artış belirlenmiştir.

Tablo 6.2. Farklı ortamlarda *B. amyloliquefaciens* ile yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite değerleri (KH:150 rpm, pHb:7.0, T:37°C).

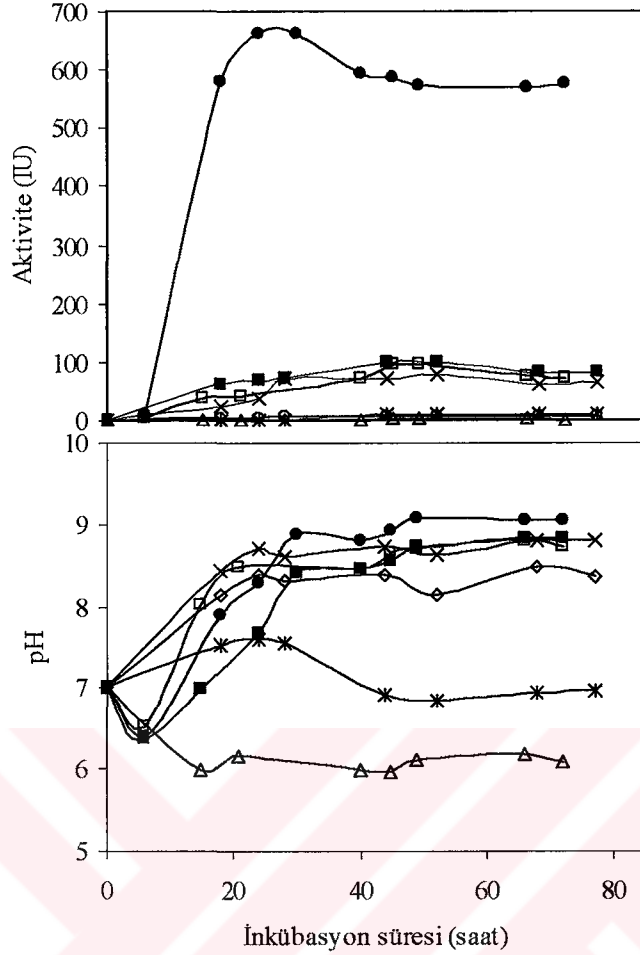
	Diger Bileş.	Substrat	Konsantrasyonlar	Maks. enzim aktivitesi(IU)
Karbon kaynaklarının etkisi	1 g/l YE, 1 g/l pepton, 0.5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.1 g/l CaCl ₂ .2H ₂ O, 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 0.01 g/l MnSO ₄ .7H ₂ O, 0.01g/l FeSO ₄ .7H ₂ O	Glikoz	2.5 (g/l)	412.957
			5 (g/l)	427.46
			10 (g/l)	436.619
			15 (g/l)	254.92
		Nişasta	2.5 (g/l)	296.127
			5 (g/l)	325
			10 (g/l)	370.423
			15 (g/l)	449.296
			20 (g/l)	440.493
		Gliserin + Glikoz	5 (% v/v)+10 (g/l)	100.352
			10 (% v/v)+10 (g/l)	67.60
		Gliserin + Nişasta	5 (% v/v)+15 (g/l)	141.373
			10 (% v/v)+15 (g/l)	105.986
			10 (% v/v)+10 (g/l)	94.014
		Nişasta + Glikoz	15 + 0 (g/l)	449.296
Azot kaynaklarının etkisi	15 g/l Nişasta, 0.5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.1 g/l CaCl ₂ .2H ₂ O, 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 0.01 g/l MnSO ₄ .7H ₂ O, 0.01g/l FeSO ₄ .7H ₂ O	Pepton	1 (g/l)	408.451
			2.5 (g/l)	859.155
			5 (g/l)	25.317
			10 (g/l)	24.331
		Yeast ekstrakt	2.5 (g/l)	590.493
			5(g/l)	641.197
			10 (g/l)	596.831
		Sodyum nitrat	2.5 (g/l)	13.768
			5 (g/l)	8.521
			7.5 (g/l)	11.919
			10 (g/l)	2.377
		Pepton + Yeast ekstrakt	2.5 + 0 (g/l)	859.155
			2.5 + 1 (g/l)	1316.972
			2.5 + 2.5 (g/l)	1235.915
Elementlerin etkisi	15 g/l Nişasta, 2.5 g/l YE, 1 g/l pepton	KH ₂ PO ₄	0 (g/l)	880.282
			1 (g/l)	1316.972
			2 (g/l)	978.873
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0 (g/l)	794.014
			0.5 (g/l)	1316.972
			1 (g/l)	1091.549
		MnSO ₄ .7H ₂ O	0 (g/l)	1286.972
			0.01 (g/l)	1320.423
			0.02 (g/l)	1308.099
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0 (g/l)	1273.028
			0.01 (g/l)	1320.423
			0.02 (g/l)	1308.099
		Ca ⁺⁺ iyonu	0 (g/l)	1102.113
			0.1 (g/l)	1333.099
			0.2 (g/l)	1324.648
Optimum ortam		Nişasta	15 (g/l)	1333.099
		Pepton	2.5 (g/l)	
		Yeast ekstrakt	1 (g/l)	
		KH ₂ PO ₄	1 (g/l)	
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 (g/l)	
		Ca ⁺⁺ iyonu	0.1 (g/l)	

6.3. Doğal Ortamda Yapılan Deneyler

Endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesiyle şeker kamışı küspesi, buğday kepeği, soya küspesi gibi tarımsal ve endüstriyel atıkların katı hal fermantasyonunda ucuz substratlar olarak kullanımının araştırılması giderek yaygınlaşmaktadır (Pandey 2000, Baysal 2003, Abate, 1999). Bu substratların kullanımıyla enzim üretim maliyetinde önemli bir kısmı oluşturan ortam maliyetlerinin azaltılması amaçlanmaktadır. Ayrıca bu tarımsal ve endüstriyel yan ürünlerin substrat olarak kullanımı hem çevre kirliliği açısından hem de bu yan ürünlerin daha verimli şekilde değerlendirilmesi açısından avantaj sağlamaktadır.

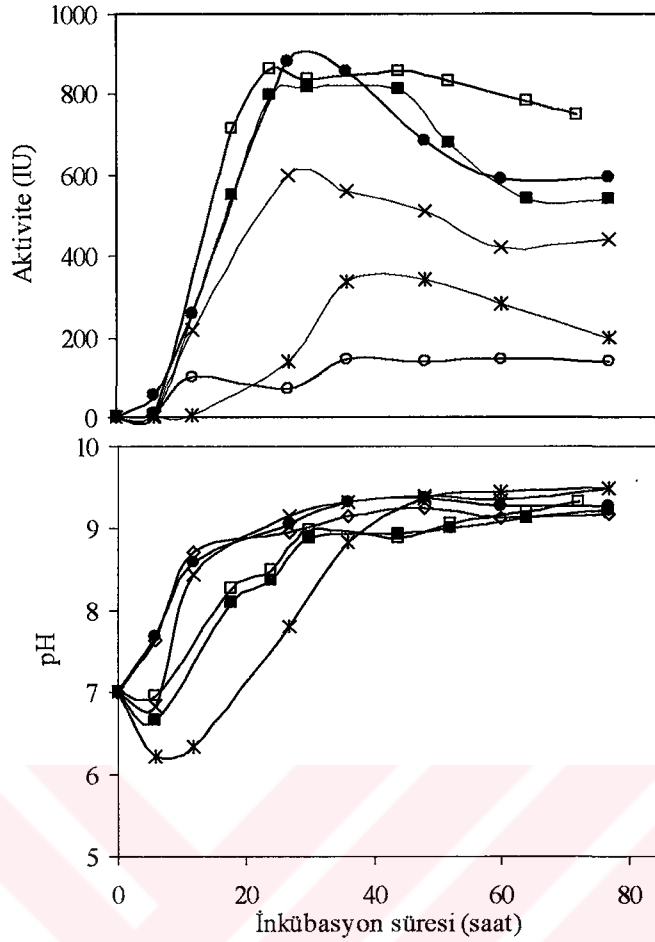
Doğal ortamların kullanılabilirliğinin araştırıldığı deneylerde, substrat olarak buğday kepeği, mısır kepeği, keçi boynuzu, şeker pancarı küspesi, ay çekirdeği küspesi, melas, mısır proteini (glüten) ve mısır kepeği kullanılmıştır. Yapılan deneylerde *B. amyloliquefaciens* ile doğal ortamlarda enzim üretimi ve ortam pH'sının zamanla değişimi takip edilmiştir.

Musluk suyu kullanılarak farklı substratlarla hazırlanan fermantasyon ortamında elde edilen enzim aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 6.22.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi şeker pancarı küspesi, keçi boynuzu ve melas kullanılan fermantasyon ortamlarında elde edilen enzim üretimi oldukça düşüktür. Mısır proteini içeren fermantasyon ortamında elde edilen enzim üretimi diğer ortamlara göre oldukça yüksek olmuştur. Bununla birlikte mısır kepeği, buğday kepeği ve ay çekirdeği küspesi kullanılan fermantasyon ortamında elde edilen enzim miktarı nispeten yüksek sayılabilir. Fermantasyon ortamında doğal substratlar ve musluk suyu kullanıldığından, mısır proteini içeren ortamda yeterli miktarda nütriyent bulunurken diğer ortamlarda mikroorganizmaların gelişmesi ve enzim üretebilmesi için yeterli nütriyent olmadığı düşünülmektedir. KHF'nunda ideal bir substrat mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu tüm nütriyentleri içeren maddelerdir. Ancak çoğu substratlar optimum üretim için gerekli olan konsantrasyonun altında bileşen içerdiğinden eklenmesi gerekmektedir (Sodhi, 2005). Bu nedenle fermantasyon ortamına çeşitli maddeler ilave edilerek enzim üretiminin artırılması amaçlanmıştır.



Şekil 6.22. Farklı substratların kullanıldığı ortamlarda enzim aktivitesinin zamanla değişimi. (10 g/l doğal substrat, ◇ şeker pancarı küspesi, Δ 1 keçi boynuzu, □ mısır kepeği, * melas, x ayçekirdeği küspesi, ● mısır proteini, ■ buğday kepeği, KH:150 rpm, pHb:7.0, T:37°C).

Enzim aktivitesinin düşük olmasının azot kaynağının yetersiz olmasından kaynaklandığı düşünülerek ortama azot kaynağı eklenmiştir. Azot kaynağı olarak sentetik ortamda maksimum aktiviteyi sağlayan ortam bileşimi (2.5 g/l pepton + 1 g/l yeast ekstrakt) kullanılmıştır. Bu fermentasyon ortamında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 6.23.'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimlerinde önemli miktarda bir artış belirlenmiştir. Özellikle buğday ve mısır kepeği içeren fermentasyon ortamlarda maksimum enzim üretiminin azot kaynağı ilave edilmeyen ortamlara göre yaklaşık 8 kat arttığı gözlenmiştir. Enzim üretimi mısır proteini ve şeker pancarı küspesi içeren ortamda önemli oranda değişmezken, melas ve ayçekirdeği küspesi içeren ortamda belirli bir artış gözlenmiştir. Enzim üretimine paralel olarak, pepton ve yeast ekstrakt ilavesiyle pH değerinde bir artış gözlenmektedir. Enzim üretiminin yüksek olması ve literatürde çalışılmadığı için daha sonra yapılan deneylerde substrat olarak mısır proteini ve mısır kepeği seçilmiştir.

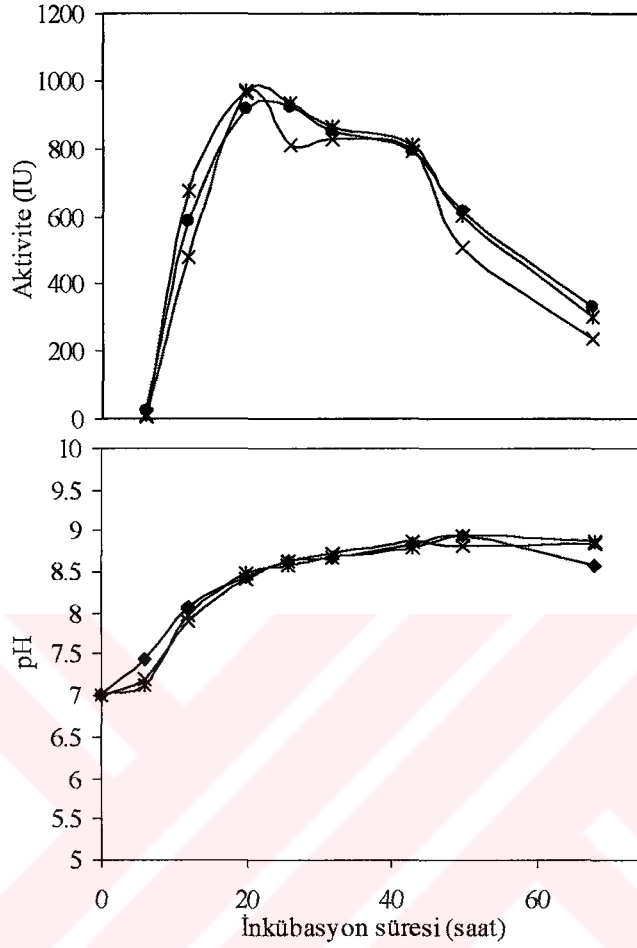


Şekil 6.23. Doğal substratlara azot ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi (10 g/l doğal substrat, 2.5 g/l pepton + 1 g/l yeast ekstrakt, ◊ şeker pancarı küspesi, □ mısır kepeği, * melas, x ayçekirdeği küspesi, • mısır proteini, ▪ buğday kepeği, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0)

6.3.1. Substrat Olarak Mısır Kepeğinin Kullanıldığı Deneyler

6.3.1.1 Tanecik Boyutunun Etkisi

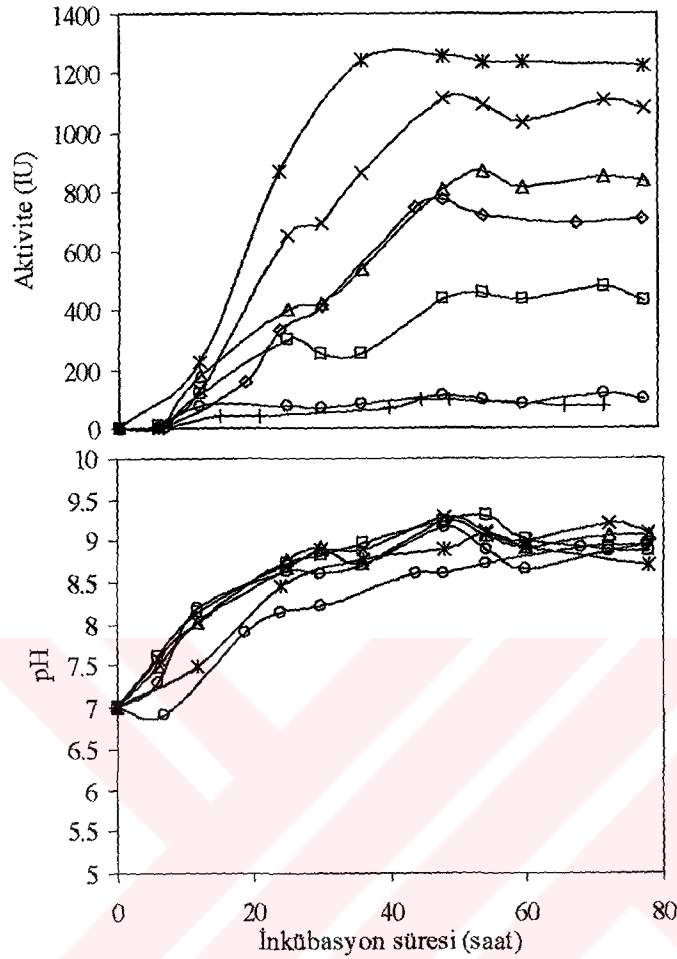
Farklı boyutlarda mısır kepeği içeren deney sonuçları Şekil 6.24.'de verilmiştir. Tane küçültme yüzey alanını artıracaktır, ancak tanecikler içerisindeki porozite azalacaktır. Büyük taneciklerde porozite fazlayken, yüzey alanı düşük olacaktır (Krishna,1996). Şekilden de görüldüğü gibi boyutun küçültülmesi ile enzim üretiminde ve ortam pH'sında önemli bir değişim görülmemiştir. Mikroorganizmanın tüm boyutlarda katı halde bulunan substratı kullanabildiği gözlenmiştir. Daha sonra yapılan deneylerde -50 mesh boyutundaki substratlar kullanılmıştır.



Şekil 6.24. Kepek boyutunun enzim üretimi üzerine etkisi. (*-50, x -30, ◆-100 mesh mısır kepeği, 5 g/l pepton + 1 g/l yeast ekstrakt, 10 g/l MK, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

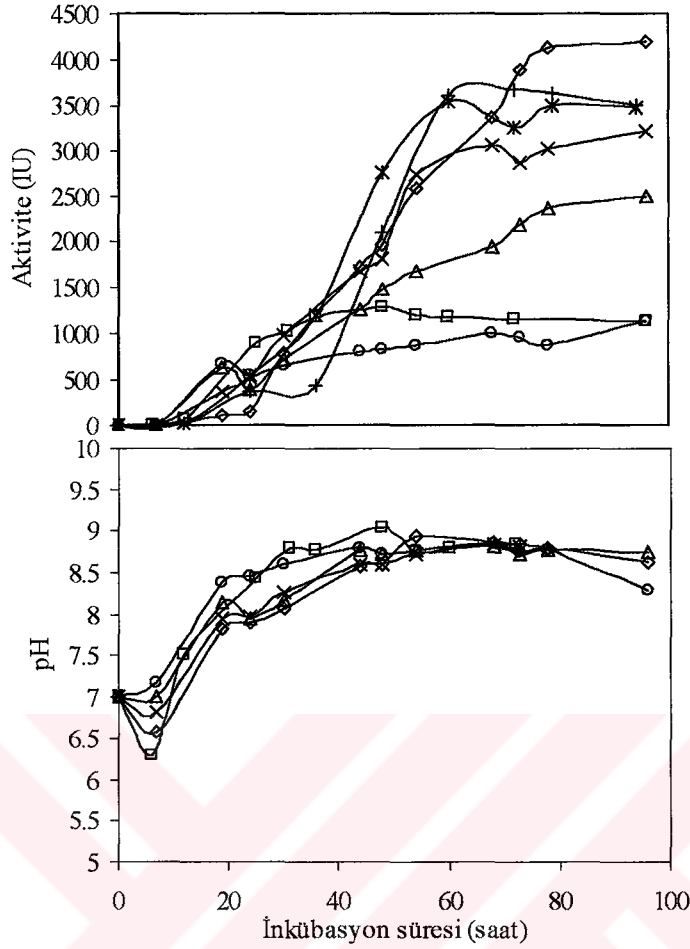
6.3.1.2. Azot Kaynaklarının Etkisi

10 g/l mısır kepeği içeren ortama farklı konsantrasyonlarda (1, 2.5, 5, 10, 15, 30 g/l) pepton ilave edilerek yapılan deney sonuçları Şekil 6.25.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 15 g/l'ye kadar pepton ilavesi enzim aktivitesini artarken, daha yüksek pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesi düşmüştür. Düşük pepton konsantrasyonlarında azot kaynağının yetersiz olması enzim aktivitesini düşürmüştür. Yüksek pepton konsantrasyonunda enzim üretiminin bastırıldığı gözlenmiştir. Maksimum enzim üretimi 15 g/l pepton kullanılan ortamda elde edilmiştir.



Şekil 6.25. Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi. (+ 0 g/l, o 1 g/l, □ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, x 10 g/l, * 15 g/l, ◇ 30 g/l pepton, 10 g/l MK, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

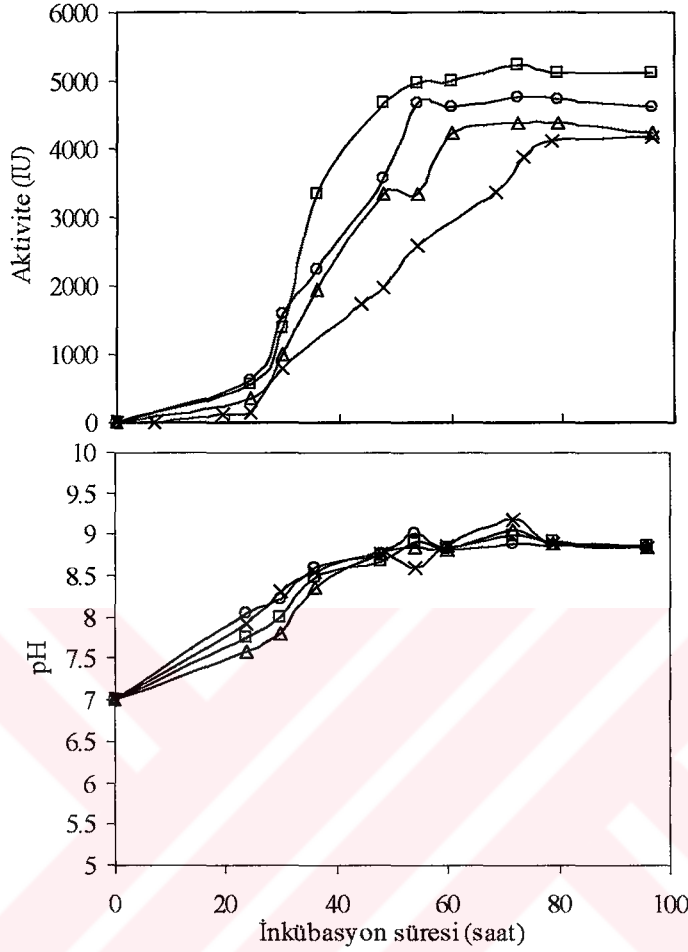
10 g/l mısır kepeği içeren fermentasyon ortamına, farklı konsantrasyonlarda yeast ekstrakt eklenerek yapılan deney sonuçları Şekil 6.26.'de verilmiştir. Düşük yeast ekstrakt içeren fermentasyon ortamında yapılan deneyde enzim üretiminin düşük olduğu, yeast ekstrakt konsantrasyonunun artmasıyla enzim üretimindeki lineer artışın 10 g/l yeast ekstrakt konsantrasyonuna kadar devam ettiği görülmüştür. Maksimum enzim üretimi 10 g/l yeast ekstrakt içeren fermentasyon ortamında elde edilmiştir. 30 g/l yeast ekstrakt içeren ortamda yapılan deneyde enzim üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Pepton kullanılan ortama göre, nispeten daha yüksek enzim üretimi belirlenmiştir. Sonraki deneylerde ortama azot kaynağı olarak 10 g/l yeast ekstrakt ilave edilmiştir.



Şekil 6. 27. Mısır kepeği konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi. (o 5 g/l, □ 10 g/l, Δ 15 g/l, x 20 g/l, ◇ 25 g/l, * 30 g/l, + 40 g/l mısır kepeği, 10 g/l YE, -50 mesh, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

6.3.1.4. Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

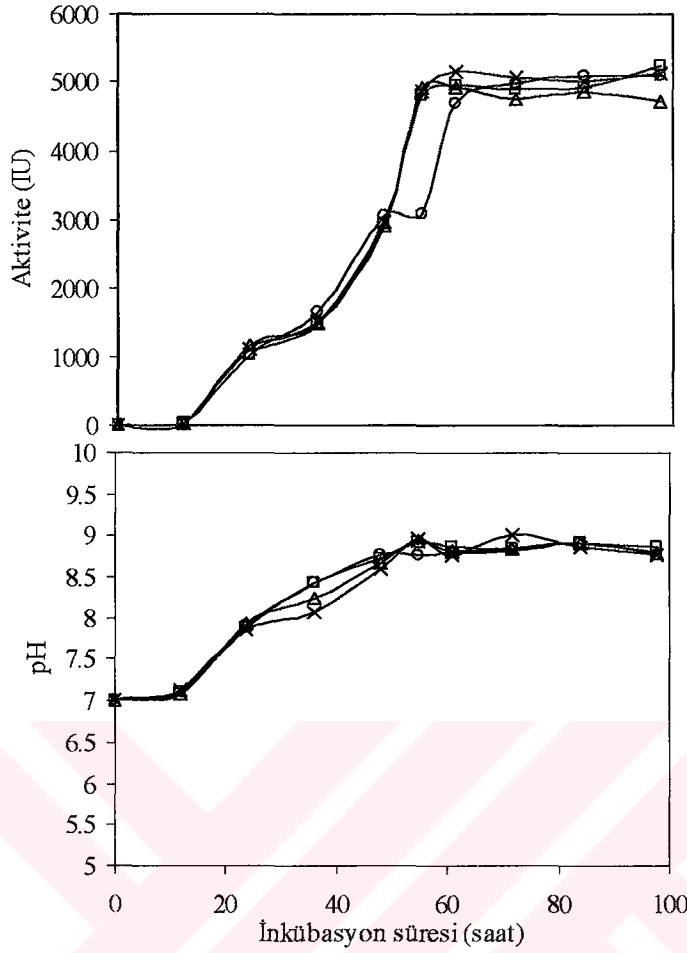
Mikroorganizmaların gelişebilmesi ve enzim üretebilmesi için ihtiyaç duyduğu elementlerden biri olan fosfatın, farklı konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.28.'de verilmiştir. KH_2PO_4 'ın tüm konsantrasyonlarında, bu elementin kullanılmadığı deneye göre maksimum enzim üretiminde önemli bir artış gözlenmiştir. Ancak maksimum enzim üretiminin elde edildiği 1 g/l KH_2PO_4 konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonda yapılan deneyde bu artış oranında bir düşüş gözlenmektedir. Mikroorganizmanın gelişebilmesi ve enzim üretebilmesi için gerekli olan bu elementlerin ortamda aşırı bulunması, mikroorganizma gelişmesi ve enzim üretimi için inhibitör etkisi yapabilmektedir. Bu durum, ortamda aşırı bulunan iyonların amino asit, protein vb. maddelerle veya oluşan ürünlerle kompleksleşerek biyodönüşüm işlemini olumsuz yönde etkilemeleriyle açıklanabilir (Pekin, 1980).



Şekil 6.28. KH_2PO_4 konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi. (x 0 g/l, o 0.5 g/l, □ 1 g/l, Δ 2 g/l KH_2PO_4 , 10 g/l YE, 25 g/l MK. -50 mesh, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

6.3.1.5. MgSO_4 Konsantrasyonunun Etkisi

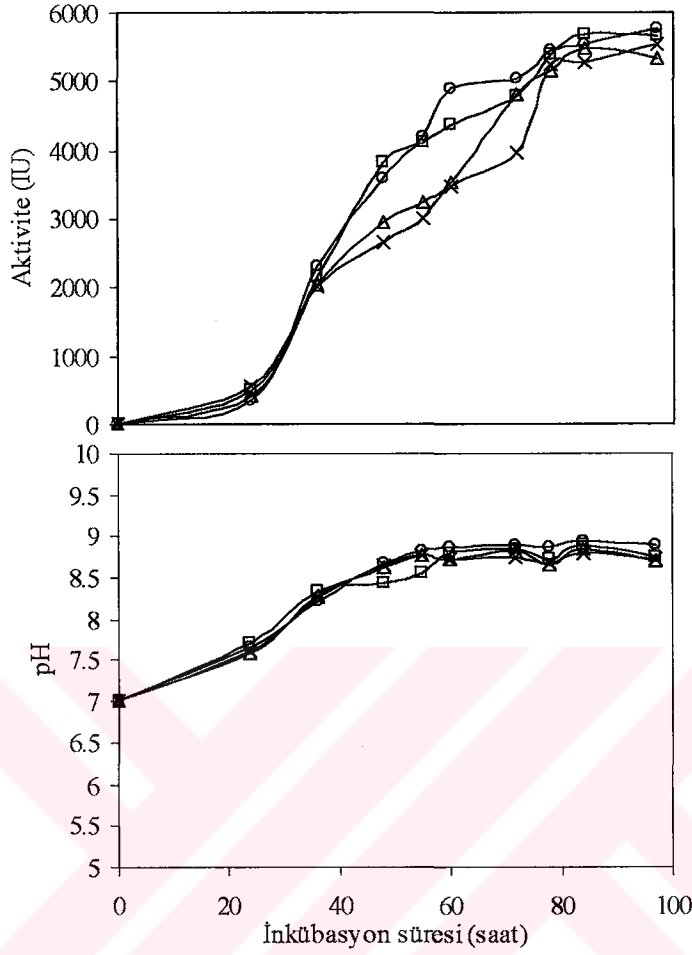
Farklı konsantrasyonlarda kullanılan (0, 0.5, 1, 2 g/l) magnezyum sülfatın enzim üretimine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.29.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ın enzim üretimi üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Sentetik ortamlarda yapılan deneylerde enzim üretimini değiştirirken, doğal ortamda hiçbir etkisinin olmaması mikroorganizmanın gelişmek ve enzim üretebilmek için ihtiyaç duyduğu elementleri kullanılan musluk suyundan ve doğal ortamın kendi bünyesinden karşıladığı düşünülmektedir.



Şekil 6.29. Farklı $MgSO_4$ konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 0 g/l , □ 0.5 g/l , Δ 1 g/l , x 2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/l YE, 25 g/l MK, 1 g/l KH_2PO_4 , -50 mesh, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

6.3.1.6. Ca^{++} Konsantrasyonunun Etkisi

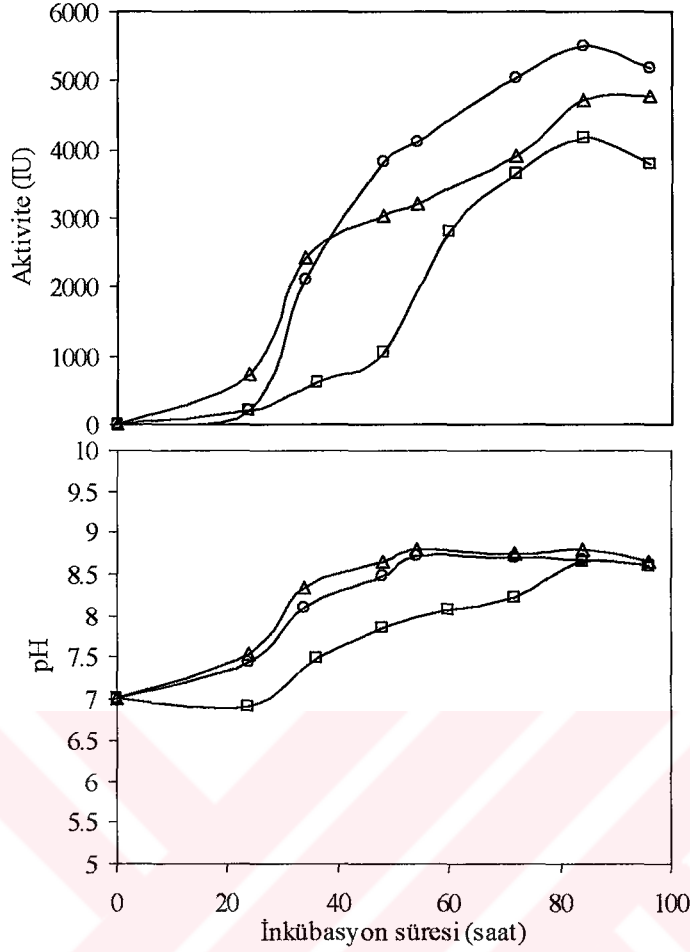
Farklı konsantrasyonlarda kullanılan (0, 0.1, 0.2, 0.4 g/l) Ca^{++} iyonunun enzim üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı deney sonuçları Şekil 6.30.'da verilmiştir. Bir metalo enzim olan α -amilazın aktivite gösterebilmesi için Ca^{++} iyonuna ihtiyaç duyduğu sentetik ortamların incelendiği deney sonuçlarında tartışılmıştı. Sentetik ortamda yapılan deneylerde enzim üretimi için gerekli olduğu belirtilmesine rağmen, mısır kepeği kullanılan deneylerde ortama eklenen kalsiyum iyonlarının enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Buradan, doğal substratların yapısında mevcut olan elementlerin mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu değerleri karşıladığı sonucu çıkarılabilir. Mısır kepeğinin ve musluk suyunun Ek 1.'de verilen spesifikasyonları mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu Ca^{++} iyonunun büyük bir kısmının musluk suyundan karşılandığını göstermektedir. Sentetik ortamda kullanılan distile suya göre ortam maliyetinin düşürme bakımından musluk suyu kullanımının avantaj sağlayacağı görülmektedir.



Şekil 6.30. Farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 0 g/l, □ 0.1 g/l, Δ 0.2 g/l, x 0.4 g/l Ca^{++} , 10 g/l YE, 25 g/l MK, 1 g/l KH_2PO_4 , -50 mesh, KH:150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

6.3.1.7. Çalkalama Hızının Etkisi

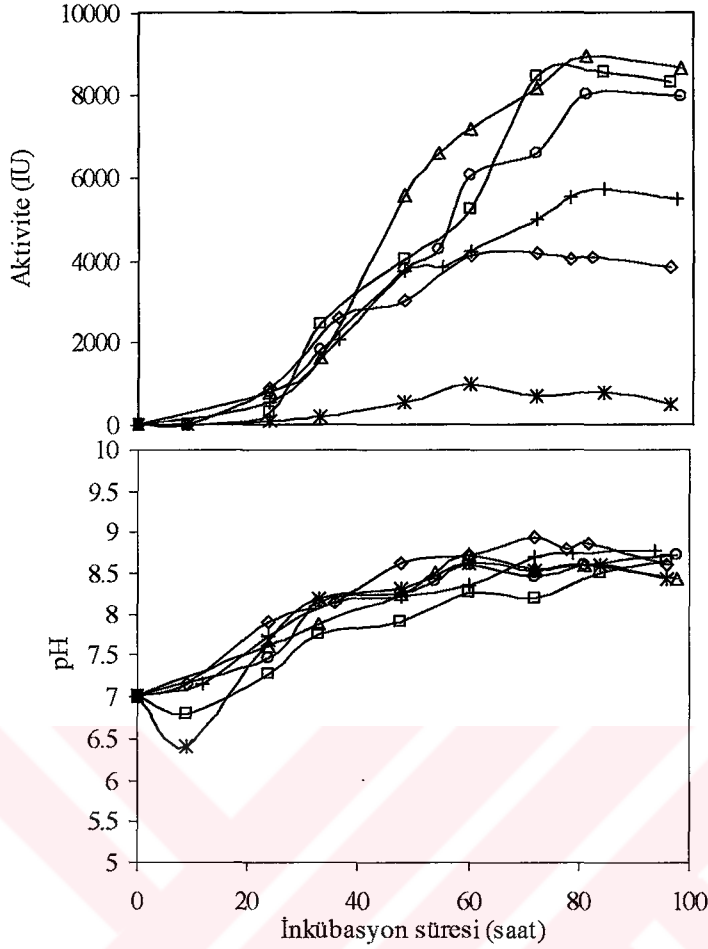
Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanında ortam şartlarının da etkin olduğu bilinmektedir. Sentetik ortama göre, doğal substratların kullanıldığı ortamlarda oksijen transferinin daha yavaş olduğu bilinmektedir. Oksijen transferini önemli oranda etkileyen çalkalama hızının incelendiği deney sonuçları Şekil 6.31.'de verilmiştir. 100 ve 200 rpm de yapılan deney sonucunda enzim üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, sentetik ortama göre daha viskoz olan doğal ortamda düşük karıştırma hızında oksijen transferi sınırlanmakta, yüksek karıştırma hızlarında ise mikroorganizmanın gelişmesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Düşük karıştırma hızında incelenen deneyde pH değerindeki değişimin daha yavaş olması, fermantasyonun oksijen sınırlandırmasından ve/veya katı substrata bağlı nutrijentlerin ortama yeterince geçememesinden kaynaklanabilir. Maksimum enzim üretiminin 150 rpm karıştırma hızında yapılan deneyde elde edilmiştir.



Şekil 6.31. Çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (□ 100 rpm, ○ 150 rpm, Δ 200 rpm, 10 g/l YE, 25 g/l MK, 1 g/l KH_2PO_4 , -50 mesh, T:37°C, pHb:7.0).

6.3.1.8. Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi

Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.32.'de verilmiştir. Bu amaçla altı farklı ortam sıcaklığında (25, 30, 33, 37, 40, 45 °C) deneyler yapılmıştır. KHF'unda sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın gelişebilmesi, enzim yada metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığıyla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Satyanara, 1995, Sodhi, 2005). 25, 30 ve 33 °C'de yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktiviteleri oldukça yakın olmalarına rağmen maksimum enzim üretimi 33 °C'de yapılan deneylerde elde edilmiştir. Ortam sıcaklığının 33 °C'den 37 °C'ye yükseltilmesiyle maksimum enzim üretiminde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Sıcaklığın 37 °C'den 45 °C ye çıkarılmasıyla ise enzim üretiminin yaklaşık % 90 azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca fermantasyon sıcaklığındaki bu azalma ortamın buharlaşma hızını düşürmesi açısından da avantaj sağlamaktadır. İncelenen parametreler içerisinde enzim üretiminin en fazla ortam sıcaklığıyla değiştiği belirlenmiştir.

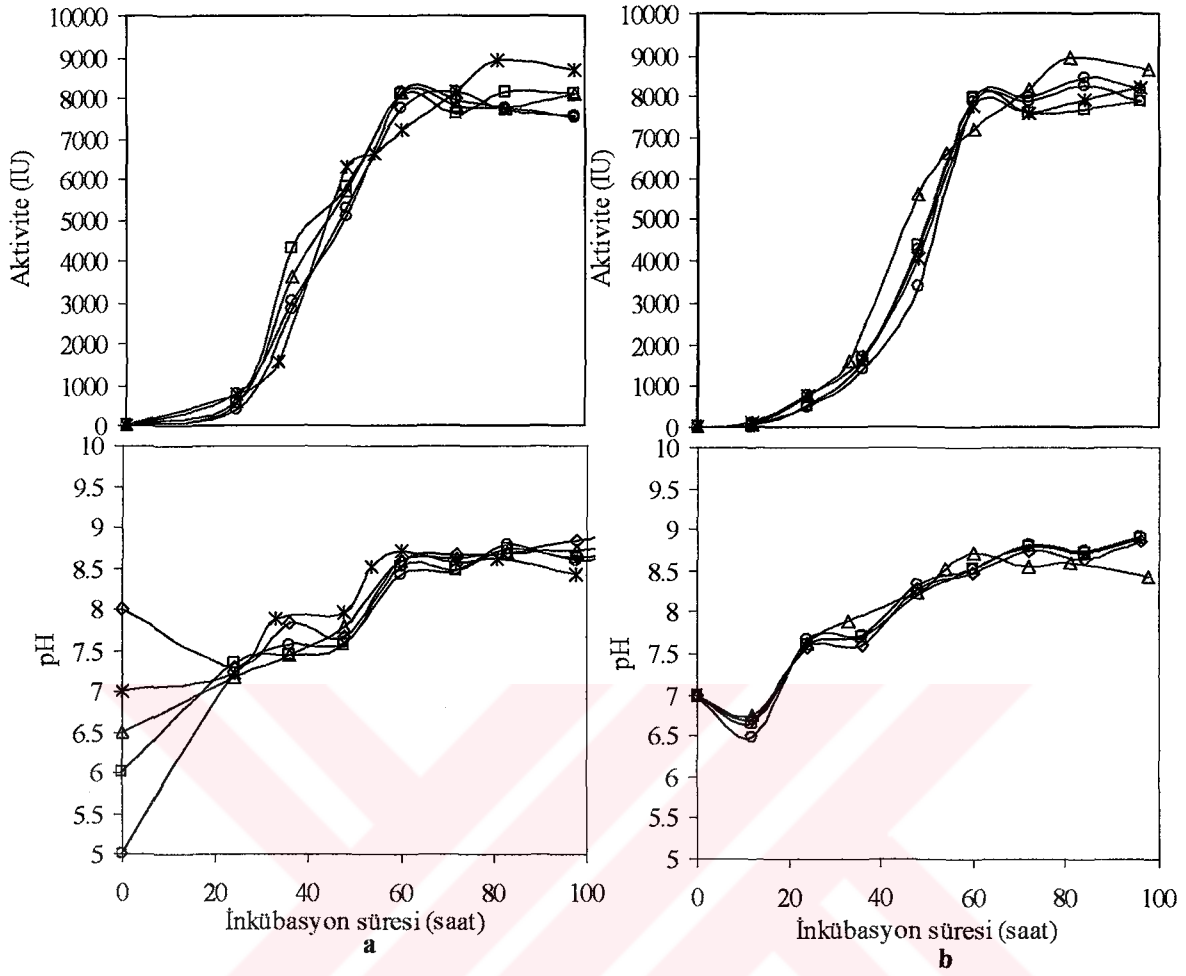


Şekil 6.32. Farklı ortam sıcaklıklarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi. (○ 25°C, □ 30 °C, Δ 33°C, + 37°C, ◇ 40 °C, * 45°C, 10 g/l YE, 25 g/l MK, 1 g/l KH₂PO₄, -50 mesh, KH:150 rpm, pHb:7.0).

6.3.1.9. Başlangıç pH'sı ve Ekim Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı başlangıç pH'larında (5, 6, 6.5, 7, 8) yapılan deney sonuçları Şekil 6.33.a.'da verilmiştir. Başlangıç pH'sının değişmesiyle enzim üretiminde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Ortam pH'sının kısa süre sonra tüm deneylerde aynı noktaya geldiği görülmüştür. pH'daki bu değişim başlangıçtan itibaren doğal substratın bünyesinde bulunan proteinlerin ortama salgılanmasıyla ve daha sonraki pH artışı ise mikroorganizmanın protein üretimi ile açıklanabilir.

Farklı ekim konsantrasyonlarında yapılan deney sonuçları Şekil 6.33.b.'de verilmiştir. Lag fazının oldukça uzun olduğu ve ekim konsantrasyonunun bu evreyi azaltmada pozitif bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Doğal ortamlarda enzim üretimi sentetik ortama göre çok daha yavaş gerçekleşmektedir. Mikroorganizmanın besiyerinde glikoz, nişasta gibi nütriyentleri doğal substratlara göre daha hızlı metabolize etmesi sonucu bu beklenen bir sonuçtur. Katı substratın ortama geçmesi, bu substratları mikroorganizmanın kullanacak forma getirmesi gibi ara kademeler sonucu ortamdaki enzim aktivitesi daha geç belirlenebilmiştir.



Şekil 6.33.a. Farklı başlangıç pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 5, □ 6, Δ 6.5, * 7, ◇ 8, 10 g/l YE, 25 g/l MK, 1 g/l KH_2PO_4 , -50 mesh, T:33°C).

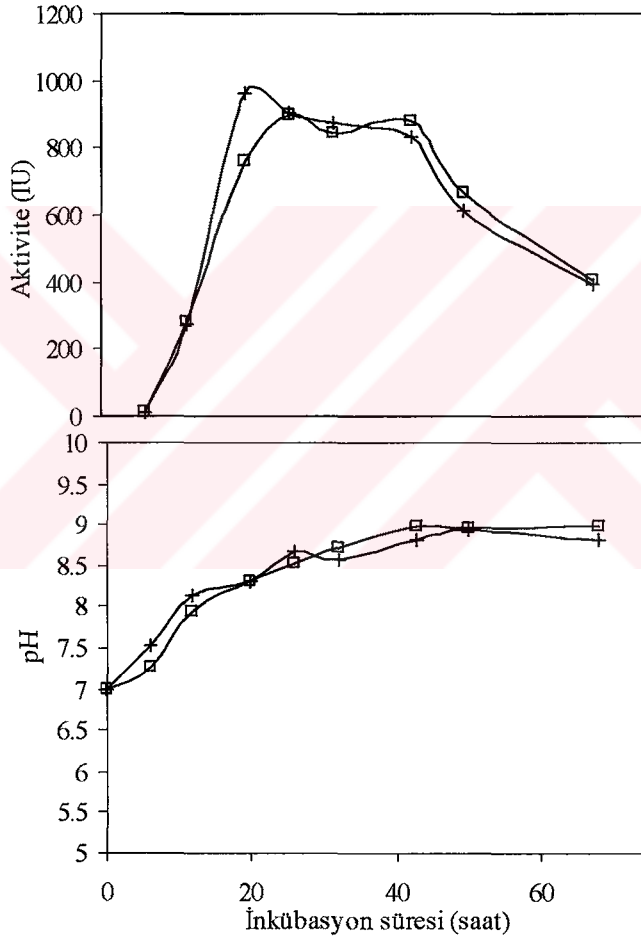
b. Farklı mikroorganizma ekim konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 0.1 ml, □ 0.25 ml, Δ 0.5 ml, x 1ml, ◇ 2 ml, 10 g/l YE, 25 g/l MK, 1 g/l KH_2PO_4 , -50 mesh, T:37°C, pHb:7.0).

Mısır kepeği ile yapılan deney sonucunda maksimum enzim üretimi 10 g/l yeast ekstrakt, 25 g/l mısır kepeği, 1 g/l KH_2PO_4 içeren fermantasyon ortamında elde edilmiştir. Fermantasyon ortamının optimizasyonunda ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerinde önemli etkisinin olduğu belirlenmiştir. Başlangıç pH'sı ve ekim konsantrasyonunun α -amilaz üretimi üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. Mısır kepeğinin kullanıldığı ortamda sentetik ortama göre α -amilaz üretiminin çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu doğal ortamda bulunan ve α -amilaz sentezini indükleyen amino asit, mineral veya vitamin gibi maddelerden kaynaklanabilir. Enzim üretimindeki bu artış doğal substratların immobilizasyon materyali gibi davranması sonucu da oluşabilir (Baysal, 2003). Bununla birlikte, mikroorganizma substratı sentetik ortamda kullandığı kadar kolay kullanamadığından maksimum enzim üretimi için gerekli süre uzamıştır.

6.3.2. Mısır Proteininin Substrat Olarak Kullanıldığı Deneyler

6.3.2.1. Tanecik Boyutunun Etkisi

Farklı boyutlarda mısır proteini kullanılarak yapılan deney sonuçları Şekil 6.34.'de verilmiştir. Mısır kepeği ile yapılan deneylere benzer olarak mısır proteininde de substrat boyutu enzim üretimi değiştirmemektedir. α -Amilaz üretiminin incelendiği daha sonraki deneyler -50 mesh boyutundaki substratlar kullanılarak yapılmıştır.

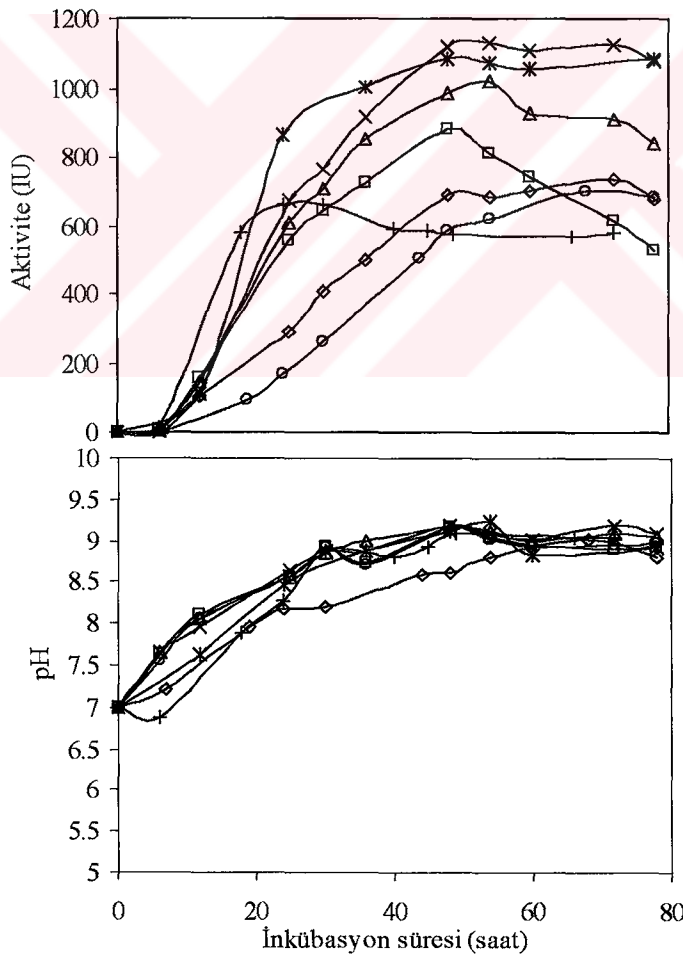


Şekil 6. 34. Tanecik boyutunun enzim aktivitesi üzerine etkisi. (+ -50, □ -100 mesh mısır proteini, 10 g/l MP, 2.5 g/l pepton, 1 g/l YE, KH: 150 rpm T:37°C, pHb:7.0).

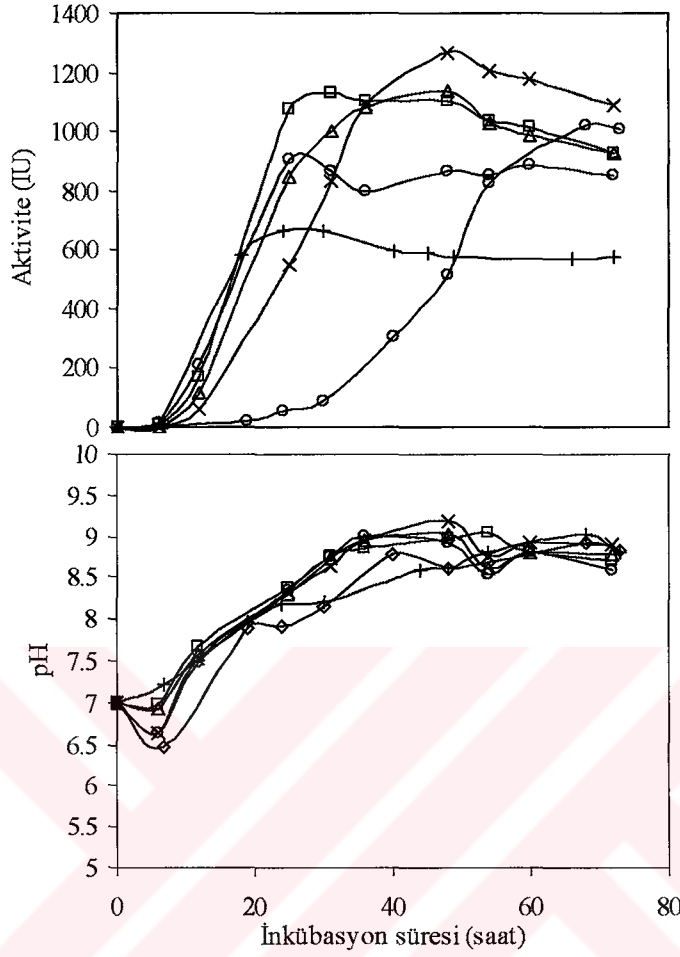
6.3.2.2. Azot Kaynaklarının Etkisi

Doğal substrat olarak 10 g/l mısır proteini içeren fermantasyon ortamına farklı konsantrasyonlarda (1, 2.5, 5, 10, 15, 30 g/l) pepton eklenen deney sonuçları Şekil 6.35.'de verilmiştir. Mısır kepeği kullanılan ortamda olduğu gibi mısır proteini kullanılan ortamda da düşük pepton konsantrasyonlarında enzim üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Pepton konsantrasyonunun 10-15 g/l değerine kadar enzim üretiminde bir artış gözlenirken, 30 g/l pepton içeren ortamda enzim üretiminde düşüş gözlenmiştir. Maksimum enzim üretimi 10 g/l pepton içeren ortamda elde edilmiştir. Mısır proteini ile yapılan deneylerde pepton konsantrasyonuyla meydana gelen enzim üretimindeki artışın, mısır kepeğine göre daha düşük olduğu görülmüştür.

Mısır proteini kullanılan fermantasyon ortamına farklı konsantrasyonlardaki (1, 2.5, 5, 10, 30 g/l) yeast ekstrakt etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.36.'da verilmiştir.



Şekil 6.35. Pepton konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi. (+ 0 g/l, $\diamond$ 1 g/l, $\square$ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, $\times$ 10 g/l, $*$ 15 g/l, $\circ$ 30 g/l Pepton, 10 g/l MP, -50 mesh, KH: 150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).



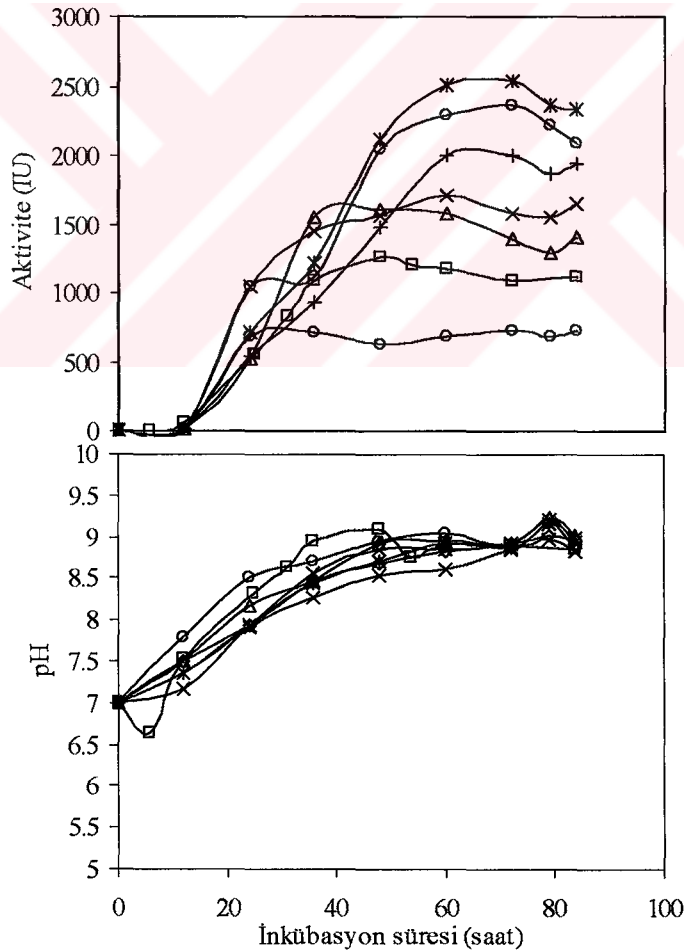
Şekil 6.36. Yeast ekstrakt konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi. (+ 0 g/l, o 1 g/l, □ 2.5 g/l, Δ 5 g/l, x 10 g/l, ◇ 30 g/l yeast ekstrakt, 10 g/l MP, -50 mesh, KH: 150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

Sentetik ortamda yapılan deneylere benzer olarak mısır proteini kullanılan deneylerde de düşük konsantrasyonda yeast ekstrakt'ın enzim üretimi için yetersiz olduğu görülmüştür. Ancak bu değişim sentetik ortama göre daha az olmuştur. Bu da kompleks bir substrat olan mısır proteinin içerisinde bulunan azot kaynaklarından dolayı olabilir. Maksimum enzim üretimi 10 g/l konsantrasyonunda yeast ekstrakt kullanılan ortamda elde edilmiştir. 30 g/l konsantrasyonunda yeast ekstrakt kullanılan fermantasyon ortamında enzim üretiminin ve ortam pH'sının düşük olduğu görülmüştür. 5 g/l yeast ekstrakt konsantrasyona kadar mısır proteini kullanılan deneylerde maksimum enzim aktivitesi mısır kepeği kullanılan deneylere göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu sonuç mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu azotun bir miktarının proteinin yapısında mevcut olduğunu göstermektedir. Yüksek konsantrasyonlarda her iki substrat içinde maksimum enzim aktivitelerinin çok yakın olması bu azot

konsantrasyonlarının mikroorganizmaların tüm ihtiyacını, ikincil bir kaynak olmaksızın karşılayabileceğini göstermektedir. Mısır proteini yapısında bulunan yüksek protein içeriğinin (% 60 kuru madde) ve proteinde içerisinde bulunan amino asitlerin, vitaminlerin veya iyonların daha fazla seviyede enzim üretimini artıramadığını göstermektedir. Querol'un (1992) amino asitlerin α -amilaz sentezi üzerine etkisini incelediği çalışmasında, amino asitlerin yalnız başına enzim üretim hızını az miktarda stimüle ettiğini ve bazı amino asitlerin (sistein, triptofan) bakteri üremesini engellediğini belirtmiştir. Sentetik ortam dikkate alındığında doğal substratların yapısında bulunan bazı maddelerin sitimulatör etkisinin olduğu veya bu substratların immobilizasyon destek materyali olarak davranması sonucu enzim üretimini önemli miktarda artırdığı belirlenmiştir (Baysal, 2003).

6.3.2.3. Mısır Proteini Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı mısır proteini konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 g/l) enzim üretimine olan etkisinin incelendiği deney sonucu Şekil 6.37.'de verilmiştir.

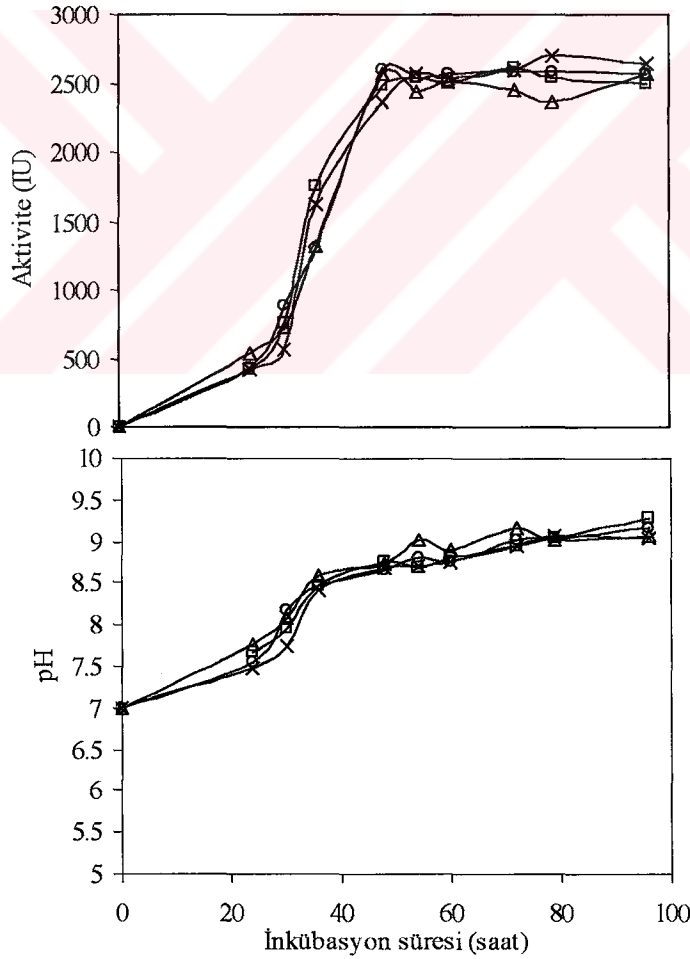


Şekil 6.37. Mısır proteini konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi. (○ 5 g/l, □ 10 g/l, △ 15 g/l, x 20 g/l, ◇ 25 g/l, * 30 g/l, + 40 g/l Mısır proteini, 10 g/l YE, 50 mesh, KH: 150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

Şekilden de görüldüğü gibi enzim üretimi 30 g/l mısır proteini konsantrasyonuna kadar artarken, daha yüksek protein içeren ortamlarda düştüğü gözlenmiştir. Hem mısır kepeği hem de mısır proteini kullanılan ortamlarda yüksek substrat konsantrasyonlarında gözlenen bu düşüş, bakterilerin ihtiyaç duyduğu serbest su miktarının ortamda kullanılan substrat konsantrasyonunun artmasıyla azalmasıyla açıklanabilir. Düşük substrat konsantrasyonları ise enzim üretimi ve mikroorganizmanın gelişmesi için yetersiz kalmaktadır. Mısır proteini konsantrasyonu 10 g/l den 30 g/l'ye çıkarıldığında, enzim üretiminde yaklaşık olarak 2 katlık bir artış belirlenmiştir. Maksimum enzim üretimi 30 g/l mısır proteini kullanılan ortamda elde edilmiş ve daha sonra yapılan deneylerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.

6.3.2.4. Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

KH_2PO_4 'ın enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.38.'de verilmiştir.

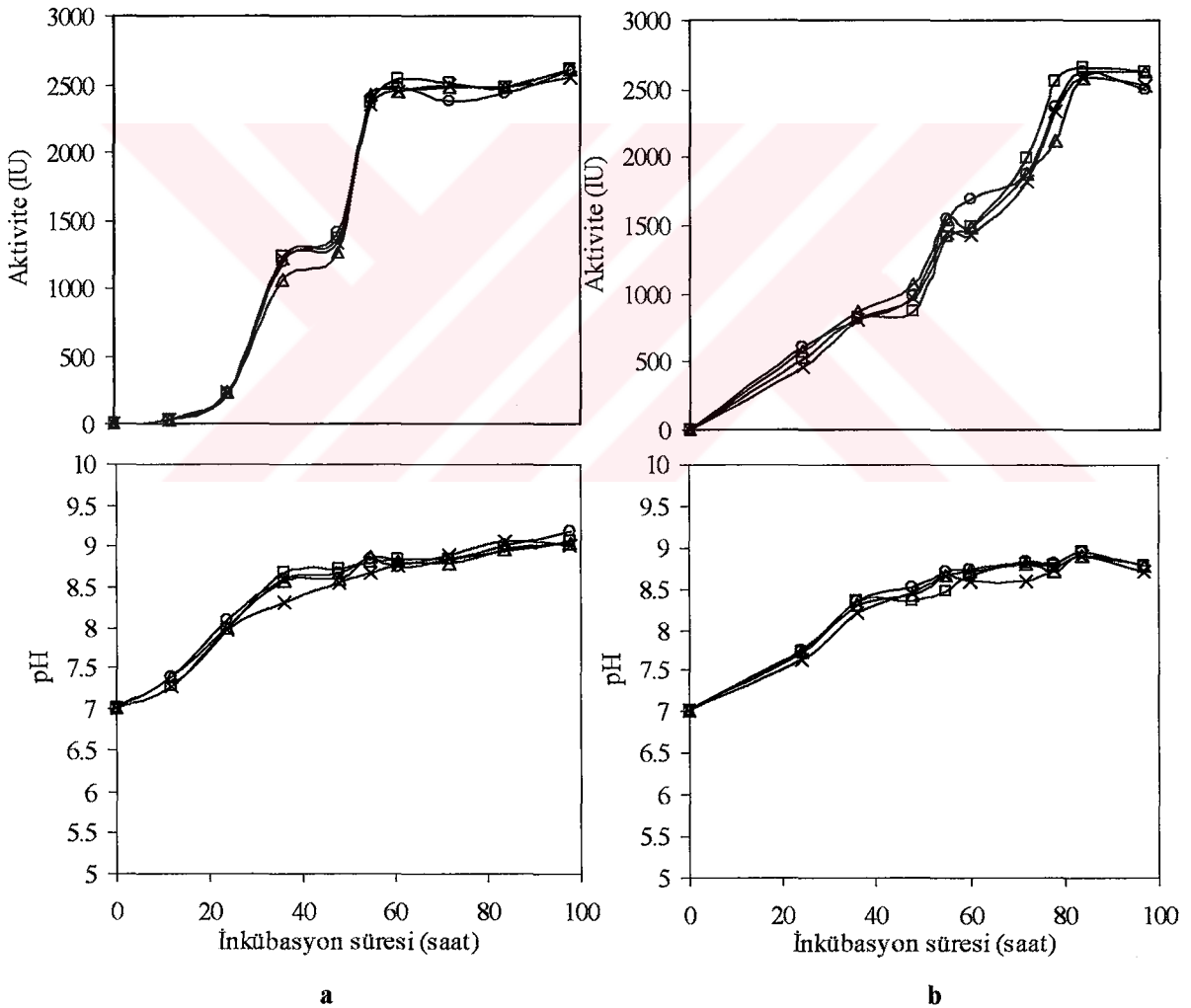


Şekil 6. 38. Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi. (x 2 g/l, o 0.5 g/l, □ 1 g/l, Δ 0 g/l KH_2PO_4 , 10 g/l YE, 30 g/l MP, 50 mesh, KH: 150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

Şekilden de görüldüğü gibi KH_2PO_4 'ın maksimum enzim üretimi üzerine önemli bir etkisi yoktur. Sentetik ortamda yapılan deneylerde mikroorganizmanın gelişmesi ve daha fazla enzim üretebilmesi için ihtiyaç duyduğu fosfatın karşılandığı düşünülmektedir. Mısır kepeğinin substrat olarak kullanıldığı deneylerde maksimum enzim üretimi için 1 g/l KH_2PO_4 ihtiyaç duyulurken mısır proteini kullanılan ortamda fosfatın enzim üretimine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu da mısır proteininin içeriğinden kaynaklanabilir.

6.3.2.5. MgSO_4 ve Ca^{++} Konsantrasyonunun Etkisi

MgSO_4 ve CaCl_2 'ün enzim üretimine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.39.a. ve b.'de verilmiştir. Ortama ilave edilen MgSO_4 ve CaCl_2 'ün enzim üretimi üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Enzim üretimi için gerekli olan bu elementlerin musluk suyundan ve mısır proteininden ortama girdiği düşünülmektedir.

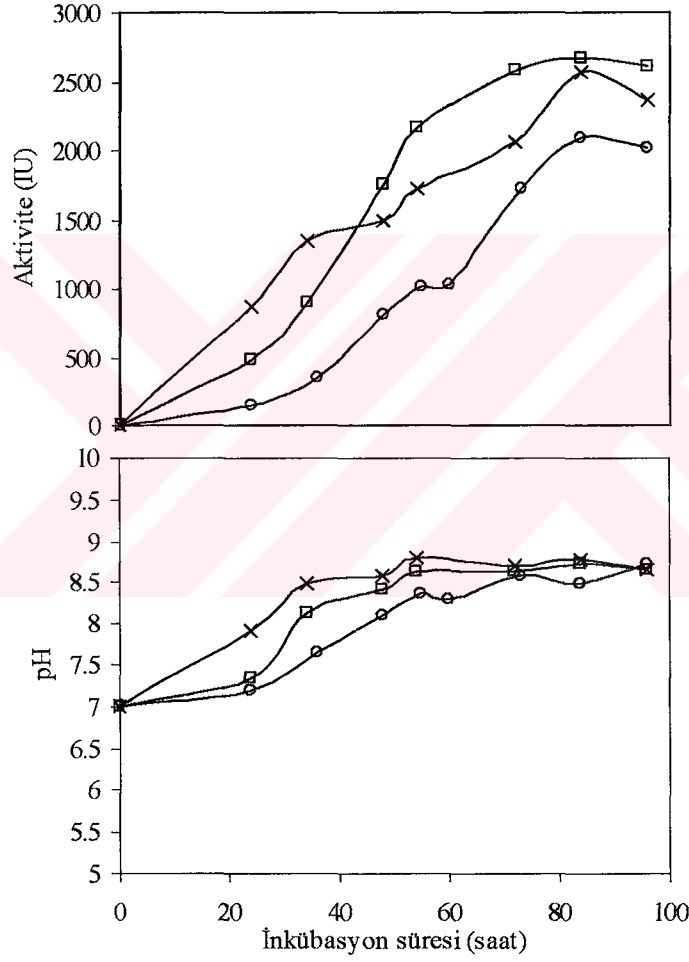


Şekil 6. 39.a. Farklı MgSO_4 konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 0 g/l, □ 1 g/l, Δ 2 g/l, x 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l YE, 30 g/l MP, 50 mesh, KH: 150 rpm, T:37°C, pHb:7.0).

b. Farklı konsantrasyonlarda $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'un enzim aktivitesi üzerine etkisi (o 0 g/l, □ 0.5 g/l, Δ 0.2 g/l, x 0.4 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

6.3.2.6. Karıştırma Hızının Etkisi

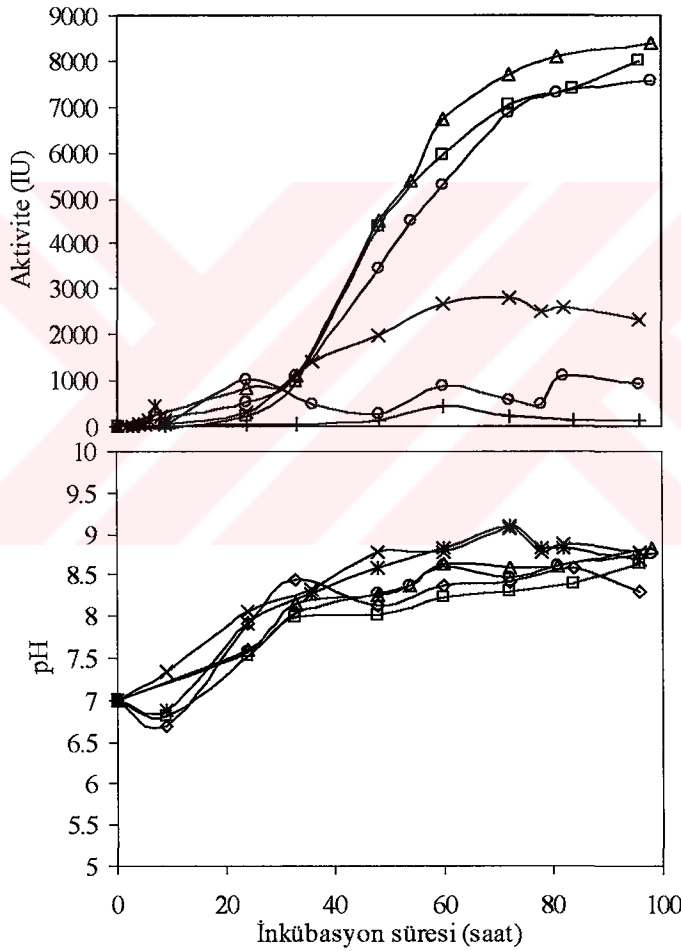
Karıştırma hızının enzim üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı deney sonuçları Şekil 6.40.'da verilmiştir. Mısır kepeği kullanılan deneylerde olduğu gibi maksimum enzim üretimi 150 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. 100 rpm karıştırma hızında enzim üretiminin daha düşük olduğu görülmüştür. Düşük karıştırma hızında enzim üretimindeki bu azalma, viskoz doğal ortamın tamamında mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu oksijeni ve nütriyentleri yeterli bir şekilde karşılanamamasından kaynaklanabilir.



Şekil 6.40. Farklı çalkalama hızlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 100 rpm, □ 150 rpm, x 200 rpm, 10 g/l YE, 30 g/l MP, 50 mesh, T:37°C, pHb:7.0).

6.3.2.7. Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi

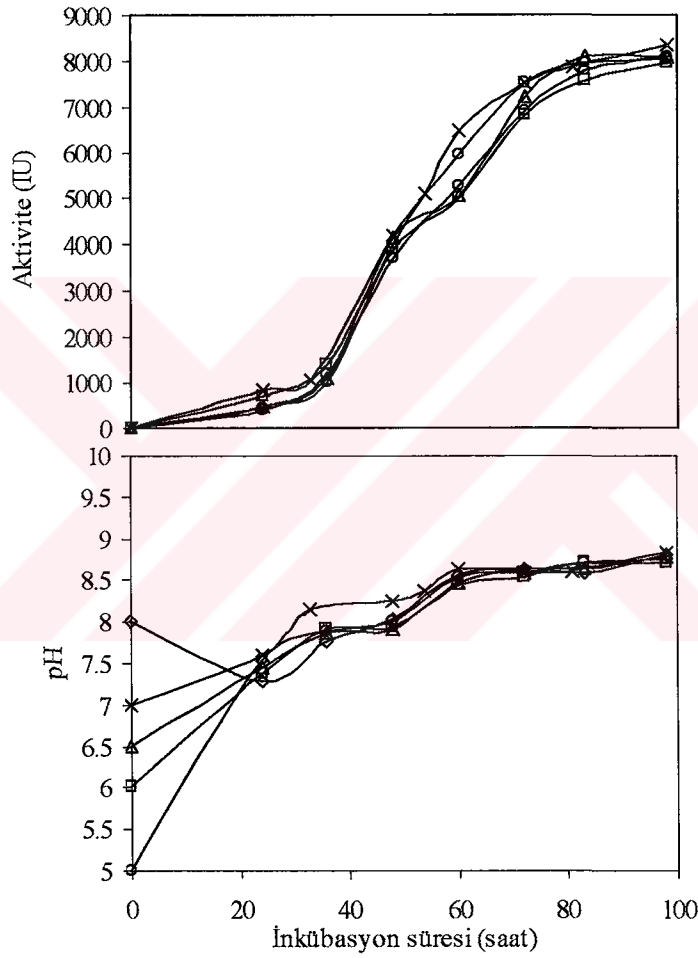
Fermantasyon sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.41.'de verilmiştir. Mısır proteiniyle elde edilen deney sonuçların mısır kepeği ile elde edilen sonuçlarla uyum içinde olduğu görülmektedir. Benzer şekilde düşük sıcaklıklarda (25, 30, 33 °C) yapılan fermantasyonlarda elde edilen enzim üretiminin daha fazla olduğu görülmüştür. Maksimum enzim üretimi 33 °C'de yapılan deneyde elde edilmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda, sıcaklık artışına paralel olarak enzim üretiminde düşüş gözlenmiştir. Mısır kepeğinde olduğu gibi, ortam sıcaklığı enzim üretimini en fazla etkileyen parametre olarak gözlenmiştir.



Şekil 6.41. Farklı ortam sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 25 °C, □ 30 °C, Δ 33 °C, x 37 °C, ◇ 40 °C, + 45 °C, 10 g/l YE, 30 g/l MP, 50 mesh, KH: 150 rpm, pHb:7.0).

6.3.2.8. Başlangıç pH'sının Etkisi

α -Amilaz üretimi üzerine fermentasyon ortamı başlangıç pH'sının incelendiği deney sonuçları Şekil 6.42.'de verilmiştir. Başlangıç pH'sının değişmesinin enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı şekilden görülmektedir. Ortam pH'sının ilk ölçümden itibaren değerlerin birbirine yaklaştığı görülmektedir. Enzim üretimin maksimuma ulaştığı anlarda ortam pH'sının aynı olduğu görülmüştür.

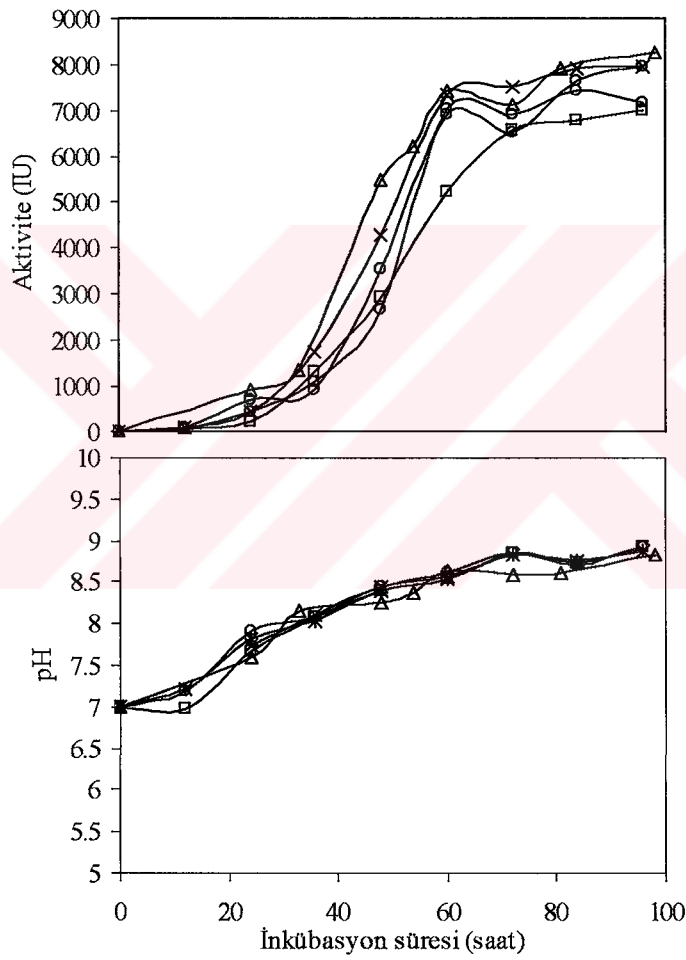


Şekil 6.42. Farklı başlangıç pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 5, □ 6, Δ 6.5, x 7, ◇ 8, 10 g/l YE, 30 g/l MP, 50 mesh, KH: 150 rpm, T:33°C).

6.3.2.9. Ekim konsantrasyonunun Etkisi

Ekim konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.43.'te verilmiştir. Ekim konsantrasyonunun mikroorganizmaların lag fazını değiştireceği ve böylece enzim üretiminin daha erken olması beklenirken, enzim üretimi üzerine bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Mısır proteiniyle yapılan deneyler sonucunda, maksimum enzim üretimi karıştırma hızının 150 rpm, ortam sıcaklığının 33 °C olduğu ve 30 g/l mısır proteini ile 10 g/l yeast ekstrakt içeren fermantasyon ortamında elde edilmiştir.



Şekil 6.43. Farklı ekim konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi. (o 0.1 ml, □ 0.25 ml, Δ 0.5 ml, x 1ml, ◇ 2 ml, 10 g/l YE, 30 g/l MP, 50 mesh, KH: 150 rpm, T:33°C, pHb:7.0).

7. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

α -Amilaz üretimi çalışmalarında aşağıdaki genel sonuçlar elde edilmiştir:

1. Sentetik ortamda yapılan deneylerde karbon kaynağı olarak glikoz veya nişastanın kullanılmasının enzim üretimini çok fazla değiştirmedeği görülmüştür. Ancak bu iki substratın birlikte kullanıldığı ortamlarda ve yüksek glikoz konsantrasyonlarında glikoz etkisinin olduğu belirlenmiştir.
2. Gliserinin, *B. subtilis* ile yapılan deneylerde enzim üretimini artırırken *B.amyloliquefaciens* ile yapılan deneylerde enzim üretimini önemli oranda azalttığı belirlenmiştir.
3. Her iki mikroorganizmanın da inorganik azot kaynaklarını kullanmadığı, organik azot kaynaklarında enzim üretiminin arttığı belirlenmiştir.
4. Sentetik ortamlarda enzimin üretiminde Ca^{++} iyonunun önemli rol oynadığı, denenen her iki mikroorganizmada da enzim üretimini artırdığı belirlenmiştir.
5. *B.amyloliquefaciens* ile yapılan deneylerde, magnezyum ve fosfatın iyonlarının mikroorganizmanın gelişebilmesi ve enzim üretebilmesi için gerekli olduğu ve enzim üretimini artırdığı görülmüştür. Mangan, demir gibi eser elementlerin enzim üretimine bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.
6. *B.subtilis* ile yapılan deneylerde NaCl'in bulunmasının enzim salgılanmasını artırdığı görülmüştür.
7. İlave azot kaynaklarının bulunmadığı deneylerde, mısır proteini ile elde edilen α -amilaz üretimi mısır ve buğday kepeği kullanılan deneylerde elde edilen enzim üretimine göre çok daha yüksek olmuştur.
8. Mısır ve buğday kepeğinin kullanıldığı deneylerde ortama azot kaynağının ilavesi enzim üretimini yaklaşık 8 kat artırırken mısır proteini kullanılan ortamda 1.5 kat artırmıştır. Enzim üretimindeki maksimum artış 10 g/l konsantrasyonunda yeast ekstrakt ilavesinde elde edilmiştir.

9. İz elementlerin doğal ortamlarda enzim üretiminde önemli bir etkiye sahip olamaması, bu elementlerin kullanılan doğal substratların yapısında bulunması ile açıklanabilir. Sentetik ortamlarda enzim üretimi ve mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli olan bu elementlere doğal ortamda ihtiyaç duyulmaması ortam maliyetinin azaltılması bakımından önemlidir.
10. Fermantasyon sıcaklığının enzim üretimini değiştiren en önemli parametrelerden biri olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sıcaklığının 37 °C'den 33 °C ye düşürülmesi ile maksimum enzim üretiminde önemli bir artış belirlenmiştir.
11. Doğal ortamda elde edilen enzim üretimi sentetik ortama göre daha yüksek olmuştur. Mısır proteinin ve mısır kepeğinin endüstriyel α -amilaz üretiminde etkin bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.
12. Doğal ortamlarda enzim üretiminin sentetik ortama göre çok daha yavaş olduğu görülmüştür. Mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu oksijenin ve nutrienlerin sentetik ortama göre daha yavaş şekilde karşılanmasından kaynaklandığı görülmüştür.

Öneriler ise şöyle sıralanabilir:

1. Doğal ortamlarda α -amilaz üretimi karıştırılmalı biyoreaktörlerde incelenebilir. Aşırı köpük oluşumundan dolayı bu çalışmada biyoreaktör deneyleri yapılamamıştır. Farklı reaktör sistemleri kullanılarak enzim üretimi artırılırken fermantasyon süresi kısaltılabilir.
2. Doğal ortamlarda elde edilen yüksek enzim üretimi bu substratların yapısında bulunan amino asitler, vitaminler veya minerallerden kaynaklanabilir. Sentetik ortamda yapılan deneylerle enzim üretimindeki bu artışa hangi maddelerin neden olduğu incelenebilir.
3. Daha sonraki yapılacak çalışmalarda enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu incelenebilir.

8. KAYNAKLAR

Andersson, E., Hahn-Hagerdal, B., 1988, High concentration of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force α -amylase production with *Bacillus amyloliquefaciens* in aqueous two-phase systems and PEG solution, Appl. Microb. And Biotech., 29,329-336.

Andersson, E., Johanson, A., C., Hahn Högerdal B., 1985, Alpha amylase production in aqueous two phase systems with *Bacillus subtilis*, Enzyme and Microb. Technology,7, 333-338.

Abate M.A., Castro G.R. Sineriz F., Callieri D.A.S., 1999, 'Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*', Biotechnology Letters, 21, 249-252.

Alam, S.; Hong, J. and Weigand, W. A. ,1989, Effect of yeast extract on α -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. Biotechnol. Bioeng., 33, 780-785.

Arslan, N., 1999, Gıda Kimyasına Giriş, Çağ Ofset , Elazığ.

Atlas 1994 Atlas R.M. 1994, Microorganisms in our World, Mosby, pp724-726.

Bajpai, P., Bajpai, P., 1989, High-temperature alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13, Biotechnol. Bioeng., 33, 72-78.

Babu K.R., Satyanara T., 1995, " α -amylase Production by Thermophilic *Bacillus coagulans* in Solid State Fermentatio", Process Biochemistry, 30,4,305-309.

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.

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

Baysal, Z., Uyar, F., Aytekin Ç., 2003, Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water, Process Biochemistry, 38 , 1665- 1668.

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

Bilgehan, H., 1987, Klinik Mikrobiyoloji, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, Bornova, İzmir, 331.

Borgia, P.T., Campell, L.L., 1978, Alpha amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens* evidence for identical primary structure, J. Bacteriology, 113, 526-528.

Buchanan and Gibbons, 1974, Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (eds.) 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.

Bulut, Ş., 2001, “*Rhizopus Oryzae*’den Laktik Asit Üretimi”, F. Ü. Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, 17-22, Elazığ.

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

Coleman, G., Elliot, W.H., 1962, Studies on alpha-amylase formation by *Bacillus subtilis*, Biochem. Journal, 83, 256-263.

Coşkun, B., Şeker, E., İnal, F., 2003, Yemler ve Teknolojisi, Selçuk Üniv., Konya.

Dercova, K., Augustin, J., Karajcova D., 1992, Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*, Folia Microbiol, 37, 17-23.

Dey G., Mitra A., Banerjee R., Maiti B., R., 2001, Enhanced production of alpha amylase by optimization of nutritional constituent using response surface methodology, Biochemical eng. J., 7, 221-231.

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

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

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

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

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

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

Fogarty, W. M. and Kelly, C. T. (1990) in *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2nd edn., pp. 71–132, Elsevier Science Publishers, London.

Frost M.G., Moss, D.A., 1987, *Production of Enzymes by Fermentation*, John&E. Sturge Lim. North Yorkshire, England.

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

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

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

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

Gron, S., Morcel, C., Emborg, C. and Biedermann, K., 1995, Cell recycling studies for α -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 14, 23–31.

Haq, İ., Ashraf, H., Iqbal J., Qadeer M.,A, 2003, 'Production of alfa amylase by *Bacillus licheniformis* using economical medium', Biosource Tech., 87, 57-61.

Hamilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M., 1999, 'Production and properties of the raw starch digesting α -amylase of *Bacillus sp.* IMD 435', Process Biochemistry, 35, 27-31.

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

Hidaka, H., Adachi T., 1980, Mechanism of saccharide polymerization and depolymerization, Academic press, New york, 101.

Hillier, P., Wase, D. A. J., Emery, A. N. and Solomon, G. L.,1997, Instability of α -amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss, Process Biochem. 32, 51-59.

Hoşrik ,E.V., 1981, Alfa amilaz enziminin *Bacillus subtilis*'den saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, Hacettepe Üniv. Doktora Tezi, ANKARA.

Imai, Y, Suzuki, M, Masoto, M., Nagayasu K., 1993, Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a new kind fermentor with a rotary draft tube, j. Ferment Bioengineering, 76, 459-464.

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

Jensen, B. and Olsen, J. ,1992, Physicochemical properties of a purified alpha-amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, Enz. Microb. Technol. 14, 112-116.

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

Jin, F., Li, Y., Zhang, C., Yu, H., 2001, Thermostable α -amylase and α -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus sp.* JF strain, Process Biochemistry, 36, 559 - 564.

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

Kennedy, M., Krouse D., 1999, "Strategies for improving fermentation medium performance", *J. Industrial Microbiology*, 23, 456-475.

Kochhar, S., Dua R.D., 1990, Thermostable liquefying α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*, *Biotechnology Lett.* 12, 393-396.

Kole M. M., Draper I., Gerson D.F., "Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations", *Appl Microbial Biotechnol*, 1988, 28, 404-408.

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

Krishna C., 1999, "Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana waste", *Biosource Tech.*, 69,231-239.

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

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

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

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

Machinus, M., Wiegand G., Huber R., J., 1995, Crystal Structure of Calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å Resolution, *Journal of Molecular Biology*, 543-545.

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

Meddan S., Chandra, A.K., 1980 New starins of *Bacillus lichenisformis* and *Bacillus coagulans* production thermostable α -amylase Active at alkaline pH, J.Appl. Bacteriology, 48, 47-58.

Melasnimi H., 1987, "Effect of Carbon Source on Production of Thermostable α -amylases Pullulanase and α -Glucosidase thermohydrosulfuricum", Journal of General Microbiology, 133, 883-890.

Milner, J. A., Martin, J. D. and Smith, A., 1997, Two-stage inocula for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*, Enz. Microb. Technol. 21, 382-386.

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.

Morcel, C. and Biedermann, K., 1994, Coupling of fermentation and microfiltration for α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*, FEMS Microbiol. Rev. 14, 57-61.

Morgan F.J., Priest F.G., 1981, Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus lichenisformis* NCIB 6346, Journal of Applied Bacteriology, 50, 107-114.

Morkeberg, R., Carlsen, M., Nielsen, J., 1995, Induction and repression of α -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*, Microbiology, 141, 2449-2454.

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

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

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

Palit,S., Banerjee R., 2001, Optimization of Extraction Parameters for Recovery of α -amylase from fermented Bran of *Bacillus circulans* GFS313, Brazilian Archives of Biology and Technology, 44,1,107-111.

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

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

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

Pimpa W., 2003, Potential Aplication of Wastewater From Rice Noodle Manufacture in α -Amylase Production, Suranare J. Science Technology, 11, 151-157.

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

Prudende K.W., Katz, A., Sugrue, J.A., Thomson, A., 1989, The effect of glucose on the expression of acloned *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase gene in strains *Bacillus subtilis* , Current Microbiology, 18,27-31.

Querol, E., Parrilla,A., 1987, Tentative rules for increasing the thermostability of enzymes by protein engineering, Enzyme Microb. Technology, 9, 4, 238-244.

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

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

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

Ramesh B., Reddy P.,R.,M., Seennayya g., Reddy G., 2001, Effect of various flours on the production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Costridium thermosulfurogenes* SV2, *Biosource Technology* 76, 169-171.

Ramesh. M.V., Lonsane B.K., 1989, Solid state fermentantion for production of α -amylase by *Bacillus megaterium* 16M, *Biotechnology Letters*,11, 49.

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

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

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

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

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

Salva, T. J. G. and Moraes, I. O., 1995, “The effects of different carbon sources on α -amylase production”, *Rev. Microbiol.* 26,46–51.

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

Sarıkaya E., 1988 “*Bacillus subtilis* alfa Amilaz Üretiminin Değişik Ortamlarda İncelenmesi”, Hacettepe unv. Bilim uzmanlığı tezi, Ankara.

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

Semets, E.V, Glenn, A.R., May, B.K., Eliot, W.H., 1973, Accumulation of Messenger Ribonucleic Acid Specific for Extracellular Protease in *Bacillus subtilis* 168, Journal of Bacteriol, 25, 73-79.

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

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

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

Srivastana R.A.K., Baruah J.N., 1986, "Culture Conditions for Production of Thermostable Amylase by *Bacillus stearothermophilus*", Applied and Environmental Microbiology, 52,1,179-184.

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

Stein, E.A., Fischer, E.H., 1958, Resistance of α -Amylases to words proteolytic attack, J. Biological chemistry, 232, 867-879.

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

Tari, C., S.J. Parulekar, B.C. Stark, and D.A. Webster, 1998, "Synthesis and Excretion of Alpha-Amylase in vgb^+ and vgb^- Recombinant *Escherichia coli*: A Comparative Study," Biotechnol. Bioeng., 59, 673-678 .

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

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

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

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

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

Torrado, A., Gonzalez, P., Pintado, J., Montemayor, I., Miron, J. and Murado, M. (1994) Meded Fac. Landbouwwet Rijksuniv Gent 59, 4b, 2471–2473.

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

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

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

Ünsaçarer, M., 1998, Serbest Ve Tutuklanmış *Rhizopus arrhizus*'dan Lipaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Vale B.L., Stein E.A., Summerwell W.M., Fischer E.M., Metal content of α -amylases of various origins, J. Biol Chem , 1959, 231, 2901-2905.

Walker N.E., Campbell, L.L., 1963, Induction of α -amylase of *Bacillus stearothermophilus* by maltodextrins, J. Bacteriol., 86, 687-691.

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

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

Wu, W.,X., Mabinadji, J., Betrand T.F., 1999, Effect of growth culture conditions on production of an extracellular thermostable alpha-amylase from an isolate *Bacillus sp.*, Agric. Life science, 45, 404-408.

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

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

Yıldız, S., 1993, Değişik bakteri ve substratlar kullanılarak amilaz üretiminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Yoo Y.J., Cadman T.,W., Hong J., Hatch R.,T., 1987, "Kinetics of α -Amylase Synthesis from *Bacillus amyloliquefaciens*", Biotechnology and Bioengineering, 31,357-365.

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

www.biotimes.com

www.dyadic-group.com

www.enzkey.com

www.cargill.com.tr/ticari/fabrika_yem_u.html

www.bioproducts-bioenergy.gov/existsite/pdfs/drymill_ethanol_industry

www.novozymes.com/ar2000/default.asp?p=01-03

www.pnpi.com/Biofactories.htm

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



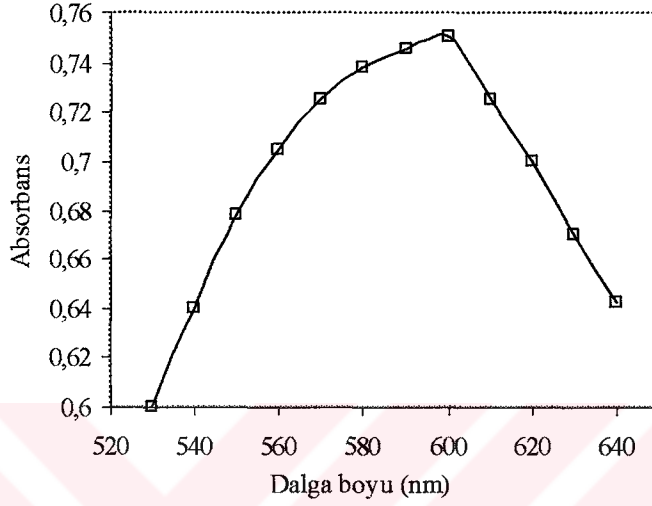
Ek.1.

Tablo E 1.1. Doğal substartların spesifikasyonları (Ergün vd., 2004, Coşkun vd., 2004).

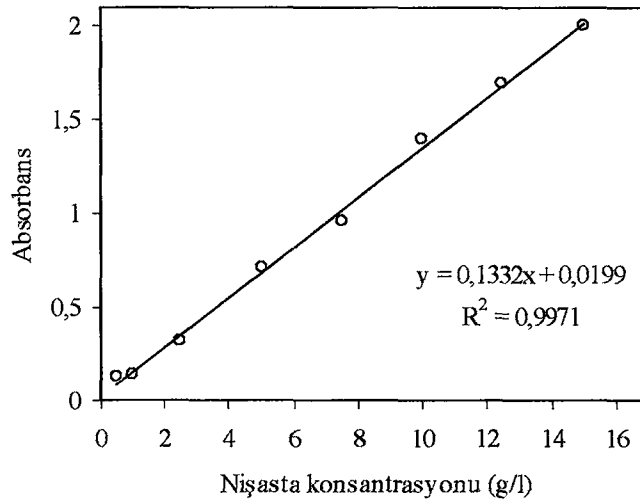
	Şeker Pancarı Melası	Şeker Pancarı küspesi	Ayçekirdeği Küspesi	Buğday kepeği	Mısır Kepeği	Mısır Pproteini (Gluten)
Nem	%22	%11.7	%7.8	%10.9	%13	%13
Protein(KM)	%8.5	%10	%28.4	%17.3	%22	%60
Yağ	%0.2	%1.1	%1.4	%4.3	%4 max	%3 max
Kül	%11.4	%7.3	%7.7	%6.3	%10	%4.5
Nişasta	-	-	-	-	%18	%15
Metabolik Enerji (ME)	2880 kcal/kg	2360 kcal/kg	2240 kcal/kg	2550 kcal/kg	3050 kcal/kg	3300 kcal/kg
MİNERAL İÇERİKLERİ						
Kalsiyum	% 0.1	% 0.13	% 0.48	% 0.17	% 0.05	% 0.07
Fosfor	% 0.03	% 1.18	% 1	% 0.29	% 1	% 0.2
Potasyum	% 6.06	% 1.32	% 1.5	% 0.33	% 1.5	% 10.23
Klor	-	% 0.16	% 0.12	% 0.69	% 0.5	% 0.08
Magnezyum	% 0.29	% 0.53	% 0.63	% 0.1	% 0.5	% 0.08
Kükürt	% 0.6	% 0.21	% 0.39	% 0.1	% 0.3	% 0.65
Sodyum	% 1.48	% 0.04	% 0.04	% 0.59	% 0.15	% 0.06
Demir	87 ppm	157 ppm	298 ppm	252 ppm	363 ppm	282 ppm
Çinko	18 ppm	85 ppm	88 ppm	80 ppm	250 ppm	31 ppm
Mangan			45 ppm	26 ppm	% 0.05	% 0.07
VİTAMİN İÇERİKLERİ						
Kolin	-		2900mg/kg	980 mg/kg	1540mg/kg	3584mg/kg
Niasin	-		220 mg/kg	321 mg/kg	72 mg/kg	61 mg/kg
Riboflavin	2.4mg/kg		3.1 mg/kg	3.1 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg
Tiamin			-	6 mg/kg	2 mg/kg	0.22 mg/kg
Biotin			-	110 mg/kg	0.34 mg/kg	0.18 mg/kg
Karoten			-	-	-	-
AMİNO ASİT İÇERİKLERİ (% protein)						
Arjinin	% 4.91	% 3.23	8.18	6.84	0.78	% 2.08
Histidin	% 1.59	% 2.54	2.6	2.82	0.61	1.4
izolöysin	% 4.44	% 3.18	4.09	3.15	2.2	10.23
Löysin	% 3.59	% 5.1	6.41	6.16	0.64	1.01
Lizin	% 1	% 4.35	3.56	4.05	0.64	1.01
Metiyonin	% 0.98	% 1.24	2.29	1.57	0.37	1.78
Treonin	% 1.57	% 3.38	3.72	3.26	0.78	2.2
Valin	% 3.36	% 4.7	4.95	4.5	3.36	4.7
Fenilalanin	%2.71	% 2.93	4.62	3.97	2.71	2.93

Ek.2.**Tablo E.2.1.** %5'lik nişasta çözeltisinin dalga boyu taraması.

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

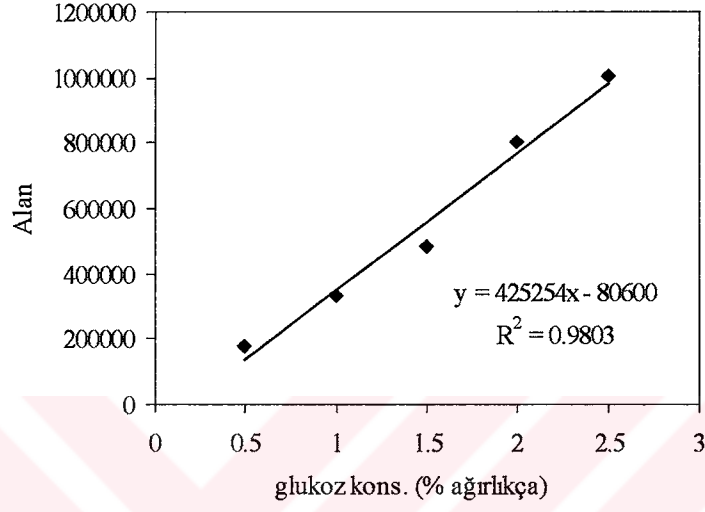
**Şekil.E2.1.** Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri.**Tablo E.2.2.** Nişasta çözeltisinin kalibrasyon verileri

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

**Şekil.E2.2.** 600 nm'de nişasta kalibrasyon grafiği.

Tablo E.2.3. Glikoz kalibrasyon verileri

Glikoz (%)	0.5	1	1.5	2	2.5
Abs. (600nm)	175001	327970	481655	799317	1002462

**Şekil.E2.3.** Glikoz kalibrasyon grafiği