T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İki Farklı Fermantasyon Tekniği ile *Aspergillus sclerotiorum*'dan Amilaz Üretimi ve Nişasta Hidrolizinde Kullanılması

ZEHRA YARKIN

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN

EDİRNE - 2007

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İki Farklı Fermantasyon Tekniği ile

***Aspergillus sclerotiorum*'dan**

Amilaz Üretimi ve Nişasta Hidrolizinde Kullanılması

ZEHRA YARKIN

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 01.05.2007 tarihinde aşağıdaki Jüri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin AKTAÇ

Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN

(Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Hülya YAĞAR

ÖZET

Bu çalışmada *Aspergillus sclerotiorum* α-amilazının SSF ve SmF'de optimum üretim şartları belirlenmiş ve nişasta hidrolizi çalışılmıştır.

SSF'de üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz aktivitesi için optimum üretim şartları araştırıldı. Optimum nem miktarı % 85, üretim süresi 6. gün, aşı miktarı 2 ml, substrat miktarı 5 gr, başlangıç pH'sı 5 olarak belirlendi.

SSF'deki katabolit represyon çalışmasında ise glukoz miktarının α-amilaz aktivitesini etkilemediği görüldü.

SSF'de kalan glukoz miktarı incelendiğinde 0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml glukoz içeren ortamlarda 3.günde, 10 mg/ml ve 50 mg/ml içeren ortamda ise 5.günde ortamda tamamen tükendiği görüldü.

SmF'de üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz aktivitesi için optimum üretim şartları araştırıldığında, optimum üretim süresi 7. gün, başlangıç pH'sı 4, aşı miktarı 1,5 ml olarak belirlendi.

SmF'deki katabolit represyon çalışmasında ise glukoz miktarının α-amilaz aktivitesini etkilediği görüldü.

SmF'de kalan glukoz miktarı incelendiğinde ise 0 mg/ml glukoz içeren ortamda 1. günde, 2,5mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml glukoz içerende 3. günde ve 50 mg/ml glukoz içeren ortamda 5. günde halen daha glukoz varlığı gözlendi.

SSF'de üretilen enzim preparatının nişasta hidrolizi gerçekleştirildi ve hidroliz ürünlerinin ince tabaka kromotografisi ile kalitatif analizi yapıldı. 120. dakikada hidroliz yüzdesi %98,91 olarak belirlendi. Hidroliz ürünleri ise maltoz, tanımlanamayan oligosakkaritler ve glukozdu.

ABSTRACT

In this study it was determined the conditions of optimum production of *Aspergillus sclerotiorum* α-amylase in SSF and SmF, and studied starch hydrolysis.

When investigated the conditions of optimum production of *Aspergillus sclerotiorum* α-amylase in SSF, it was found that the production period was 6th day, amount of inoculation was 2 ml, amount of substrate was 5 gr, level of moisture was 85 %, initial pH was 5.

It was studied catabolite repression in SSF, and discovered that α-amylase production wasn't effected by amount of glucose.

When investigated the residual amount of glucose in SSF it was seen that glucose was totally dissappeared at 3rd day in mediums containing 0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml glucose and at 5th days in the mediums containing 10 mg/ml, 50 mg/ml glucose

When studied the conditions of optimal production of *Aspergillus sclerotiorum* α-amylase in SmF, it was found that the production period was 7th day, amount of inoculation was 1,5 ml, initial pH was 4.

It was studied catabolite repression in SmF. It was discovered that α-amylase production was effected by amount of glucose.

When investigated the residual amount of glucose in SmF it was seen that glucose was totally dissappeared at 3rd day in mediums containing 0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml glucose and at 5th days in the mediums containing 50 mg/ml glucose

It was carried out the starch hydrolysis of *Aspergillus sclerotiorum* α-amylase produced in SSF, and studied the qualitative analysis of the hydrolysis products with thin layer chromatography. After 120 minutes, the hidrolysis percentage was found as 98,91 %. Hydrolysis products were mainly maltose, unidentified oligosaccharides, and glucose.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleşmesinde öneri ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN' a;

Çalışmalarım boyunca her tür yardım ve desteğinden dolayı, Sayın Bilal BALKAN' a; mikroorganizmanın teminindeki yardım ve ilgileri için Sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Halide AYDOĞDU' ya; ayrıca, tezimle ilgili her konuda yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya YAĞAR' a;

Tez çalışmam sırasında Biyoloji Bölümü imkan ve olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Tülin AKTAÇ' a,

Her zaman yanımda olan ve bana en büyük desteği veren sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkür etmeyi büyük bir görev sayarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET……	**I**
ABSTRACT……..	**II**
TEŞEKKÜR……	**III**
1. GİRİŞ……....	**1**
2. GENEL BİLGİLER……	**3**
2.1. SSF……..	3
2.2. SmF…….	8
2.3. SSF ve SmF'nin karşılaştırılması……	9
2.4. Nişasta…….	11
2.5. α-Amilaz (E. C. 3. 2. 1. 1.)…….	14
2.6. Katabolit Represyon……	16
2.7. *Aspergillus sclerotiorum*…….	19
3. MATERYAL METOD……	**20**
3.1. Fungus…….	20
3.2. *Aspergillus sclerotiorum*'un Üretim Ortamı……...	20
3.3. *Aspergillus sclerotiorum*'un Üretimi ve Üretim Ortamına Ekimi……..	20
3.4. SSF Kültür Ortamı Hazırlaması……..	21
3.5. SmF Kültür Ortamının Hazırlanması……..	21
3.6. SSF ve SmF'de α -Amilaz Aktivitesinin Ölçümü……...	22
3.7. Kalan Glukoz Miktarının Ölçümü……..	23
3.8. Üretim Koşullarının SSF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α -Amilaza Üretimine Etkisi……...	24
3.8.1. Nem düzeyinin etkisi……..…….	24
3.8.2. Üretim süresinin etkisi…….	24
3.8.3.Aşı konsantrasyonunun etkisi….....	25
3.8.4. Substrat miktarının etkisi…….	25

3.8.5. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi……..…….... 25

3.8.6. Glukozun katabolit represyon etkisi……..…….. 25

3.8.7. Kalan glukoz miktarının etkisi……..……... 25

3.9. Üretim Koşullarının SmF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α – Amilaz Üretimine Etkisi…… 26

3.9.1. Üretim süresinin etkisi…….…… 26

3.9.2. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi……..……... 26

3.9.3. Aşı konsantrasyonunun etkisi…….……. 26

3.9.4. Glukozun katabolit represyon etkisi……..……...……. 26

3.9.5. Kalan glukoz miktarının etkisi……..……... 27

3.10. Nişasta Hidrolizi……... 27

3.11. Hidroliz Ürünlerinin Analizi…….…… 27

4. BULGULAR…….…… 28

4.1. Üretim Koşullarının SSF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α - Amilaza Üretimine Etkisi……... 28

4.1.1. Nem düzeyinin etkisi…….…….. 28

4.1.2. Üretim süresinin etkisi…….…… 29

4.1.3. Aşı konsantrasyonunun etkisi…….....… 30

4.1.4. Substrat miktarının etkisi……. 31

4.1.5. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi..…….....……. 32

4.1.6. Glukozun katabolit represyon etkisi……..……...…… 33

4.1.7. Kalan glukoz miktarının etkisi……..…….…….. 34

4.2. Üretim Koşullarının SmF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α- Amilaz Üretimine Etkisi…… 35

4.2.1. Üretim süresinin etkisi……. 36

4.2.2. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi…….....……..……. 36

4.2.3. Aşı konsantrasyonunun etkisi…….……. 37

4.2.4. Glukozun katabolit represyon etkisi…….…..…… 38

4.2.5. Kalan glukoz miktarının etkisi……..……... 39

4.3. Nişasta Hidroliz……..... 40

4.4. Hidroliz Ürünlerinin Analizi……... 41

5. TARTIŞMA……..…… 42

6. KAYNAKLAR…….…… 48

1. GİRİŞ

Bir enzimden herhangi bir alanda yararlanabilme olanağı büyük ölçüde ekonomik parametreler ile ilgilidir. Bilindiği gibi enzimler canlı materyallerden elde edilmek zorundadırlar. Ayrıca izolasyon ve saflaştırma işlemleri çok emek gerektiren pahalı proseslerden oluşmaktadır. Bu nedenlerden dolayı enzimler genellikle pahalı materyallerdir. Herhangi bir enzimin mikrobiyal kaynaklardan eldesi ve ham preparatının saflık düzeyinin tasarlanan işlemler için yeterli olması söz konusu enzimin yaygın bir şekilde kullanılabilme şansını arttırmaktadır.

Enzimler, başlıca endüstriyel, tıbbi, bilimsel ve analitik amaçlı olmak üzere üç farklı alanda kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerdeki dünya pazarı 1965'lerde birkaç milyon dolar iken, 1986'da 400 milyon dolara ulaşmıştır (Telefoncu, 1997). 1990'da ise endüstriyel enzimlerin büyük bir kısmını karşılayan ABD'de pazarında 625 milyon dolar olduğu tahmin ediliyor (Nigam ve Singh, 1994). Günümüzde ise bu rakamın birkaç kat artmış olduğunu söylemek yanıltıcı olmaz. Tıp alanında kullanılan enzimlerin pazarı ise bir milyon dolar civarındadır. Bilimsel ve analitik amaçlarla kullanılan enzimler de diğer iki alanla kıyaslanamayacak kadar yüksek olup binlerle ifade edilebilir (Telefoncu, 1997).

Enzim kaynağı olarak mikrobiyal hücrelerin kullanılmasının bazı avantajları vardır. Yüksek enzim aktiviteleri, enzim izolasyonun kolaylığı, fermentasyonunun kısa sürmesi; fermentasyon ortamının ucuz olması, eleme presedürlerinin basitliği ve binlerce kültürün oldukça kısa zamanda test edilebilirliği, farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen farklı enzimleri üretmesi ve reaktörde istenen çalışma koşulları ile ilgili esnekliği sağlaması bu avantajlar arasında yer alır. (Telefoncu, 1997). Genellikle *Aspergillus sp*. ve *Rhizopus sp*. endüstriyel amilazların kaynağı olarak kullanılmaktadır (Boyce, 1986).

Endüstride kullanılan en önemli ham materyallerden birisi nişastadır. Son yıllarda, endüstriyel sistemlerde nişastayı hidrolizleyen enzimlerin kullanılmasının avantajları belirlenmiştir (Wambutt vd., 1984). Nişasta hidrolizi endüstrisinde en yaygın kullanılan enzimler α-amilazlardır. α-amilaz, α-1,4-glikozidik bağlarının içten parçalanmasını katalizler ve kısa oligosakkaritleri ve limit dekstrinleri açığa çıkartır (De Mot, 1990). Çeşitli endüstriler nişastayı farklı şeker solüsyonları haline dönüştürmek için mikrobiyal amilolitik enzimler ile çalışmaktadır (Saha ve Zeikus, 1989; Vihinen ve Mantsala, 1989; Bowles, 1996; Ray ve Nanda, 1996).

SSF (Solid State Fermentation-Yüzey kültür tekniği) ve SmF (Submerged Fermentation-Derin kültür tekniği) teknikleri amilaz üretmek için kullanılır. SSF kültürünün, SmF'ye göre daha üstün avantajları vardır. Süper üretim, basit teknik, bakteri kontaminasyonunu engelleyen az nem içeriği, düşük maliyetli yatırım, düşük enerji ihtiyacı ve az artık su çıkışı, daha iyi ürün geri alma ve köpük toplanmaması bu avantajlar arasında yer alır (Babu ve Satyanarayana, 1995; De Souza ve Peralta, 2001). Hem SSF hem de SmF ile üretimde nem, sıcaklık, pH, besin içeriği gibi çevresel faktörler mikrobiyal büyümeyi ve ürün oluşumunu etkiler (Raimbault, 1998).

Katabolit represyon veya feed back represyonu SSF ve SmF'de önemlidir. Pek çok ekstrasellüler katabolit enzimin katabolit veya son ürün feed back represyonu tarafından etkilendiği görülmektedir. Bakteri ve fungusların SmF'de üretiminde enzim sentezininin katabolit represyona uğradığı, α-amilaz ve diğer enzimlerin SmF ekonomisinde katabolit represyonun ciddi problemlere yol açtığı bildirilmektedir. Bununla birlikte son yıllarda *Bacillus* türlerininden α-amilaz üretiminde SSF'nin önemli ölçüde katabolit represyonun üstesinden geldiği bulunmuştur (Nandakumar vd., 1999).

Bu tez kapsamında, *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz enziminin SSF ve SmF'de üretimi, üretim şartlarının optimizasyonu, her iki ortamda katabolit represyonun incelenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen enzim preparatları ile nişasta hidrolizi gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SSF

SSF, nemli katı substratta mikroorganizmanın (esas olarak mantar) büyütülmesini içeren, eczacılığa ait ilaç, enzim, yakıt, hayvan yemi, fermente yiyecek üretimi için kullanılan işlemdir (Guitiérrez-Correa ve Villena, 2003). SSF, nemli katı destekte mikroorganizma kültürü olarak da tanımlanır. Katı destek ya hareketsiz bir taşıyıcı ya da çözülmeyen substrat olabilir. Mikroorganizma bu desteği karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilir. Fermentasyon, serbest su yokluğunda veya serbest su yokluğuna yakın ortamda meydana gelir. Böylece, mikroorganizmanın adapte olduğu çevre doğal çevreye yakın olur (Hölker vd., 2004).

SSF'de gerekli nem, absorblanır veya katı matriksin içindeki kompleks yapı halinde vardır ki bu da büyüme için bir çok avantaj sağlar. Böylece yeterli oksijen transferi olmaktadır. Genellikle SSF, katı fazdan sıvının ayrımına izin vermeyen katının doyması için su eklenmesinin limitlenmesi ile karakterize edilir (Balagopalan vd., 1991).

SSF uygulamaları; katı atıklardan organik gübre ve hayvan yemi üretimi, zehirli bileşiklerin biyolojik bozulması ve biyolojik iyileştirilmesi, endüstriyel atıkların biyolojik zehirsizleştirilmesini kapsayan çevresel kontrol uygulamaları ve biyotransformasyonla tahıl ürünlerinin veya artıklarının besinsel zenginleştirilmesi, fermente gıda, enzim, pigment, antibiyotik, biyopestisit, organik asit ve tat bileşiklerinin üretimi olmak üzere iki farklı alanda kullanılmaktadır (Raghavarao vd., 2002).

SSF işlemi yüzyıllardan beri kullanılmaktadır (Guitiérez-Correa ve Villena, 2003). 5000 yıl önce yiyecek üretimi için SSF'de mantar kültürü kullanıldı. *Aspergillus oryzae*'nın pirincin fermentasyonunun koji işlemlerinde kullanılması; *Penicillium roquefortii* küfünün 4000 yıldan beri peynir üretimi ve Asya da soya sosu üretimi ve Mısır'da 3000 yıldan beri ekmek üretimi SSF uygulamalarına örnek olarak verilebilir.

SSF en eski biyoteknolojik işlem olarak bilinmesinin yanısıra, SSF ile ilgili teknik problemler halen daha çözülememiştir (Hölker vd., 2004).

SSF işlemini etkileyen bazı faktörler vardır. Bunlar uygun türün seçimi, substrat seçimi ve parametre işlemlerinin seçimidir.

Mantarlar SSF'de anahtar rol oynayan mikroorganizmalardır. Hifsel gelişim, verimli koloni oluşumuna ve katı substrata nüfuz edilmesine izin verir (Te Biesebeke vd., 2002). Morfolojileri nedeniyle özellikle filamentli mantarlar SSF için uygun mikroorganizmalardır (Viniegra-Gonzalez, 2003). SSF, aeriyal hif tarafından mantar sporlarının eldesinde kesinlikle en iyi metoddur (Hölker vd., 2004). Bir çok mikroorganizma katı substratta büyüme kabiliyetindedir, ama sadece filamentli mantarlar serbest su eksikliğinde önemli derecede büyüyebilirler (Raghavarao vd., 2002).

Doğal katı substrat, SSF'de en önemli faktördür. Yalnızca kültür için besin sağlamakla kalmaz, mikrobiyal hücrelere barınak gibi hizmet verir. Böylece, parçacık boyutu ve substratın kimyasal bileşimi kritik olarak önemlidir.

SSF'nin amacı, çözülmeyen substrat ile sıkı temasta olan bakteri veya mantar kültürü meydana getirmektedir ve böylece fermentasyon için yüksek substrat konsantrasyonu elde edilir.

SSF işlemi için substrat seçimi bazı faktörlere bağlıdır. Esas olarak, fiyatı ve faydalılığı önemli olan faktörlerdir. İdeal bir katı substrat, optimum fonksiyon için mikroorganizmaya gerekli bütün besini sağlar. Bazı substratlar, üreme ve büyüme için, bazı kimyasal oluşumları sağlamak için veya miselyumların nüfuz etmesini kolaylaştırmak için aşılamadan önce genellikle ön hazırlıklara ihtiyaç duyar (Sodhi vd., 2005).

SSF'deki substratlar mikrobiyal büyüme için karbon ve besin kaynağı olarak kullanılır. SSF işleminde kullanılan katı destekler iki çeşittir. Birincisi, SSF işleminde nişasta, lignoseluloz kalıntıları, tohum gibi endüstriyel kaynaklar, tohum ürünleri, cassava, patates, pirinç, fasulye, şeker pancarının kullanılmasıdır. İkincisi; SSF işleminde şeker pancarı baggase, perlit, amberlit, poliüretan, köpük ve benzeri yapay veya doğal hareketli katı destekler kullanılır. Bu işlemde kullanılan destek, mikroorganizmaların bağlı olması için kullanılır.

Mühendislikte, hareketli destek kullanımının avantajları daha çoktur. Çünkü mikrobiyal büyümede geometrik ve fiziksel karakterler değişmez ve kütle transferine ve sıcaklık kontrolüne daha iyi izin verir (Guitiérez-Correa ve Villena, 2003).

pH, fermentasyon işlemleri için en önemli diğer faktörler arasındadır ve ortamda kullanılan nemlendirici madde tipine bağlıdır. Su veya farklı tamponlar, çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılan ortak nemlendirici maddelerdir (Sodhi vd., 2005).

SSF'de pH değerini kontrol etmek ve ayarlamak çok zordur. Ama tampon kullanımı ile pH kontrolüne gerek kalmaz (Pérez-Guerra vd., 2003).

Fermentasyon ortamında doğal nemlendirici ajanlar ve nem içeriği seviyesi, SSF'de önemli diğer faktörlerdir. Nem içeriği, SSF işlemlerinde kritik bir faktördür. Çünkü bu değişken, farklı metabolitlerin salgısı ve biyosentezi ve büyümesinde etkilidir. SSF ortamında, kritik olarak önemli olan nem miktarı ve onların enzim biyosentezine etkisi, katı parçacıkların fiziksel özelliklerinde nemin müdahalesi için kullanılır (Sodhi vd., 2005).

Nem içeriğinin düzeyi optimum değerden daha yüksek veya daha düşük miktarda bulunduğu zaman SSF sisteminin verimliliğini etkiler (Goes ve Sheppard, 1999). Daha yüksek nem miktarı seviyesi katı substratın gözeneklerini azaltır, substrat

partikül yapısını değiştirir, yapışkanlığın gelişimini arttırır, gaz hacmini azaltır, değiştirir ve O_2 transferinin düşmesinden dolayı difüzyon düşmesine sebep olur ve aeriyal miselyum yapılanması arttırır. Düşük nem içeriği, katı substrat tarafından organizma için sağlanan besinin çözünürlüğünü ve şişkinlik derecesini azaltır, su gerilimini yükseltir (Sodhi vd., 2005).

SSF'de katı substratın su içeriği genellikle % 30–75 arasında değişir. Daha az miktarda su içeriği, mikroorganizmada sporlanmayı meydana getirir, oysa yüksek miktardaki su, bakteriyel kontaminasyon riskini arttırır ve oksijen transfer kısıtlanması meydana getiren porosit sisteminin azalmasına sebep olur.

Fermentasyon esnasında, substratın su miktarı ve dolayısıyla mikrobiyal aktivite buharlaşma ile değişebilir. Genellikle, bu işlemlerin hepsinin sonucunda rutubet kaybı olur. Bu kaybı gidermek için gerekli olan su eklenir veya su ile doymuş hava akımına başvurulur.

Optimum nem miktarı hem mikroorganizmaya hem de kullanılan katı desteğe bağlıdır. Uygulamaya bağlı olarak hem maksimum seviyeye çıkarılmış büyüme için hem de maksimum seviyeye çıkarılmış metabolit (enzim, organik asit vb.) üretimi için mikroorganizma optimum nem seviyelerinde büyütülmelidir (Pérez-Guerra vd., 2003).

Mikroorganizmanın su ihtiyacını en iyi tanımlayacak terim katı substratın su içeriğinden çok su aktivitesidir. Substrattaki su aktivitesi SSF'de çok önemlidir. Su aktivitesi, saf suyun buhar basıncı ve sistemdeki suyun buhar basıncı arasındaki ilişki gibi tanımlanır. Su aktivitesi, biyokütle gelişimini, metabolik reaksiyonları ve kütle transfer işlemlerini etkiler. Substratın doğal kimyasına, fiziksel yapısına bağlıdır.

SSF' de ürün sentezini ve mikrobiyal büyümeyi kütle transfer işlemleri de etkiler. SSF'de kütle transfer işlemleri, sıvı faz sistemleri ve substratın fiziksel yapısıyla güçlü şekilde etkilenen besin difüzyonu ve gaz difüzyonu için tanımlanır.

Raghavarao ve ark. kütle transferi olayının iki çeşidini tanımlamıştır; bunlar hücre dışındaki mikroskala ve makroskaladır. İlkinde, kütle transferi mikroorganizma hücrelerinin içi ile dışında olur. İkincisinde, birçok faktör etki eder; biyoreaktörün dışı ve içindeki hava akımının hacmi, doğal konveksiyon, substrattaki difüzyon ve taşıma, biyoreaktör materyalleri, mikroorganizmaya yapılan zarar ve substrat partükülleri arasındaki zarar bu faktörlerdendir.

Gaz difüzyonunun, havalandırmada iki esas görevi vardır. Bunlar, mikroorganizmaya oksijen sağlamak ve metabolizma esnasında oluşan karbondioksit, sıcaklık, su buharı ve uçucu elemanları azaltmaktır. Katı ve gaz fazı arasındaki O_2 ve CO_2 değişimi intrapartiküller ve inter partiküllerin ikisinde de meydana gelir. Gaz difuzyonu, faz ile temasyüzeyinin artması faktörüne bağlıdır; bu da substratın boş fraksiyonuna partiküllerin por ve boyut çapına, karışımın ve substratın derinlik derecesine bağlıdır.

Besin difüzyonu, mikrobiyal enzim tarafından katı substratın hidrolizi ve hücrelere doğru besinin difüzyonunu içerir ve intrapartiküler düzeyde meydana gelir. Besin difüzyonu işlemleri, bakteri ve maya SSF'sinde önemlidir. Besin difüzyonu mantar için kritik faktör değildir. Çünkü miselyumları katı substratı daha iyi şekilde delip geçer (Pérez-Guerra vd., 2003).

Metabolit ve enzim üretimi için optimum sıcaklığın not edilmesi zorunludur, buna büyüme esnasında her zaman uyulmayabilir.

Substrat yatağında sıcaklık kontrolü, büyüme esnasında SSF için çok önemlidir. Çünkü enzim üretimi veya metobolitler sıcaklığa genelde duyarlıdırlar (Sodhi vd., 2005). SSF'de sıcaklık yükselişi, sıcaklığın azalması olmadığı zaman metabolik aktivitenin sonucudur. Sıcaklıktaki artış, sporların üremesini, büyümesini ve ürün yapısını direk olarak etkiler.

Sıcaklık düzeyine ulaşmak, mikroorganizma çeşidinin görevine substratın gözenek çapına ve derinliğine bağlıdır. Sıcaklık transferi SSF'de çok azdır, çünkü katı

substratın kullanım kapasitesi sıcaklık transferini limitlemiştir. Sıcaklık transferi, gaz faz için partikül yüzeyinden sıcaklığın transfer edilmesi oranı ile partikül içi ve partiküller arası sıcaklık transferi oranına bağlıdır (Pérez-Guerra vd., 2003).

Sıcaklık kontrolü ana problemlerden biridir. Mantarı sıcaklığın nasıl etkilediğinin bilinmesi önemlidir. Mantarın ürettiği sıcaklık, onların solunum oranı ile orantılıdır. SSF süresince, mantarın karakteristik büyüme fenotipini gösterir ve belli moleküler fizyolojik karakterlere sahiptir (Balagopalan vd., 1991).

2.2. SmF

Mekanik aletler kullanılarak havalandırılan ve karıştırılan çok miktardaki su içinde mikrobiyal hücrelerin asılı durduğu bir sistemdir. Geleneksel SmF tekniği kullanılarak birçok enzim üretilir. Bu sistemde kültür ortamının, kimyasal bileşenleri hemen hemen homojen olarak dağılmıştır. Çünkü karıştırma oranı, reaksiyon oranından daha hızlıdır (Viniegra-González ve Favela-Torres, 2006).

SmF sisteminde, karbon, azot, fosfor ve diğer besinler erimiş durumdadır (Balagopalan vd., 1991). SmF sistemi mikrobiyal metabolitlerin sentezinin fizyolojik ve biyokimyasal çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Solis-Pereira vd., 1993).

SmF'de sıcaklık sterilizasyonu ve aseptik kontrol şarttır. Metabolik sıcaklığın, pH'nın ve aşılama işlemlerinin kontrolünün kolay olduğu bir sistemdir. Bu sistemde, sadece bakteri kontaminasyonu riski vardır. Yüksek değerde ve yüksek fiyatta teknoloji ürünlerine ihtiyaç duyulan bir sistemdir.

Yüksek miktarda havadaki çözünmüş O_2 limitasyonu zorunludur. Çok miktarda su tüketilir ve sıvı artıklar atılır (Raimbault, 1998).

2.3. SSF ve SmF'nin Karşılaştırılması

SSF laboratuvar ölçütünde SmF'ye göre bazı proses avantajlarına sahip olmasının yanı sıra pek çok biyolojik avantaja da sahiptir. SSF, süper üretim, basit teknik, düşük maliyetli yatırım, düşük enerji ihtiyacı ve az artık su çıkışı, daha iyi ürün geri alma ve köpük toplanmamasını içeren, SmF'den daha üstün çok sayıda avantajları olan bir tekniktir (Babu ve Satyanarayana, 1995).

SSF'nin SmF'ye göre üstünlükleri aşağıda verilmektedir:

1 **–** SmF ile SSF arasındaki çalışmalar karşılaştırıldığında SSF'nin daha yüksek üretime sahip olduğu gözlendi.

2 – Bakteri ve maya kontaminasyonu sulu ortama göre daha azdır. Aynı durumda aseptik koşullarda çalışmaya izin verir.

3 – SSF'de kullanılan mikroorganizmaların ana grubunu oluşturan mantar için, onların doğal habitatına benzer çevresel koşullara sahiptir.

4 – Daha yüksek değerdeki havalandırma, özellikle bu işlemlerde istenen kuvvetli oksidatif metabolizma için uygundur.

5 – Sporlar ile aşılama, ortamda değişmez dağıtım vasıtasıyla kolaylaştırılır.

6 – Kültür ortamı genellikle çok basittir. Suda çözünmeyen katı substrat, genellikle büyümek için gerekli besini sağlar.

7 – Kullanılan düzenekler ekonomik açıdan çok ucuzdur.

8 – Atık su, çok az olduğundan daha az çevre kirliliğine yol açmaktadır.

9 – Düşük nem içeriğinden dolayı besiyerinin kontaminasyon riski çok azdır.

10 – SSF ile SmF karşılaştırıldığında farklı özellikte ürünler elde edilir.

11 – Substratın konsantre edilmiş yapısı nedeniyle SSF'de SmF'ye göre daha küçük reaktörler kullanılabilir (Pérez-Guerra vd., 2003).

12 – Katabolit represyon SmF'ye göre daha düşüktür veya yoktur.

13 – SSF'de ısıtma için düşük enerjiye ihtiyaç duyulur (Hölker vd., 2004).

SSF bu avantajlara sahip olmasıyla beraber SmF'ye göre bazı dezavantajları da vardır. Bu dezavantajlar aşağıda verilmiştir:

1 – Sadece az nem miktarında büyüyebilen organizmalar için kullanılır.

2 – Genelde, substratların ön hazırlığa ihtiyacı vardır (törpüleme veya vurma, boyuta göre öğütme, homojenizasyon, fiziksel, kimyasal ya da enzimatik hidroliz, pişirme ve buharlaştırma işlemleri).

3 – Biyokütleyi tanımlamak çok zordur.

4 – Katı olan doğal substrat, işlemsel parametrelerin (pH, nem miktarı ve substratın oksijen ve biyomas konsantrasyonu) belirlenmesinde problemlere sebep olur.

5 – Sallama işlemi güç olabilir. Bu nedenle statik koşullar tercih edilir.

6 – Sık sık, yüksek aşı miktarına ihtiyaç duyar.

7 – İstenilmeyen mantar kontaminasyonu olasıdır.

8 – Büyüme esnasında, meydana gelen metabolik sıcaklığı kaldırmak çok zor olabilir.

9 – Fermente edilmiş katılardan elde edilen ürünleri içeren ekstraktlar genellikle viskoz yapıdadır.

10 – Difüzyon için kütle transferi limitlenmiştir.

11 – Bazı SSF'lerde, havalandırma, yüksek katı konsantrasyonu yüzünden zor olabilir.

12 – Sporlar, üreme ihtiyaçlarından dolayı daha uzun lag fazına sahiptirler.

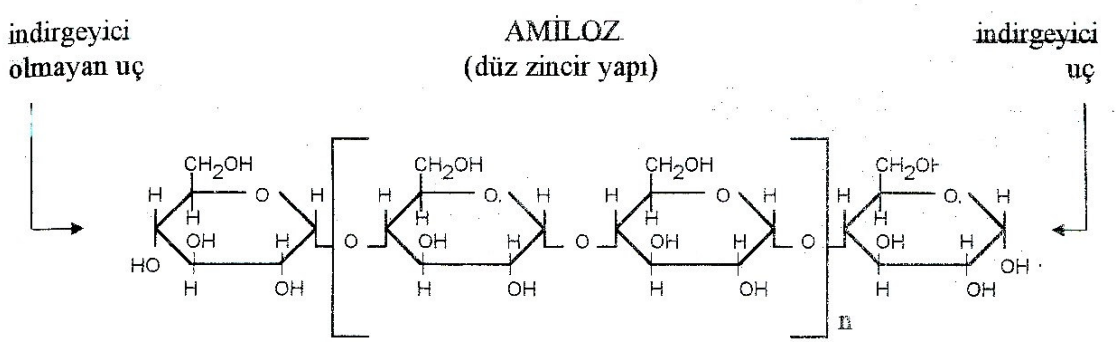
13 –Üretim zamanı SmF'ninkinden daha uzundur (Pérez-Guerra vd., 2003).

2.4. Nişasta

Nişasta, hemen hemen bütün bitki hücrelerinde bulunmasına karşın, bitkisel tohumlar, yumru kökler nişastaca daha zengindir. Depo polisakkarit olan nişasta glukoz monomerlerinden oluşan bir homopolisakkarittir (Kalaycıoğlu L. vd., 2000).

Nişasta ekstraksiyon ve fraksiyonlama ile iki farklı maddeye parçalanır: Amiloz ve amilopektin.

Amiloz; doğal nişastanın % 20-30'unu oluşturmakta olup α-1,4-glikozid bağları ile bağlı çok sayıda (250–300) glukoz artığından meydana gelir (Şekil 2,1). Temel yapıtaşı maltozdur ve maltoz birimleri arasında da yine α-1,4-glikozid bağları sayesinde molekül düz bir biçimde uzayıp, spiral oluşturmaya yatkın uzun zincirler halindedir. Molekül ağırlıkları birkaç binle 150.000 arasında değişir.

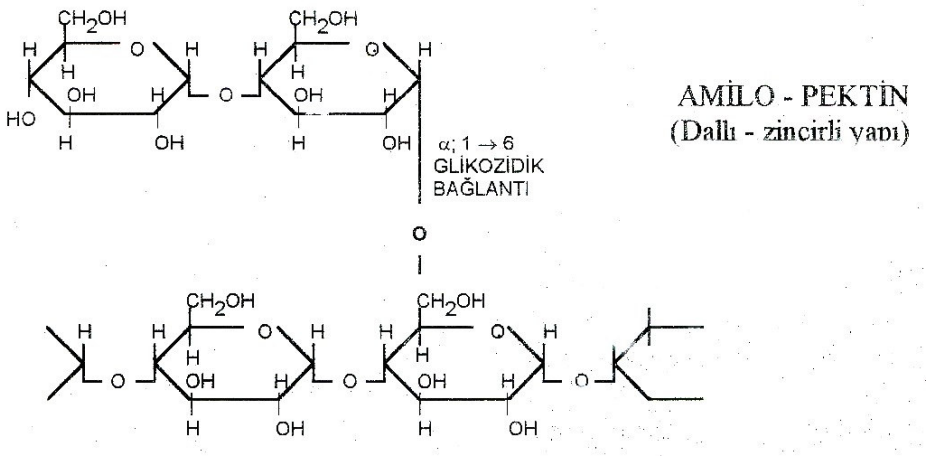


Şekil 2.1. Amiloz'un kimyasal yapısı (Ası, 1996)

Amilozun molekül şekli kendisinin kimyasal ve biyokimyasal reaktivitesi için önemsiz değildir. Amiloz, iyot ile koyu mavi renk verir. Reaksiyon, iyot moleküllerinin glukoz birimleri tarafından oluşturulan tünelciklerin boşluğuna yerleşmesi sonucu oluşan formun farklı fiziksel özellikler göstermesi esasına dayanır. Ayrıca bu

borucukları, 6., 7. ve 8. glukoz birimlerinden ibaret halka şeklindeki parçalara ayıran enzimler de vardır. Bu ürünlere "Siklodekstrin" veya "Schandinger dekstrin" adı verilir (Karlson, 1992).

Amilopektin adı verilen ikinci molekül şekli ise dallanmış bir yapı gösterir (Şekil 2.2). Nişasta molekülün yaklaşık % 70'ini oluşturur. Yapısında en az 1800 glukoz birimi bulunur. Amilopektin molekülünde glukoz birimleri α-1,4 ve α-1,6 glikozidik bağları ile birbiriyle bağlanmışlardır. Glukoz birimleri α-1,4 glikozidik bağı ile bağlanarak düz bir zincir oluştuktan sonra her 24 ile 30'uncu glukoz birimlerinde α-1,6-glikozidik bağı ile yan zincir oluştururlar. Ve bu şekilde de dallanmış bir yapı ortaya çıkmış olur. Böylece, binlerce glukoz ünitesinin α-1,4 ve α-1,6-glikozidik bağları ile birleşmeleriyle amilopektin molekülü ortaya çıkar. Moleküler ağırlığı 300.000 ile birkaç milyon arasında değişir (Ası, 1996). Amilopektin sıcak suda çözünmez ve iyot ile kırmızı renk verir (Menevşe ve Menevşe, 1982).



Şekil 2.2. Amilopektin'in kimyasal yapısı (Kalaycıoğlu vd., 2000)

Nişastanın kompleks yapısından dolayı onun degredasyonu için pek çok enzime ihtiyaç duyulur (Antrakian, 1992; Rüdiger vd., 1994). Bu enzimler basitçe endo-etkili ve ekzo-etkili enzimler olarak iki grup halinde sınıflandırılabilirler. α-amilazlar gibi

endo-etkili enzimler rastgele biçimde nişasta polimerinin iç kısımlarındaki zincirleri hidrolizler, dallanmış ve doğrusal oligosakkaritlerin oluşumuna yol açar. Ekzo-etkili enzimler (β-amilaz, glukoamilaz ve α-glukozidaz) indirgenmeyen uçtan substrata saldırır, oligo ve/veya monosakkaritleri üretir.

Amilopektin ve pullulanda α-1,6-glikozidik bağlarını hidroliz etme yeteneğinde olan enzimler, dallanmayı kırıcı enzimler veya pullulanazlar olarak bilinirler (Crabb ve Mitchinson, 1997). Pullulanazlar dekstrinlerde bulunan α-glikozidazlar, glukoamilazlar ile birleşmiş biçimde kullanılır (Emmanuel vd., 2000).

Nişastadan endüstriyel glukoz üretimi, her bir nişasta üzerine farklı etki şekline sahip birkaç amilolitik enzim içeren iki adımdan oluşan yöntemdir. Birinci adım polimerizasyonun farklı derecelerine sahip çözünmüş dekstrin solüsyonu içinde konsantre nişasta süspansiyonunu değiştirir. İkinci adım sırasında bu dekstrinler glukoza hidroliz olur. Çözünür nişasta, çözünmeyen nişastadan amilaz için daha iyi substrattır ve nişasta jeletinizasyonu sadece yüksek sıcaklıkta yer alır (ºC>70), yükseltilmiş sıcaklıklarda (90-110 ºC) nişastanın enzimatik hidrolizi termofilik amilaz kullanılması sayesinde yapılmıştır. Bu gibi enzimler kimyasal modifikasyonlar ya da mutajenler kullanılarak mezofilik enzimlerden elde edilebilir (Li vd., 1998). Doğal termofilik amilazlar da bulunmaktadır.

Nişasta çok eskiden beri tekstil endüstrisinde sertleştirici olarak kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması, kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilir. Bu işleme haşıllama (sizing) adı verilmektedir. Nişastadan başka bazı yapay haşıllayıcı maddeler bulunduysa da nişasta halen en güvenli ve en yaygın haşıllayıcı madde olarak kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastayı uzaklaştırmak gereklidir. Bu işlemede haşıl alma (desizing) denir. Haşıl alma işleminde de bazı kimyasal maddeler kullanılmasına rağmen en yaygın kullanılanı

enzimler ile yapılan haşıl alma yöntemidir. Haşıl alma işleminde genellikle α-amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakçıoğlu, 1979).

Nişastanın etanole dönüşümündeki kimyasal ve/veya mikrobiyal anlamda sakkarifikasyon ve sıvılaşma işlemlerinde, mikrobiyal ve bitki kaynaklarından elde edilen amilolitik enzimlerin ticari preperasyonunun kullanılmasına ihtiyaç vardır (Admassu vd., 1981, Wilson vd., 1982).

2.5. α-Amilaz (EC 3.2.1.1)

Çeşitli endüstrilerde (örneğin; yiyecek, kimyasal, deterjan, tekstil) değişik şeker solüsyonları içinde nişastanın dönüştürülmesi için mikrobiyal amilolitik enzimler kullanılır. Nişastanın indirgenmesinde bazı enzim tipleri söz konusudur; esas olarak α-amilaz (1,4-α-glukan glukanohidrolaz, E C.3.2.1.1), β-amilaz (1,4-α-glukan maltohidrolaz, E C.3.2.1.2) ve glukoamilaz (1,4-α-glukan glukohidrolaz, E C.3.2.1.3) kullanılmaktadır.

α-amilaz (α-1,4-glukanohidrolaz, E C.3.2.1.1, endoamilaz ve dekstrojenik) doğada yaygın olarak oluşur (Viswanatha ve Surlikar, 2001). Bu enzimler, mantarlarda ortaktır. *Aspergillus sp*. ve *Rhizopus sp.* endüstriyel amilaz kaynağı olarak sık sık kullanılır (Moriera vd., 1999). Bakteri, maya ve filamentli mantarları içeren çeşitli mikroorganizmalar, amilaz enzimi üretimi için uygundur. Amilaz, ham nişastanın etkili sakkarifikasyonuna ihtiyaç duyan çeşitli endüstri işlemlerinde kullanılır (De Souza ve Peralta, 2001). Bakteriyel amilaz preparatları yüksek oranda α-amilaz içerir. Bu enzim nişastanın α-1,4-glikozidik bağlarını parçalayan bir endoenzimdir (Telefoncu, 1997).

α-amilazlar nişasta polisakkaritini rastgele parçalayarak; dekstrinler, oligosakkaritler ve monosakkaritler meydana getirir (Gupta vd., 2003).

Nişasta üzerine bu enzimlerin etkinliği, nişasta solüsyonunun vizkozitesinde hızlı bir azalmaya sebep olur. α-Amilazlar nişastayı hidroliz etme derecesine göre değişen iki kategori içinde sınıflandırılır. Sıvılaştırıcı α-amilazlar nişastanın % 30 ile % 40'ını, şekerleştirici α-amilazlar nişastanın % 50 ile % 60'ını hidroliz eder (Vihinen ve Mantsala, 1989).

Amilazın hikayesi, Kirchhoff tarafından, nişastanın indirgenmesinin ilk keşfedildiği zaman başlamıştır.

α-Amilazın optimum pH'sı 2.0'den 12.0'ye kadar değişmektedir. *A. oryzae* için α -amilazın optimum ürünü 30-37 ºC'dir. α-amilazın moleküler ağırlığı 10-210 kDa civarındadır. Mikrobiyal α-amilazların moleküler ağırlığı 50-60 kDa'dur. α -amilaz, en az bir Ca^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir (Gupta vd., 2003).

Pek çok α-amilaz Hg^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonları tarafından inhibe edilmektedir (Ramesh ve Lonsane, 1990).

α-Amilazların çoğu ekstaselülar karaktertedir. Ekstraselülar α-amilazlar haricinde intraselülar α-amilazlar da üretilmektir. *Pyrococcus furiosus*'un ürettiği α-amilazı bunlara örnek olarak verilebilir (Laderman vd., 1993).

Fungal α-amilaz, 37 ºC civarında ve asidik koşullar altında, insan ve hayvan tüketimini kapsayan uygulamalarda formülasyon için tercih edilir.

Fırıncılıkta ve gıda endüstrisinde mantarlar tarafından üretilen α-amilaz kullanılması FDA'nın izin vermesi sebebiyle tercih edilir (Shah vd.,1991).

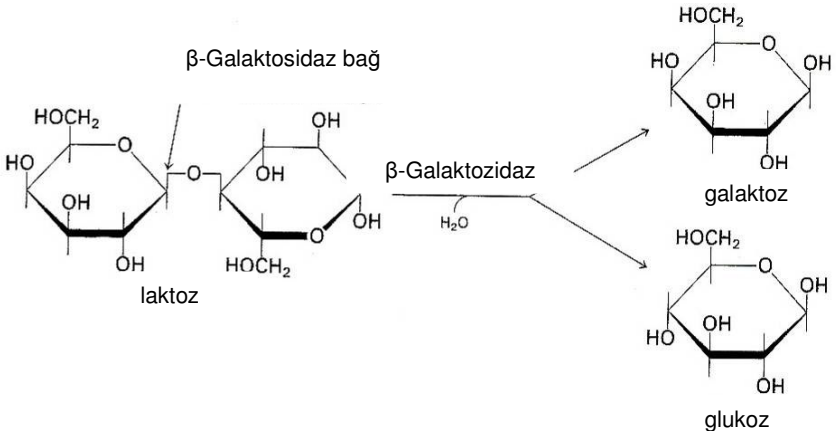
Amilazlar, nişasta endüstrisinde dekstrin, glukoz ve maltoz şurubu üretiminde kullanılır. Ekmekçilikte ise mayalarda, maltaz aktivitesi düşük olduğundan yardımcı enzim görevi üstlenir. Ayrıca tekstil sanayinde de kullanılır (Telefoncu, 1997).

2.6. Katabolit Represyon

Represyon, genellikle sentezlenen bir ürünün fazlalığı halinde veya ürünün üreme ortamında hazır bulunması halinde ortaya çıkar. Laktoz adlı şekerin *E. coli'*de kullanımı açıklığa kavuşturmuş olan *lac* operonu modeli gen sunumunun represyon veya indükleme yoluyla düzenlenmesine en iyi örnektir (Ustaçelebi vd., 1999).

Katabolit represyon, enzim tarafından katalize olunan katabolik reaksiyonlar dizisinde bir ara maddenin katabolit enzimlerin sentezini baskı altına alma yeteneğini ifade eder (Murray vd., 1993).

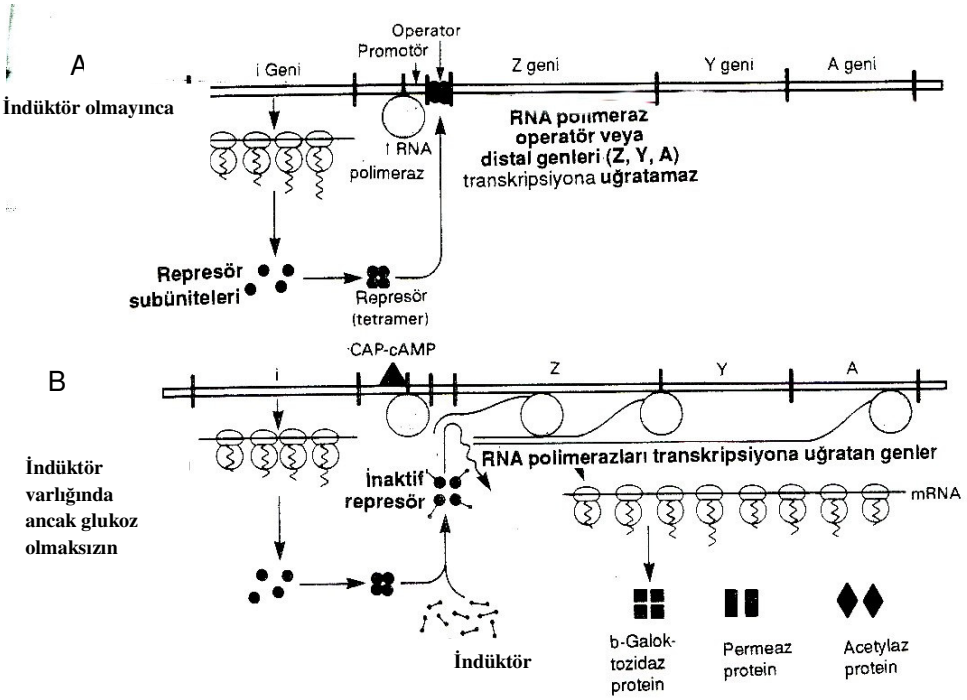
1960'ta François Jacob ve Jacques Monod ve meslektaşları *lac* operonu modelini *E. coli*'de tanımladılar (Lodish vd., 1997). *Lac* operonu, laktoz metabolizmasının ihtiyaç duyduğu Y, Z ve A genini içerir. Lac Y geni, *E. coli* hücre membranı aralığı ve hücre içinden laktoz pompalanması için elektokimyasal gradiyentinden enerji kullamı için laktoz permeaz'ı şifreler. Lac Z geni, β-galaktosidaz'ı şifreler. β-galaktozidaz laktoz disakkaritini glukoz ve galaktoza parçalar (Şekil 2.3). Lac A geni tiyogalaktozit transasetilazı'nı şifreler.



Şekil 2.3. Laktoz'un β-galaktozidaz tarafından galaktoz ve glukoza parçalanması (Lodish vd., 1997)

Bu üç enzim fiziksel olarak birbirleriyle bağlantılı durumdadır. Yapısal genler ve bunların düzenleyici genlerine ait olan söz konusu genetik düzenleme, laktoz metabolizması ile ilgili üç enzimin koordine ifadelerine izin vermektedir. Bağlantılı olan bu genlerin her biri, her siston için çok sayıda bağımsız çeviri başlatıcı (AUG) ve durdurucu (UAA) kodonlar içeren bir büyük mRNA molekülüne kopyalanır. Bu tip mRNA molekülüne polisistronik mRNA denilir. Polisistronik mRNA'lar en çok prokaryot organizmalarda bulunurlar.

E. coli laktoz ve bazı spesifik laktoz analogları ile birlikte olunca β-galaktozidaz, galaktozit permeaz ve tiyogalaktozit transasetilaz aktivitelerinin ifadesi 10-100 misli kadar artmaktadır.



Şekil 2.4. *E.coli*'de katabolit represyon (Murray vd., 1993)

Şekilde gösterildiği gibi A tipi yanıtta; sinyalin, yani indükleyicinin uzaklaştırılması ile bu üç enzimin sentez hızları düşer. Bakterilerde bu enzimlerin belirgin bir yıkımı olmadığından, β-galaktozidaz düzeyi kadar diğer iki enzimin düzeyleri de hücre bölünmesi ile seyrelmedikleri sürece aynı kalmaktadır.

E. coli karbon kaynakları olarak laktoz ve glukoz ile karşı karşıya kalınca, organizmalar önce glukozu metabolize eder, sonra *lac* operon genleri laktozu metabolize etme yeteneğini sağlamak için uyarılıncaya kadar bunlar gelişimlerini geçici olarak durdururlar. Laktoz her ne kadar bakteriyel büyüme fazının başlangıcından itibaren mevcutsa da, hücre glukoz tükenene kadar laktoz katabolizması için gerekli olan enzimleri indüklemez (Murray vd., 1993).

Çoğunlukla katabolit olarak indüklenebilen tipteki belirli enzimler, hücrelerce kolay kullanılabilen bir karbon kaynağı tarafından büyümeleri sırasında önemli derecede baskılanırlar. Bu cAMP'nin hücre içi konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Yeterince cAMP'nin olmadığı durumlarda da yapısal genler devreden çıkar. Mevcut veya potansiyel öneme sahip çoğu enzim bu tip regülasyona maruz kaldıklarından ticari kullanımda çok büyük önem kazanırlar. Ortamda baskılayıcı karbon kaynaklarının kullanılmasından kaçınılması katabolit represyona duyarlı enzimlerin üretimini büyük oranda stimüle eder (Telefoncu, 1997).

Birçok ekstrasellüler katabolit enzimlerinin, katabolit veya son-ürün feed-back represyonu tarafından etkilendiği görülür (Nandakumar vd., 1999).

Mikroorganizma tarafından, amilaz üretiminde glukoz ve diğer kolay metabolize olan şekerler tarafından katabolit represyon meydana gelir. *Bacillus licheniformis M27* tarafından SSF'de üretilen amilaz üretiminde, düşük su aktivitesinden dolayı difüzyon işleminin yavaş ve az olması ile katabolit represyonunda biraz olduğu yazarlar tarafından belirtildi (De Souza ve Peralta, 2001).

Aspergillus türleri, SSF tarafından amilolitik enzimlerin üretimi için geniş olarak kullanılır ve glukozun katabolit represyonu şimdiye kadar rapor edilmemiştir.

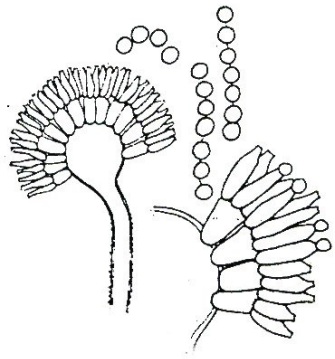
Bakteri ve mantarların, SmF'de enzim sentezinin katabolik represyonu rapor edilmiştir. Katabolit represyon, α-amilaz ve diğer enzimlerin üretilmesi için SmF ekonomisinde istenen bir durumdur (Nandakumar vd., 1999).

2.7. *Aspergillus sclerotiorum*

Aspergillus sclerotiorum, subtropikal ve tropikal topraklarda, en fazla rastlanan bir toprak fungusudur. Genellikle çöl topraklarında bol miktarda bulunurlar (Klich, 2002).

Czapek agar besiyerinde koloni oldukça yavaş gelişir. Genelde gelişimini 2 haftada tamamlar. Konidi başları oldukça yavaş gelişir ve renkleri kremsi sarı renkte, yarı küreden püskül veya kolumnara kadar değişebilir. Genellikle bol miktarda, bazı ırklarında ise az miktarda konidi meydana getirir. Czapek agarda besiyerinin altı kremsi soluk sarı rengidir.

Sterigmaları iki seri halindedir. Skleresyumları cepheden bakıldığında globoz-subgloboz, enine kesitinde ise biraz diskoid gözükür.



Şekil 2.5. *Aspergillus sclerotiorum*'un morfolojik yapısı (Hasenekoğlu, 1991)

3. MATERYAL METOD

3.1. *Aspergillus sclerotiorum*'un Temin Edilmesi

Aspergillus sclerotiorum, Trakya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji biriminin küf koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2. *Aspergillus sclerotiorum*'un Üretim Ortamı

Czapek-Dox sıvı (CDS) temel besi ortamı, % 2.5 oranında agarın eklenmesiyle kullanıldı. Besiyerinin pH'ını 5.5'e ayarlamak için 1 N NaOH veya 1 N HCl çözeltileri kullanıldı. Besiyerinin sterilizasyonu 121 ºC' de 15 dakika süreyle otaklavda gerçekleştirildi. Czapek-Dox Agar'ın içeriği aşağıdaki verilmiştir.

Çözünür nişasta….....	20 gr
$NaNO_3$.....	1 gr
K_2HPO_4.....	1 gr
$MgSO_4.7H_2O$.....	0,5 gr
$FeSO_4$.....	0,01 gr
Destile su.....	1000 ml
Agar.....	25 ml

3.3. *Aspergillus sclerotiorum*'un Üretimi ve Üretim Ortamına Ekimi

Tüpler içerisindeki Czapek-Dox Agar ortamına, steril şartlar altında ekilen mikroorganizmamız 30 ºC'lik etüvde 7 gün üretime bırakıldı. 7. günde her bir tüpe 7 ml steril destile su eklenerek spor süspansiyonu hazırlandı. Bu stoktaki spor süspansiyonu mililitrede 1×10^6 spor içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu spor süspansiyonu aşılama amacıyla kullanıldı.

3.4. SSF Kültür Ortamı Hazırlaması

Substrat olarak kullanılan buğday kepeği 80 ºC'deki etüvde 24 saat kurutulup 250 ml'lik erlenlere, istenilen substrat miktarlarında konuldu. Daha sonra besiyerinin nem içeriği destile su veya tampon ile ayarlandı. Hazırlanan üreme ortamı 121 ºC'de 20 dk süreyle otoklavda steril edilip, aşı yapıldı ve bu üreme ortamı 30 ºC'deki etüvde üretime bırakıldı. Daha sonra besiyerine 50 ml destile su konarak 200 rpm'lik çalkalamalı etüvde 1 saat çalkalanıp, gazlı bezden ve Whatman No:1 kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.5. SmF Kültür Ortamının Hazırlanması

SmF'de enzim üretimi için kullanılan besiyerinin içeriği şu şekildedir:

$NaNO_3$……..	3 gr
KH_2PO_4……..	1 gr
$MgSO_4.7H_2O$…….	0,5 gr
KCl……..……..	0,5 gr
$FeSO_4.7H_2O$……..	0,01 gr
Yeast Ekstrakt……..….....	1 gr
Nişasta…….....	20 gr
Destile su……	1000 ml

250 ml'lik erlenlerde 50 ml olacak şekilde hazırlanan üreme ortamı istenilen pH değerine ayarlandı ve 121 ºC'de 20 dk otoklavda steril edildi. Üretim ortamına ekim yapıldıktan sonra 200 rpm çalkalama hızına sahip etüvde 30 ºC'de üremeye bırakıldı.

Daha sonra Whatman No:1 kağıdından elde edilen süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.6. SSF ve SmF' de α-Amilaz Aktivitesinin Ölçülmesi

α-amilaz aktivitesi "dekstrinleyici yöntem" kullanılarak belirlendi.

α-amilaz aktivitesini ölçmek için kör, kontrol ve örnek tüpleri hazırlandı. Kör tüp spektrofotometreyi sıfırlamak için kullanıldı. Kontrol tüpü başlangıçtaki nişastanın miktarını 620 nm'de optik dansite cinsinden belirlemek amacı ile hazırlandı (Wilson vd., 1982). Örnek tüpü ise enzimim aktivite gösterdiği tüptür. Subtsrat çözeltisi olarak, % 0,8'lik çözünür nişasta kullanıldı. Substrat çözeltisi 0.1 M asetat tamponu (pH 5.0) ile kaynatılarak hazırlandı.

Hazırlanan tüplerin içeriği aşağıda verilmiştir:

Kör tüpün içeriği: 0.2 ml substrat çözeltisi, 0.05 ml enzim ve 5 ml iyot çözeltisi,

Kontrol tüpün içeriği: 5 dk 40 ºC' de inkübe edilmiş 0.2 ml substrat çözeltisi, 5 ml taze iyot çözeltisi ve 0.05 ml enzim çözeltisi,

Örnek tüpün içeriği: 0.2 ml substrat çözeltisi; 0.05ml enzim, 5dk inkübasyondan sonra 5ml taze iyot çözeltisi.

Taze iyot çözeltisinin içeriği: % 5 KI içinde hazırlanmış % 0.5 I_2 stok çözeltisinden 1 ml alınarak 5 N HCI'in 5 ml'si, destile su ile 500 ml'ye tamamlandı (Abou - Zeid, 1997).

Hazırlanan tüm tüplerin absorbans değerleri 620 nm'ye ayarlanmış spektrofometrede kör tüpüne karşı okundu. Kontrol tüplerinin verdiği OD değerinden, örnek tüplerin verdiği OD değerleri çıkartılarak fark OD yani enzim tarafından parçalanan nişastanın (kaybolan nişastasının) OD değeri bulundu. 620 nm'de taze iyot çözeltisi ile çıkarılmış nişasta standart grafiğinden yararlanılarak, kaybolan nişasta miktarı mg'a ve daha sonrada Unite/ml'ye dönüştürüldü.

Bir ünite α-amilaz aktivitesi, dakikada 0.1 mg nişastayı 40 ºC'de parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.7. Kalan Glukoz Miktarının Ölçümü

Glukoz miktarının ölçümü "ortotoluidin methodu" ile gerçekleştirildi.

Ortotoluidin, aromatik bir amindir. Aromatik aminler sıcak asetik asitli ortamda glukozla reaksyona girerek renkli bileşikler oluştururlar. Rengin şiddeti kolorimetrede okunarak glukoz tayini yapılır. Piyasada bu metoda dayalı ticari kitler bulunmaktadır. Metodun prensibi; glukoz ortotoluidin asetikasit ile ısıtıldığında mavi-yeşil renkli bir kompleks oluşturmasıdır. Rengin şiddeti 620 (±10) nm'de okunur.

Kullanılan reaktifler aşağıda verilmiştir:

Ortotoluidin (40 ml/L): 1.5 gr tiyoüre'ye 960 ml glasiyel asetik asit ve 40 ml ortotoluidin ilave edilir ve tiyoüre çözününceye kadar karıştırılır. Koyu renkli şişede oda ısısında saklanır. Oda ısısında aylarca stabildir.

Glukoz standardı (100 mg/dl): 100 mg glukoz tartılır. Bir miktar benzoik asit çözeltisinde eritilir. Son hacmi aynı çözelti 100 ml'ye tamamlanır. Standart çözeltinin ağzı iyi kapatılırsa, buzdolabında uzun süre stabildir. Benzoik asit bakteri üremesini engeller.

Benzoik asit çözeltisi: % 100 mg

Tablo 3.1. Ortotoluidin metodunun çalışma şeması

Reaktifler	**Kör**	**Standart**	**Numune**
Destile su	50 µl	-	-
Numune (serum)	-	-	50 µl
Standart	-	50 µl	-
Orto-toluidin	2 ml	2 ml	2 ml

Tablo 3.1'e göre çalışma tüpleri hazırlanır. Tüpler 100 ºC'de (kaynar su banyosunda) 5 dk kaynatılır. 5 dk sonra tüpler çıkarılır ve çeşme suyu altında soğutulur. 620 nm'de köre karşı okunur.

$$\% \text{ mg glukoz} = \frac{\textit{Numunenin O.D}}{\textit{Standardın O.D.}} \text{ x } 100$$

3.8. Üretim Koşullarının SSF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-Amilaz Üretimine Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde optimum kültürasyon koşullarının belirlenmesi amaçlandı. α-amilaz sentezine etkili olabileceği düşünülen; nem düzeyi, üretim süresi, aşı konsantrasyonu, substrat miktarı ve üretim ortamının pH'sının etkileri çalışıldı.

3.8.1. Nem düzeyinin etkisi

Aspergillus sclerotiorum'un % 45, % 55, % 65, % 75, % 85, % 95' lik nem düzeyi destile su ile ayarlanarak üretim ortamı 7 günlük inkübasyon süresinde enzim aktivitesi ölçülerek optimum nem yüzdesi bulundu.

3.8.2. Üretim süresinin etkisi

Üretim süresinin α-amilaz aktivitesine etkisini görmek için % 85'lik nem düzeyine sahip üreme ortamnını değişik günlerdeki (3. , 4. , 5. , 6. , 7. ve 8. gün) enzim aktivitesi ölçüldü.

3.8.3. Aşı konsantrasyonunun etkisi

Üretim ortamında, bulunan aşı konsantrasyonunun α -amilaz aktivitesine etkisini belirlemek için 0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, 2.0 ml ve 2.5 ml'lik aşı miktarına göre ayarlanan % 85 nem içeriğine sahip üretim ortamları 6 günlük inkübasyona bırakıldıktan sonra, enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.8.4. Substrat miktarının etkisi

Substrat miktarının α-amilaz sentezine etkisini incelemek için 5, 10, 15, 20 gr kepekleri içeren üretim ortmaları % 85 nem içerecek şekilde ayarlanıp, 2 ml spor süspansiyonu ile aşılanıp 6. günlük inkübasyon süresinden sonra enzim aktiviteleri belirlendi.

3.8.5. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi

5 gr kepek içeren kültür ortamları farklı pH' lardaki tampon (asetat tamponunu pH 4.0, 5.0, fosfat tamponu pH 6.0, 7.0, 8.0) destile su (pH 6.5) ve çeşme suyu (pH 7.5) ile % 85 nem içerecek şekilde nemlendirilip 2 ml aşı yapılarak 6 günlük inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresinden sonra enzimin aktiviteleri ölçüldü.

3.8.6. Glukozun katabolit represyon etkisi

Belirlenen optimum üretim ortamında farklı glukoz miktarlarını (0.12 mg, 25 mg, 50 mg, 250 mg) içeren kültür ortamlarının farklı günlerdeki (1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. gün) enzim aktivitesi ölçüldü.

3.8.7. Kalan glukoz miktarının etkisi

Katabolit represyon için kullanılan örneklerden elde edilen enzim çözeltilerinde ortotoluidin metodu kullanılarak kalan glukoz miktarı hesaplandı.

3.9. Üretim Koşullarının SmF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-Amilaz Üretimine Etkisi

3.9.1. Üretim süresinin etkisi

Üretim süresinin enzim aktivitesine etkisini araştırmak için, farklı üretim sürelerinde (3., 4., 5., 6., 7. ve 8. gün) 30 ºC' de 200 rpm'lik çalkalamalı etüvde, pH 6.0 olan 500 ml'lik erlenler 100 ml' lik ortamda gerçekleştirildi. Enzim aktiviteleri ölçülerek üretim süresi ile enzim aktiviteleri arasındaki ilişki saptandı.

3.9.2. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi

Farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) hazırlanan 250 ml'lik erlenlerdeki 50 ml'lik besiyerlerine 2 ml aşı yapıldıktan sonra 30 ºC'de 200 rpm'lik çalkalamalı etüvde 7 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra enzim aktivitesi ölçüldü.

3.9.3. Aşı konsantrasyonunun etkisi

Farklı aşı miktarlarında (0.5 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 2.5 ml, 3.0 ml) hazırlanan pH 4.0 olacak şekilde, 250 ml'lik erlenlere hazırlanan 50 ml'lik besiyerleri 30 ºC'de 200 rpm çalkalamalı etüvde 7 günlük inkübasyona bırakıldı ve enzim aktiviteleri ile kalan glukoz miktarları ölçüldü.

3.9.4. Glukozun katabolit represyon etkisi

Optimum şartlarda 500 ml'lik erlenlerde hazırlanan, farklı miktarda glukoz içeren (0.12 mg, 250 mg, 500 mg ve 2500 mg) 100 ml'lik besiyerleri 30 ºC'de 200 rpm' lik çalkalamalı etüvde farklı günlerde (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. gün) enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.9.5. Kalan glukoz miktarının etkisi

Katabolit represyon için kullanılan örneklerden elde edilen enzimler ortotoluidin methdu kullanılarak kalan glukoz miktarı hesaplandı.

3.10. Nişasta Hidrolizi

2 ml % 1'lik nişasta ve 1 ml enzim çözeltisi alınıp deney tüpünde 40 ºC'de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında (0, 10, 30, 60 ve 120 dk) karışımdan 0,3 ml alınıp 5 ml taze iyot çözeltisi ile reaksiyon durdurulduktan sonra 620 nm'de OD değerleri ölçüldü ve hidroliz yüzdeleri hesaplandı.

3.10. Hidroliz Ürünlerinin Analizi

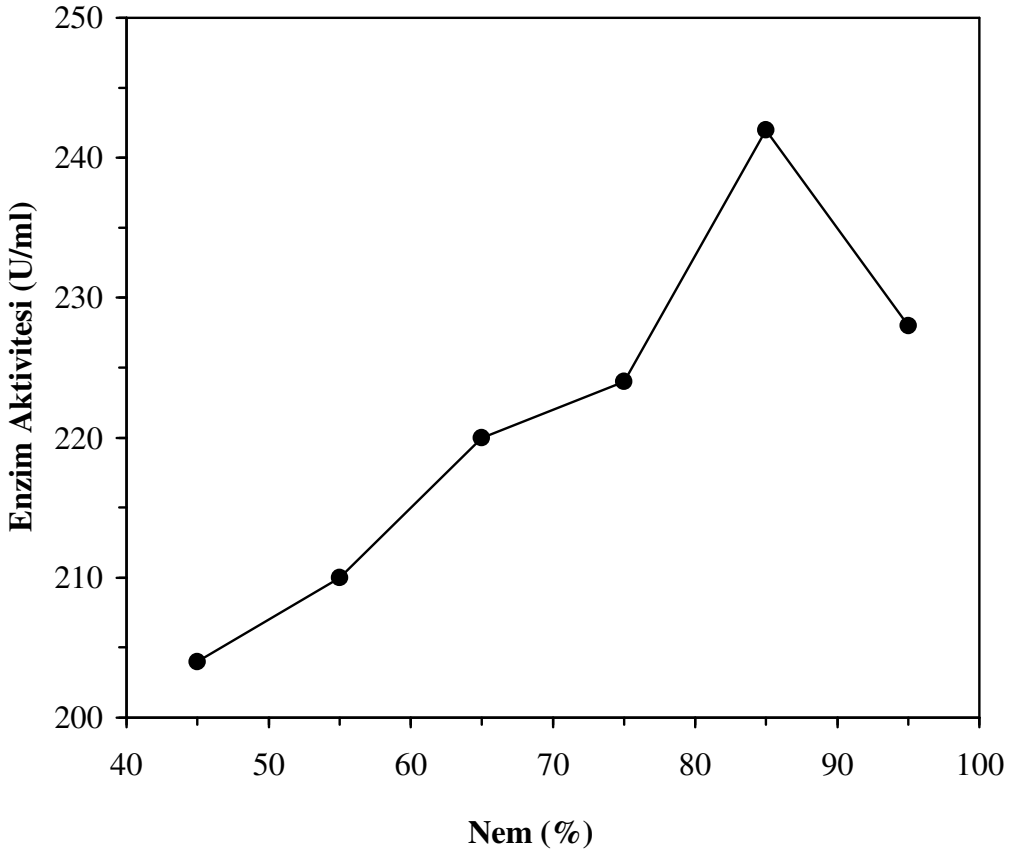
Bu inceleme için Silikajel 60 F-254 20 cm'lik alüminyum plaklar kullanıldı. Asetik asit: Kloroform: Su (35:35:5) (v/v/v) yürütücü solüsyon olarak kullanıldı. Standart olarak % 1'lik maltoz, glukoz ve nişasta solüsyonları hazırlandı. 2 ml çözünür nişasta ve 1 ml enzim solüsyonu karıştırılarak 0, 10, 30, 60 ve 120 dk. süre ile 40 ºC'de inkübasyona bırakıldı. Hidroliz süresi sonunda reaksiyon kaynar su banyosunda 5 dk. kaynatılarak durduruldu. Hazırlanan standart ve enzim substrat karışımı TLC plaklarına 3 µl olarak uygulandı. Plaklara örneklerin uygulanmasından sonra ayrıştırma işlemi asetik asit: kloroform: su yürütücüsünün kullanıldığı çıkan tip ince tabaka kromotografi (TLC) ile belirlendi. Havada kurutulan plaklarda karbonhidratlar anilin difenilamin reaktifi ile boyanarak tespit edildi. Bu ajan, % 85'lik fosforik asitin 10 ml'si ile asetonun 100 ml'sine 1 gr difenilamin ve anilinden 1 ml eklenmesiyle hazırlandı (fosforik asit kullanımdan hemen önce ve en son eklendi). Hazırlanan bu reaktif plağa püskürtüldü ve 15 dk. 120 ºC'de ısıtmadan sonra renk oluşumu gözlendi. Bu yöntem kullanılarak, glukoz, maltoz ve belirlenmeyen oligosakkaritler mavi lekeler olarak gözlendi.

4. BULGULAR

4.1. Üretim Koşullarının SSF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-Amilaz Üretimine Etkisi

4.1.1. Nem düzeyinin etkisi

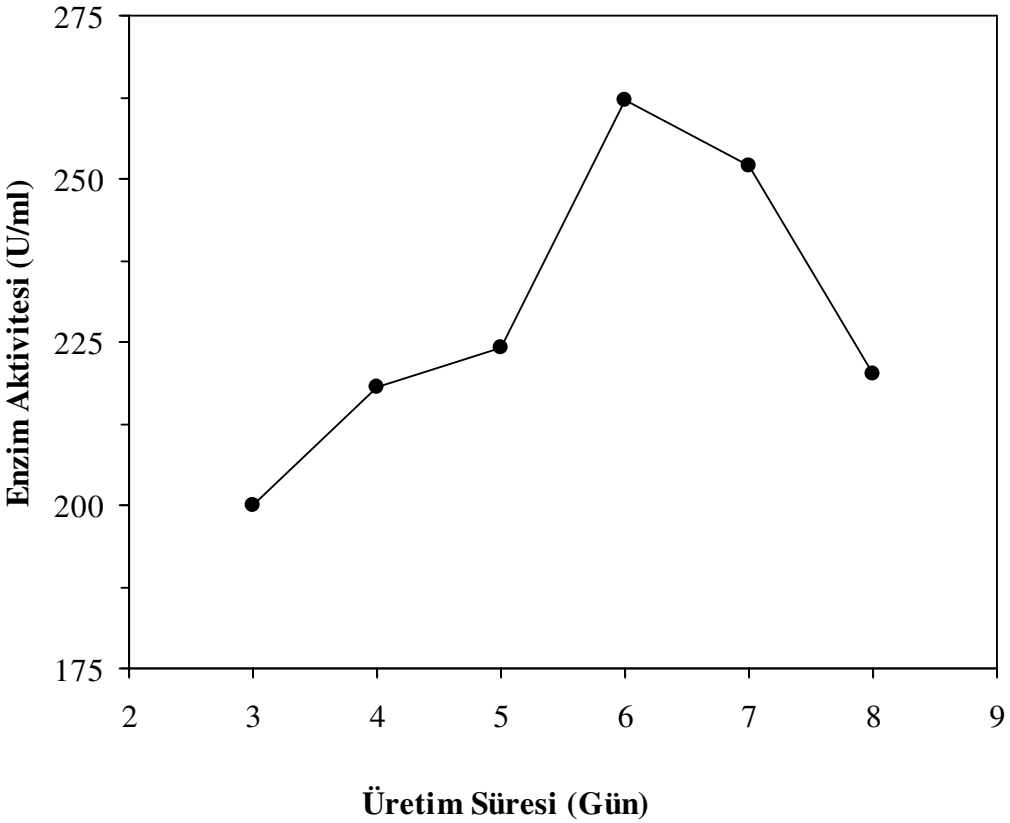
7 günlük inkübasyondan sonra % 85 nem düzeyinde α-amilaz aktivitesinin maksimum olduğu görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. SSF'de başlangıç neminin α-amilaz aktivitesine etkisi

4.1.2. Üretim Süresinin Etkisi

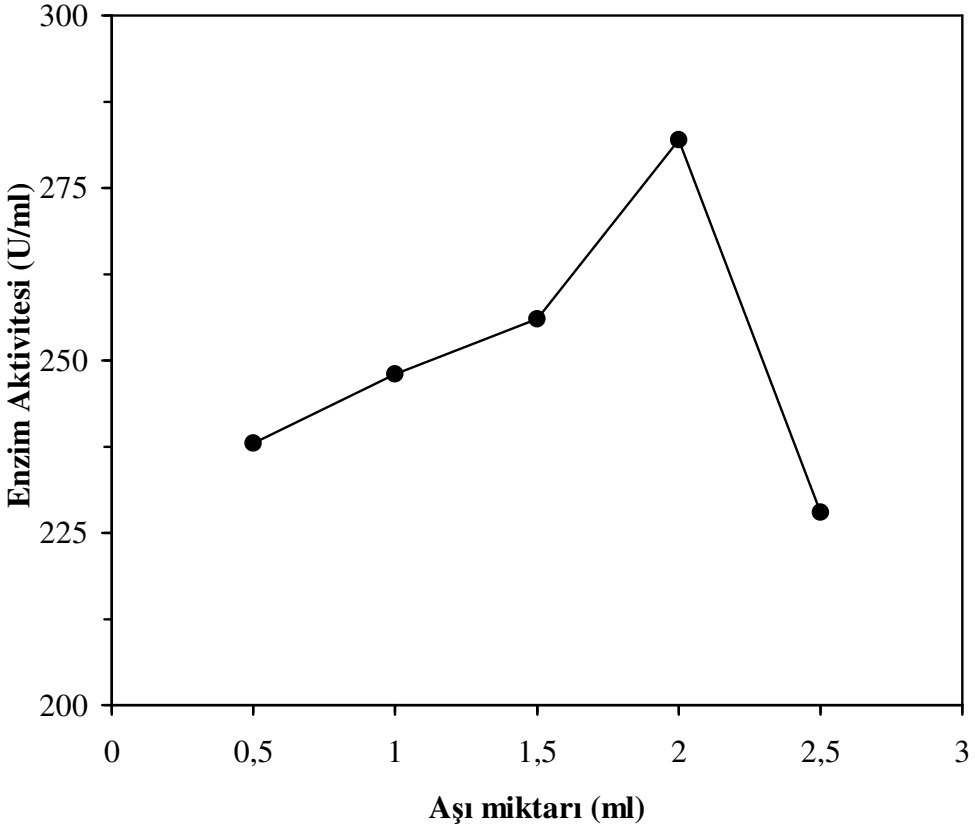
% 85 nem düzeyine sahip besiyerinin farklı üretim sürelerindeki α-amilaz üretimi incelendiğinde, α -amilazın 6. günde en fazla aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SSF'de üretim süresinin α-amilaz aktivitesine etkisi

4.1.3. Aşı Konsantrasyonunun Etkisi

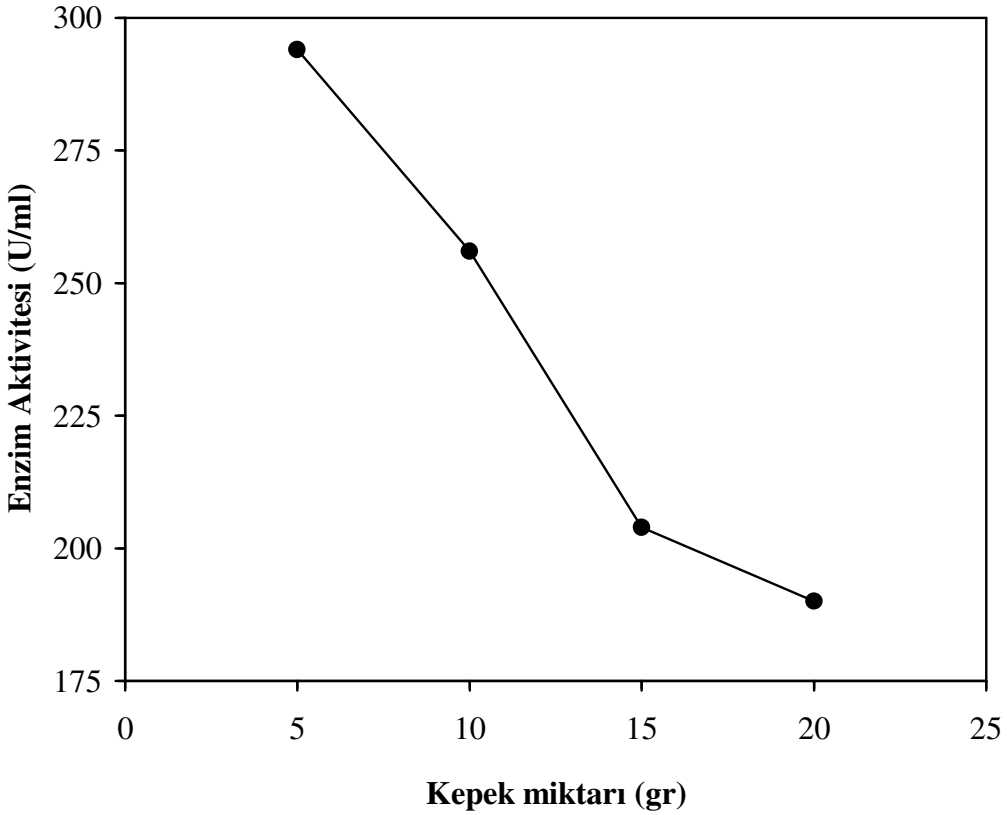
Farklı aşı miktarlarına sahip, % 85 destile su ile nemlendirilmiş besiyerlerinin 6 günlük inkübasyondan sonra ölçülen enzim aktivitelerine bakılınca en iyi α-amilaz aktivitesi 2 ml aşı içeren besiyerinin olduğu gözlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. SSF'de aşı miktarının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.1.4. Substrat miktarının etkisi

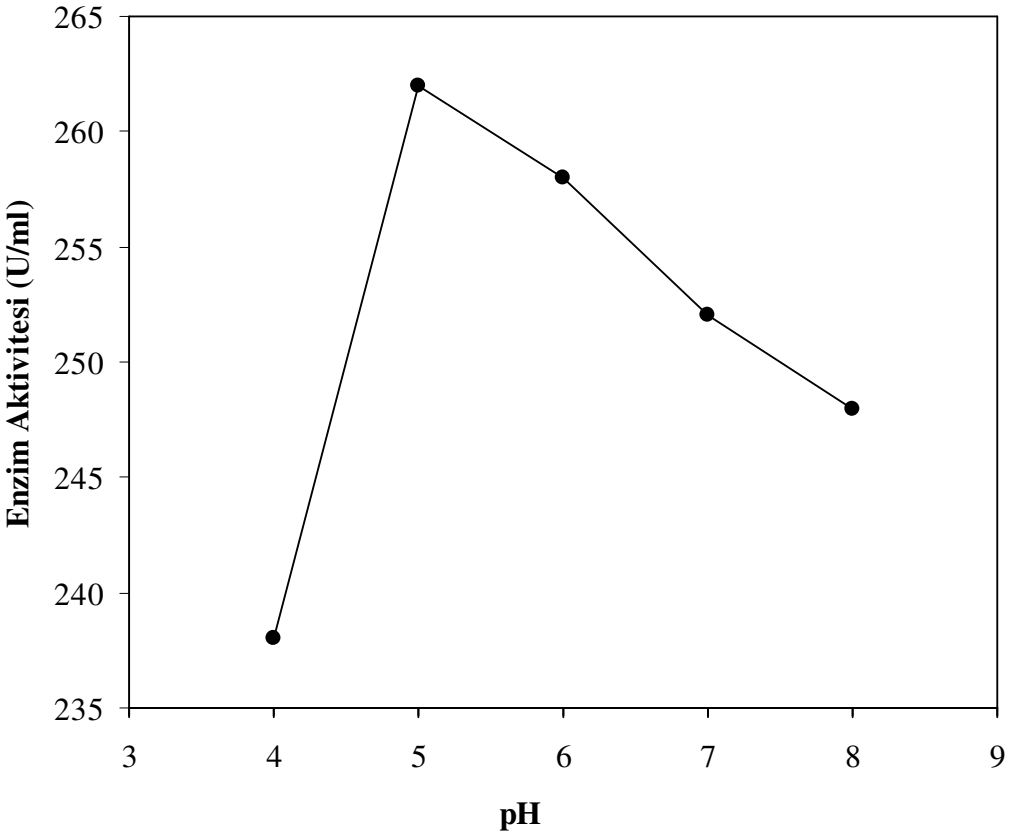
Farklı substrat miktarına sahip, % 85'lik destile su ile nemlendirilen, 2 ml spor süspansiyonu içeren üretim ortamının 6. günlük inkübasyon süresinden sonra α-amilaz aktiviteleri ölçülen besiyerlerinde 5 gr kepek içeren besiyerinde maksimum bulundu (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. SSF'de kepek miktarının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.1.5. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi

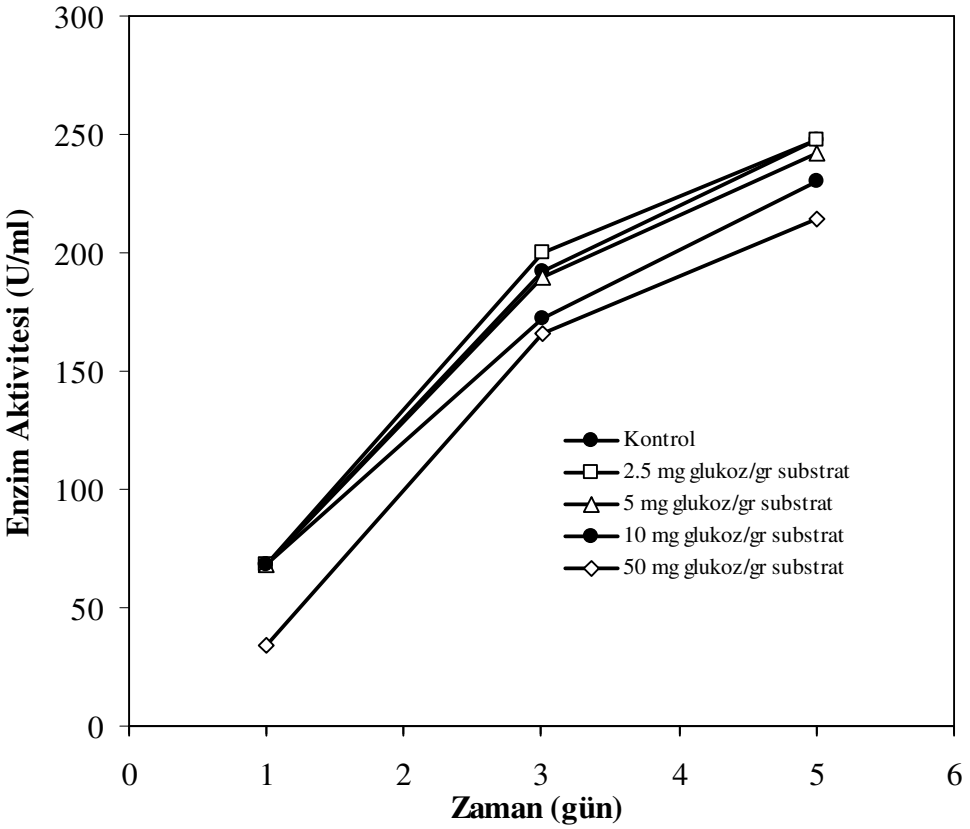
% 85' lik nem içeren 2 ml aşı yapılan ve 6 günlük inkübasyona bırakılan 5 gr'lık besiyerinin pH 5.0'te en iyi enzim aktivitesini gösterdiği belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SSF'de başlangıç pH'ının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.1.6. Glukozun katabolit represyon etkisi

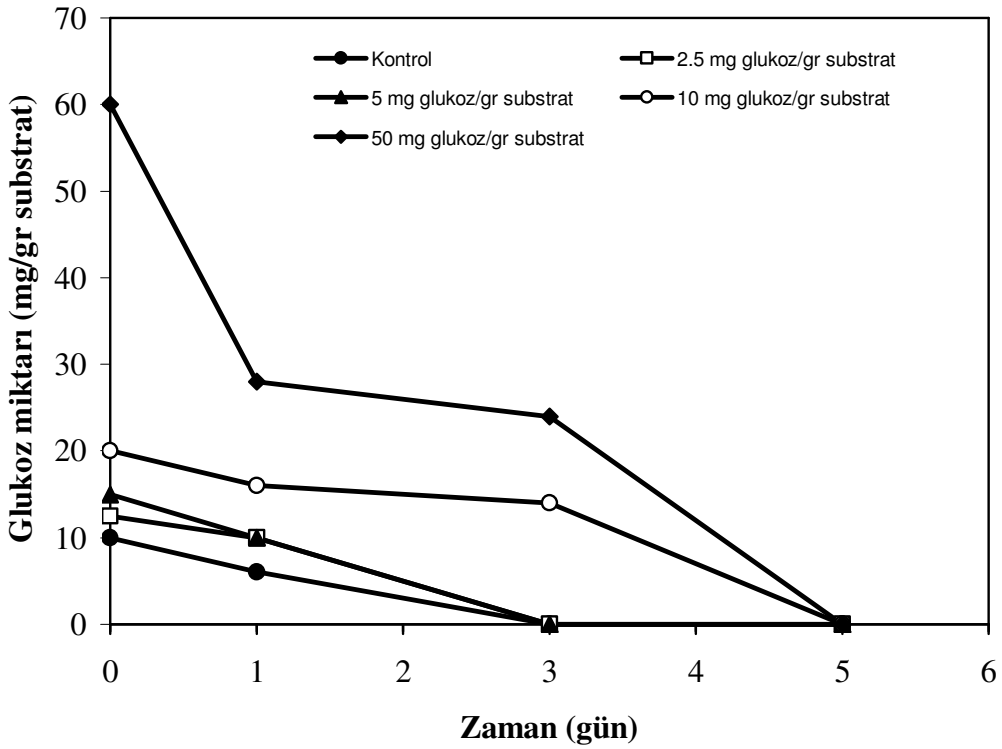
Farklı glukoz miktarları içeren *Aspergillus sclerotiorum* için belirlenmiş optimum SSF ortamlarının α-amilaz aktivitelerine bakıldığında 2.5 mg/ml glukoz içeren ortamın 5. günde enzimatik aktivite maksimum değerde bulundu. Eklenen glukoz miktarı arttıkça α-amilaz aktivitesini pek fazla etkilenmediği görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. SSF'de eklenen glukoz miktarının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.1.7. Kalan glukoz miktarının belirlenmesi

SSF'de kalan glukoz miktarı incelendiğinde glukoz içermeyen ortamda, 2.5 mg ve 5 mg glukoz içeren ortamda 3. günde ortamdaki glukoz biterken, 10 mg ve 50 mg içeren örneklerde ise 5. günde bittiği gözlendi (Şekil 4.7).

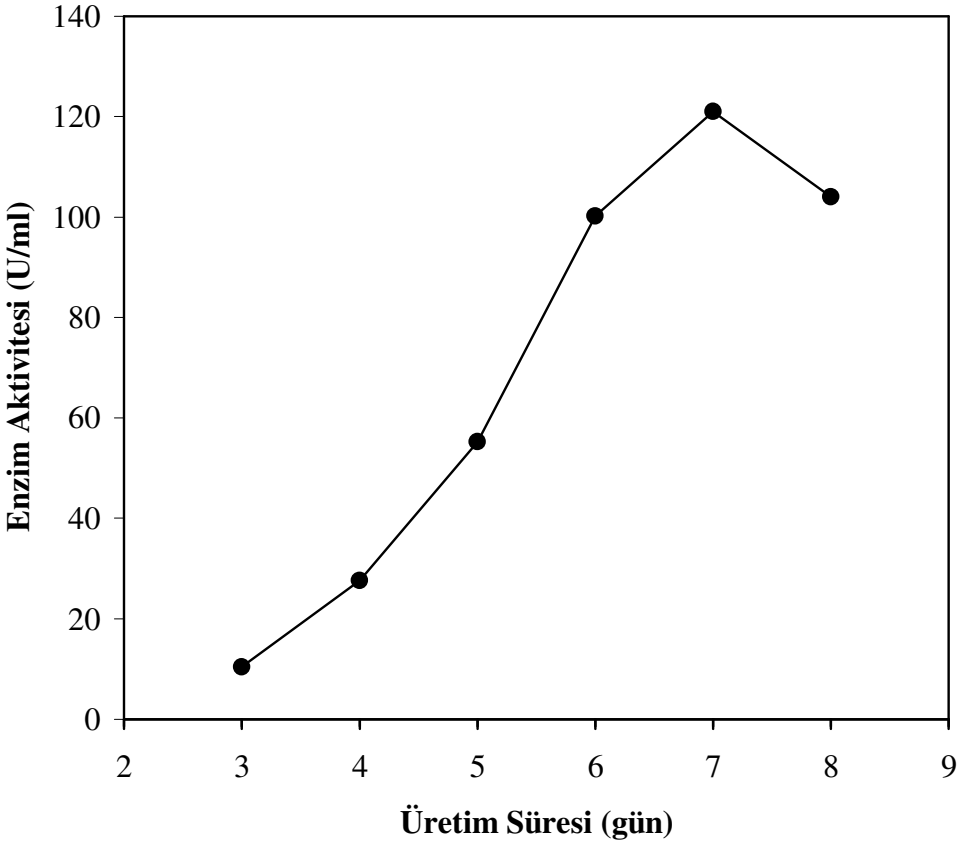


Şekil 4.7. SSF'de ortamda kalan glukoz miktarı

4.2. Üretim Koşullarının SmF'de Üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-Amilaz Üretimine Etkisi

4.2.1. Üretim süresinin etkisi

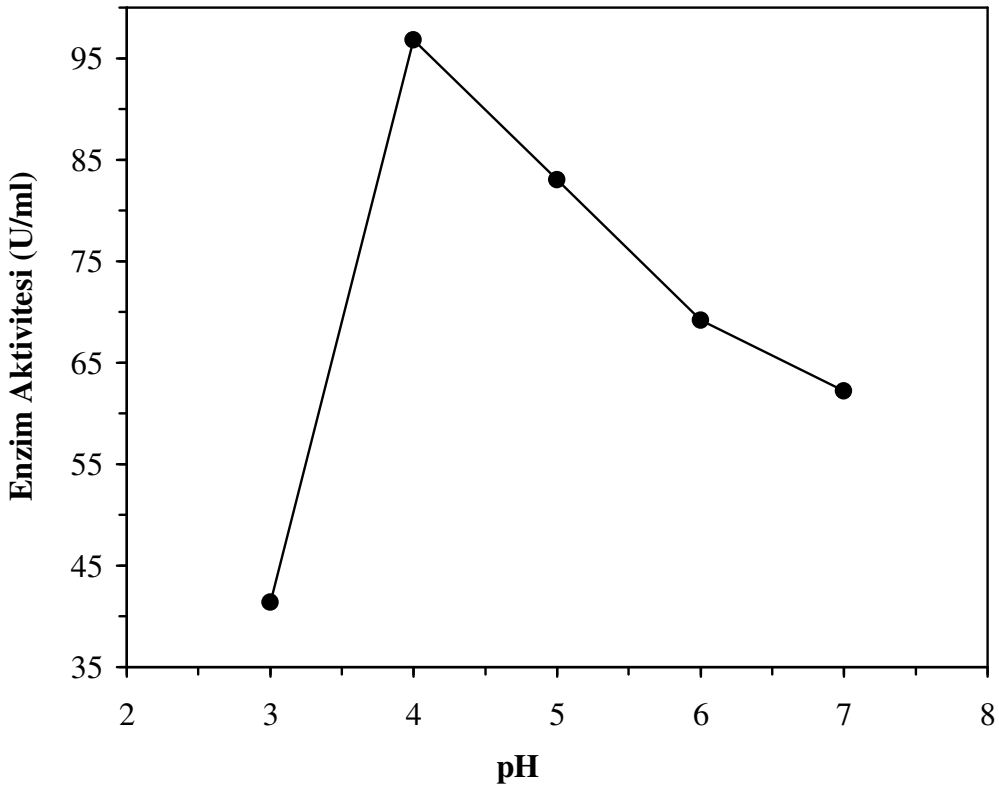
500 ml'lik erlende pH 7.0'ye ayarlanmış, 2 ml'lik aşı içeren 100 ml'lik besiyeri 30 ºC'de 200 rpm'lik çalkalamalı etüvünde inkübasyona tabi bırakıldığı 8 günlük süreçte, her gün aktivitesine bakılan α-amilaz en iyi aktiviteyi 7. günde verdiği gözlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. SmF'de üretim süresinin α-amilaz aktivitesine etkisi

4.2.2. Üretim ortamının başlangıç pH'sının etkisi

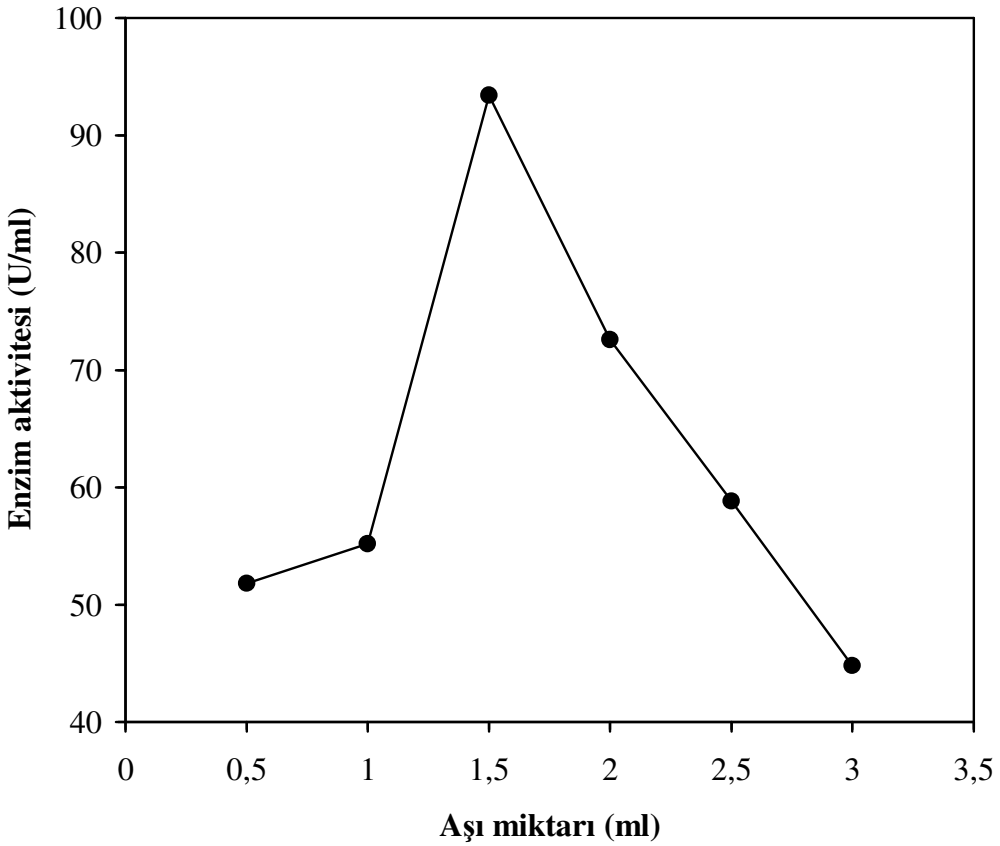
250 ml'lik erlenlerde farklı pH'larda ayarlanmış 50 ml besiyeri 30 ºC'de 200 rpm'lik çalkalamalı etüvünde 7 günlük inkübasyona bırakıldıktan sonra farklı pH'lara sahip besiyerlerindeki α-amilaz aktivitesi ölçüldü. α-amilaz aktivitesinin pH 4.0'te maksimum değerde olduğu belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SmF'de başlangıç pH'ının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.2.3. Aşı konsantrasyonunun etkisi

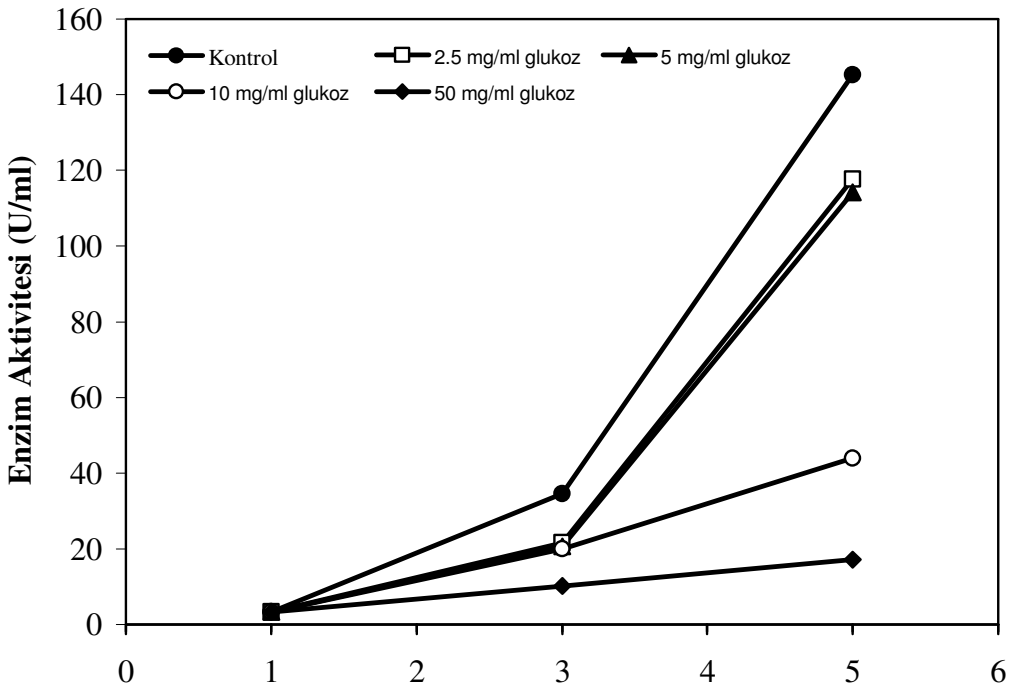
30 ºC'de 200 rpm'lik çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılan 250'lik erlenler içindeki pH'sı 4.0 olan 50 ml'lik besiyerlerinin farklı aşı miktarları incelendiğinde en iyi aktiviteyi 1.5 ml'lik aşı içeren besiyerinin gösterdiği görüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. SmF'de aşı miktarının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.2.4. Glukozun katabolit represyon etkisi

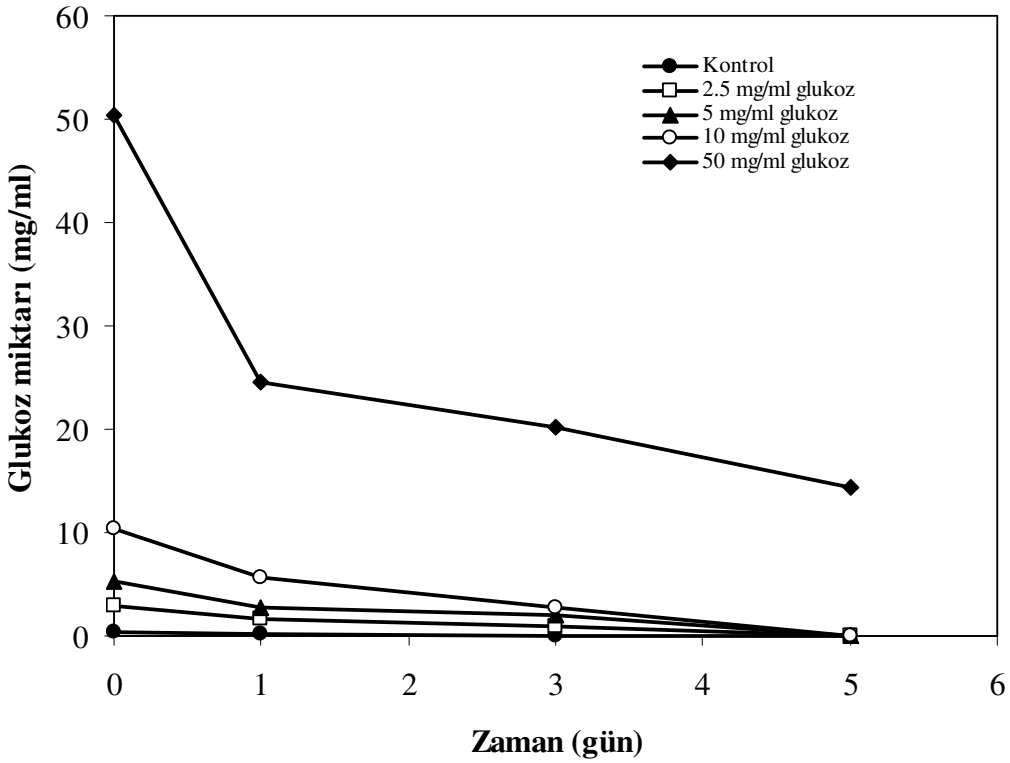
Belirlenen optimum şartlarda yapılan katabolit represyon çalışmaları, incelendiğinde α-amilaz aktivitesi glukoz içermeyen ortamda 1. günde α-amilaz aktivitesi 3.4 U\ml, 5.günde ise 145.2 U/ml bulundu. 50 mg/ml glukoz içeren de ise 5. günde 17.2 U/ml bulundu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. SmF'de eklenen glukoz miktarının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.2.5. Kalan glukoz miktarının belirlenmesi

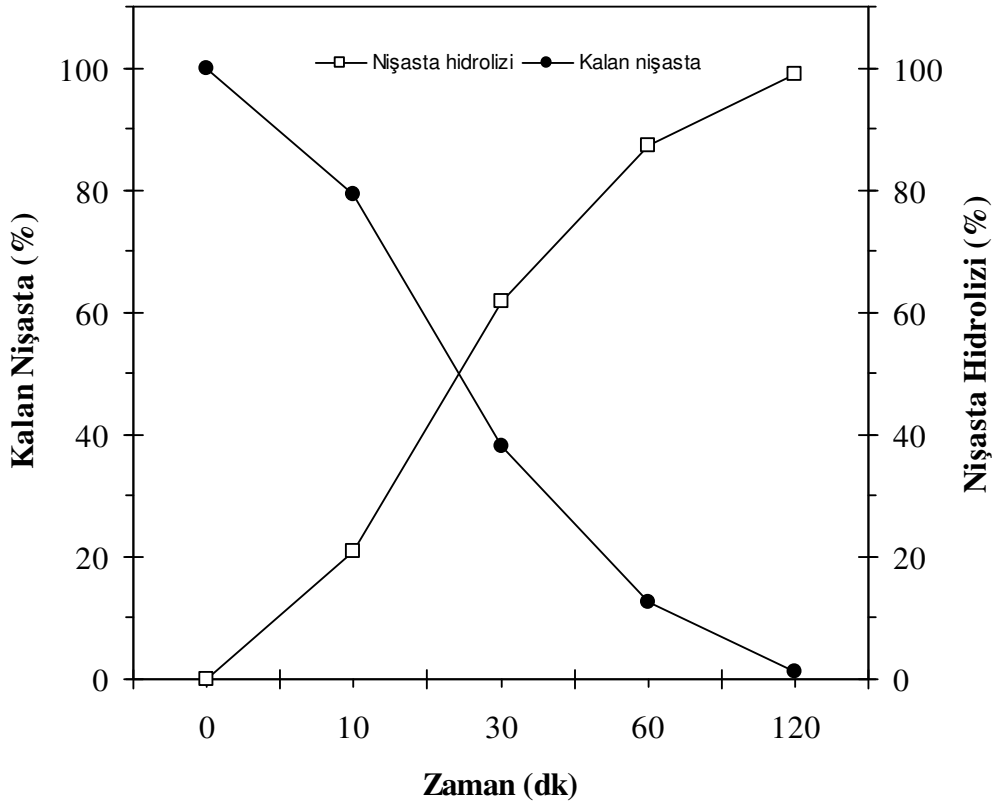
SmF'de kalan glukoz miktarı incelendiğinde, kontrol grubunun başlangıç glukoz miktarı 0.34 mg/ml ölçüldü ve üretimin 3. gününde ortamdaki glikoz miktarının bittiği gözlendi. Aşlangıç glikoz miktarı 5 mg/ml, 10 mg/ml olan ortamlarda glikozun 5. günde yok olduğu görüldü. 50 mg/ml glukoz içeren ortamda 5. günde 14.4 mg/ml glikozun varlığı saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. SmF'de ortamda kalan glukoz miktarı

4.3. Nişasta Hidrolizi

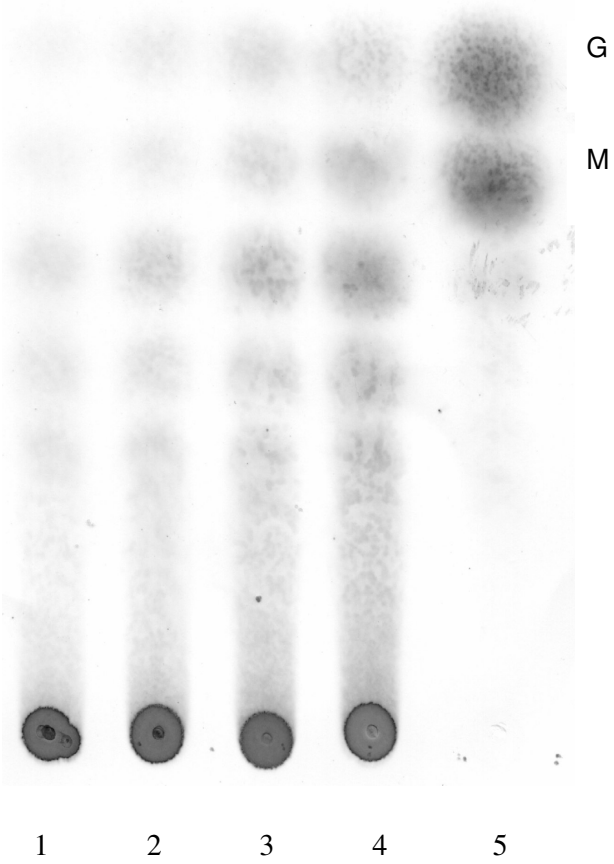
SSF'de üretilen ve maksimum aktivite gösteren enzim preparatının nişasta hidrolizi denemesinde 0., 10., 30., 60. ve 120. dakikalardaki alınan örneklerin iyot çözeltisi ile verdiği rengin şiddeti 620 nm'de okundu. 0. dakikadaki nişasta miktarı % 100 kabul edilerek her tüpteki kalan nişasta yüzdeleri hesaplandı. Bu değerlerden de hidroliz yüzdeleri belirlendi. 10.dk'da hidroliz yüzdesi % 20.8'nin, 120. dakikada ise %98.9 olarak belirlendi (Şekil 4.13). Bu bulgular *Aspergillus sclerotiorum* α-amilazının nişasta hidroliz işleminde başarı ile kullanılabileceğini gösterdi.



Şekil 4.13. α-amilazın çözünür nişasta hidrolizi

4.4. Hidroliz Ürünlerinin Analizi

Aspergillus sclerotiorum α-amilazının nişasta hidrolizi denemesinde 0., 10., 30., 60. ve 120. dakikalarda alınan örnekler ince tabaka kromotografisi ile incelendiğinde hidroliz ürünlerinin; maltoz, tanımlanamayan oligosakkaritler ve glukoz olduğu görüldü. Bu ürünler *Aspergillus sclerotiorum* α-amilazının endo-etkili bir amilaz olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. Hidroliz ürünlerinin TLC analiz sonuçları; 1: 10. dakikadaki hidroliz, 2: 30. dakikadaki hidroliz, 3: 60. dakikadaki hidroliz, 4: 120. dakikadaki hidroliz, 5: Standart, G: Glukoz, M: Maltoz

4.5. *A. sclerotiorum* α-amilazının SSF ve SmF'deki optimum üretim şartları

α-Amilaz enzimi A.sclerotiorum'dan SSF ve SmF teknikleri ile üretilmiş ve ütretim şartları optimize edilmiştir. Her iki üretim şeklinin optimum şartları Tablo 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. *A. sclerotiorum* α-amilazının SSF ve SmF'deki optimum üretim şartları

SSF	**Optimum Şart**	**SmF**	**Optimum Şart**
Üretim süresi	6. gün	Üretim süresi	7. gün
Başlangıç pH	5.0	Başlangıç pH	4.0
Aşı konsantrasyonu	2 ml	Aşı konsantrasyonu	1.5 ml
Nem düzeyi	% 85		
Substrat miktarı	5 gr		

5. TARTIŞMA

α-Amilaz nişasta endüstrisinde geniş kullanım alanına sahiptir. Bu yüzden de α-amilaz üretimi için yeni metodlar geliştirmek çok önemlidir. Bu yeni uygulamalardan biri; enzim üretiminde düşük fiyatlı bir üretim metodu olan SSF'nin kullanımıdır. Bu çalışmada SSF *Aspergillus sclerotiorum*'dan α-amilazın yüksek düzeylerinin üretiminde oldukça ucuz bir yol olarak kullanılmıştır.

SSF'deki nem içeriği çalışmalarında; *Aspergillus sclerotiorum*'un % 85 nem içeriğinde maksimum seviyede α-amilaz sentezlediği belirlendi.

SSF kültür ortamında, *Bacillus licheniformis M27*'nin % 65 nem içeriğinde maksimum düzeyde α-amilaz ürettiği (Nandakumar vd., 1999), % 60 nem içeren SSF'de *B. coagulans*'ın tarafından maksimum düzeyde α-amilaz (Nandakumar vd., 1996), % 70 nem içeren SSF kültüründe *A. niger*'in maksimum düzeyde pektinaz (Solis-Pereira vd., 1993)., % 53 nem içeren SSF kültüründe ise *A. niger*'in maksimum düzeyde fitaz (Papagianni vd., 1999), % 74 nem içeren SSF kültüründe *A. niger 38*'in maksimum düzeyde endoglukonaz (Jecu, 2000), % 60 nem içeren SSF kültüründe ise *A. niger NCIM 1248*'in maksimum düzeyde glukoamilaz (Selvakumar vd., 1998), % 68 nem içeren SSF kültüründe *A. oryzae*'nin maksimum düzeyde α-amilaz (Ramachandran S. vd, 2004), % 73 nem içerdiğinde *A. tamarii*'in maksimum düzeyde amilaz ürettiği (De Souza ve Peralta, 2001) literatürde belirtilmektedir.

SSF'de nem düzeyi üretilen enzim ve mikroorganizma çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

SSF'deki üretim süresi çalışmalarında, *Aspergillus sclerotiorum*'un 6. günde (144. saat) maksimum α-amilaz ürettiği gözlendi.

SSF'de, *Aspergillus flavus*'un maksimum α-amilaz üretiminin 48. saatte (Viswanathan vd., 2001) *Bacillus coagulans*'ın maksimum α-amilaz üretiminin de 48. saatte (Babu ve Satyanarayana, 1995), *Aspergillus oryzae*'nin maksimum α-amilaz üretimi 56-60. saatleri arasında (Shah vd., 1991), *Gibberella fujuikuroi*'nin maksimum α-amilaz üretimi 120. saatte (Mulimani vd., 2000), *A. niger 38*'nin maksimum endogulukonaz üretimi 96. saatte (Jecu , 2000) olduğu belirtilmektedir.

Üretim süresi açısından bulgularımız, *Giberelle fujikuroi*'nin bulgularına benzerlik göstermektedir.

Aşı konsantrasyonu değerine bakıldığında 2 ml aşı içeren SSF kültüründe *Aspergillus sclerotiorum*'un maksimum α-amilaz ürettiği görüldü.

Yapılan daha önceki çalışmalarda ise *Bacillus sp. PS-7*'nin 2.5 ml aşı içeren SSF kültüründe maksimum α-amilaz ürettiği (Sodhi vd., 2005), *Aspergillus niger*'inde 3 ml aşı içeren SSF kültüründe maksimum fitaz ürettiği (Papagianni vd., 1999), *A. niger 38*'in 0.5 ml aşı içeren SSF kültüründe maksimum endogulukonaz ürettiği (Jecu , 2000), *Aspergillus oryzae*'ninde 2 ml aşı içeren SSF kültüründe maksimum α-amilaz ürettiği (Ramachandran vd., 2004) bildirilmiştir.

SSF'de *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz üretiminin 5 gr substrat içeren besiyerinde maksimum olduğu gözlendi.

Benzer olarak, *A. niger NCIM 1248*'in 5 gr substrat içeren SSF kültüründe maksimum gkukoamilaz ürettiği (Selvakumar vd., 1998), *A. oryzae HS-3*'nin da 5 gr substrat içeren SSF kültür ortamında maksimum amiloglukozidaz ürettiği (Singh vd.,

2001), *A.oryzae (IFO-30103)*'ün 5 gr substrat içeren SSF kültüründe maksimum α-amilaz ürettiği (Ramachandran vd., 2004a) bildirilmiştir.

Aspergillus sclerotiorum'dan SSF'de α-amilaz üretimi için, üretim başlangıç pH'sının etkisi araştırıldığında optimum pH'sı 5.0 olarak bulundu.

SSF'de, *Bacillus sp. PS-7*'de pH 5.0-6.0'da maksimum α-amilaz ürettiği (Sodhi vd., 2005), *Aspergillus sp. A3*'nin pH 5.0'de maksimum glukoamilaz ürettiği (Ellaiah vd., 2002), *Aspergillus niger*'in pH 4.5'de maksimum pektinaz ürettiği (Solis-Pereira vd., 1993), *Aspergillus niger 38*'in pH 5.0'de maksimum değerde endoglukonaz ürettiği (Jecu, 2000), *Aspergillus oryzae'*nın ise pH 7.0'de maksimum α-amilaz ürettiği (Rahardjo vd., 2005), *Bacillus coagulans*'ın pH 7.0'de maksimum değerde α-amilaz ürettiği (Babu ve Satyanarayana, 1995), bildirildi.

Çalışmanın bu bölümünde başlangıç glukoz miktarının *Aspergillus sclerotiorum*'dan SSF'de ve SmF'de α-amilaz üretimine etkisi araştırıldı. Glukozun her iki üretim şekli içinde katabolit represyon etkisi gösterip göstermediği belirlendi. SSF ortamında üretilen materyaller incelendiğinde, 0 ve 2.5 mg/gr glukoz içeren örnekte 5. günde enzim aktivite 248 U/ml olduğu gözlenirken, 50 mg/gr glukoz içeren materyalde 5. günde aktivitenin 214 U/ml olduğu belirlendi. Sonuçlardan da anlaşıldığı gibi denenen en düşük glukoz konsantrasyonundaki aktivite (248 U/ml), en yüksek konsantrasyon olan 50 mg/gr glukoz içeren ortamdaki aktivite (214 U/ml) kontrol (248 U/ml) ile kıyaslandığında anlamlı bir azalış gözlenmemiştir. Glikozun SSF'de *A. sclerotiorum*'dan α-amilaz üretimi üzerine katabolit represyon etkisi yoktur.

Bacillus licheniformis M27 ve *Aspergillus* türleri üzerinde glukozun katabolit represyon etkisi incelendiğinde, SSF'de α-amilaz aktivitesine pek bir etkisi olmadığı (Nandakumar vd., 1999), glukozun katabolit represyonun *A. tamarii* üzerindeki etkisi de

incelendiğinde glukozun katabolit represyona etkisi olmadığı (De Souza ve Peralta, 2001,) bildirildi.

Aspergillus sclerotiorum'un SSF'de kalan glukoz miktarı incelendiğinde glukoz içermeyen ortamda, 2.5 mg ve 5 mg glukoz içeren ortamda 3. günde ortamdaki glukoz biterken, 10 mg ve 50 mg içeren örneklerde ise 5. günde bittiği gözlendi. Ortamda kalan glukoz miktarı, başlangıç glukoz miktarına göre azalma gösterdi.

SmF'de *Aspergillus sclerotiorum*'un optimizasyon koşulları incelendiğinde 7. günde maksimum α-amilaz ürettiği görüldü.

SmF kültüründe *Aspergillus niger*'in 144. saatte maksimum fitaz ürettiği (Papagianni vd., 1999), *Aspergillus oryzae*'nin 126-144. saatleri arasında maksimum α-amilaz ürettiği (Shah vd., 1991), *Alteromonas sp. TAC 24OB2*'nin 4. günde maksimum α-amilaz enzim ürettiği (Chessa vd., 1999) bildirilmiştir.

SmF kültür ortamı başlangıç pH'sının *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz sentezine etkisinin araştırıldığı çalışmada, pH'sı 4.0 olan ortamda α-amilaz sentezinin maksimum olduğu bulunmuştur.

SmF kültür ortamı başlangıç pH'sı, *Aspergillus niger CFTRI 1105* için 4.5 (Nandakumar vd., 1999), *Bacillusl licheniformis M27* için pH 7.1 ± 0.1 (Ramesh ve Lonsane, 1991), *Aspergillus oryzae* için pH 6.5-6.6 (Shah vd., 1991), *Aspergillus awamori* için pH 4.5 (Viswanathan ve Surlikar, 2001) olarak bildirilmiştir.

Aspergillus sclerotiorum için SmF'deki kültür ortamı aşı konsantrasyonu çalışmalarında 1.5 ml aşı içeren örneklerde α-amilaz aktivitesinin maksimum olduğu gözlendi.

Aspergillus niger CFTRI 1105'in 1.0 ml aşı konsantrasyonu içeren SmF kültüründe (Nandakumar vd., 1999), *Bacillus licheniformis M27*'nin 1.5 ml aşı konsantrasyonu içeren (Ramesh ve Lonsane, 1991) SmF kültüründe maksimum enzim ürettiği bildirilmiştir.

Glukozun katabolit represyon etkisi *Aspergillus sclerotiorum* için SmF ortamında incelendiğinde, 1. günde α-amilaz aktivitesi 3.4 U\ml, 5. günde ise 145.2 U/ml bulundu. 50 mg/ml glukoz içeren de ise 5. günde 17.2 U/ml bulundu. Bu da, göstermektedir ki, artan glukoz miktarına bağlı olarak SmF ortamında glukozu katabolit represyon etkisi oldukça bariz şekilde görülmektedir.

Benzer bulgular SmF'de üretilen, *A. niger CFTRI 1105* içinde (Nandakumar vd., 1999), bulunmuştur.

SmF'de kalan glukoz miktarı incelendiğinde, kontrol grubunun başlangıç glukoz miktarı 0.34 mg/ml ölçüldü ve üretimin 3. gününde ortamdaki glikoz miktarının bittiği gözlendi. Başlangıç glikoz miktarı 5 mg/ml, 10 mg/ml olan ortamlarda glikozun 5. günde yok olduğu görüldü. 50 mg/ml glukoz içeren ortamda 5. günde 14.4 mg/ml glikozun varlığı saptandı.

Aspergillus sclerotiorum α-amilazının nişasta hidroliz işlemi incelendiğinde, 0. dakikadaki nişasta miktarı % 100 kabul edildiğinde, 10.dk'da hidroliz yüzdesi % 20.8'nin, 120. dakikada ise % 98.9 olarak belirlendi

Aspergillus sp.AS-2 glukoamilzının nişasta hidrolizi incelendiğinde, 8 saat sonra nişastanın ortamdan tamamen yok olduğu (Soni vd., 2003) bildirildi.

Aspergillus sclerotiorum α-amilazı'nın nişasta hidroliz ürünleri ince tabaka kromotografisi ile incelendiğinde hidroliz ürünlerinin; maltoz, tanımlanamayan oligosakkaritler ve glukoz olduğu görüldü.

Bacillus thermooleovorans NP54 α-amilazının hidroliz ürünlerinin: glukoz, diğer oligosakkaritler, maltoz ve maltotrioz (Malthotra vd., 2000), *Bifidobacter adolescentis Int 57* α-amilazının hidroliz ürünlerinin: maltoz ve maltotrioz (Lee vd., 1999), *Bacillus brevis* α-amilazının hidroliz ürünlerinin: glukoz, maltopentoz, maltoz ve maltotrioz (Stefanova ve Emanuilova, 1992) olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak; *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz üretimi hem SSF metodu hem de SmF kullanıldığında çok farklı üretim sonuçları görülmezken katabolit represyon açısından SSF'nin daha avantajlı olduğu belirlendi. SSF'de üretilen *Aspergillus sclerotiorum* α-amilaz aktivitesi için; optimum nem miktarı % 85, üretim süresi 6. gün, aşı miktarı 2 ml, substrat miktarı 5 gr, başlangıç pH'sı 5.0 olup SmF için bu parametreler optimum üretim süresi 7. gün, başlangıç pH'sı 4.0, aşı miktarı 1.5 ml olarak belirlendi. *Aspergillus sclerotiorum* α-amilazının çözünür nişastayı 2 saat sonunda % 98.9 gibi yüksek hidroliz yüzdesi ile hidrolizlediği gözlendi. SSF'nin SmF'ye göre uygulaması daha basit, daha ekonomik, kontaminasyon riski daha az olduğu bu tez kapsamında da gözlendi.

Aspergillus sclerotiorum belirlenen bu özellikleri doğrultusunda iyi bir α-amilaz kaynağıdır ve üretim metodu olarak SSF daha uygundur. Üretilen α-amilaz enziminin biyoteknolojik uygulamalar için kullanılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Abou-Zeid A.M., 1997, Production, Purification and Characterization of an Extracellular α-Amylase Enzyme Isolated from *Aspergillus flavus*. Microbios, 89: 55–66

2. Admassu W., Korus R.A., Heimsh R.C., Lemmel S.A.; 1981, Growth of Saccharomycopsis-Fibuligera in a Continous-Stirred-Tank Fermenter, Biotechnol. and Bioengin. 23(10): 2361–2371

3. Antranikian G., 1992, Winkelmann G (Editor), Microbial Degradation of Starch. in Microbial Degradation of Natural Products, VCH, Weinheim, 27–51

4. Ası Tanju, 1996, Tablolarla Biyokimya, Tayf Ofset, 71–116

5. Babu K.R. ve Satyanarayana T., 1995, α-Amylase Production by *Thermophylic Bacillus coagulans* in Solid-State Fermentation, Process Biochemistry, 30(4), 305-309

6. Balagopalan C., Padmaja G. ve George M, 1991, Improving The Nutritional Value of Cassava Products Using Microbial Techniques, Root, Tuber, Plantains and Bananas in Animal Feeding, Fao Animal Production and Health Paper 95, 127-140

7. Bowles L.L.,1996, Amlolytic Enzymes, Food Sci. Technol., 75, 105-129

8. Boyce C.L.O., 1986, Noves Handbook of Practical Biotechnology Novo Industry A/S, Bagsvaerd, Denmark

9. Chessa J.P., Feller G., Gerday C., 1999, Purification and Characterization of the Heat Labile α-amylase Secreted by the *PsychropHilic Bacterium TAC 24OB*:, Can. J. Microbiol., 45: 452-457

10. Crabb W.D., Mitchinson C., 1997, Enzymes Involved in The Processing of Starch to Sugars,Trends Biotechnol, 15, 349-352

11. De Mot. R., 1990, Conversion of Starch by Yeast., Biotechnology and Biocatalysis, (Bioprocess Technology), 5, 163-222

12. De Souza, D.F., Peralta R.M., 2001, Production of Amylases by *Aspergillus tamarii* in Solid State Fermentation at High Initial Glucose Concentrations, Acta Scientiarum, Maringá, 23(2), 599-602

13. Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P., Srinivasulu, 2002, Optimization of Process Parameters for Glucoamylase Production under Solid Substrate Fermentation by A Newly İsolated *Aspergillus species*, Process Biochemistry, 38, 615-620

14. Emmanuel L., Stafan J., Bernard H., Abdel B., 2000, Thermophilic Archaeal Amylolytic Enzymes, Enzyme and Microbial Technology, 26, 3-14

15. Goes O. A., Sheppard J. D., 1999, Effect of Surfactants on α-Amylase Production in a Solid Substrate Fermentation Processes, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 74, 709-712

16. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B., 2003, Microbial α-Amylase: a Biotechnological perspective Process Biochemistry, 38(11), 1599-1616

17. Gutiérrez-Correa M., Villena G.K., 2003, Surface Adhesion Fermentation: A New Fermentation Category, Revista Peruana de Biología, 10 (2), 113-124

18. Hasenekoğlu İsmet, 1991, Toprak Mikrofungusları, Cilt 1, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 291–292

19. Hölker U., Höfer M., Lenz J., 2004, Biotechnological Advantages of Laboratory-Scale Solid-State Fermentation with Fungi, Applied Microbiol Biotechnol, 64, 175-186

20. Jecu L., 2000, Solid State Fermentation of Agricultural Wastes for Endoglucanase Production, Industrial Crops and Products, 11, 1-5

21. Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamoğlu M., Başpınar N., Tiftik A. M., 2000, Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, 163-165, 246-247

22. Karlson Peter, Çevirmen; Telefoncu A., 1992, Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya, Sermet Matbaa, 235-236

23. Klich Maren A.,2002, Identification of Common *Aspergillus species*, 88

24. Laderman K.A., Davis B.R., Krutzsch H.C., Lewis M.S., Griko V.V., Privalov P.K., Anfinsen C.B., 1993, The Purification and Characterization of an Extremely Thermostable α-amylase from the Hyperthermophilic Archaebacterium *Pyrococcus furiosus*, J. Biol. Chem., 268 (24), 394-401

25. Lee J.H., Ji G.E., Hwang K., Park K.H., Lee S.K., 1999, Fermentation of Rice Using Amylolitic Bafidobacterium, International of Food Microbiology, 50, 155-161

26. Li Y., Coutinho P.M., Ford C., 1998, Effect on Thermostability and Catalytic Activity of Introducing Disulfide Bonds into *Aspergillus awamori* glucoamylase, Protein Eng, 11, 661-667

27. Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudair P., Darnell J., 1997, Molecular Cell Biology, 3.Baskı, Scientific American Books, 407-411

28. Malhotra R., Satyanarayana T., Noorwez S.M., 2000, Production and Partial Characterization of thermostable and Calsium-Independent α-Amylase of on extreme thermophile Bacilllus thermmooleovorans NP54, Letters in Applied Microbiology, 31, 378-384

29. Menevşe A., Menevşe S., 1982, "Temel Biokimya" A.İ.T.İ.A. Gazetecilik ve Halkla İlişkiler Yüksek Okulu Basımevi, Ankara, 144

30. Moriera F.G., De Lima F.A., Pedrinho S.R.F., Lenartovicz V., De Souza C.G.M., Peralta R.M., 1999, Production of Amylase by *Aspergillus tamarii*, Revista De Microbiologia,30 (2), 157-162

31. Mulimani V.H., Patil G.N., Ramalingam, 2000, α-Amylase Production by Solid State Fermentation: a New Oractical Approach to Biotechnoloy Courses, Biochemical Education, 28, 161-163

32. Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W., Çevirenler:Menteş Gülriz, Ersöz Biltan, 1993, Harper'in Biyokimyası, Barış Kitabevi, 117-118, 168-169, 508-511

33. Nandakumar M.P., Thakur M.S., Raghavarao K.S.M.S., Ghildyal N.P., 1996, Substrate Particle Size Reduction by *Bacillus coagulans* in Solid-State Fermentation, Enzyme and Microbial Technology, 18, 121-125

34. Nandakumar M.P., Thakur M.S., Raghavarao K.S.M.S., ve Ghildyal N.P., 1999, Studies on Catabolite Repression in Solid State Fermentation for Biosynthesis of Fungal Amylases, Letters in Applied Microbiology, 29 (6), 380-384

35. Nigam P., Singh D., 1994, Solid State (substrate) Fermantation Systems and Their Applications in Biotechnology, J. Basic Microbiol., 34 (6), 405-423

36. Papagianni M., Nokes S.E. ve Filer K., 1999, Production of phytase by *Aspergillus niger* in Submerged and State Fermentation, Process Biochemistry, 35 (3-4), 397-402

37. Pérez-Guerra N., Torrado-Agrasar A., López-Macias C. ve Pastrana L., 2003, Main Characteristics and Applications of Solid Substrate Fermentation, Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2 (3), 343-350

38. Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., Karanth N.G, 2002, Biochemical Engineering Journal, 13 (2),125-135

39. Rahardjo Yovita S.P, Weber F.J., Haemers S., Tramper J., Rinzema A., 2005, Aerial Mycelia of *Aspergillus oryzae* Accelerate α-amylase Production in a Model Solid-State Fermentation System, Enzyme and Microbial Technology, 36, 900-902

40. Raimbault M., 1998, General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation, EJB Electronic of Biotechnology, 1 (3), 1-15

41. Ramachandran S., Patel A.K., Nampoothiri K.M., Francis F., Nagy V., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey A., 2004, Coconut Oil Cake-a Potential Raw Material for Production of α-Amylase, Bioresource Technology, 93 (2), 169-174

42. Ramachandran S., Patel A.K., Nampoothiri K.M., Chandran S., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey A., 2004a, Alpha amylase from a Fungal Culture Grown on Cakes and Its Properties, Brazilian Archives of Biology and Technology, 47 (2), 309-317

43. Ramesh W.M:, Lonsane B.K., 1990, Effect of Metal Salts and Protein Modifying Agents on Activity of Thermosytable α-amylase Produced *Bacillus Licheniformis M27* under Solid Substrate Fermentation, Chem. Microbiol. Technol. Lebensm, 12, 129–136

44. Ramesh M.V., Lonsane B.K., 1991, Ability of a Solid State Fermentation Technique to Significantly Minimize Catabolic Repression of α-amylase Production *Bacillus licheniformis M27*, Applied Microbilogy and Biotechnology, 35, 591-593

45. Ray R.R., Nanda G., 1996, Microbial Beta-Amylases, Biosynthesis, Characteristics and Indusrtrial Applications, Crit. Rev. Microbial, 22,181–199

46. Rüdiger A, Sunna A., Antranikian G. 1994, Enzymes from Extreme Thermophilic and Hyperthermophilic Archaea and Bacteria. in; Waldmann (Ed). Carbohydrases. Handbook of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. VCH, Weinheim, 946–961

47. Saha B.C., Zeikus J.G., 1989, Microbial Glucoamylases, Biochemical and Biotechnological Features, Starch Staerke 41, 57-64

48. Selvakumar P., Ashakumary L., Pandey A., 1998, Biosynthesis of Glucoamylase from Aspergillus niger by Solid-State Fermentation using Tea Waste as the Basıs of a Solid Substrate, Bioresource Technology, 65, 83-85

49. Shah N.K., Ramamurthy V., Kothari R.M., 1991, Comperative Profiles of Fungal α-amylase Production by SmF and SSF, Biotechnology Letters, 13 (5), 361-364

50. Singh Harpeet, Soni Sanjev K., 2001, Production Of Starch-Gel Digesting Amyloglucosidase by *Aspergillus Oryzae HS-3* in Solid Substrate Fermentation, Process Biochemistry, 37, 453-459

51. 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 Synergistic Use in the Hydrolysis of Malt Starch for Alcohol Production, Process Biochemistry, 40, 525–534.

52. Solís-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegrá G.G., Gutiérrez-Rojas M., 1993, Effects of Different Carbon Source on the Synthesis of Pectinase by *Aspergillus niger* in Submerged and State Fermentations, Applied Microbilogy and Biotechnology, 39, 36-41

53. Soni S.K., Kaur A., Soni K.J., 2003, A Solid State Fermentation Based Bacterial α-amylase and Fungal Glucoamylase System and Its Suitability for the Hydrolysis of Wheat Starch, Process Biochemistry, 39, 185-192

54. Stefanova M., Emanuılova E., 1992, Characterization of a thermostable α-amylase from Bacillus brevise, Eur. J. Biochem., 207, 345-349

55. Tarakçıoğlu L., 1979, Tekstil Terbiyesi ve Makinaları, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-İzmir.

56. Te Biesebeke R., Ruijter G., Rahardjo Y.S.P., Hoogschagen M. J., Heerikhuisen M., Levin A., Van Driel Kenneth G. A., Schutyser Maarten A. I., Dijksterhuis J., Zhu Ya Y., Weber Frans J., De Vos Willem M., Van den Hondel Kees A. M. J. J. Von, Rinzema Arjen ve Punt Peter J., 2002, *Aspergillus Oryzae* in Solid-State and Submerged Fermentations, Science Direct-FEMS Yeast Research, 2 (2), 245-248.

57. Telefoncu A., 1997, Enzimoloji, Ege Üniversitesi Yayınevi, 1-3, 139-144, 256

58. Ustaçelebi Ş., Mutlu G., İmir T., Cengiz A. T.,Tümbay E., Mete Ö., 1999, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 76-77

59. Vihinen M., Mantsala P., 1989, Microbial Amylolytic Enzymes, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 24 (4), 329-418

60. Viniegra-González G. ve Favela-Torres E., Aguilar Cristobal N., De Jesus Rómero-Gomez S., Díaz-Godínez G., Augur C., 2003, Advantages of Fungal Enzyme Production in Solid State over Liquid Fermentation Systems, Biochemical Engineering Journal, 13, 157-167

61. Viniegra-González Gustavo ve Favela-Torres Ernesto, 2006, Why Solid State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression?, Food Technol. Biotechnol., 44 (3), 397-406

62. Viswanathan P., Surlikar N.R., 2001, Production of α-amylase with *Aspergillus flavus* on Amaranthus Grains by Solid State Fermentation, J. Basic Microbiol., 41 (1), 57-64

63. Wilson J.J., Khactourians C.G., Ingledew W.M., 1982, Schwanniomyces: SCP and ethanol from starch., Biotechnol. Letters, 4, 333–338

64. Wambutt R., Riesenberg D., Kruger M., Schultze M., 1984, Formation of Extracellular α-amylase by *Bacillus subtilis* in relation to guanosine polyphosphates, Z.Allg. Microbiol., Pub Med, 24 (8), 575-579