T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİ İLE *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'DEN PROTEAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI

Sedat KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Haziran 2011

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Sedat KAYA tarafından yapılan "Katı Faz Fermantasyon Yöntemi ile *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den Proteaz Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Araştırılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan:	Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL
Üye :	Doç. Dr. Veysel TOLAN
Üye :	Doç. Dr. Fikret UYAR (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 30/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../ 07 /2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez konumun seçiminde, planlamasında, deneysel çalışmalarım için gerekli kimyasal ve teçhizatların sağlanmasında ve tezimin yazımında bilgi ve desteğiyle yol gösterip bana örnek olan yardımlarını hiç esirgemeden bütün desteğiyle her an her konuda yanımda olan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fikret UYAR'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım sorunları aşmak için çözüm yolları bulmak adına bilgisini esirgemeyerek destek veren ve yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren, yol gösteren ve laboratuvar çalışmalarıma katkıda bulunan ikinci tez danışman hocam Siirt Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurullah AKCAN'a, teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım ve tez yazım aşaması sırasında desteğini esirgemeyen Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL'a ve Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ'a teşekkür ederim.

Manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Birgül OTLUDİL ve Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN' a teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım BARIŞ ENEZ, BESİ SERİN ve YUSUF ÖNEN'e, teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuarı'nda yardımlarını gördüğüm Yüksek Lisans ve Doktora yapan arkadaşlara teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı Diyarbakır İl Kontrol Labaratuvar Şeflerinden Mehmet DENİZ'e, çeviri konusunda yardımlarını esirgemeyen sayın arkadaşlarım E.Sıddık MARANGOZ'a ve Medeni AKGÜN'e teşekkür ederim.

Hep bana destek olan, varlıklarıyla daha güçlü olmamı sağlayan dostlarıma teşekkür ederim. Çok değerli arkadaşım sayın Mürvet YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca hep yanımda olan ve desteklerini, bana olan güvenlerini hep üzerimde hissettiğim aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……... I
İÇİNDEKİLER…… II
ÖZET…….. V
ABSTRACT……..... VI
ÇİZELGE LİSTESİ…… VII
ŞEKİL LİSTESİ……..... VIII
KISALTMA VE SİMGELER…… IX

1. GİRİŞ……...……...……..……1

1.1. Enzimler…….……..……..……..1

1.1.2. Proteazlar……...……..……...……2

1.1.2.1. Proteazların Genel Özellikleri……..……..……...4

1.1.2.2. Proteazların Sınıflandırılması……..……..……..……4

1.1.2.3. Mikrobiyal Proteaz Çeşitleri…….……..……..…….5

1.1.2.3.1. Ekzopeptidazlar…….……..……..……..……6

1.1.2.3.2. Endopeptidazlar……..……..……..……6

1.1.2.4. Proteazların Etki Mekanizması ……..……...……..……7

1.1.2.5. Proteaz Kaynakları……...……..……8

1.1.2.6. Proteaz Üretimi……...……..…8

1.1.2.7. Endüstriyel Açıdan Alkalin Proteazlar……...……...……9

1.1.2.8. Proteazların Endüstriyel Uygulama Alanları…….……..11

1.1.2.8.1. Deterjan Endüstrisinde Proteaz Kullanımı…..……...……..……..12

1.1.2.8.2. Fırında Pişirme Uygulamaları…….……12

1.1.2.8.3. Süt Teknolojisinde Proteazlar…….……..……13

1.1.2.8.4. Atık Arıtımı ve Dönüşümü……...……...…..……13

1.1.2.8.5. Fotoğrafçılıkta Proteaz Kullanımı…….……..……..14

1.1.2.8.6. Deri Endüstrisinde Proteaz Kullanımı…….…..……...…...…..……14

1.1.2.8.7. Tekstil Sanayinde Proteaz Kullanımı ……14

1.1.2.8.8. Et ve Balık Sanayinde Proteazların Kullanımı……15

1.1.2.8.9. Alkol ve Bira Üretiminde Proteazların Kullanımı……..15

1.2. *Bacillus* Cinsi……15

1.2.1. *Bacillus licheniformis*……..16

1.3. Katı Faz Fermantasyonu Tekniği ……17

1.3.1. SSF'in Avantajları ve Dezavantajları……21

1.3.2. SSF'i Etkileyen Faktörler……..23

1.3.2.1. Biyolojik Faktörler:……23

1.3.2.2. Fiziko-Kimyasal Faktörler……23

2. KAYNAK ÖZETLERİ……25

3. MATERYAL ve METOT……33

3.1. Materyal……..33

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ……33

3.1.1.1. Azot Kaynakları ……33

3.1.1.2. Karbon Kaynakları ……33

3.1.1.3. Deterjanlar ……33

3.1.1.4. Metal Tuzları ……33

3.1.1.5 Besi Yeri Maddeleri ……33

3.1.2. Kullanılan Aletler…….. 34

3.1.3.Biyolojik Materyal……..34

3.1.4. Mikroorganizmaların Üretimi ve Saklanması……34

3.1.5. Substrat Seçimi ……35

3.1.6. Substrat Parça Büyüklüğü ……35

3.1.7. Kullanılan Besiyerleri……35

3.1.8. SSF Besiyeri ……36

3.2. Metot……37

3.2.1. Mikroorganizma Üretimi……..……...……37

3.2.2. Çözeltiler……..……..……37

3.2.3. SSF Besiyerinde Enzim Ekstraksiyonu…….……..……38

3.2.4 Proteaz Aktivite Tayini……38

3.2.5. SSF Besiyerinde Proteaz Üretimi……...……39

3.2.6. Protein Miktar Tayini……...……..……39

3.2.7. Enzimi Üretimi Üzerine Değişik Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi……39

3.2.7.1. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi…….39

3.2.7.2. SSF Ortamında Uygun Substratın Seçimi……..40

3.2.7.3. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi……..40

3.2.7.4. SSF Ortamında Uygun Ekstraksiyon Ortamının Tespiti ……..……..……..40

3.2.7.5. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi……..41

3.2.7.6. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine pH'ın Etkisi……...…….……41

3.2.7.7. SSF Ortamında Uygun Nem Miktarının Seçimi ……41

3.2.7.8. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi……..41

3.2.7.9. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi……42

3.2.7.10. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımının Belirlenmesi.42

3.2.7.11. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Partikül Büyüklüğündeki Substratın Etkisi……..42

3.2.7.12. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi…… 43

3.2.7.13. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi……..43

3.2.7.14. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal Tuzlarının Etkisi…….……..43

3.2.7.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi……...44

4. ARAŞTIRMA BULGULARI……45

5. TARTIŞMA VE SONUÇ ……**55**

6. KAYNAKLAR……65

ÖZGEÇMİŞ……..77

ÖZET

KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİ İLE *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'DEN PROTEAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sedat KAYA

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Enzimler genelde biyoteknolojide, endüstride, yiyecek, tekstil, kağıt, tıp ve eczacılık gibi alanlarda kullanılmaktadır. Enzimler; bitkisel, hayvansal kaynaklardan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, kültür ortamında kolay çoğalmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Proteazlar endüstriyel enzim grupları içersinde önemli bir role sahiptirler. Deterjan, ilaç, dericilikte, et, süt, bira gibi gıda endüstrilerinde, boynuz, tüy, saç gibi proteinlerin hidrolizinde, X-ray filmlerindeki gümüşün geri kazanılmasında ve daha birçok endüstri alanında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda katı faz fermentasyonu (SSF) yöntemiyle *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den proteaz üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi incelendi. SSF besiyeri için pirinç kabuğu, buğday kabuğu, arpa kabuğu, pamuk sapı, mısır küspesi ve mercimek kabuğu katı substrat olarak kullanıldı. En iyi aktivite mısır küspesi elde edildiğinden dolayı sonraki çalışmalarımızda katı substrat olarak mısır küspesi kullanıldı. Proteaz için en iyi inkübasyon süresinin 24.saat olduğu belirlendi. Substratın partikül büyüklüğünün proteaz üretimi üzerine etkisini incelemek için yapılan çalışmada, 1500 μm partikül büyüklüğündeki substratta en iyi proteaz üretimi tespit edildi. Maximum proteaz aktivitesi sırasıyla pH:8,0'da ve 37^0C'de tespit edildi. İnokülüm hacmi 2 ml olarak belirlendi. Enzim üretimi üzerine azot ve karbon kaynaklarının etkisini araştırmak için yapılan çalışmada, proteaz için %1 maya özütü ve amonyum klorid ve %1 galaktoz bulunan ortamda maksimum aktivite elde edilmiştir. Kepek miktarı ve kepek karışım oranlarının etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada, proteaz için %30 kepek (%25 mısır küspesi+%5 pirinç kabuğu) bulunan ortamda en yüksek enzim üretimi belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Katı faz fermentasyonu (SSF), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, Proteaz, Mısır küspesi

ABSTRACT

THE EFFECT of SOME PARAMETERS on PROTEASE from the *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 with SOLID STATE FERMENTATION METHOD WAS EXAMINED

MSc THESIS

Sedat KAYA

DICLE UNIVERSTY
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT of BIOLOGY

2011

The usages of enzymes are used in biotechnology, industry, food, textil, paper, medicine and pharmaceutical. Enzymes obtained from microorganisms are produced by microorganisms have some advantages when compared with enzymes produced by plants or animals, they have considerably higher catalytic activity, they don't from undesirable by-products, they are more stable and relatively cheap, and they can be obtained much quantity. Proteases that are a group of industrial enzymes have an important role. Proteases were used detergent, pharmaceutical, leather, meat, milk, beer indüstries, hydrolysis of proteins such as horn, feather and hair, recovery of silver from x-ray films and used many more industries field.

In our study, the effect of various parameters on protease from the *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 with the Solid state fermentation (SSF) method was evaluated. Rice husk, wheat husk, barley husk, cotton stalk, crushed maize and lentil husk were used as solid substrate for SSF medium. The best result was gained crushed maize, therefore, crushed maize was used as solid substrate in the following studies. The suitable incubation time for the obtaining, for the protease has been determined as 24th hour. The effect of substrat particle size on the protease production was tested. Maximum protease production was detected at 1500 μm substrat particle size. Maximum protease pruductıon was detected at pH 8.0 and 37°C respectivelly. Inoculum volume was found to be 2 ml. The effect of carbon and nitrogen sources on protease pruduct were observed the highest with yeast extract and %1 galactose. The effect amount of solid substrate and mixed solid substrate on highest protease activity was investigated. The highest protease activity was observed at %30 mixed substrate (%25 Crushed maize+%5 Rice husk).

Keywords: Solid state fermentation (SSF), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, Protease, Crushed maize

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	Bazı Proteaz Kaynakları ve Endüstriyel Uygulamaları	3
Çizelge 1.2.	Bakteriyel Alkali Proteazlar, Kaynakları, Endüstriyel Uygulama Alanları ve Üreticileri	10
Çizelge 1.3.	Proteazların Bazı Endüstriyel Alanlardaki Uygulamaları	11
Çizelge 1.4.	SSF'in Tarihsel Gelişimi	20

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No **Sayfa**

Şekil 1.1. Proteazların Sınıflandırılması 5

Şekil 1.2. Proteazların Hidroliz Reaksiyon Mekanizması 7

Şekil 4.1. Uygun Substratın Seçimi 45

Şekil 4.2. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi 46

Şekil 4.3. Ssf Ortamında Uygun Ekstraksiyon Ortamının Tespiti 47

Şekil 4.4. Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi 48

Şekil 4.5. Enzim Üretimi Üzerine pH'ın Etkisi 48

Şekil 4.6. Uygun Nem Miktarının Seçimi 49

Şekil 4.7. Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi 50

Şekil 4.8. Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi 50

Şekil 4.9. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımının Belirlenmesi 51

Şekil 4.10. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Partikül Büyüklüğündeki Substratın Etkisi 52

Şekil 4.11. Proteaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi 52

Şekil 4.12. Proteaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi 53

Şekil 4.13. Proteaz Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi 54

Şekil 4.14. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi 54

KISALTMA VE SİMGELER

SSF : Katı faz fermantasyonu

SmF : Submerged fermentasyonu

YE : Maya Özütü

NB : Nutrienth Broth

LB : Laura Broth

IMC : Başlangıç nem içeriği

RGPW : Red Gram Plant Waste

TCA : Trikloroasetikasit

CSL : Corn Speed Luquor

pH_0 : Başlangıç pH'sı

aw : Su aktivite faktörü

SDS : Sodyum dodesil sülfat

BSA : Bovim serum albümin

$CaCl_2$: Kalsiyüm klorür

$CuCl_2$: Bakır klorür

$MgCl_2$: Magnezyum klorür

$ZnCl_2$: Çinko klorür

$FeCl_2$: Demir klorür

$MnCl_2$: Mangan klorür

NaCl : Sodyum klorür

Na_2CO_3 : Sodyum karbonat

$CuSO_4$: Bakır sülfat

$MgSO_4$: Magnezyum sülfat

NaOH : Sodyum hidroksit

$(NH_4)_2SO_4$: Amonyum sülfat

1.GİRİŞ

1.1. Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran, genel olarak protein yapısında olan ve organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik makromoleküllere enzim denir. Enzimler biyolojik katalizörler olmaları nedeni ile dünyamızdaki canlıların yaşamını olası kılan etmenlerin başında gelir. Enzimlerin katalitik güçleri gerçekten şaşırtıcıdır. Enzimler, molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar (Telefoncu 1997).

Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ilaç olarak yararlanmışlardır. Enzimlerin hücre dışı bir aktivitelerinin olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmacanın mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek kanıtlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchoff, buğday nişastasının zamanla şekere dönüştüğünü saptamıştır (Gupta ve ark. 2003). 1825 yılında Berzellius buğdaygillerden elde edilen enzim karışımının nişastayı sülfirik asitten daha hızlı parçaladığını saptamıştır (Gözükara 1989). Willy Kühne 1878 yılında, biyolojik reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler için "hücrede bulunan" anlamına gelen "enzim" deyimini ilk kez kullanmıştır. Çağdaş enzim kimyası çalışmaları enzimatik reaksiyonlarla ilgili Michelis-Menten varsayımı ve Sumner tarafından 1926 yılında saf olarak kristal üreaz enziminin izolasyonu ile başlamıştır (Follmer 2008).

Dünyadaki enzim talebi 2006 yılında 4.1 milyar $'a ulaşmıştır. Dünya enzim piyasasındaki bu değerin yıllık %7.6'lık bir artışla 2011 yılında 6 milyar $ olacağı beklenmektedir. Endüstride kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Proteazlar; çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira fotoğraf vb. endüstriyel alanlarda, organik sentezlerde ve atık arıtımında kullanılmaktadır (Patel ve ark. 2005; Alpan 2008).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler mikroorganizmalardan, bitkilerden, mantarlardan ve hayvanlardan elde edilmektedirler. Son yıllarda endüstriyel katalizörler olarak enzimlerin kullanımında büyük bir artış gözlenmiştir.

Bugün 3000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunların çoğu biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar yoluyla bulunmuştur. Bu kadar çeşitli enzime rağmen endüstriyel talepleri karşılamada enzimlerin yetersiz olduğu görülmüştür (Patel ve ark. 2005).

Son yıllarda diğer tekniklere oranla daha fazla ürün elde edilmesinden ötürü Katı Faz Fermantasyonu (SSF) tekniği, biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda gittikçe artan bir önem kazanmıştır. Bu teknikte, ticari önemi olmayan veya az olan, çevre kirliliğine yol açan bazı bitkisel atıkların substrat olarak kullanılmasıyla, ekonomik ve ekolojik açıdan değerlendirilebilirliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla enzim üretim kaynağı olarak elimizde bulunan bakterilerden en fazla proteaz üretimine sahip *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 kullanılacak ve uygun substrat, enzim üretim şartları belirlenecektir.

1.1.2. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Endüstride kullanılan enzimlerin %75'i hidrolitik enzimlerdir. Proteazlar da bu %75'lik kısımda yer alan üç büyük gruptan birini oluştururlar (Çelik 2006). Proteazlar enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteazlar enzim sınıfları içerisinde hem fizyolojik hem de ticari alanda büyük bir uygulama alanına sahiptirler (Mukherjee ve ark. 2008).

İnsanoğlu uzun yıllardan beri peynir, şarap ve bira üretimi gibi birçok uygulamada enzimlerin katalitik aktivitelerinden faydalanmaktadır (Pandey 2006). Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığında alkalin proteazlar %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, rennin %10, analitik enzimler %10 tripsin %3, lipaz %3 ve diğer karbonhidratları parçalayan enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır. Doğada var olan enzim sayısının 25000 olduğu tahmin edilmektedir. Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak elde edilmektedir (Adlercreutz ve ark. 1994; Schrerier 1997).

Proteolitik enzimler hem ekstrasellüler ve hem de intrasellüler olarak sentezlenirler (Kumar ve Sharma 2005). Proteazlar fizikokimyasal ve katalitik

özelliklerinde muazzam farklılıklar göstermektedirler ve bu enzimlerle ilgili yapılan çalışmaların birçoğu biyokimyasal ve biyoteknolojik yaklaşımları içermektedir (Rao ve ark. 2009; Saeki ve ark 2007). Proteazlar; fırınlama, bira yapımı, çamaşır deterjanları, deri uygulamaları, gıda endüstrisinde, etlerin yumuşatılması, organik sentezlerde, atık arıtımında, kumaş ağartma, ipek kalitesinin yükseltilmesinde, kozmetik ürünlerde, peptit sentezleri ve tıbbi teşhisler olmak üzere endüstriyel uygulamaların geniş bir kısmında önemli bir rol oynarlar (Gupta ve ark. 2002; Najafi ve Deobagkar 2005).

Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel işlemler daha ucuz ve kaliteli ürün elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır ve bu nedenle enzim pazarında oldukça büyük bir paya sahiptir (Rao ve ark. 1998). Bazı proteaz kaynakları ve endüstriyel uygulamaları Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Bazı Proteaz Kaynakları ve Endüstriyel Uygulamaları (Pandey 2008).

Mikroorganizma	**Proteaz Çeşidi**	**Endüstri**
Bakteriler		
Bacillus licheniformis	Alkalin	Deterjan
Bacillus amyloliquefaciens	Alkalin	Deterjan
Bacillus firmus	Alkalin	Deterjan
Bacillus megaterium	Alkalin	Deterjan
Bacillus pumulis	Alkalin	Deterjan
Streptomyces fradiae	Alkalin	Deterjan
Streptomyces griseus	Alkalin, Nötral	Deterjan
Streptomyces rectus	Nötral	Deterjan, Deri, Gıda
Bacillus subtilis	Nötral	Deri, Gıda
Bacillus cereus	Nötral	Deri, Gıda
Bacillus megaterium	Nötral	Deri, Gıda
Pseudomonas aeruginosa	Nötral	Deri, Gıda
Mantarlar		
Aspergillus niger	Alkalin	Deterjan
Aspergillus sofae	Alkalin, Nötral	Deterjan, Deri, Gıda
Aspergillus oryzae	Alkalin, Nötral	Deterjan, Deri, Gıda
Aspergillus flavus	Alkalin	Deterjan
Pericularia oryzae	Nötral	Deri, Gıda
Endothia parasitica	Asidik	Eczacılık, Gıda
Mucor michei	Asidik	Eczacılık, Gıda
Mucor pusillus	Asidik	Eczacılık, Gıda

1.1.2.1. Proteazların Genel Özellikleri

Proteazlar en önemli endüstriyel enzimler arasındadır. Proteolitik (protein sindirim) aktivite göstermeleri nedeniyle yüzyıllardır mandıra endüstrisinde peynir yapımı için süt-pıhtılaşma ajanları (rennet) gibi kullanılmışlardır.

Proteazlar tüm canlı sistemlerde bulunur ve çeşitli metabolik reaksiyonları katalizleyerek normal ve anormal çevre şartlarında önemli rol oynarlar. Proteazlar saprofitlerde proteinlerin parçalanması, gelişmiş organizmalarda peptidazlar ile proteinlerin belirli sinyal dizilerindeki bağların koparılması gibi çok yönlü bir role sahip olmaları ile biyosferdeki etkilerini açıkça göstermektedirler (Pandey 2006).

Proteolitik enzimlerin spesifikliği aminoasitlerin yapısı ve diğer fonksiyonel gruplar (aromatik, alifatik ve sülfür içerenler) tarafından kontrol edilmektedir. Bu enzimler sadece proteolitik reaksiyonları gerçekleştirmezler aynı zamanda karbonhidratlar ve yağların yıkımını içeren tüm metabolik reaksiyonları etkileyerek değişik metabolik reaksiyonları da düzenlerler (Sumantha ve ark. 2006).

Mikroorganizmalardaki proteolitik enzimler hücre içinde (intrasellüler), hücre duvarı ile ilişkide (periplazmik) ve bulunduğu ortama (ekstrasellüler) salgılanırlar. Ekstrasellüler enzimler genelde sellüloz, protein, nişasta gibi çözünmeyen besinlerin sindirimini gerçekleştirirler ve sindirim sonucu meydana gelen ürünler büyüme için gerekli besinler şeklinde kullanılmak üzere hücre içine alınırlar (Oh ve ark 2000; Andrade ve ark. 2002). İntrasellüler proteazlar sporlanma, farklılaşma, protein yıkımı, enzim ve hormonların üretimi, hücresel protein rezervlerinin onarımı gibi çeşitli metabolik olaylarda rol oynamaları ile hücreler için önemlidirler (Gupta ve ark. 2002).

1.1.2.2. Proteazların Sınıflandırılması

Ken McDonald (1985) tüm proteolitik enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için, peptidaz (peptit bağlarını hidrolize edenler) ve proteaz olmak üzere iki terim belirleyerek terminolojideki sorunları büyük oranda çözmüştür.

Proteazlar ayrıca kataliz ettikleri reaksiyon tipine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Nduvimana ve ark. 1995; Rao ve ark. 1998). Bu tanımlamada belirleyici olan, enzimlerin substratta etkili oldukları bölgedir.

Proteazlar katalitik mekanizmalarına ve aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruplarına göre 4 gruba ayrılmışlardır. Bunlar; serin proteazlar (EC. 3.4.21.), sistein proteazlar (EC. 3.4.22.), aspartik proteazlar (EC. 3.4.23.) ve metallo proteazlar (EC. 3.4.24) şeklindedir (Kumar ve ark. 2008).

Proteazlar aktivite gösterdikleri pH aralığına göre; asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır (Nduvimana ve ark. 1995).

1.1.2.3. Mikrobiyal Proteaz Çeşitleri

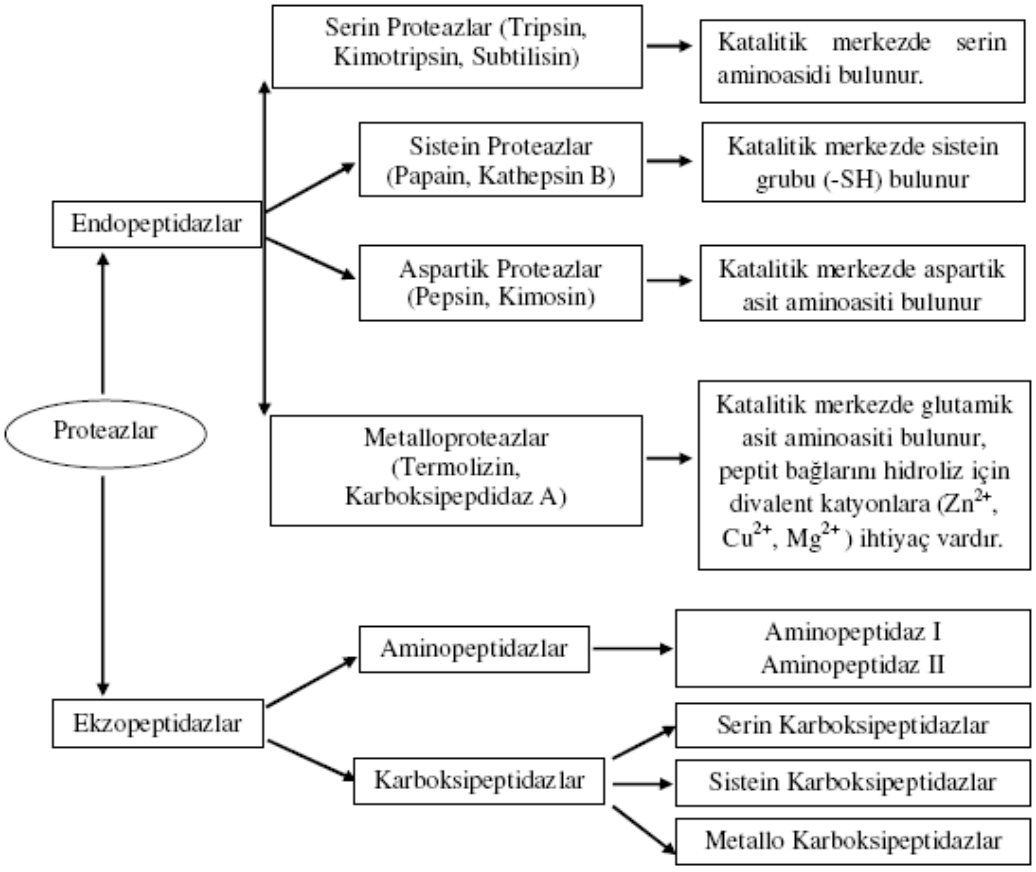
Etki özelliklerine bağlı olarak Uluslararası Biyokimya Birliği proteazları başlıca peptidazlar ve proteinazlar olmak üzere iki büyük gruba ayırmışlardır. Peptidazlar daha sonra aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılmıştır **(**El Enshasy ve ark. 2008).

1- Reaksiyon katalizi

2- Katalitik bölgenin kimyasal yapısı

3- Yapı ile bağlantılı evrimsel ilişkiler

Proteazların sistematik dağılımı Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. Proteazların sınıflandırılması **(**Kumar ve ark. 2008)

Genelde proteazlar aktif merkezlerinde katalitik bir üçlüye sahiptirler. Bu üçlü katalizin meydana geldiği aktif merkezde bulunmaktadır. Örneğin tüm serin proteazlarda bu bölge korunmaktadır. Katalitik üçlüyü histidin (His 57), serin (serin195) ve aspartik asit oluşturmaktadır. Bu aminoasitler birbirlerine yakın olarak bulunmaktadırlar ve proteazların hidroliz yeteneğinde önemli rol oynamaktadırlar

1.1.2.3.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar polipeptit zincirinin amino ya da karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler. Proteinin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz eden ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz edenler ise karboksipeptidazlar olarak adlandırılırlar. Proteazlarda, zincirin amino ucundaki ilk peptit bağını hidrolizleyen aminopeptidazlar, amino ucundaki ikinci peptit bağının hidrolizini kataliz eden endopeptidazlar, dipeptilaminopeptidazlar v.b olarak bilinirler.

Karboksipeptidazlar proteinlerin karboksil ucunda etki gösterirler. Gerçek karboksipeptidazlar bu uçtaki son peptid bağını hidroliz ederler. Dipeptidil karboksipeptidazlar ise karboksi uçta bulunan son peptid bağından bir önceki peptid bağını hidroliz ederler (Nduvimana ve ark. 1995).

1.1.2.3.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler (Nduvimana ve ark. 1995).

Serin proteazlar; aktif merkezlerindeki aspartik asit (Asp), serin (Ser) ve histidinden (His) oluşan üçlü katalitik yapılar ile karakterize edilirler. Bu yapı içinde serin, substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir elemandır (Nduvimana ve ark. 1995). Serin proteazlar alkali koşullarda aktivite göstermeleri ve kararlılıkları nedeni ile farklı endüstriyel uygulama alanlarına sahip enzimlerdir. Alkali pH değerlerinde aktif olan bu enzimler geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptirler. Molekül ağırlıkları ise çoğunlukla 18-35 kDa aralığındadır (Rao ve ark. 1998).

Sistein proteazlar; tiolproteazlar olarak de bilinir ve aktif merkezlerindeki sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterize edilirler. Sistein, substrat ile kompleks oluşturulmasında etkili olup aktif

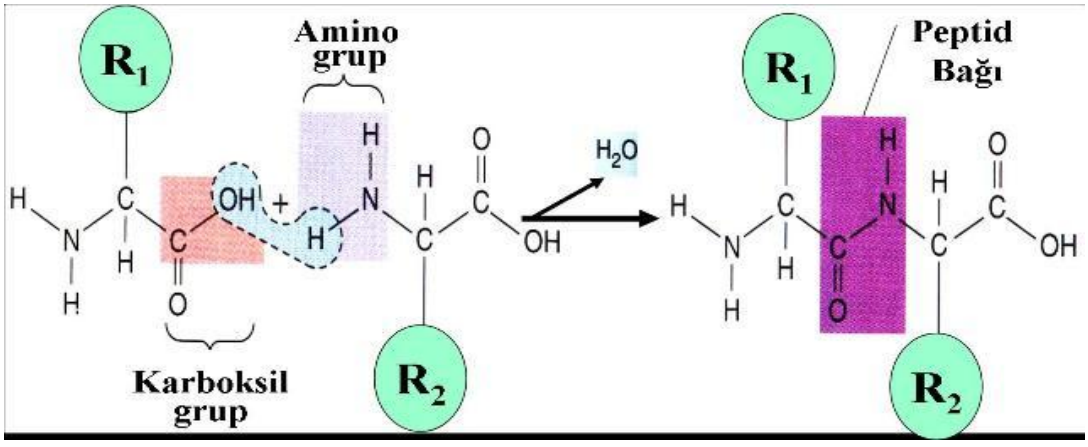
merkezlerinde bir -SH grubu içermektedirler. Bu grup, ağır metal iyonları ile okside edici ajanlarla kolayca inhibe edilmektedir.

Aspartat proteazlar; asit endopeptidazlar olarak da bilinirler. Bu enzimlerin katalitik bölgeleri iki aspartik asit içerir ve bu proteazlar genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa aralığındadır.

Metallo proteazlar; bu grup, etki mekanizması yönünden diğer protezlara göreceli olarak, en çok farklılık gösteren enzimleri içerirler. Metallo proteazlar aktiviteleri için divalent katyonlara gerek duyan enzimlerdir. Metallo proteazların yapısında katyon olarak genellikle çinko (Zn^{+2}) bulunmaktadır, bunlar EDTA gibi, şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Metallopeptidazlar nötral, alkali, miksobakter I ve II olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Nduvimana ve ark. 1995; Rao ve ark. 1998).

1.1.2.4. Proteazların Etki Mekanizması

İki amino asit yan yana geldiklerinde -COOH ve $-NH_2$ grupları arasında bağlanma meydana gelir ve bu bağa "Peptid" bağı adı verilir. Bağlanma sırasında ise bir su molekülü serbest kalır. İki amino asitin yanyana gelmesiyle oluşan peptid bağına "Dipeptid", üç veya daha fazla (yüzlerce ya da binlerce) amino asitin yanyana gelmesiyle oluşan zincirdeki peptid bağlarına ise "Polipeptid" adı verilir. Proteazların etki mekanizması şekilde görüldüğü gibidir. Reaksiyon çift yönlü olarak oluşmaktadır.



Şekil 1.2. Proteazların hidroliz reaksiyon mekanizması (Çelik, N. 2006)

1.1.2.5. Proteaz Kaynakları

Proteolitik enzimler bitki, mantar, hayvan ve mikrobiyal kaynaklarda bulunmaktadır. Bununla birlikte, mikroorganizmalar geniş biyokimyasal çeşitlilik göstermeleri ve genetik manipulasyonlara uygun olmalarından dolayı proteaz kaynakları olarak tercih edilmektedirler. Bunlar arasında fungilerin enzim üretiminde kullanımları birçok avantaj sağlamaktadır. Ekstraselüler enzimlerin fermentasyon ortamlarında geri kazanımları kolaydır (Pandey 2006).

Proteaz biyosentezinin; *Aspergillus* (Fan-Ching ve ark. 1998), *Rhizopus* (Rao ve ark. 1998) ve *Penicillum* (Farley ve ark. 1992) gibi funguslar tarafından yapılabildiği belirtilmektedir.

1.1.2.6. Proteaz Üretimi

Geleneksel olarak proteazların ticari üretimleri submerged fermentasyonunun (SmF) kullanılmasıyla başarılmıştır. Ancak yapılan son çalışmalarda SSF'in enzim üretimlerinde büyük bir potansiyele sahip olduğu kabul edilmektedir.

Proteolitik enzimler biyoteknolojik faaliyetlerin büyük bir bölümünde uygulama alanı bulurlar ve birçok endüstriyel alanlarda kullanılırlar (El Enshasy ve ark. 2008). Proteaz çeşitlerinden olan alkalin proteazlar gıda, deri, eczacılık ve deterjan endüstrileri gibi çeşitli endüstrilerde yaygın kullanımlarından dolayı en fazla çalışılmış enzim gruplarından biridir (Gupta ve ark. 2002). Aynı zamanda protein ultrafiltrasyonunda membran temizliği için kullanılmışlardır (Dayanandan ve ark. 2003). Değişik uygulamalardan biri de alkalin proteazların başlıca deterjan endüstrisinde kullanımına yöneliktir. Alkalin proteazlar proteinli lekeleri parçalama aktivitesi gösterirler (Saeki ve ark. 2007). Mikrobiyal proteazlar bakteri, fungi ve mayaların kullanılması ile katı-faz fermentasyonu ve submerged fermentasyonu gibi çeşitli yöntemlerle üretilebilirler (Haki ve Rakshit 2003).

Genel olarak mikroorganizmaların meydana getirdiği proteazlar doğada temel ve kısmen birçok kültür şartlarında indüklenirler. *Bacillus* türleri logaritmik artış öncesi ve durağan fazlarda ekstraselüler proteazları üretirler (Pandey 2006). Mikroorganizmaların ürettiği ekstraselüler proteazlar aynı zamanda C/N oranındaki farklardan, glukoz gibi kolay metabolize edilen şekerler ve metal iyonları gibi ortam bileşenlerinden yoğun

şekilde etkilenirler. Proteaz sentezi ortamdaki aminoasitler gibi hızlı metabolize edilebilen azot kaynaklarından da etkilenir (Gupta ve ark. 2003). Ayrıca havalandırma, inokülüm hacmi, pH ve inkübasyon sıcaklığı gibi diğer fiziksel faktörlerde proteaz sentezini etkilerler (Puri ve ark. 2002).

1.1.2.7. Endüstriyel Açıdan Alkalin Proteazlar

Alkalin proteazlar, bakteri, fungi, küf, maya ve böcekler gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de alkalifilik *Bacillus* türleri biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır (Anwar ve Saleemuddin 1998). Bunun nedeni çok çeşitli ortamlardan izolasyonu nispeten kolaydır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik ortamda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* türleri tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'a dayanmaktadır. Ayrıca *Bacillus* türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (Fogarty ve Kelly 1990). Alkalin proteazlar etkili enzimler olup önemli ölçüde deterjan, deri, gümüş, ilaç, yiyecek, tohum ve kimya sanayinde kullanılırlar. Bu enzimler yüksek kaliteli sindirimde kullanılırlar (Kumar ve ark. 1999).

Proteazların endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini bazı özellikleri belirler, daha önce bu alanda yapılan çalışmalarda proteaz ürünleri için fungal kültürlerde çalışılmış ve ürün miktarının kullanılan tür ve ortama göre fazlasıyla değişken olduğu ortaya konmuştur. Proteaz üretimi için etken süreçlerin geliştirilmesi, alkali proteazların endüstride birçok alanda kullanılmasında etken olmuştur. Çizelge 1.2.'de alkali proteazların güncel endüstriyel kullanım alanları, kaynakları ve üreticileri görülmektedir. Alkali proteazların yüksek pH ve sıcaklıklarda, çeşitli surfaktanların varlığında aktivite göstermeleri, bunları endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır (Kumar ve Takagi 1999; Anwar ve Saleemuddin 1998).

Çizelge 1.2. Bakteriyel alkali proteazlar, kaynakları, endüstriyel uygulama alanları ve üreticileri (Gupta ve ark. 2002)

Üretici	**Ürün İsmi**	**Mikrobiyal Kaynak**	**Uygulama Alanı**
Novo Nordisk, Danimarka	Alcalase Savinase Esparase Biofeed pro Durazym Novozyme47 1MP Novozyme 243 Nue	*B. licheniformis* *Bacillus sp.* *B. lentus* *B. licheniformis* *Bacillus sp.* Belirtilmiyor *B. licheniformis* *Bacillus sp.*	Deterjan, ipek Deterjan, tekstil Deterjan, gıda, ipek Yem Deterjan Fotoğraf Deri
Genencor International, A.B.D.	Purafact Primatan	*B. lentus* Bakteriyel Kaynaklı	Deterjan Deri
Gist-Brocades, Hollanda	Subtilisin Maxacal Maxatase	*B. alcalophilus* *Bacillus sp.* *Bacillus sp.*	Deterjan Deterjan Deterjan
Solvay Enzymes, Almanya	Opticlean Optimase Maxapem HT-proteolytic Protease	*B. alcalophilus* *B. licheniformis* *Bacillus sp.'nin* Protein mühendisliği ile üretilmiş varyantı *B. sublilis* *B. licheniformis*	Deterjan Deterjan Deterjan Alkol, içki, ekmek, yem, gıda, deri, fotoğrafik atık Gıda, atık
Amano Pharmaceuticals, Japonya	Proleather Collagenas Amano protease S	*Bacillus sp.* *Clostrodium sp.* *Bacillus sp.*	Gıda Teknik Gıda
Enzyme Development, A.B.D.	Enzeco alkaline protease-L FG Enzeco high alkaline protease	*B. licheniformis* *B. licheniformis* *Bacillus sp.*	Teknik Gıda Endüstriyel
Nagase Biochemicals, Japonya	Bioprase concantrate Ps. Protease Ps. Elastase Cryst.Protease Cryst.Protease Bioprase Bioprase SP-10	*B. sublilis* *P. aeruginoso* *P. aeruginoso* *B. subtilis(K2)* *B.subtilis(bioteus)* *B. sublilis* *B. sublilis*	Kozmetik, farmasötik Araştırma Araştırma Araştırma Araştırma Deterjan, temizlik Gıda
Jodo Shusei,	Japonya Codo Bap	*B. licheniformis*	Deterjan, gıda
Rohm, Almanya	Corolase 7089	*B. sublilis*	Gıda

1.1.2.8. Proteazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Proteazların bazı endüstriyel alanlardaki uygulamaları çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Proteazların Bazı Endüstriyel Alanlardaki Uygulamaları **(**Gupta ve ark. 2002; Pandey 2004**)**

Endüstri	**Proteaz**	**Uygulama**
Ekmek yapımı	Nötral proteaz	Hamur kalitesini arttırma
İçecek	Papain	Soğuktan etkilenmeme, içeceklerde bulanıklığın giderilmesi
Mandıra	Fungal proteazlar, simozin, diğer proteazlar	Sığır renneti yerine kesilmiş süt suyunun işlenmesi, modifiye peynir enzim üretimi
Deterjan	Alkali proteaz, subtilisin	Giysilerdeki protein lekelerinin uzaklaştırılması
Gıda üretimi	Bazı proteazlar	Soya protein veya buğday gluteni gibi zengin protein metaryallerinin modifikasyonu
Deri	Tripsin, diğer proteazlar	Derinin asitlenmesi, derilerden tüylerin uzaklaştırılması
Et ve balık	Papain, diğer proteazlar	Et yumuşatılması, kemik ve balık atıklarından protein eldesi
Tıp	Tripsin	Ölü dokunun uzaklaştırılması, kan pıhtısını çözme, doku iltihaplarının azaltılması, tıbbı ürünlerin geliştirilmesi, kontakt lensler ve takma dişlerin temizlenmesi
Fotoğraf	Bazı proteazlar	Kullanılan X-ışını ve fotoğraf filmlerinden gümüş eldesi
Tatlandırma	Termolizin	Aspartam sentezinde revers Hidroliz
Endüstriyel ve Evsel Atıkların İşlenmesi	Bazı proteazlar	Gıda endüstrilerinde ve evsel faaliyetler sonucu meydana gelen atıkların işlenmesi

1.1.2.8.1. Deterjan Endüstrisinde Proteaz Kullanımı

İlk olarak 1913 yılında pankreas ekstresi ve sodyum karbonat karışımı şeklinde patenti alınan 'biyo-ıslatma' ürününden sonra pek önemsenmeyen bu sektör, 1960 yıllarında *Bacillus subtilis* alkalin proteazının nispeten bol ve ucuz üretimi ile tekrar gündeme gelmiş ve devamlı gelişmiştir. Zamanla *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus alcalophilus* gibi suşların seçimi ile pH optimum değerleri alkaline kayan proteazlar üretilmiştir. Son zamanlarda ise, protein mühendisliği sayesinde, deterjanlarda ağartıcı madde olarak kullanılan perborata dayanıklı alkalin proteazlar kullanılmaktadır (Dağaşan 1997).

Deterjanlar proteaz, amilaz, lipaz gibi farklı enzimler içerir ve deterjan katkı maddesi olarak farklı enzimlerin kullanılması protein içerikli lekelerin yanı sıra, nişasta ve karbohidrat lekelerinin de çıkarılmasına olanak sağlar. Enzimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanılmasında etken olan başlıca özellikler; alkali pH'da çalışmaları ve deterjanlarla uyumlu olmalarıdır. Deterjan endüstrisinde genellikle subtilisinler kullanılmaktadır. Subtilisinlerin başarılı kullanımının temelinde, yüksek sıcaklıklardaki kararlılık ve yüksek substrat özgüllülüğü gibi nitelikleri yatmaktadır. Bu proteazlar her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmakta; işlevleri kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin çıkarılmasını sağlamaktadır (Maurer 2004).

1.1.2.8.2. Fırında Pişirme Uygulamaları

Proteazlar hamurun karıştırılması ve fermantasyon aşamalarında ortama ilave edilerek hamur vizkozitesi, yoğurmaya karşı direnç ve yoğurma zamanının azalması sağlanır ve böylece vizkoelastik özellikler iyileşir. Proteazın etkisiyle hem hamurun makine ile işlenebilirliği artar hem de ekmek içi yapısı gelişir (Linko ve ark. 1999; Puri ve ark. 2002).

Yüksek miktarda buğday proteini (gluten) içeren hamurların işlenmesi mekanik olarak daha zordur. Bu amaçla proteaz tipi enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Özellikle bisküvi ve kraker yapımında düşük gluten içeren unlar tercih edilmekte, ancak bunun yeterli olmadığı durumlarda proteaz tipi enzimlerle bu ihtiyaç giderilebilmektedir. Proteaz tipi enzimler ekmeğin besin değerini etkilemeden, unun yapısında bulunan gluteni hidroliz etmekte ve hamurun kolay işlenebilirliliğini sağlamaktadır (Dağaşan 1997).

1.1.2.8.3. Süt Teknolojisinde Proteazlar

Proteazlar süt işleme sürecinde kullanılan en önemli enzimlerdendir. Peynirin olgunlaşmasına yardımcı olurlar. Peynir yapımı sırasında süt proteinlerinin çöktürülmesi için chymosin (renin) adı verilen bir proteaz kullanılmaktadır. Bu enzim süt danalarının midesinin dörtüncü bölümünde bulunmaktadır. Renin süt danalarından tuzlu su ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Yetişkin hayvanların midesinde renine ilaveten pepsin de bulunur, ancak pepsin peynir yapımı sırasında istenmeyen aromalara sebep olduğu için kullanılması istenmemektedir. Bu yönde yapılan araştırmalar sayesinde bakteriyel kökenli renin elde edilmiş ve 1985 yılından itibaren tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Dağaşan 1997).

Laktik asit bakterileri, süt teknolojisinde peynir ve süt ürünlerinin yapımında çok önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur (Thomas ve Mills 1981). Bu bakterilerin salgıladıkları proteazlar sütte bulunan kazeinin peptit bağlarını kırarak kazeinin pıhtılaşmasını ve buna bağlı olarak peynirin oluşumunu sağlarlar. Laktik asit bakterileri, peynir üretiminde sütün asitlenmesi ile peynirin olgunlaşmasında işlevseldir ve özgün lezzetin oluşumuna da katkıda bulunurlar. Laktik asit bakterileri başka besinlerin fermentasyonu ve fermentasyon için uygun ortamın oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Proteazlar ayrıca gıda sektöründe bebek maması, diyet ürünleri, meyve suyu vb. ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1998).

1.1.2.8.4. Atık Arıtımı ve Dönüşümü

Boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi lifsel proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarla kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilirler. Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kümes atıklarının düzenlenmesi proteazların kullanım alanları arasındadır, bu yolla atıklar ve tüy birikintileri giderilebilmektedir.

1.1.2.8.5. Fotoğrafçılıkta Proteaz Kullanımı

Alkalin proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde önemli miktarda gümüş bulunmaktadır. Filmlerin yakılması ile yüzeyindeki gümüş geri kazanılmakta ancak bu yöntemle çevre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Bu işlemde proteazların kullanılması, gümüşün geri dönüşümü için çevre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmler üzerindeki jelatinin enzim tarafından parçalanması ile üzerinde bulunan gümüş kolayca geri kazanılmakta, proteazlar film sektöründe de giderek önemli bir yer edinmektedir (Anwar ve Saleemuddin 1998).

1.1.2.8.6. Deri Endüstrisinde Proteaz Kullanımı

En eski sanayi kollarından birisi olan dericilikte proteaz enzimleri, farkında olunmadan yüzlerce belki binlerce yıldır kullanılmıştır. Hayvan derileri epidermis denilen ve kıl kökleri ile yağ ve ter bezlerini içeren dış deri, korjium denilen ve kollajen fiberleri ile elastin ve diğer proteinleri içeren esas deri ve nihayet deriyi besleyen damarları da içeren bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu enzimlerle, tabaklama işlemleri sırasında ıslatma, kireçlik-kıl dökme ve sama işlemi gibi üç ayrı uygulama yapılmaktadır (Dağaşan 1997). Deri endüstrisinde enzim kullanımı ile hayvan derilerinin daha düzgün bir yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır (Anwar ve Saleemuddin 1998).

1.1.2.8.7. Tekstil Sanayinde Proteaz Kullanımı

Ham ipek, sericin adı verilen mumsu ve mat bir protein kılıfı ile sarılıdır. Tipik ipek parlaklığının ve yumuşaklığının ortaya çıkabilmesi için sericinin ağartma adı verilen işlemle çözülmesi gerekmektedir. Bu operasyon geleneksel olarak ipek çilelerini sabunlu ve sodalı suda kaynatarak yapılmaktadır ve kayıplara neden olmaktadır. Alkalin proteaz enzimi non-iyonik bir ıslatıcıyla pH:8.0 civarında 50–55°C kullanılarak 1-2 saatte ekonomik bir şekilde ağartma işlemi yapılabilir. Böylece ipek kalitesi yükseldiği gibi kayıplar da asgariye indirilebilir (Dağaşan 1997).

1.1.2.8.8. Et ve Balık Sanayinde Proteaz Kullanımı

Et endüstrisinde papain, fisin ve bromelain gibi bitkisel proteazlar ile fungal proteazlardan et yumuşatma (tenderizasyon) amacıyla yararlanılmaktadır. Bu proteolitik enzimler etteki elastin ve kollajeni kısmi hidrolize uğratarak etin yumuşamasına neden olurlar. Bu etki özellikle kas fibrillerini tutan sarkolemma ve benzeri kas doku bölgelerinde olmaktadır. Kas fibrillerindeki aşırı proteolitik parçalanma, etin lapalaşma şeklinde istenmeyen bir değişikliğe uğramasına neden olur. Etin rigor mortis (ölüm sertliği) fazındaki sertliğinden uzaklaşarak daha fazla yumuşaması ise, ette doğal olarak bulunan ve Ca^{+2} tarafından aktive edilen proteazlar ile katepsinler tarafından gerçekleşir (Claus ve ark. 1986).

Et ve balık işleme sanayinde bunlardan başka balık protein hidrolizatlarının elde edilmesinde, bazı kabuklu deniz hayvanlarının etlerinden ayrılmasında ve kabukların açılmasında proteolitik enzimler kullanılmaktadır. Proteince zengin bazı sebze ve meyvelerden örneğin soyadan yapay et elde edilmesinde de proteazlardan yararlanılmaktadır (Patel ve ark. 2005).

1.1.2.8.9. Alkol ve Bira Üretiminde Proteaz Kullanımı

Bira teknolojisinde üretim sürecini kısaltmak, yatırım ve işçilik giderlerini en az düzeye indirmek için bu dalda enzim kullanımının esas amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla en çok alfa amilaz ve proteazlardan yararlanılmaktadır.

Proteazlardan biracılıkta biyolojik olmayan bulanıklığı engellemek amacıyla da yaralanılmaktadır. Birada biyolojik ve biyolojik olmayan iki tip bulanıklığa rastlanmaktadır. Biyolojik bulanıklığın nedeni mikroorganizmalardır. Biyolojik olmayan bulanıklık ise, biradaki protein ve taninin gözle görülebilir partiküller halinde kompleksler oluşturmasından kaynaklanmaktadır (Claus ve ark. 1986).

1.2. *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsinin üyeleri mezofiller ve ekstremofilleri içeren çubuk şeklinde, endospor formundaki gram-pozitif bakterilerdir. *Bacillus*'ların vejetatif hücreleri tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. 0.5x1.2µm–2.5x10µm büyüklükte olan hücrelerin yuvarlak veya köşeli şekilde görünümleri vardır (Rosovitz ve ark. 1998; Tunail ve Köşker 1986). *Bacillus* türleri toprak ve bununla ilişkili nehirler, nehir

ağızları ve kıyı suları gibi su kaynakları ve bitkileri de içeren ortamlarda en fazla yayılış gösteren mikroorganizmalardır (Telefoncu ve ark. 1997; john 2009). Çok farklı enzimler, antibiyotikler ve küçük metabolitleri üreterek endüstriyel amaçlarda kullanılmak üzere arzu edilen ürünleri oluştururlar. Enzim salgılamak için optimum 37°C'ye ihtiyaç duyarlar (Priest ve ark 1994; Veith ve ark 2004). Proteaz ve çeşitli enzimlerini üretebilmeleri ile besin döngüsüne katkıda bulunan organizmalar gibi düşünülmektedirler.

Genellikle aerobik koşullar altında ortamda gıda maddelerinin tam olarak tüketilmediği veya besin maddelerinin (mineral maddeler, üreme faktörleri, nitrojen, karbon ve enerji kaynakları) azaldığı ve çevresel koşulların değiştiği durumlarda olgun *basiller* içersinde spor oluşturmaktadırlar. Sporilizasyon işlemi bakteri üremesinin duraksama fazında gerçekleşmektedir. Sporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, hücrenin çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Normal fiziksel faktörlere (ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon, vs), kimyasal maddelere (dezenfektanlar, vs) ve mekanik tesirlere karşı vejetatif formlarından çok daha fazla dayanıklıdırlar (Arda 2000).

Bacillus hücrelerinde genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç aniyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarından ayrı olarak ve hücre duvarının dışında jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde olan kapsül içermektedirler (Sneath 1986). Ayrıca, bazı *Bacillus* türünde ince, uzun, dalgalı, fleksibilitesi fazla, sarmal yapıda ve hareketi sağlayan "flagellum" organeli bulunmaktadır. *Bacillus* bakterileri karbon kaynağı olarak organik asit, şeker, alkol ve nitrojen kaynağı olarak amonyum içeren besiyerlerinde iyi gelişirler. Gelişimleri sıvı ve katı besiyerlerinin üst kısımlarında olmaktadır. Katı besiyerlerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, granüller yapıda olan koloniler meydana getirirler (Tunail ve Köşker 1986; Taubman 1992).

1.2.1. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis doğada yaygın olarak bulunan ve üyelerinin çeşitli enzimleri üretmesinden dolayı besin döngüsüne önemli katkı sağladığı düşünülen saprofit bir bakteridir. *B.licheniformis* her yerde bulunan ve çubuk şeklinde olan gram pozitif bir bakteridir (Claus ve ark. 1986).

Bacillus licheniformis; fermantasyon endüstrisinde, biyoteknolojik öneme sahip amilaz, proteaz, antibiyotikler, çevre ve insan sağlığı açısından çok az risk oluşturan özel kimyasalların üretimi için yaygın olarak kullanılır. Tıp ve veterinerlikte yaygın olarak kullanılan 'Bacitracin' adı verilen ilk antibiyotik peptidi *Bacillus licheniformis* kültüründen elde edilmiştir (He ve ark. 2006). *Bacillus licheniformis'*ten elde edilen diğer enzimler ve bazı metabolitler aşağıda verilmiştir: Gümüş nano-kristalleri (Kalimunthu ve ark. 2008), β-laktamaz BS3 (Beck ve ark. 2008), ksilanaz (Liu ve Liu 2008), endoglukanaz (Bischoff ve ark. 2007), elastaz (Qihe ve ark. 2007).

*Bacillus licheniformis'*in metabolik farklılıkları, önemli genetiksel farklılıklarından kaynaklanmaktadır. DNA'sının GC içeriği %33-67 arasında değişmektedir (Akcan 2009).

1.3. Katı Faz Fermantasyonu Tekniği

Katı faz fermantasyonu genel olarak suyun olmadığı veya az olduğu ortamda katı (nemli) materyaller üzerinde mikroorganizmaların gelişimi olarak tanımlanır (Pandey 2008). SSF son yıllarda bazı biyolojik uygulamalar ve ürünlerin gelişiminde umut vermektedir. SSF mikroorganizmaların doğal habitat ortamına benzer ve bu nedenle mikroorganizmaların büyümesi için tercih edilmektedir. Denizde yaşayan mikroorganizmalar bile suda serbest halde yaşamayı istemezler. Çünkü deniz ortamında bulunan canlıların %98'inden fazlası su altındaki katı substratların yüzeyinden izole edilmiştir (Singhania ve ark. 2009).

Katı faz fermentasyonu işlemleri, Asya ülkelerinde eski zamanlardan beri uygulanmaktadır. Batı ülkelerinde ise 1940'lardan sonra önem kazanmaya başlamıştır. Penisilinin sıvı fermentasyonu sürecinde üretilmesi nedeniyle o dönemde araştırıcılar bütün ilgilerini sıvı ortam fermentasyonuna yönlendirmişler ve bu nedenle batı ülkelerinde katı faz fermentasyonu 1940'lardan daha sonra önem kazanmaya başlamıştır (Pandey 2003). Katı faz fermentasyonunun tipik örnekleri geleneksel fermentasyonlardır**.** Bunlara örnek olarak Japonya'da buharla muamele edilmiş pirinç kullanılan "koji", Endonezya'da mikrobiyal kaynak olarak küf ve katı substrat olarak buhar uygulanmış bezelye tohumlarının kullanıldığı "tempeh" veya Hindistan'a ait "ragi" verilebilir. Yine *Penicillum roquefortii* veya *Penicillum camemberti* ile küflü peynir üretimi uzun yıllardan beri uygulanan katı faz fermentasyonlarına örnek

verilebilir**.** Fransa'da küflü peynir üretimi, çevresel şartların kontrolü, küf sporlarının üretimi ve peynirin mekanik durumunun geliştirilmesiyle modernize edilmiştir. Benzer olarak fungusların küçük ölçekli üretimi için kullanılan kompost işlemi, modernize edilip Avrupa ve ABD'de geliştirilmiştir (Raimbault 1998).

Son on yılda SSF sistemleriyle tıpta tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler, alkoloidler, bitki büyüme faktörleri, çeşitli yiyecekler, tatlandırıcılar vb. içeren biyolojik olarak aktif sekonder metabolitler, çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel alanda kullanılan enzimler, organik asitler, mikopestisitler ve biyoherbisitleri içeren biyopestisitler, biyosurfaktanlar, biyoyakıt, aroma bileşikleri gibi değerli katkı maddelerinin SSF ile üretimindeki metotların gelişimi için eşi görülmemiş olağanüstü bir çabaya şahit olunmuştur (Mehrotra ve ark. 1999; Patel ve ark. 2005).

SSF işlemlerinde genelde katı atıklar, zirai-endüstriyel substratlar kullanılmaktadır. Bu amaçla; portakal kabuğu, mısır küspesi, şeker kamışı kabuğu, pirinç kabuğu, pirinç sapı, buğday kepeği, buğday unu, pirinç unu, nohut unu, mısır unu, soya unu, mercimek kabuğu, muz kabuğu, manyok kökü gibi katı substratlar kullanılmaktadır (Economou ve ark. 2010; Uyar ve Baysal 2004; Mukherjee ve ark. 2009).

Araştırmacılar SSF'in, SmF'ye göre üstün olduğunu ileri sürmüşlerdir. SmF genelde sentetik olarak hazırlanmış ortamlarda meydana gelen fermantasyon işlemidir. SmF ortamında katı destekleyici yerine sıvı ortam bulunmaktadır. Mikroorganizmaların SSF'te doğal ortamına daha yakın olması ve buna bağlı olarak daha etkin aktivite göstermektedir (Pandey 2003). SSF'te maksimum verime ulaşabilmek için, kullanılan mikroorganizmanın çevre koşullarını bilmek çok önemlidir. Çalışmalar SSF'in önemli avantajlarından birinin de esas substrat gibi kullanılan ham materyallerin son derece ucuz olduklarını göstermiştir. Hem gıda hem de tarım atıkları bol miktarda üretilmekte ve bu atıklar karbonhidratça ve diğer besinlerce zengin olduklarından SSF tekniğinin kullanımıyla enzimler ve önemli kimyasalların üretiminde bir substrat gibi hizmet ederler. Aynı zamanda çevre kirliliğini azaltırlar (Couto ve Sanromán 2006). Daha fazla biyokütle, yüksek enzim üretimi ve daha düşük protein bozulması, SSF'de daha iyi özellikte üretime katkıda bulunur. SSF yöntemlerinde ekstre edilen enzimin yüksek kararlılık göstermesi bu tekniğin diğer önemli avantajıdır (George ve ark. 1997).

SSF'te dikkat edilmesi gereken bir nokta da parametrelerin ve optimum koşulların seçimidir. Bunlar; partikül büyüklüğü, substrat seçimi, bağıl nem, pH, inkübasyon süresi, çalkalama hızı, üreme sıcaklığı, inokülüm hacmi, ortama eklenen azot ve karbon kaynaklarıdır (Pandey 2003; Singhania ve ark. 2009).

Biyoteknolojide alkalin proteaz daha çok SmF ile üretilir fakat son zamanlarda SSF ile üretilmektedir. SSF ile alkalin proteaz üretimi daha az su isteği ve substrat olarak zirai endüstriyel katı atıkların kullanımından dolayı maliyeti azalttığı için SmF'ye kıyasla daha ekonomik ve çevre dostudur (Uyar ve Baysal 2004)

SSF, kullanılan mikroorganizmalara göre 2 çeşide ayrılmaktadır:

1-Doğal SSF; doğal mikrofloranın kullanıldığı SSF sürecidir.

2-Saf kültür SSF; mikroorganizmaların saf kültürleri ya tek veya kombine olarak kullanılır (Nigam ve Singh 1994).

Çizelge 1.4. SSF'in Tarihsel Gelişimi (Pandey ve ark. 2000).

A.BİYOLOJİK UYGULAMALARI:	
M.Ö. 2000	Mısırlılar tarafından ekmek yapımı
Hz. İsa'nın doğumundan önce Asya'da	Peynir yapımı için *Penicillium roquefortiii*'den yararlanılmıştır.
M.Ö 1500	Balık fermantasyonu/şeker, nişasta ve tuzlar ile koruma
M.Ö 1500	*Koji* işlemi
7. yüzyıl	*Koji* uygulamasının Çin'den Japonya ya geçmesi
18. yüzyıl	Meyve ezmesinden sirke yapımı
18. yüzyıl	Tabaklama ve baskı uygulamalarında gallik asit kullanımı
1860-1900	Kanalizasyon ıslah işlemleri
1900-1920	Fungal enzimlerin üretilmesi, kojik asit
1920-1940	Fıçı tipi fermentörin geliştirilmesi sayesinde fungal enzimler, gallik asit ve sitrik asit üretimlerinin gerçekleştirilmesi
1940-1950	Fermantasyon endüstrisinde penisilin üretimi ile görülen olağanüstü gelişme
1950-1960	Steroid transformasyonu
1960-1980	Mikotoksinler ve protein değeri artırılmış hayvan yemlerinin üretimi
1980-1990	Çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin üretimi, column tipi fermentörün geliştirilmesi, SSF kinetikleri ve modellerine yönelik çalışmalar
1990-Günümüze kadar	SSF'e yönelik temel yaklaşımlardaki gelişmeler, biyolojik uygulamalar/elde edilen ürünlerdeki ilerlemeler:
	Tehlikeli bileşiklerin ıslahı, biyolojik dönüşümü, tarım endüstrisi atıklarının detoksifikasyonu, biyotranformasyonlar

B. SSF İLE ELDE EDİLEN ÜRÜNLER

Biyoaktif bileşikler: Alfatoksin, osiratoksin, bakteriyel endotoksinler, giberillik asit, zearalenon, çavdar alkaloidleri, penicilin, cephalosporin, cephalomycin C, tetrasiklin, klorotetrasiklin, oksitetrasiklin, iturin, aktinorhodin, metilenomisin, surfaktin, monordan, siklosporin A,ustiloksinler, antifungal uçucu bilesikler, destruksin A ve B, klavulanik asit, mikofenolik asit

Enzimler: Sellulaz, β-glukosidaz, CMCaz, lakkaz, ksilanaz, poligalaktorunaz, ligninaz, β-ksilosidaz, α-arabinofuranosidaz, lakkaz, Li-peroksidaz, Mn-peroksidaz, proteazlar (asidik, nötral ve alkalin), lipazlar, α-amilaz, β-amilaz, glukoamilaz, glutaminaz, inulinaz, fitaz, tannaz, feruloil para-kaumaroil esteraz

Organik asitler: Sitrik asit, fumarik asit, laktik asit, oksalik asit, gallik asit

Diğer bileşikler: L-glutamik asit, pigmentler, karotenoidler, xanthangum, süksinoglikan, etanol, aramo bilesikleri, vitamin B-12, B-6, riboflavin, tiamin, biyosurfaktanlar, biyopestisitler/biyoherbisitler

1.3.1. SSF'in Avantajları ve Dezavantajları

SSF verimlilik, ürün konsantrasyonu ve atık oluşumu gibi hallerde SmF'ye göre belirgin avantajlara sahiptir. SSF'in çeşitli avantajları aşağıda sıralanmıştır:

- SSF'in daha fazla verime sahip olması
- SSF'de bakteri ve maya kontaminasyonu daha azdır.
- Atık su çok az olduğundan daha az çevre kirliliğine yol açmaktadır.
- Geri besleme baskılanması SmF'ye göre daha düşük ya da hiç yoktur (Perez-Guerra ve ark 2003).
- Düşük maliyet ve tekrarlanabilir harcamalar
- Düşük enerji ihtiyacı (Pandey ve ark. 2000).
- Köpüklenmenin olmaması
- Basit ve daha kolay üretilebilirlik
- Daha basit fermantasyon ortamı
- Daha kolay havalandırma

- Küçük ölçeklerde bile ekonomik kullanım
- Kontaminantların basit kontrolü (Akcan 2009)
- Fermantasyonda kullanılan katıların doğrudan uygulanabilirliği
- Kurutulmuş fermantasyon materyallerinin muhafazası
- Ürün elde edilme sürecindeki daha düşük maliyet
- Mikroorganizmaların doğal habitatlarına benzer ortamlarda gelişimine izin veren yabani-tip mikroorganizmaların kullanılmasına olanak sağlaması
- Enerji gereksinimi düşüktür (Mazutti ve ark. 2006). Bazı durumlarda otoklavlama, buhar uygulama, mekanik çalkalama ve havalandırmaya gereksinim yoktur.
- Oksijen sirkülasyonu daha iyidir.
- Katabolik baskılama genellikle daha düşüktür (Perez-Guerra ve ark 2003).
- SSF'te çoğunlukla yabani suş mikroorganizmalar genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalara nazaran daha iyi uygulama imkânı sağlar ve daha güvenilirdir.

Yukarıda adı geçen avantajlara rağmen SSF tekniği SmF tekniği ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajları vardır. Bunlar:

- Nadiren meydana gelen bakteriyel ve fungal kontaminasyon
- Kullanılabilen mikrobiyal türlerin sınırlı olması
- Biyokütle değerlendirmesi için dolaylı metotlara ihtiyaç duyulması
- Ortamın nem içeriğinin kontrolündeki zorluklar
- Yapılan ön işlemlerin pahalı olabilmesi
- Büyük miktarda spor inokülümüne ihtiyaç duyulması
- Fermantasyon süresince pH kontrolünün mümkün olmaması
- Devamlı çalkalama için yüksek enerji gereksinimi

- Substratlar genellikle ön uygulamaya ihtiyaç duyar (öğütme, parçalama, homojenizasyon, fiziksel, kimyasal ve enzimatik hidroliz, buhar uygulama gibi).
- Sıvı substrat fermentasyonuna göre biyokütle (üreme) miktarının saptanması zordur. Çünkü misel ve katı substrat arasındaki sıkı penetrasyon biyokütlenin tamamen elde edilmesini engeller (Rahardjo ve ark 2004).
- Üreme esnasında oluşan metabolik sıcaklığın uzaklaştırılması oldukça zordur.
- Temel, bilimsel ve mühendislik bilgileri açısından belirsizlikler vardır. Büyük ölçekli reaktörlerin dizaynı ve işlenmesi hakkındaki bilgiler çok azdır (Perez-Guerra ve ark 2003).

1.3.2. SSF'i Etkileyen Faktörler

Genel olarak SSF'i etkileyen 2 tip faktör vardır (Pandey 2004).

1. Biyolojik faktörler
2. Fiziko-kimyasal Faktörler

1.3.2.1. Biyolojik Faktörler:

Bu faktörler yaşayan türler veya organizmanın biyolojisi, metabolik işleyişi ve üremesiyle ilişkili faktörlerdir. Bu faktörlerin spesifik bir yol ile incelenmesi belirli türlerin davranışlarının saptanmasını sağlar (Prakasham ve ark. 2006).

Uygun bir tür seçimi SSF'in en önemli kriterlerinden biridir. Mikroorganizmalar, hedeflenmiş ürünlerin ticari olarak uygun verimlerde olması, yan ürün miktarı ve substrat üzerindeki üreme ve gelişim şekillerine göre ayırt edilirler.

1.3.2.2. Fiziko-kimyasal Faktörler:

Karbon ve azotun yapı ve kaynağı her fermantasyon işleminde en önemli faktörlerdendir. Karbon kaynağı mikroorganizmanın gelişimini sağlayacak enerjiyi sağlar. Bu nedenle herhangi bir fermantasyon işleminde uygun bir enerji veya karbon kaynağı seçilmelidir. Azot, büyüme ve nükleik asit-aminoasit bileşeni gibi protein sentezini belirler. Karbon ve azot miktarı arasındaki ilişki, spesifik bir ürünü elde etme işleminde çok önemlidir. SSF ortamına organik ve inorganik azot bileşiklerin eklenmesiyle genelde enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

Biyolojik işlemler genelde belirli sıcaklık derecelerinde gerçekleştirilmektedirler. Biyolojik bir işlemin geliştirilmesinde sıcaklığın önemi protein denatürasyonu, enzimatik inhibisyon, belirli bir metabolit üretiminin indüklenme ve baskılanması veya hücre yaşam/ölümü gibi etkilerin belirlenmesi şeklindedir.

Yaşayan hücreler ortamın %70-80 nem içeriği ile karakterize edilir ve bu nedenle su içeriği yeni hücrelerin sentezini belirleyen bir faktördür. Bir faktör olarak nem, SSF'in tanımlanmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Herhangi bir SSF işlemi için en önemli faktörler arasında pH bulunmaktadır. SSF işlemi sırasında farklı pH değerlerini dengede tutmak için yapılan çalışmalardan biri biyolojik aktivite üzerinde ters etki yapmayacak tamponların kullanılması ile sağlanabilir.

Genel olarak küçük substrat parçacıkları mikrobiyal büyüme için geniş bir yüzey alanı sağlar ve bu nedenle arzu edilen bir faktör gibi düşünülür. Bununla birlikte çok küçük substrat parçacıkları substrat yığını oluşturabilir bu gibi hallerde en çok mikrobiyal solunum/havalanmayı engelleyen ve bu nedenle zayıf hücresel büyüme meydana getiren olay görülür (Liu ve Tzeng 1999). Buna karşın daha büyük partiküller kullanıldığında iç kısımdaki parçalar arasındaki alan arttığından büyük parçacıklar daha etkili solunum/havalanmayı sağlayabilir, ancak mikrobiyal büyüme için sınırlı bir alan oluşmasına neden olur. Bu nedenle belirli bir SSF işleminde parça büyüklüğünü belirlemek oldukça önemlidir (Graminha ve ark. 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Klingeberg ve ark. (1995) ekstrem termofil arke olan *Thermococcus stetteri*'den elde edilen yüksek sıcaklıkta kararlı alkali proteazın çok geniş bir sıcaklık ve pH aralığında (50-100°C, pH 5-11) aktif olduğunu belirlemişlerdir. Bu enzimin 85°C ve pH 8.5-9.0 arasında, kazeine karşı optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Ferrero ve ark. (1996) farklı karbon ve azot kaynaklarının varlığında farklı düzeylerde enzim üretebilen, 60ºC sıcaklığa ve pH 9.0 değerine kadar gelişebilen, *Bacillus licheniformis* MIR 29 ile yapılan çalışma sonucunda, kazeinin enzim sentezini uyardığını, ayrıca üst kültür sıvısının amino asit ve peptidlerden (10 kDa'dan küçük moleküller) arındırılmadığı koşullarda aktivitenin azaldığı, enzim üretiminin son ürün inhibasyonu ile düzenlenebileceğini önermişlerdir. Üre Besiyerinde azot kaynağı olarak kullanıldığında, enzim üretimini baskıladığını ifade etmişlerdir.

Mehrotra ve ark. (1999) tuzlu ve alkali topraklardan izole edilen 52 alkalofilik bakteriyel suşu alkalin proteaz üretmeleri için süt-agar besi yerinde üretmişler. Topraktan izole edilen 52 suştan sadece 15 suşun alkalin proteaz üretimini gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Burada karbon kaynağı olarak %1 sükroz, fruktoz, mannitol, glukoz, maltoz, nişasta ve laktoz kullanılmış, azot kaynağı olarak %1 NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, $NH_4H_2PO_4$, NH_4Cl, pepton, kazein ve maya ekstraktı kullanılmıştır. Maximum enzim aktivitesi için , %1 glikoz, %1 amonyum klorür kullanmışlar. Maksimum enzim aktivitesi pH 10.5, 40ºC ve 20 saatlik inkübasyonda elde edilmiştir.

Towatana ve ark. (1999) yaptıkları bir çalışmada hidrotermal kaynaklarından izole ettikleri ve 55ºC sıcaklıkta gelişen alkalifilik ve termofilik bir *Bacillus* PS719 suşunun proteolitik aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuç olarak ekstraselüler proteazın, azokazein substrata karşı, 75 °C sıcaklıkta ve pH 9.0'da maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin 2 mM $CaCl_2$ varlığında %185 oranla artığı ve Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının inhibitör olarak etkili olduğu belirlenmiştir.

Johnvesly ve Naik (2001) *Bacillus* sp. JB-99'un ürettiği termostabil alkali proteazın (optimum pH :11.0, optimum sıcaklık 75ºC) en yüksek enzim aktivitesini, karbon kaynağı olarak sitrik asit, çözünür nişasta veya fruktoz (10g/L); azot kaynağı olarak da $NaNO_3$ veya KNO_3 (10g/L) içeren besiyerinde gösterdiğini belirlemişlerdir.

Karbon kaynağı olarak kullanılan glukozun (10g/L) alkali proteaz sentezini baskıladığını tespit etmişlerdir.

Haki ve Rakshit (2003) geçmiş yıllarda *Bacillus brevis, Bacillus licheniformis, Bacillus thermoruber, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus* gibi mikroorganizmalar kullanılarak, 45-90ºC sıcaklık aralığında optimal aktiviteye sahip proteazlar üretilmiştir. Yine, *Bacillus* türlerinde yapılan çalışmalarda proteazların, pH 6.0-12.0 gibi geniş bir aralıkta aktivite gösterebildiğini belirtmişlerdir.

Bahçeci (2004) Tuz Gölü'nden izole edilen bakterilerin endüstriyel öneme sahip ksilanaz, selülaz, α-amilaz ve proteaz enzimlerini üretip üretmediklerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmıştır. Elde edilen izolatların birinin *Bacillus pumilis*, iki izolatın *Bacillus subtilis* ve geriye kalanların *Bacillus licheniformis* olduğunu tespit etmiştir. Bu izolatların önemli ölçüde amilaz ve proteaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Proteaz enziminin optimum aktivite sıcaklıkları 50–60ºC ve optimum pH 7.0–7.4 olarak belirlenmiştir. Proteaz enziminin 80ºC ve pH:9'a kadar stabilite gösterdiği belirtilmiştir.

Joo ve ark. (2004*) Alkalofilik Bacillus sp.* 103 bakterisinden SSF yöntemiyle alkalin proteaz üretimini gerçekleştirmek için patates nişastası, mısır nişastası, buğday kepeği ve buğday ununu katı substrat olarak kullanmışlar. En iyi enzim aktivitesini buğday unundan (3856.0 U/ml) elde etmişlerdir. Alkalin proteaz üretiminde maksimum enzim aktivitesi elde etmek için mikroorganizma %2 soya, %1 kazein, %1 buğday unu , %0.5 K_2HPO_4 , %0.5 sodyum sitrat, %0.01 $MgSO_4$ ve %0.4 sodyum karbonat; 37 ºC, 250 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim pH 5.5-12 arasında aktivite gösterirken optimum aktivite pH:10'da elde edilmiştir. Optimum sıcaklık ise 50ºC'de gözlenmiştir.

Uyar ve Baysal (2004) *Bacillus* kullanarak SSF tekniği ile mercimek kabuğu ve buğday kepeğinin bulunduğu ortamda alkalin proteaz aktivitesini incelemişlerdir. Buğday kepeğinin katı subsrat olarak kullanıldığı SSF besiyerinde en yüksek enzim aktivitesini belirlemişlerdir. Maksimum aktivite 429.041 U/mg ve 168.640 U/mg olarak buğday kepeğinin ve mercimek kabuğunun substrat olarak kullanıldığı ortamda %40'lık başlangıç nem içeriği ve pH:10'da inkübasyonun 24. saatinde elde edilmiştir. İnokülüm hacmi %20 olarak rapor etmişler.

Agrawal ve ark. (2005) topraktan izole edilen *Beauveria feline*'da soya proteinini hidrolizleyen alkalin proteaz aktivitesini, alkalin proteaz üreticisi olarak bilinen *Aspergillus oryzae* NCIM 649 ile karşılaştırmışlardır. SSF ortamında alkalin proteaza etki eden parametreleri inceleyerek, *Beauveria feline*'da buğday unu kullanarak 7 gün boyunca inkübasyona bırakılan ortamda maksimum enzim aktivitesini 20.000 U/g olarak tespit etmişlerdir. Başlangıç nem oranı %120 ve optimum pH 7.0 olarak tespit etmişlerdir. *Aspergillus oryzae* NCIM 649'un, *Beauveria feline'*ya oranla iki kat daha fazla alkalin proteaz ürettiğini tespit etmişlerdir.

Kazan ve ark. (2005) *Bacillus clausii* GMBAE 42 suşundan üretilen bir serin alkali serin proteazın optimum pH değerinin 11.3, optimum sıcaklığının ise 60°C olduğu, 5 mM $CaCl_2$ ilavesiyle optimum sıcaklığın 70°C'ye yükseldiğini belirtmişlerdir. Enzimin, pH 10.5'ta 2 saat inkübasyon sonucunda 30ºC ve 40°C sıcaklıklarda stabil olduğu, 50°C sıcaklıkta aktivitesini %86 düzeyinde koruyabildiğini tespit etmişler.

Sandhya ve ark. (2005) tarımsal endüstriyel atıklar kullanarak nötral proteaz üretiminin SmF ile karşılaştırılmasını yapmışlardır. *Aspergillus oryzae*'nın 3 ırkı, *Penicillum'*un 4 ırkı olan *P.* sp., *P. funiculosum, P. pirophillum, P. aculetum* kullanarak proteaz üretimleri karşılaştırılmıştır. Buğday kepeği, pirinç kabuğu, Hindistan cevizi küspesi, susam yağı küspesi, bira yapımında ortaya çıkan atıklar ve palmiye küspesi gibi tarımsal ve endüstriyel atıklar kullanılarak SSF ortamı hazırlanmış ve üretilen enzim SmF'te üretilen enzimle karşılaştırılmıştır. Bu sistemde en iyi substrat kaynağı olarak buğday kepeği belirlenmiştir. SSF'te başlangıç nem seviyesi olarak optimum %43.6, en iyi aktivite sıcaklığı 30ºC, optimum pH 7.5, süre olarak'ta 72. saat olarak belirlenmiştir. SmF'te optimum pH 7.5 ve %2 buğday kepeği ve 3 ml spor süspansiyonu kullanarak 30ºC'de 180 rpm'de 72. saatte maksimum enzim verimi 8.7 U/gds olarak belirlenmiştir. Bu iki fermantasyon sisteminin karşılaştırılması göstermiştir ki SSF yöntemiyle 3.5 kat daha fazla enzim üretilmiştir.

Chellappan ve ark. (2006) *Engyodontium album* BTMFS, deniz tortularından izole edilmiş ekstrasellüler proteaz üretimini pH:11'de tespit etmişlerdir. Partikül büyüklüğünü 425 µm, başlangıç nem içeriğini %60 bulmuşlardır. Buğday kepeği katı substrat olarak kullanılmış ve proteaz üretimi için 25ºC'de, 120 saat inkübasyona bırakılmıştır. Karbon kaynağı olarak sukroz, inorganik azot kaynağı amonyum hidrojen

karbonat ilavesi ve aminoasitlerden lösin kullanıldığında enzim üretimi artmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 60ºC'dir. Enzimin yüksek pH ve sıcaklıkta maksimum aktivite göstermesi deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Mehta ve ark. (2006) SSF yöntemiyle alkalofilik aktinomisetes üzerinde yaptıkları çalışmada glukoz, pepton, maya ekstraktı, KH_2PO_4 farklı konsantrasyonlarda kullanarak alkalin proteaz üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada katı substrat olarak molas, buğday unu ve buğday kepeğine %0-2 oranında bu kaynaklar ilave edilerek 37ºC'de 32 saatlik inkübasyona bırakıldı. Alkalin proteaz üretiminde SSF yöntemiyle kullandıkları katı substratlardan en yuksek aktiviteyi 32. saatte elde etmişlerdir. Bu inkübasyondan sonra glukozun %0.5 ile %1'de enzim aktivitesini olumlu etkilediği, %2 ve daha yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi olumsuz etkilediği görülmüştür. KH_2PO_4'an ise %1.5 konsantrasyonunda enzim aktivitesini artırdığı %2 ve daha yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi baskıladığını gözlemişlerdir. Pepton ve maya ekstraktının ise sırasıyla %0.5 ve %1 konsantrasyonlarında aktiviteyi olumlu etkilerken bunun dışındaki konsantrasyonlarda enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür.

Prakasham ve ark. (2006) alkalofilik *Bacillus sp.* yi kullanarak SSF yöntemiyle alkalin proteaz üretimini gerçekleştirmişler. Kullandıkları katı atıklar arasında en iyi aktiviteyi yeşil gram kabuğunda elde etmişlerdir. Ortamda %1.5 maltoz ve %2 maya ekstraktı kullandıklarında optimum enzim üretimi kontrole göre %371 daha fazla artmıştır. Glukoz enzim üretimini baskılamamış fakat kullanılan inorganik azot kaynakları ise enzim üretimi üzerine negatif etki göstermişlerdir. Maksimum enzim üretiminde optimum pH 9.0, nem içeriği %140, inokülüm oranı %3 ve inkübasyon süresi 60. saat olarak belirlenmiştir.

Agüloğlu ve Okumuş (2007) yaptıkları çalışmada SSF ortamı olarak karpuz ve kavun kabuğunu kullanmışlar. En iyi proteaz üretimini kavun kabuğunda tespit etmişlerdir. Partikül büyüklüğünü 1500 μm olarak bulmuşlar. Maksimum proteaz üretimini pH 10'da ve 65°C sıcaklıkta tespit etmişlerdir. Karbon kaynaklarından nişasta ve arabinoz, metal tuzu olarak ta $CaCl_2$ ve $BaCl_2$, azot kaynaklarından ise pepton ve amonyum sülfat enzim aktivitesini artırmıştır.

Wei-Hua Chu (2007) ekstrasellüler alkalin proteaz üretebilen 34 türü topraktan ve değişik çevrelerden izole etmiştir. *Bacillus* sp. APP1 türü ile en yüksek alkalin proteaz aktivitesi elde edilmiştir. Maksimum enzim üretimi için kültür şartları optimize edilmiştir. Ortam başlangıç pH'sı 9.0 olduğunda, maksimum proteolitik aktivite (2.560 U ml^{-1}) değeri 48. saatten sonra (g^{-1}): 15 soya unu, 30 buğday unu, 4 K_2HPO_4, 1 Na_2HPO_4, 0.1 $MgSO_4.7H_2O$ ve 6 Na_2CO_3 içeren ortamdan elde edilmiştir. Alkalin proteaz 72. saatte %5 SDS ve %5 H_2O_2 gibi SDS ve oksitleyici ajanlar varlığında stabilite göstermiştir.

Mahanta ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada yağı alınmış Jatropha tohum küspesinin SSF'te enzim üretimi için substrat olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar daha önce kendileri tarafından rapor edilen çözücü tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA soyunu fermantasyon için kullanmışlardır. Bu tohum küspesinin bakteriyel gelişimi ve enzim üretimini iyi bir şekilde desteklediğini görmüşlerdir (Proteaz 1818 U/g ve lipaz 625 U/g). Araştırmacılar maksimum proteaz ve lipaz aktivitesini %50 substrat nemliliğinde ve 72-120. saat geliş periyotlarında pH 6.0-7.0' da tespit etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak maltoz ile zenginleştirmenin proteaz üretimini 6.3 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Proteaz üretimi için azot kaynağı olarak pepton eklenmesinin enzim üretimini Jatropha tohum küspesinin gramı başına proteaz aktivitesi 11.376 U/mg arttırdığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar elde edilen bu sonuçların endüstriyel enzimlerin üretimi için değerlendirilmesi ve değişken yaklaşımların olabileceğini göstermişlerdir.

Mukherjee ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada termofilik *Bacillus subtilis* DM-04 bakterisi SSF metodunu kullanarak farklı tarımsal-endüstriyel atıklar ve mutfak atıklarını; buğday kepeği, pirinç kepeği, *Imperata cylindrica* çimeni, muz yaprağı, patates kabuğu ve çay yapraklarını substrat olarak kullanarak alkalin proteaz üretiminin hangisinde maksimum aktivite gösterdiğini incelemişler. En yüksek proteaz aktivitesi patates kabuğu ve *Imperata cylindrica* çimeninde gözlemişler. Hatta patates kabuğu *ve Imperata cylındrica* çimeni 1:1 oranında karıştırıldığında aktivitenin daha da yükseldiğini gözlemişler. *I. cylındrica* çimenine azot kaynağı olarak sığır eti ekstraktı ve maya ekstraktı ayrı ayrı ilave edildiğinde proteaz üretimini olumlu etkilediği görülmüştür. Karbon kaynaklarından sadece maltozun kontrolden daha fazla proteaz üretimine neden olduğunu dile getirmişlerdir. Ham proteazın optimum aktivitesi

37-45ºC'de ve pH 8.0 ve 9.0'da bulmuşlardır. *Bacillus subtilis* DM -04'ten elde edilen enzimin 60ºC'de 15 dk bekletildikten sonra %67 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Bu özelliğinden dolayı enzim ticari deterjanlara ilave edilip olumlu sonuçlar alınacağı umulmaktadır.

Nadeem ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada alkalofilik *Bacillus licheniformis* N-2 tarafından meydana getirilen proteaz üretimini g/L'de 10 glukoz, 10 soya unu, 3 K_2HPO_4, 0.5 $MgSO_4.7H_2O$ ve 0.5 $CaCl_2$ içeren 50 ml kültür ortamında gerçekleştirmişlerdir. Farklı karbon ve azot kaynakları organik ve inorganik formda ve yağı çıkarılmış unlar uygun substratı belirlemek için kullanılmıştır. En yüksek alkalin proteaz aktivitesi (677.64 U/mg) buğday kepeği, çözünür nişasta ve glukoz içeren ortamda elde edilmiştir. Değişik azot kaynakları arasında soya unu alkalin proteaz üretimini en iyi seklide indüklemistir. İnorganik azot kaynaklarından amonyum tuzları %96 oranında enzim üretimini baskılamıştır. Termostabilite çalışmalarında enzim 10 mM Ca^{2+} iyonları varlığında 12 saat 40ºC'de kaldıktan sonra %80 oranında aktifliğini korumuştur. Enzim pH: 8.0-11.0 gibi geniş bir aralıkta aktif olarak kalmış ve pH:12.0'da aktivitesini %52 oranında korumuştur. Enzim, Tween 20, Tween 45, Tween 65, Triton X-45, H_2O_2 ve sodyum perborat gibi kimyasallarla %1 konsantrasyonunda muamele edildikten sonra enzim aktivitesini sırasıyla %105, %82, %116, %109, %135 ve %126 oranlarında koruyabilmiştir.

Hmidet ve ark. (2009) alkalofilik özellik gösteren *Bacillus licheniformis* NH1 türünün beş önemli ekstrasellüler proteaz ürettiğini belirlemislerdir. Alkalin proteaz için optimal pH ve sıcaklığı sırasıyla 10.0 ve 70ºC'de elde etmişlerdir. Ham alkalin proteazın çeşitli katı ve sıvı deterjanlarda kullanımı denenmiştir ve yıkama perfomansı test edilmiş; kan, çikolata ve salça gibi lekeleri temizlemede başarılı bulunmuştur. Ayrıca saf enzim çeşitli katı ve sıvı deterjanlar ile kusursuz bir uyum ve stabilite göstermiştir. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde özellikle Ca^{2+}, Mg^{2+} ve Cu^{2+}'nin aktiviteyi olumlu etkilediği gözlenmiştir. Kullanılan inhibitörler arasında PMSF'nin proteaz üretimi üzerinde güçlü bir inhibisyona neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Lazim ve ark. (2009) *Stretomyces sp.* CN902 ile SSF yöntemiyle alkalin proteaz üretimini ve optimizasyonunu gerçekleştirmişler. Burada çeşitli zirai endüstriyel atıklar katı substrat olarak kullanılmış ve en iyi aktivite buğday kepeği ve ezilmiş hurma çekirdeği karışımında elde edilmiştir. Bu iki substratı beraber kullanmaları durumunda enzim aktivitesi 90.50 U/g iken ayrı ayrı kullanıldıklarında buğday kepeğinde 74.50 U/g ezilmiş hurma çekirdeğinde ise 69.50 U/g olarak tespit edilmistir. %60'lık başlangıç nem içeren ortamda ve 45ºC'de 5 günlük inkübasyondan sonra enzim üretimi 220.50 U/g olarak bulunmuştur. Optimal pH ise 9.0'da gözlenmiştir. Bu karışıma azot kaynağı olarak maya özütü eklendiğinde SSF tekniğiyle enzim üretimi 245.50 U/g yükselmiştir. Kullanılan karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine olumsuz etkide bulunduğunu belirlemişlerdir.

Rao ve ark. (2009) *Bacillus circulans'*tan alkalin proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Enzim geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösterip optimum aktivitesi 70ºC'de, alkalin pH ortamında, surfaktanlar ve oksitleyici ajanların bulunduğu ortamda görülmüştür. Enzim için optimum pH:11 olarak tespit edilmiştir. Ca^{2+}, Mg^{2+} ve Mn^{2+} gibi metal iyonlar enzim aktivitesini olumlu etkilerken Cu^{2+}'nin olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Enzim bu ortamlarda aktivite gösterdiği için hayvan derilerindeki kıl, tüy gibi maddeleri temizlemekte ve pamuk ipliklerindeki kan lekelerini yok ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca serin proteaz üretiminde %1 oranında Tween-20, Triton X-100 ve SDS'yi enzime ilave ettikten sonra aktivite tayini yapmışlardır. Kontrol ile karşılaştırıldığında Triton X-100 ve Tween 20'nin enzim aktivitesinde artışa neden olduklarını tespit etmişlerdir. Fakat SDS'nin enzim aktivitesini olumsuz etkilediğini gözlemlemişlerdir.

Mahalaxmi ve ark. (2010) *Amycolatopsis sp.* RSP 3'ten zirai–endüstriyel atık materyallerini kullanarak SSF yöntemiyle Rifamycin B üretmişlerdir. Kullanılan katı substratlardan mısır kabuğu, buğday kepeği ve mısır koçanına göre 4 kat daha fazla üretim gerçekleştirmiştir.

Rajkumar ve ark. (2011) SSF tekniği ile *Bacillus sp.* RRM1 den proteaz üretimi ve karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. En iyi proteaz aktivitesini buğday kepeğinde belirlemişlerdir. Enzimin 30-60°C sıcaklıkta ve pH 6.0-12 arasında stabil olduğunu maksimum aktiviteyi ise 50°C de ve pH 9.0 da tespit etmişlerdir. Na^{+}, Ca^{+2}

ve K^{+} metal iyonları aktiviteyi arttırırken Hg^{+2}, Cu^{+2}, Fe^{+2}, Co^{+2} ve Zn^{+2} iyonları ise aktiviteye neğatif bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Enzim aktivitesini EDTA inhibe ederken Cu^{+2} iyonun aktiviteyi arttırdığını gözlemlemişler ve bu sonuca göre proteazın metaloproteaz olduğunu söylemişlerdir.

Sevinç ve ark (2011) topraktan izole edilen 54 *bacillus* türünde proteaz üretimi için tarama yapmışlardır. Maksimum proteaz üreten bir tür seçilerek, proteaz üretimi için besi yeri içeriğine; karbon, azot kaynakları, metal iyonları eklenerek enzim üretimine etkisi araştırıldı. Kullanılan karbon kaynakları arasında fruktozun en fazla üretim potansiyeline sahip olduğu belirlendi. En iyi organik azot kaynağı ise skim milk olarak bulundu. Birleştirerek eklenen metal iyonları enzim üretimine minimum etki etti. Ca^{2+} ve Mg^{2+} kombinasyonu en iyi ortam olduğu tespit edildi. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığı 55^{o}C ve pH'sı ise 7.0 olduğu görüldü. Stabilite çalışmasında alkalin pH da 6.0-9.0 ve 40° ve 70°C sıcaklık aralıklarında stabil olduğu bulundu. Mn^{2+} ve Ca^{2+} iyonları enzim aktivitesini arttırmış. SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığı 52 kDa olarak tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Folin-Ciocalteu's ayıracı (FCR), tris-hidroksimetilaminometan, sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), trikloroasetik asit (TCA), Tris-base [Tris (hydroxymetyl)], sodyum sitrat, sodyum-potasyum tartarat MERCK'ten, hidroklorik asit (HCl) ve NaCI Riedel-de Hean'dan, azocasein SIGMA'dan temin edilmiştir.

3.1.1.1 Azot kaynakları

Pepton, beef extract, kazein, OXOID'den, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl) Riedel-de Haen'dan, amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$, yeast extract MERCK' ten, tryptone DIFCO'dan temin edilmiştir.

3.1.1.2. Karbon kaynakları

Laktoz, sukroz, fruktoz ve galaktoz SIGMA'dan, glukoz ve maltoz MERCK'den temin edilmiştir.

3.1.1.3. Deterjanlar

Sodyum dodesil sülfat (SDS), tween-80 MERCK'ten, triton-X100 Sigma'dan temin edilmiştir.

3.1.1.4. Metal tuzları

$FeSO_4.7H_2O$, $CaCl_2$ ve $MgSO_4.7H_2O$ MERCK' ten $CuSO_4.5H_2O$ Riedel-de Haen'dan $ZnSO_4.7H_2O$ AnalaR'dan temin edilmiştir.

3.1.1.5. Besi yeri maddeleri:

Nutrient Broth (NB) OXOID'den, yeast extract, sodyum klorür (NaCl), tryptone ve agar MERCK'ten temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan aletler:

İnkübatör (Sanyo) (EN 400)

Steril Kabin (Telstar AV-100)

Spektrofotometre (U.V-VIS SHIMADZU 1240)

Çalkalayıcı (Julobo) (Selecta P)

Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K15)

Vorteks (Stuart) (VWR International)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Deep-Freeze (Haris, -70ºC)

Etüv (Heraus)

Dijital Göstergeli Hassas Terazi (GEG, AVEY)

Otoklav (HIRAYAMA)

Su Banyosu (Grant 6G, -20, +100ºC)

pH metre (Jenvay 3010, PCP J01 elektrod) (METTLER TOLEDO MP220)

Sterilizatör (Heraus)

Blender (Waring Commercial Laboratory Blender)

3.1.3. Biyolojik materyal

Çalışmamızda MicroBioLogics Inc.'ten temin edilen *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 suşu kullanılmıştır.

3.1.4. Mikroorganizmaların üretimi ve saklanması

Katı besiyerine ekilen bakterilerin stok bakteri kültürleri olarak katı besiyerlerine ekim yapıldı. Ekim için günlük bakteri kültürleri kullanıldı. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere bakteri kültürleri +4°C'de saklandı.

3.1.5. Substrat seçimi

Çalışmamızda substrat olarak, çevremizdeki tarımsal ürün atıklarından buğday kabuğu, arpa kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, pamuk sapı ve mısır küspesi kullanılmıştır.

3.1.6. Substrat parça büyüklüğü

Çalışmamızda kullanılan bitkisel atıklardan buğday kabuğu, arpa kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, pamuk sapı ve mısır küspesi öğütüldükten sonra 3 farklı elek (500, 1000 ve 1500 μm çaplı) yardımıyla elendi ve kurutuldu. Elde edilen farklı substratlardan 1500 μm çapındaki parçalar kullanılıp enzim üretimi sağlandı.

3.1.7. Kullanılan Besiyerleri

Sıvı besiyeri:

Luria Broth (LB): 10 g yeast extract, 5 g NaCl (Merck), 5 g tryptone 1 litre saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

Nutrient Broth (NB): 8 g Nurtient Broth 1 litre saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

Katı besiyeri:

10 g yeast extract, 5 g NaCl, 5 g tryptone ve 15 g agar, 1 litre saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

8 g Nutrient Broth (Oxoid) ve 16 g agar (Merck), 1 litre saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

SmF besiyeri:

0.2 g yeast extract, 0.1 g NaCl, 0.1 g tryptone (LB) 100 ml'lik erlenmayerler içinde 20 mL saf suya tamamlanıp otoklavlandı.

0.16 g NB. 100 ml'lik erlenmayerler içinde 20 ml saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklavlandı.

3.1.8. SSF besiyeri:

Pamuk kabuğu, mısır küspesi, pirinç kabuğu, buğday kabuğu, arpa kabuğu ve mercimek kabuğu kurutularak blendırdan geçirildi. Farklı gözenek büyüklüğündeki eleklerden geçirilerek 500, 1000 ve 1500 μm olmak üzere üç farklı parça büyüklüğünde substratlar elde edildi. 1500 μm büyüklüğünde olanlar alınarak 100 ml'lik erlenmayer içerisinde hacim %30 olacak şekilde 3 g tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu eklendi. 121°C'de 15dk otoklavlanarak steril edildi. Soğuduktan sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden %20 inokülüm besiyerinden katılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2. METOT

3.2.1. Mikroorganizma Üretimi

Çalışmamızın başında *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 alındı. Bakterimizi katı besiyerine ekimi yapıldı. Daha sonra petri kutuları 37°C 24 saat inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen bakteriler LB ve NB besiyerlerine aktarıldı. LB ve NB besiyerleri 37°C 24 saat boyunca 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra bakteri üretimi için LB ve NB sıvı besiyerleri kullanıldı. Bu besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 250 ml'lik erlenmayerlerde 100 ml farklı sıvı besiyeri içeren ortamlara 5 ml örnek eklenerek, mikroorganizmalar 0.6 absorbansa gelecek şekilde 37°C'de 24 saat süreyle üretildi. Buradan alınan 0.5 ml alınarak taze NB besiyerine ekimi yapıldı. Ardından 37°C'de 150 rpm'de 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürelerin sonunda örnekler +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre sporlardan arındırıldı. Enzim aktivitesi ve optimizasyon çalışmaları için üst sıvı kullanıldı.

3.2.2. Çözeltiler

Çözeltilerin hazırlanması:

Çözeltiler 1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması:

pH:7.0; 0.1 M Tris- HCl Tamponu: 50 ml 0.1 M Tris-baz ve 46.6 ml 0.1 M HCI hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinden karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH:8.0; 0.1 M Tris- HCl Tamponu: 50 ml 0.1 M Tris-baz ve 29.2 ml 0.1 M HCI hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinden karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH:9.0; 0.1 M Tris- HCl Tamponu: 50 ml 0.1 M Tris- baz ve 5.7 ml 0.1 M HCI hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinden karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH:6.8; 0.1 M Fosfat Tamponu: 24.5 ml 0.1 M Na_2HPO_4 ve 25.5 ml 0.1 M NaH_2PO_4 hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinden karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH:7.0; 0.1 M Fosfat Tamponu: 30 ml 0.1 M Na_2HPO_4 ve 19 ml 0.1 M NaH_2PO_4 hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinden karıştırıldıktan sonra hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Alkalin Çözeltisi

% 4 Na_2CO_3

% 4 Na-K tartarat

% 2 $CuSO_4$

Bir beherde 100 ml için %4 oranında Na_2CO_3 hazırlandı. Ayrı tüplerde hazırlanan Na-K tartarat ve $CuSO_4$ 'ten 1'er ml ilave edilerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Alkalin çözeltisi protein miktar tayininde kullanıldı.

Azo-kazein hazırlanması

0.05 gr azokazein 10 ml 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH:9) içerisinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

3.2.3. SSF Besiyerinde Enzim Ekstraksiyonu

Bakteriyel kültür ortamında bulunan enzimi ekstrakte etmek için SSF besiyeri ortamına 10 ml çeşme suyu eklenerek 30 dakika çalkalanması sağlandı. Bu süre sonunda örnekler steril sargı beziyle süzüldükten sonra +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre sporlardan ve katı atıklardan arındırıldı. Süpernatant üzerinden proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.4. Proteaz Aktivite Tayini

Proteaz aktivite tayini için 150 µl enzim çözeltisine 250 µl %0.5 azokazein (0.1 M Tris-HCI tamponu; pH: 9.0) ilave edilerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda ortama 1 ml TCA katılarak reaksiyon durduruldu. 15 dakika +4°C'de bekletildikten sonra +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika 10000 rpm de santrifüj edildi. 1 ml üst sıvı üzerine 500 µl NaOH ilave edilerek 420 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi (Leighton ve ark. 1973).

Bir enzim ünitesi deney koşullarında 1 µmol azokazeini 30 dakikada parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.2.5. SSF Besiyerinde Proteaz Üretimi

Çalışmamızda pamuk kabuğu, mısır küspesi, pirinç kabuğu, buğday kabuğu, arpa kabuğu ve mercimek kabuğu kullanarak SSF besiyeri hazırlamak için bu substratlar 3'er gr tartılarak 100'lik erlenlere koyuldu. Üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edildikten sonra 121°C'de 15 dk otoklavlandı.

NB besiyerinde üretilen stok bakteriler steril ortamda her bir erlene 3 ml ilave edildi. Daha sonra örnekler 37°C ve 150 rpm'de 24, 48, 72, 96 ve 120. saatte kadar inkübasyona bırakıldı. Ekstraksiyon için her 24 saattin bitiminden yarım saat önce örneklere 10 ml çeşme suyu daha ilave edilip 30 dk çalkalandıktan sonra SSF besiyerindeki sıvı kısım süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne alınarak soğutmalı santrifüjde 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde ettiğimiz üst sıvı (süpernatant) enzim aktivite tayininde kullanıldı.

3.2.6. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini standart olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (5 mg/ml-1) Bovin serum albumin'den bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı.

Tüplere 2.5 ml alkalin çözeltisi konulduktan sonra üzerine 25 µl enzim ve 225 µl saf su ilave edildi. Örnekler 15 dakika 40ºC'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 250 µl Folin Reaktifi (FCR) ilave edilerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Lowry ve ark. 1951).

3.2.7. Enzimi Üretimi Üzerine Değişik Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi

3.2.7.1. SmF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Değişik Besiyerlerinin Etkisi

SmF yöntemiyle enzim üretimi üzerine değişik besiyerlerinin etkisini incelemek için NB ve LB besiyerlerleri kullanıldı. Hazırlanan besiyerlerine %0.5 bakteri ekimleri yapılarak 37°C'de 150 rpm'de 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda alınan örnekler +4°C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvılardan proteaz aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.7.2. SSF Ortamında Uygun Substratın Seçimi

Pirinç kabuğu, pamuk kepeği, mısır küspesi, buğday kepeği, arpa kabuğu ve mercimek kabuğu her biri ayrı ayrı 3'er gram tartılarak 100 ml'lik erlenlere aktarıldıktan sonra üzerlerine çeşme suyu eklenip 121°C' de 15 dk otoklavlandı.

Daha sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden her bir erlene 3'er ml ekimi yapılarak 37°C ve 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı elde edilen süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.2.7.3. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Farklı partikül büyüklüğündeki substratlar alınarak 3'er gr tartılıp erlenlere konuldu, üzerine 10 ml çeşme suyu ilave edilip steril etmek için otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (NB) her bir erlene 3'er ml bakteri ekimi yapıldıktan sonra 37 °C 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir 5 gün süreyle (24, 48, 72, 96, 120. saat) örnekler alınıp enzim aktivite tayini yapılarak en uygun inkübasyon süresi belirlendi.

3.2.7.4. SSF Ortamında Uygun Ekstraksiyon Ortamının Tespiti

Mısır küspesi 3 g tartılıp 100 ml'lik erlenmayerler içerisine konuldu ve 10 ml çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (NB) her birine 3'er ml bakteri ekimi yapılarak. 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek amacıyla proteaz için 24. saat sonunda SSF ortamlarına ekstraksiyon kaynakları olarak; çeşme suyu (kontrol) , tampon (0.1 M pH:9.0 Tris-HCI tamponu), çeşme suyu ile 10 ml olacak şekilde hazırlanan %1 SDS, 50 mM NaCl, %1 Tween-80, %1 Triton X-100 çözeltileri ve saf su (10 ml) eklendikten sonra 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Bu süre sonunda örnekler steril sargı bezlerinde süzüldükten sonra santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.5. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Proteaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için örnekler; 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55°C'deki sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı 24 saat bekletildikten sonra aktivite tayini yapılarak optimum sıcaklık belirlenmeye çalışıldı.

3.2.7.6. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzimlerin üretimi üzerine pH' ın etkisini incelemek için çeşme suyunun pH'sı pH 4'ten pH 10'a kadar 1.0 birim aralıklarla 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile ayarlandı. Hazırlanan SSF besiyerlerine çeşme suyu eklendikten sonra otoklavlandı. Otoklav sonucunda örneklere 3 ml ekim yapıldı. Daha sonra örnekler inkübasyona bırakıldı.

3.2.7.7. SSF Ortamında Uygun Nem Miktarının Seçimi

Proteaz üretimine etki eden uygun nem miktarını tespit etmek için SSF besiyerine, besiyeri hacminin % 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 olacak şekilde sırasıyla; 1 g, 2 g, 3 g, 4 g, 5 g ve 6 g ağırlığında mısır küspesi ilave edildi. Üzerine 10 ml çeşme suyu eklenerek otoklavlandı. Daha sonra SSF besiyerlerine bakteri ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı. 120. saate kadar her 24 saatte bir örneklerin üst sıvısından aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.8. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi

Mısır küspesi 3 g tartılıp 100 ml 'lik erlenmayerler içerisine konuldu ve 10 ml çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Uygun inokülüm hacminin belirlenmesi için sıvı besiyerinden SSF ortamına 1-2-3-4-5-6 ve 8 ml'ye kadar arttırılarak bakteri ekimi yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C'de 150 rpm'de çalkalandı. Proteaz için 24. saat sonunda ekstraksiyon medyumu olarak 10 ml çeşme suyu uygun ekstraksiyon çözeltisi olarak eklendi ve 30 dakika çalkalanmaya devam etti.

Bu süre sonunda örnekler steril sargı bezlerinde süzüldükten sonra santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.9. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

Mısır küspesi daha önceki deney basamağında belirlenen miktarlarda katı bitki atıkları tartılıp 100 ml'lik erlenmayerlere konulup otoklavlandı. Otoklav işlemi sonrası her aktivite tayini için daha önceden belirlenen miktarlarda ekim yapıldı ve daha sonra farklı çalkalama hızlarında (60- 100- 120- 150- 180 ve 200 rpm) inkübasyona bırakılan örneklere proteaz için 24. saatte 10 ml çeşme suyu eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyallerin üst sıvısından proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.10. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımının Belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine kepek karışım miktarını belirlemek için proteaz için 24 saat pirinç kabukları ile mısır küspesi toplam kütleleri 3 g olacak şekilde 0.5 gram mısır küspesinden başlanarak (0.5 g mısır küspesi +2.5 g pirinç kabuğu ; 1 g+2 g; 1.5 g+1.5 g, 2 g+1 g; 2.5 g+0.5 g) farklı karışım oranlarında karıştırıldı. 3 g tartılan tarımsal atıkların her biri farklı 100 ml'lik erlanmayerler içerisine konuldu. Üzerlerine 10 ml çeşme suyu eklenip otoklavlandı. Daha sonra sıvı besiyerinden (NB) her birine 3'er ml bakteri ekimi yapıldı.

Çalkalayıcıda 37°C'de 150 rpm'de çalkalandı. Her inkübasyon süresi sonunda SSF ortamlarına 10 ml çeşme suyu ilave edilerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.11. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Partikül Büyüklüğündeki Substratın Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız kurutulmuş bitkisel atıkları blendırde öğütüldükten sonra 3 farklı elek yardımıyla (500, 1000 ve 1500 µm çaplı) elendi. Elde edilen bu subtratlardan SSF besiyeri hazırlanarak sterilizasyon ve ekim işlemleri yapıldıktan sonra inkübasyona bırakıldı. Daha sonra enzim aktivitesine bakılarak uygun büyüklükteki substrat tespit edildi. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarda bu büyüklükteki substrat kullanıldı.

3.2.7.12. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Besiyeri ortamlarına %1 olacak şekilde 0.1 g miktarlarında tartılan farklı karbon kaynaklarından maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz ve sükroz steril edildikten sonra mısır küspesi daha önceki deney basamağında belirlenen miktarlarda tartılıp 100 ml 'lik erlenmayerlere 10 ml çeşme suyu eklenerek otoklavlanıp SSF besiyerlerine eklendi. Proteaz aktivite tayini için 2 ml bakteri ekimi yapıldı.

Daha sonra proteaz için 24. saatin sonunda aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 ml) çeşme suyu eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Proteaz için 24. saatin sonunda elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.13. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

Besiyeri ortamlarına %1 olacak şekilde 0.1 g miktarında tartılan azot kaynaklarından pepton, beef extract, kazein, amonyum nitrat (NH_4NO_3), amonyum klorid (NH_4Cl), yeast extract, amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$ ve tryptone daha önce tartılıp hazırlanmış 100 ml'lik erlenmayerler içeresinde bulunan mısır küspesi bulunan SSF ortamlarına eklenerek otoklavlandı.

Otoklav sonrası aktivite tayini için daha önceden belirlenen miktarda ekim yapıldı. Proteaz için 24 saat inkübasyona bırakılan örneklere inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 ml) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp proteaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.14. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal İyonlarının Etkisi

Mısır küspesi 3 g tartılıp 100 ml'lik erlenmayerlere konuldu. Daha sonra %0.1 olacak şekilde $FeSO_4.7H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ ve $CaCl_2$ 0.01 g miktarlarında metal tuzlarından tartıldı ve SSF besiyerlerine eklenip otoklavlandı. Otoklav sonrası proteaz aktivite tayini için örneklere 2 ml bakteri ekimi yapıldı.

Proteaz için 24. saat inkübasyona bırakılan örneklere inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini için uygun ekstraksiyon sıvısı (10 ml) eklenerek 30 dakika çalkalanmaya

devam etti. Santrifüjlenen materyalden üst sıvı elde edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim kaynağı olarak kullanılıp proteaz aktivite tayini yapıldı.

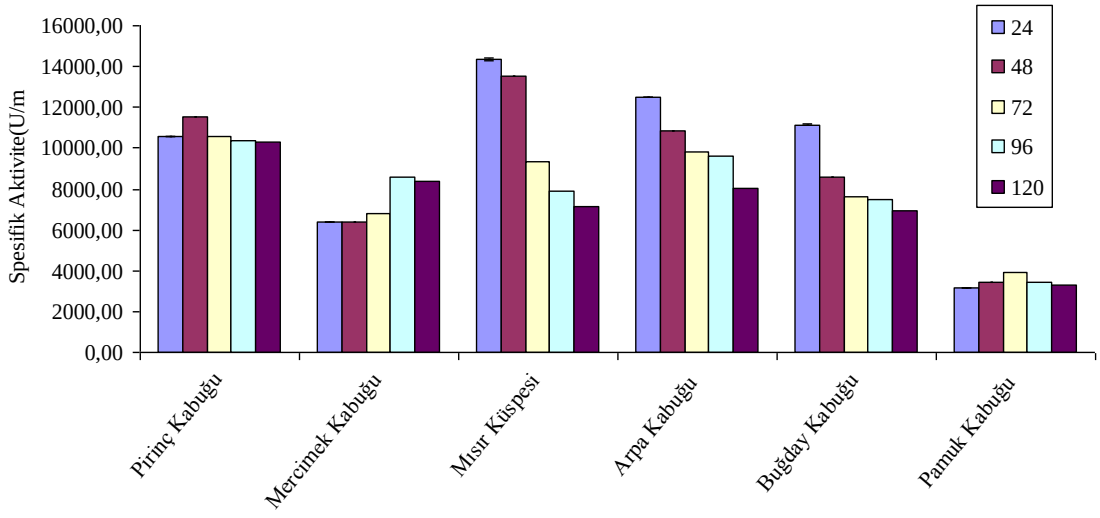
3.2.7.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler; 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'deki sıcaklıklarda 30 dk bekletildikten sonra aktivite tayini yapılarak optimum sıcaklık belirlenmeye çalışıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. SSF Ortamında Uygun Substratın Seçimi

SSF ortamında buğday kepeği, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, pamuk sapı, arpa kabuğu, mısır küspesi substrat olarak kullanılarak *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'nin kültür edilmesi sonucu elde edilen proteaz aktivite değerleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



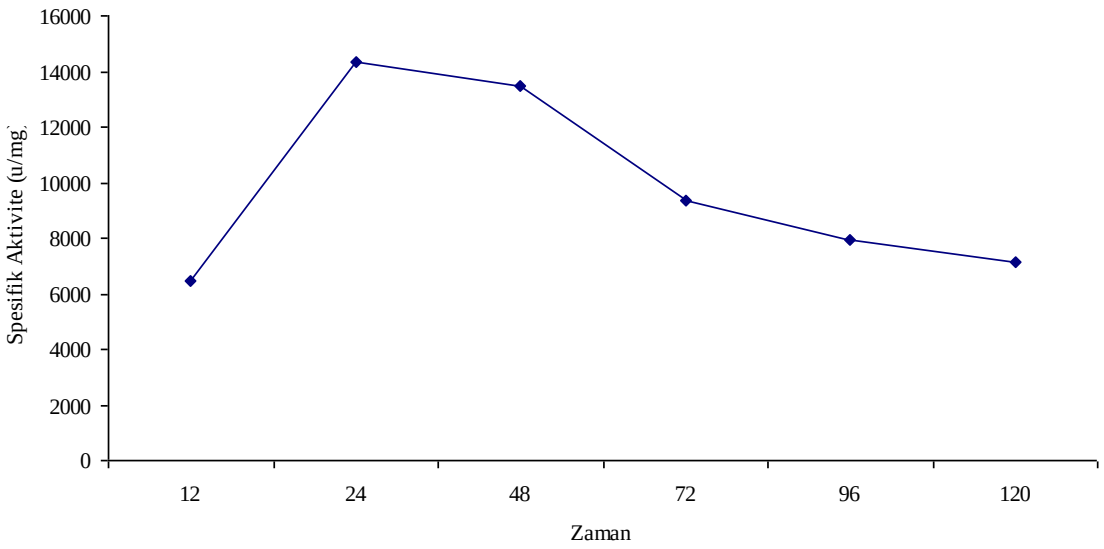
Şekil 4.1. Uygun Substratın Seçimi

B.licheniformis ATCC 14580'nin farklı bitki atıklarının bulunduğu SSF ortamlarında 120. saat kadar üretilmesiyle ilgili sonuçlara göre maksimum proteaz üretimi 24. saatte 14019.05 U/mg olarak öğütülmüş mısır küspesinin bulunduğu ortamda elde edilmiştir. Bunun dışındaki inkübasyon sürelerinde proteaz aktivite değerleri 24. saate göre daha düşük bulunmuş ve en düşük proteaz üretimi pamuk kabuğunda elde edilmiştir.

4.2. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Uygun inkübasyon süresini tespit etmek için 24. saatten 120. saate kadar ilk örnek 24. saatte alındıktan sonra her 24 saatlik sürelerde *B.licheniformis* ATCC 14580'nin kültür edildiği ortamlardan örnekler alınıp proteaz aktivite tayini yapıldı. Bulunan değerler Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

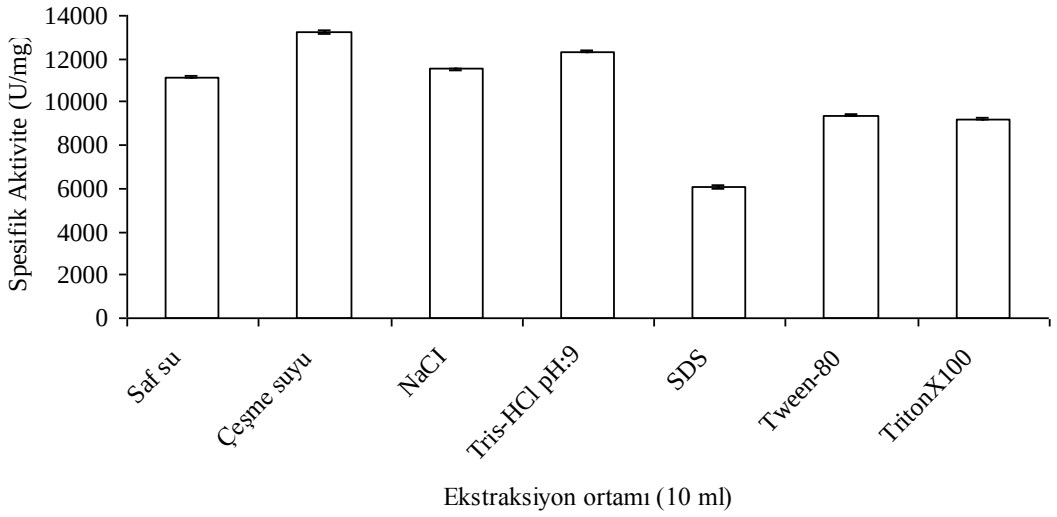
B.licheniformis ATCC 14580'nin mısır küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamlarında en yüksek proteaz üretimi 24. saatte 14019.05 U/mg olarak gerçekleşmiştir. Proteaz aktivitesinin diğer inkübasyon sürelerinde 24. saatte göre azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

4.3. SSF Ortamında Uygun Ekstraksiyon Ortamının Tespiti

Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemede uygun katı substratların bulunduğu SSF ortamlarının her biri için ayrı ayrı 10 ml 50 mM NaCl, %1 TritonX100, %1 SDS, %1 Tween-80, saf su, Tris-HCI pH:9.0 tamponları ve çeşme suyu (kontrol) eklenerek elde edilen üst sıvılar proteaz aktivitesi için enzim kaynağı olarak kullanıldı.

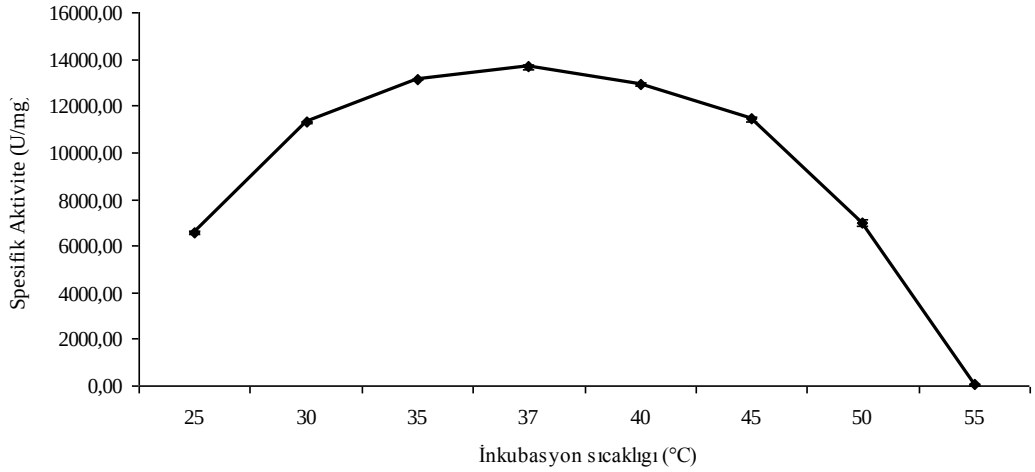


Şekil 4.3. SSF Ortamında Uygun Ekstraksiyon Ortamının Tespiti

B.licheniformis ATCC 14580'nin mısır küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamında eklenen 10 ml çeşme suyunun diğer ekstraksiyon ortamlarına göre daha yüksek oranda proteaz üretimi (13263.9 ± 67.4 U/mg) meydana getirdiği belirlendi. SDS ekstraksiyon medyumu olarak kullanıldığı ortamda en düşük proteaz üretimine rastlanıldı.

4.4. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

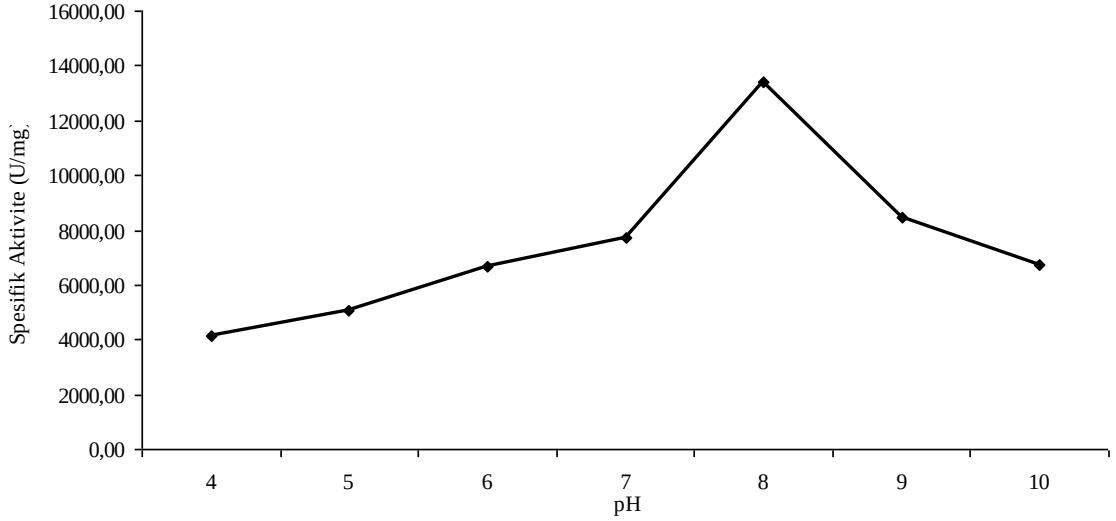
B.licheniformis ATCC 14580 mısır küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamında kültür edildi. Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için SSF besiyerleri 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 ve 55ºC'de inkübasyona bırakıldı. Proteaz aktivitesi incelendiğinde en uygun proteaz üretim sıcaklığı 37ºC (13680.7 ± 96,7 U/mg) olarak tespit edildi. Bulunan değerler şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

4.5. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine pH'ın Etkisi

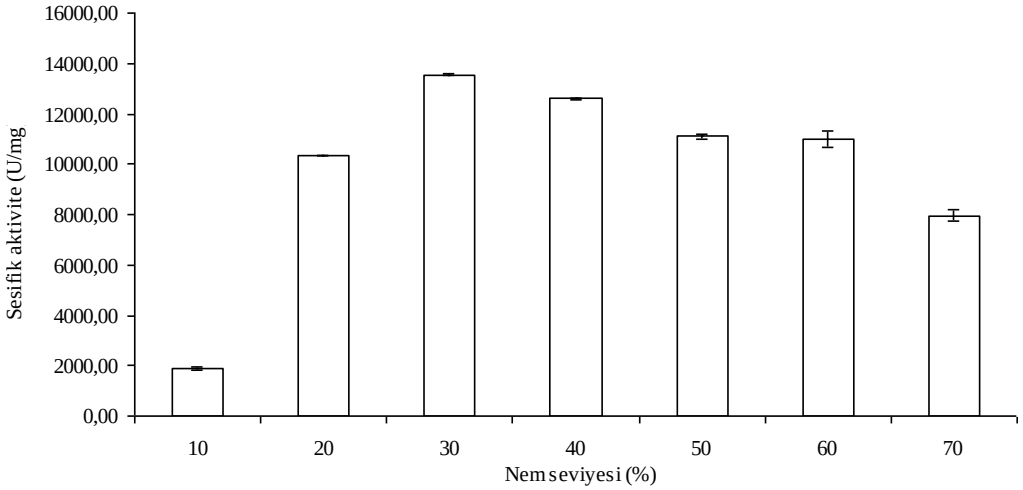
B.licheniformis ATCC 14580'nin kültür edileceği ortamda proteaz üretimi için mısır küspesi katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamında pH:4.0 ile başlayan ortamda proteaz üretiminde giderek bir artış gözlenmiş ve en uygun üretim pH'sı 8.0 (13422.3 ± 12.8 U/mg) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Enzim Üretimi Üzerine pH'ın Etkisi

4.6. SSF Ortamında Uygun Nem Miktarının Seçimi

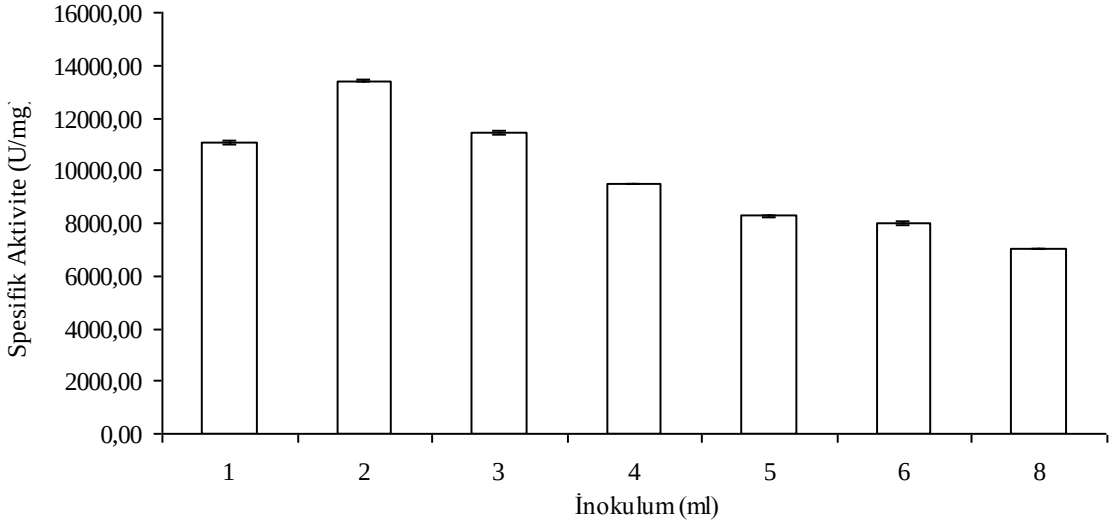
B.licheniformis ATCC 14580'nin kullanıldığı SSF ortamında proteaz üretimi için en uygun substrat miktarı olarak %30'luk (3 g) mısır küspesinin kullanıldığı ortamda proteaz üretimi 13554.2±17.4 U/mg olarak belirlendi. Kepek miktarı arttırıldığında proetaz aktivitesinin aşamalı olarak düştüğü görüldü. Çalışmada elde edilen sonuçlar Şekil4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Uygun Nem Miktarlarının Seçimi

4.7. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi

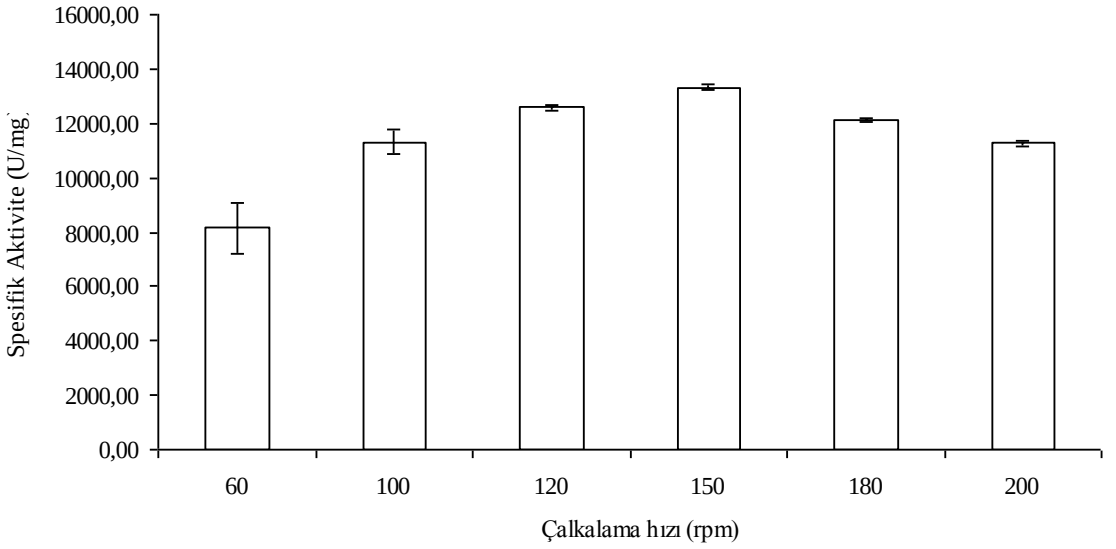
Enzim üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisini belirlemek için yapılan çalışmada *B.licheniformis* ATCC 14580'den en yüksek proteaz üretimi için uygun inokülüm hacmi 2.0 ml (13397.6 ± 45.1 U/mg) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm Hacminin Etkisi

4.8. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

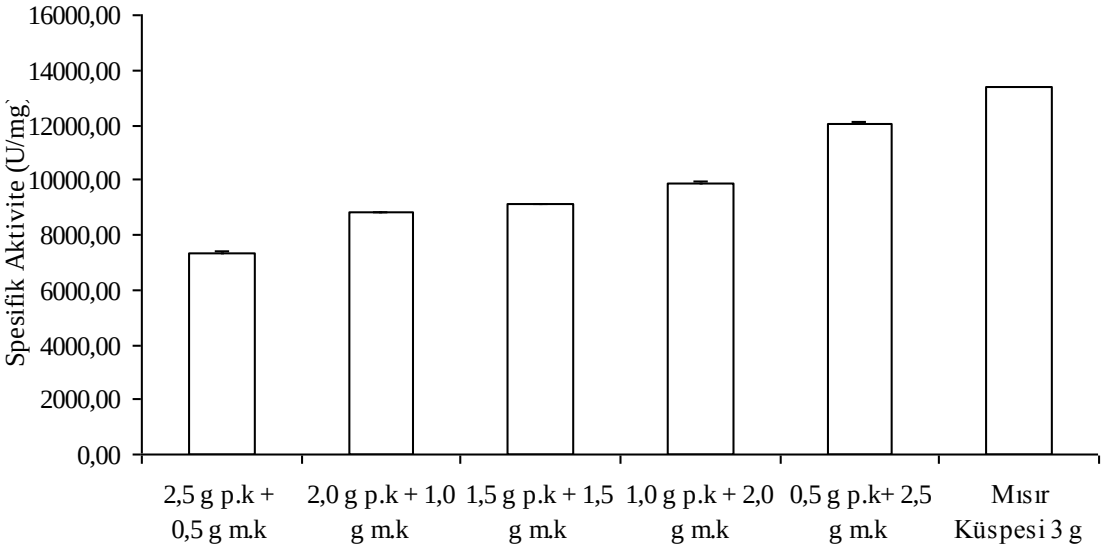
Yaptığımız çalışmada SSF ortamlarında *B.licheniformis* ATCC 14580'den maksimum proteaz üretimleri için mısır küspesi farklı çalkalama hızlarında (60- 100- 120- 150- 180 ve 200 rpm) inkübasyona bırakıldı. Maksimum proteaz üretimi için uygun çalkalama hızı 150 rpm (13315.8 ± 97.2 U/mg) olarak tespit edildi.



Şekil 4.8. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Çalkalama Hızının Etkisi

4.9. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımının Belirlenmesi

SSF ortamında en iyi aktivite veren substrat karışımlarının kullanılması ile yaptığımız deneyde maksimum proteaz üretimleri için 2.5 g mısır küspesi–0.5 g pirinç kabuğunun (12060.6 ± 17.8 U/mg) substrat olarak kullanıldığı SSF ortamlarında maksimum enzim üretimleri gerçekleşmiştir.

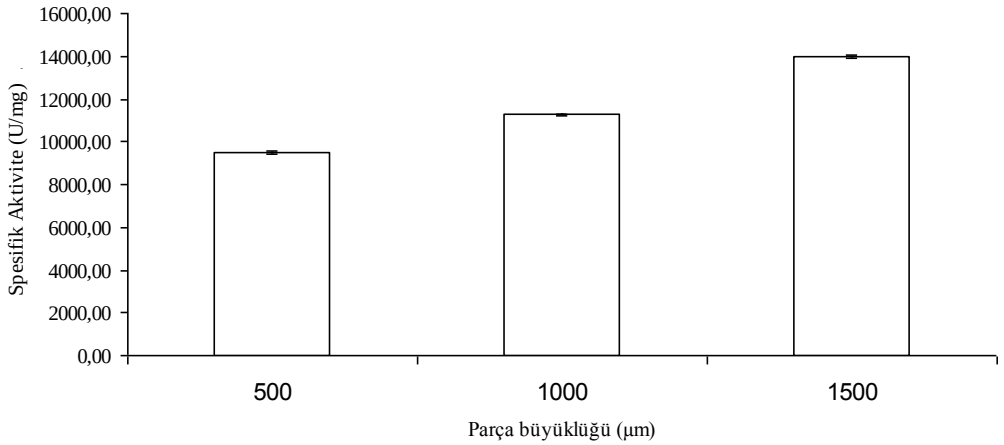


Şekil 4.9. Enzim Üretimi Üzerine En İyi Aktivite Gösteren Substrat Karışımının Belirlenmesi

m.k: Mısır küspesi, p.k: Pirinç kabuğu

4.10. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Partikül Büyüklüğündeki Substratın Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız kurutulmuş tarımsal atıklar blendırda öğütüldükten sonra 3 farklı elek yardımıyla (500 µm, 1000 µm ve 1500 µm çaplı) elendi. Farklı partikül büyüklüğündeki substratlar SSF besiyerinde kullanıldı. Şekil 4.10'da da görüldüğü gibi en fazla enzim üretiminin en büyük partikül büyüklüğündeki substratta 1500 µm'de (13987.9 ± 98.4 U/mg) olduğu belirlendi.

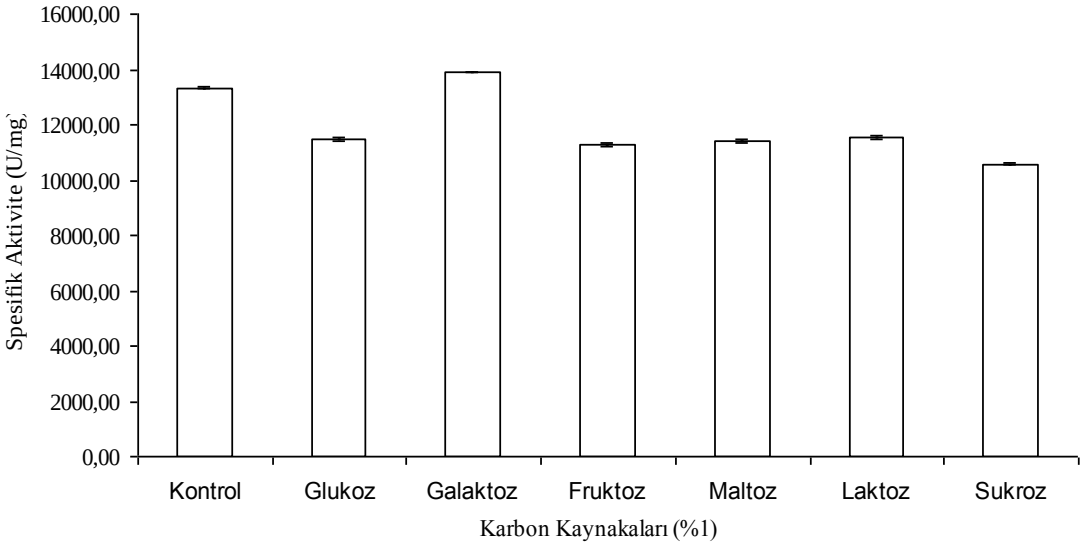


Şekil.4.10. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Partikül Büyüklüğündeki Substratın Etkisi

4.11. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikroorganizmaların kültür edildiği SSF ortamlarına farklı karbon kaynakları (%1 maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sükroz) ilave edilmiştir. Maksimum proteaz üretimi galaktozun bulunduğu ortamda (13900.6 ± 18.2 U/mg) olarak tespit edildi.

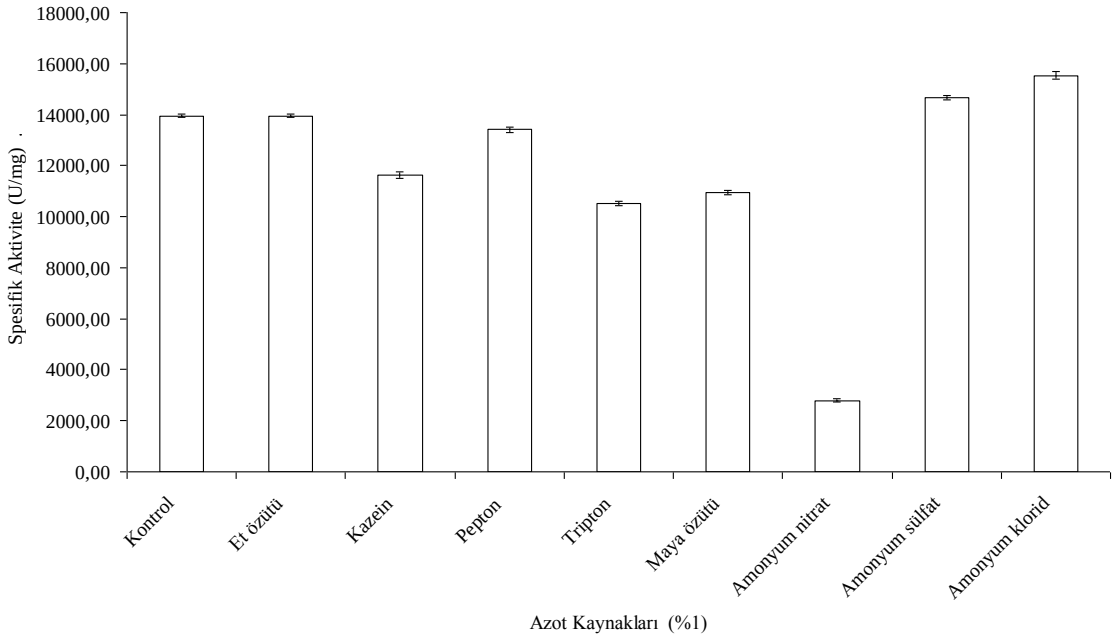
Kültür ortamına eklenen karbon kaynaklarının galaktoz dışında hiçbiri proteaz üretiminde arttırıcı rol oynamamıştır.



Şekil 4.11. Proteaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

4.12. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

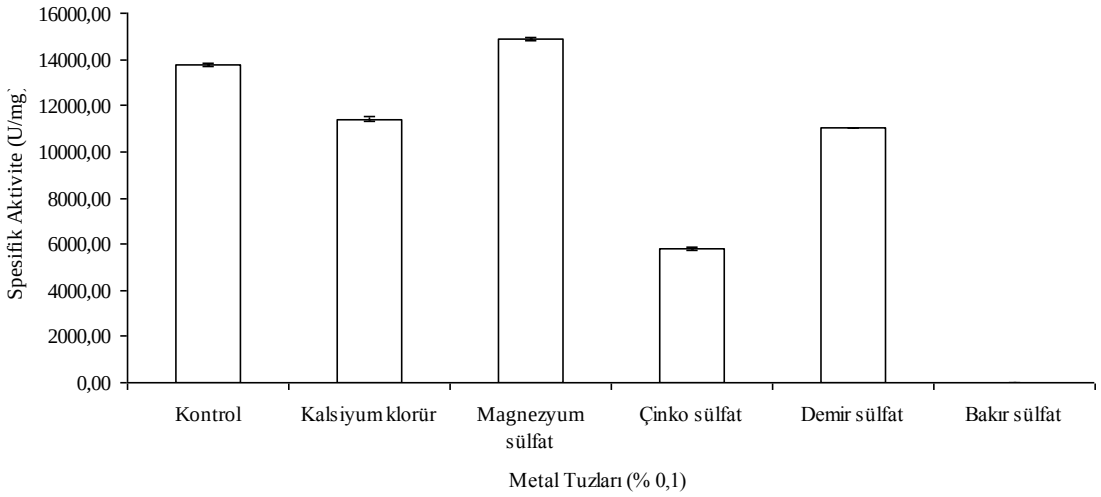
Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikroorganizmanın kültür edildiği SSF ortamlarına farklı organik ve inorganik azot kaynakları (%1 kazein, pepton, tripton, maya özütü, amonyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorid ve et özütü) ilave edilmiştir. Azot kaynakları arasında amonyum klorid %105 ve et özütü %111 proteaz aktivitesini kontrole göre artırmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Proteaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

4.13. SSF Ortamında Enzim Üretimi Üzerine Farklı Metal Tuzlarının Etkisi

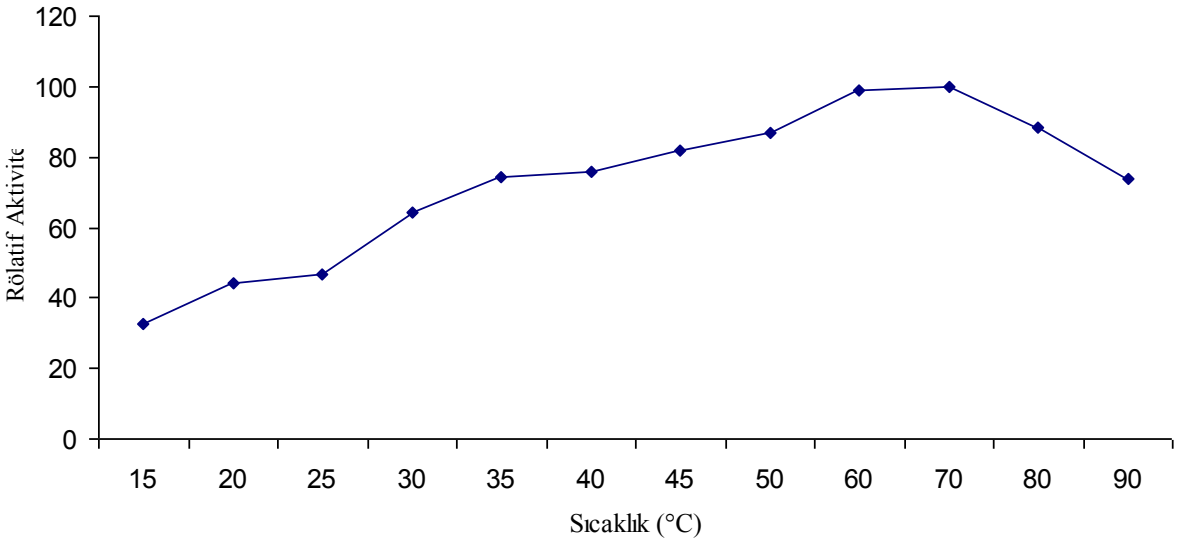
Mısır küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamlarına eklenen %0.1 konsantrasyonundaki metal tuzları bulunan ortamlarda kültür edilen *B.licheniformis* ATCC 14580'nin üretildiği $MgSO_4.7H_2O$ (14884.8 ± 49.7 U/mg) ortamında maksimum proteaz üretimi kontrole göre daha fazla olduğu tespit edildi. Metal tuzlarını içeren ortamlardan $CuSO_4$ içeren ortamda proteaz üretimi inhibe edilmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.13. Proteaz Üretimi Üzerine Metal Tuzlarının Etkisi

4.14. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

B.licheniformis ATCC 14580'nin mısır küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamında kültür edildi. Proteaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için reaksiyon başlatıldıktan sonra örnekler; 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'deki sıcaklıklarda 30 dk bekletildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Optimum aktivite sıcaklığı 70°C'de tespit edildi. Bulunan değerler şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Katı faz fermentasyonu yıllardır bilinen bir teknik olmasına rağmen son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır (Botella ve ark. 2005). Bu işlem, tarımsal atıkların doğal formlarında kullanılabildiğinden ve atıkların birikimi sonucu oluşan çevresel problemler azaldığından dolayı da avantajlıdır.

Bu çalışmada, *B.licheniformis* ATCC 14580 türünden tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı, katı substrat fermantasyon tekniği ile proteaz üretimi incelenmiştir. *B.licheniformis* ATCC 14580'nin tercih edilmesinin nedeni; değişik ekstraselüler enzimleri sentezleyebilme ve bu enzimleri çok miktarlarda salgılama yeteneğinde olması ve büyüme gereksiniminin basit oluşudur. En önemli avatanjlarından biri de kuşkusuz bir çoğunun patojen olmamasıdır (Jose ve Kurup 1999).

Katı faz fermantasyonunda mikroorganizmalar nemli katı bir yüzey üzerinde gelişir ve ortamda bulunan serbest hava kullanılır. Böylece fermantasyon ortamı ideal olarak bazı mikroorganizmalardan belirli metabolitleri elde etmek için uygun olan doğal bir büyüme ortamına benzer hale gelmektedir (Pandey 2008).

SSF'te fermantasyon süreci için uygun katı substrat seçimi oldukça önemli bir faktördür. Bu yüzden mikrobiyal büyüme ve ürün eldesi için çok sayıda tarımsal sanayi atıkları kullanılmaktadır. SSF'te kullanılan başlıca substratlar daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi genellikle pirinç, buğday, darı, arpa, mısır, soya fasulyesi gibi yöresel olarak farklı kullanım oranları gösteren sanayi ve tarımsal atıklardır (Pandey 2006).

Çalışmamızda, SSF yöntemiyle *B.licheniformis* ATCC 14580 türünün proteaz üretimi incelenmiştir. Farklı tarımsal atıkların bulunduğu SSF ortamlarında kültür edilen *B.licheniformis* ATCC 14580 en iyi proteaz üretimini mısır küspesinin bulunduğu ortamlarda gerçekleştirmiştir. Kullanılan tarımsal atıklar karbonhidratlarca zengin olması, önemli oranda vitamin ve mineral madde içermeleri mikroorganizmaların üremesini kolaylaştırmış ve enzim üretme kapasitelerini arttırmış olabilir.

Mahalaxmi ve ark. (2010) *Amcolatopsis sp.* RSP suşunu kullanarak SSF yöntemiyle Rifamycin B'yi üretmek için çeşitli tarımsal ve zirai atık kullanmışlardır. En iyi üretimi mısır kabuğundan elde etmişler. Mukherjee ve ark. (2008) termofilik

Bacillus subtilis kullanarak SSF yöntemiyle alkalin proteaz üretmek için yaptığı çalışmada en iyi proteaz aktivitesini patates kabuğu ve *Impereta cylindrica* çimeninde elde etmişlerdir. Joo ve ark. (2004) *Bacillus sp'*den SSF yöntemiyle alkalin proteaz üretimini gerçekleştirmek için en iyi enzim aktivitesini buğday unundan elde etmişlerdir.

Mikrobiyal metabolizma kompleks bir süreç olup fermantasyon ve ortam bileşenleri tarafından etkilenir. Maksimum enzim üretimi gerçekleşen inkübasyon sürelerinden sonra enzim aktivitelerinde görülen azalmaların nedeni fermantasyon ortamında bulunan diğer bileşenler ile meydana gelen enzim etkileşimleri sonucunda enzim yapısında oluşan konformasyonel değişiklik ve meydana gelen denatürasyondan kaynaklı olabilir. Bunun yanında ortama salgılanan diğer hidrolitik enzimlerin etkisi sonucu enzim üretiminde azalma meydana gelmiş olabilir (Hamilton ve ark. 1997)

Bu çalışmada *B. licheniformis* ATCC 14580 katı substrat olarak mısır küspesinin bulunduğu ortamda kültür edildiklerinde maksimum proteaz aktivitesi 24. saatte 14019,05 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.). Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir. (Pandey 2006; Uyar ve Baysal 2004)

Mehrotra ve ark. (1999) *Bacillus sp.'*den alkalin proteaz üretimi sırasında enzimdeki maksimum aktivitenin 20. saatte olduğunu raporlamışlardır. Mehta ve ark. (2006) alkalofilik *actinomycete*'den alkalin proteaz üretiminde SSF yöntemiyle kullandıkları katı substratlardan en yüksek aktiviteyi 32. saatte elde etmişlerdir.

Ekstraksiyon fermente olmuş biyokütleden enzim elde etmek için önemlidir ve bundan dolayı uygun bir solvent seçimi gereklidir. Ekstraksiyon işlemi için düşük solvent hacmi kullanılırsa total aktivitede azalma gözlenir ve bu yetersiz solvent hacmi fermente olmuş katı substrat kütlesine yeterince nüfus edemez (Swain ve Ray 2007). Uygun ekstraksiyon sıvısı seçimi enzim elde etme aşamasında maliyeti azaltan önemli bir farktördür.

Enzim üretimi üzerine ekstraksiyon ortamının etkisini belirlemek için katı substrat olarak mısır küspesinin kullanıldığı SSF ortamında en yüksek proteaz aktivitesi ekstraksiyon ortamı olarak çeşme suyunda (13263.9 U/mg) elde edilmiştir. Çeşme suyunun mineral madde bakımından zengin olması mikroorganizmanın enzim üretme yeteneğini arttırmış olabilir (Priest ve ark. 1994; Chellappan ve ark. 2006). SSF'te

amaçlanan enzim üretimi için oluşturulacak ortamın üretim maliyetini azaltmak oldukça önemlidir.

Kumar ve Takagi (1999) *Bacillus sp.*'dan SSF yöntemiyle alkalin proteaz üretiminde aktivitenin en fazla Tween-20'de olduğunu, SDS'nin ise proteaz aktivitesinde azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir (Akcan 2009).

Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için yaptığımız çalışmada proteaz için maksimum enzim üretimi 37°C'lik (13680.7 U/mg) inkübasyon ortamından elde edilmiştir. Sıcaklık 45°C'den sonra ani bir düşüş gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Hamilton ve ark. 1997; Jin ve ark. 1990). Bunun yanında yapılan çalışmalarda uygun inkübasyon sıcaklıkları 25°C ile 45°C arasında değişiklik göstermektedir (Oberoi ve ark. 2001; Ferrero ve ark. 1996; Gangadharan ve ark. 2006).

SSF'te sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın gelişebilmesi, enzim ya da metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığıyla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sodhi ve ark. 2005). Genellikle katı substrat fermantasyonunda ortam sıcaklığı 25-37ºC aralığında değişmektedir ve mikroorganizmaların büyüme kinetiğine bakıldığında sıcaklığa bağlı olarak bu sıcaklık aralıklarında kararlı kaldığı belirtilmektedir (Krisha ve Chandrasekaran 1996). Maksimum enzim üretimi 37°C'de yapılan deneylerde elde edilmiştir ve bu sıcaklık literatürde belirtilen sıcaklık değerlerine oldukça yakındır.

İnkübasyon sürelerinden sonra ortamda oluşmaya başlayan sekonder metabolitlerin, enzimin denatürasyonuna neden olup enzim miktarında düşüşe yol açtığını düşünmüşlerdir (Johnvesly ve Naik 2001). Kullanılan bakterinin büyüme hızı ve enzim üretme özelliğinin inkübasyon süresini etkilediğini söylemişlerdir (Uyar ve Baysal 2004). Aynı zamanda inkübasyon sürelerinin farklı olması, çalışmalarda kullanılan mikroorganizma özelliklerinin farklı olması ve katı substratların içerdikleri besin maddelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sıcaklık biyokimyasal reaksiyon oranlarını etkiler ve SSF'te önemli bir parametredir, ancak kontrolü SmF'den daha zor olduğu belirtilmiştir (Mitchell ve ark. 2008).

B.licheniformis ATCC 14580'nin kültür edileceği SSF ortamlarının başlangıç pH'sı 4.0-10.0 değerleri arasında maksimum proteaz için pH:8.0 (13422.3 U/mg) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).

pH çeşitli metabolik aktiviteler üzerinde etki göstererek hücre zarından geçen bazı bileşikleri etkileyen her fermantasyon işleminde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür (Battal 2004). Enzimler pH'a karşı oldukça duyarlıdırlar. Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı, enzimin primer ve sekonder yapısını oluşturan aminoasitlerin iyonlaşması pH'tan etkilenir. Bu durum enzim aktivitesine de etki eder. pH'ta meydana gelen herhangi bir değişiklik protein yapısında anlamlı değişikliklere yol açar. pH enzimlerin aktivasyon ve inaktivasyonunda önemli bir rol oynar. Her enzim maksimum enzim aktivitesi için optimum bir pH değerine sahiptir.

Mikrobiyal büyüme ve metabolizma hidrojen iyon dengesini ve dolayısıyla kültür ortamının pH'ını bozar (Pedersen ve Nielsen 2000). Proteaz üretimi üzerine başlangıç pH'sı etkisi ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (Olajuyigbe ve Ajele 2005).

Proteazlarda özellikle alkalin olanlar için genellikle pH:8.0 ve üzeri olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda proteaz üretimi için uygun başlangıç pH'ı 8.0 olarak tespit edilmiştir. Serin proteazların (E.C. 3.4.21) bir alt tipi olan "alkalin proteazlar" yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olmalarından dolayı başta deterjan endüstrisi olmak üzere deri, gıda, ipek ve kâğıt endüstrilerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Abu Sayem ve ark. 2006).

Mehta ve ark. (2006) izole ettikleri haloalkalofilik *Bacillus sp.*'den proteaz aktivitesini incelemişler ve pH:8.0 ve 9.0'da maksimum üretimin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada sterilizasyon için otoklavlanan örneklerin başlangıç pH'larının farklı olmasına rağmen örneklerin aynı pH özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun üzerine çalışmada katı substrat olarak kullanılan subtratın içerdiği yüksek yapıdaki proteinlerden (yaklaşık %60) dolayı bu proteinlerin tampon olarak görev yaptığını düşünmüşler (Souza ve ark. 2008).

Kumar ve Takagi (1999) alkali proteazların, optimum pH aralığı genellikle 9.0-11.0 olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte pH 6.0-12.5 değerleri arasında aktivite

gösteren alkali proteazlar da bulunmakta olup, geniş bir pH aralığında aktivite yeteneği, alkali proteazların farklı endüstriyel alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Cheng ve ark. (1995) *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan optimum pH değerinin 8.5 olduğunu açıklamışlardır. Kazan ve ark. (2005) ise *Bacillus clausi* GMBAE 42'den üretilen proteazın maksimum aktivite pH'sının ise 11.3 olduğunu belirtmişlerdir.

B.licheniformis ATCC 14580'nin kültür edileceği SSF ortamına katı substrat olarak eklenen substrat miktarının (nem) proteaz üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada en yüksek proteaz aktivitesi %30'luk (3 g ve 13554.2 U/mg) substrat miktarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6.). SSF tekniği kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda, kullanılan substrat miktarları farklı değerlerde (%15, 20, 70 ve 85) rapor edilmiştir (Krisha ve Chandrasekaran 1996; Kunamneni ve ark. 2005; Kokab ve ark. 2003). Elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Uyar ve Baysal (2004) *Bacillus sp.*'den proteaz üretmek için buğday kabuğunda nem oranını %30; mercimek kabuğunda ise %40 olarak raporlamışlar.

Ortamın nem içeriğindeki değişimler fermantasyon süresince havalandırma ve metabolik aktivitelerde değişimlere yol açar bu yüzden SSF işleminde nem oranını optimize etmek oldukça önemlidir (Baysal ve ark. 2003). Ortamın nem içeriğinin de değiştiği bu deneylerde düşük substrat konsantrasyonlarında enzim üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Kepek miktarı azlığında ortamda substrat az olacağından üreme ve enzim üretimi de yavaş olacaktır. Substrat miktarı belli bir miktarın üzerine çıktığında ise mikroorganizmalar için havalandırmanın güçlüğü, su oranının düşmesi gibi nedenlerden dolayı enzim üretimi de azalmış olabilir.

Enzim üretimi üzerine inokülüm hacminin etkisini belirlemek için yapılan çalışmada *B.licheniformis* ATCC 14580'den en yüksek proteaz üretimi için uygun inokülüm hacmi 2.0 ml (13397.6 U/mg) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7.). Araştırmacılar tarafından yapılan önceki çalışmalarda, kullanılan mikrooganizma ve substrat türüne bağlı olarak inokülüm hacimleri farklı değerlerde (% 10, 20, 25 ve 30) bildirilmiştir (Kunamneni ve ark. 2005; Chutmanop ve ark. 2008). Elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

İnokülüm seviyesindeki artış genelde organizmanın büyümesi ve büyüme ile ilgili aktiviteleri belirli oranda arttırmaktadır. İnokülüm seviyesindeki artış besin azlığından dolayı mikrobiyal aktivitede azalmaya neden olabilir. Düşük inokülüm hacmi üretim ortamındaki hücrelerin sayısında azalmayla sonuçlanabilir. Bu istenen ürün oluşumu ve substrat kullanımı için daha fazla zaman gereksinimine yol açar (Kunamneni ve ark. 2005). Yüksek miktarda bakteri ekimi nem seviyesini arttırarak yüzeyde emilmeyen bir tabaka oluşumuna ve difüzyon bariyeri gibi görev yapmasına ve katı substratın olumsuz etkilenmesine yol açar. Bu durum mikrobiyal aktiviteyi azaltacağından enzim üretiminde düşüşe yol açabilir (Kunamneni ve ark. 2005; Chutmanop ve ark. 2008).

Uyar ve Baysal (2004) ettikleri *Bacillus sp.*'den enzim üretimi için en uygun inokulum hacminin %20 olduğunu, Prakasham ve ark. (2006) ise alkalofilik *Bacillus sp.*'yi kullanarak enzim üretiminde optimum inokülüm oranını %30 olarak tespit etmşlerdir.

Yaptığımız çalışmada SSF ortamlarında *B.licheniformis* ATCC 14580'den maksimum proteaz üretimleri için uygun çalkalama hızı 150 rpm (13315.8 U/mg) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8.). Elde ettiğimiz bu sonuç önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Larson ve ark. 1994; Swain ve Ray 2007). Çalışmamızda 60, 100, 120, 180 ve 200 rpm de yapılan deney sonuçlarında ise enzim üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, derin fermantasyona göre daha viskoz olan katı substratın kullanıldığı ortamda düşük karıştırma hızında oksijen transferi sınırlanmakta, yüksek karıştırma hızlarında ise mikroorganizmanın gelişmesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Düşük karıştırma hızında enzim aktivitesindeki azalma fermantasyonun oksijen sınırlandırmasından veya katı substrata bağlı besinlerin ortama yeterince geçememesinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Mikroorganizmalardan enzim optimizasyonu çalışmalarında çalkalama hızları farklılık göstermektedir. Bunun yanında diğer araştırmacılar tarafından yapılan önceki çalışmalarda enzim üretimi için uygun çalkalama hızları 120, 150,180, 200 ve 250 rpm olarak tespit edilmiştir (Uyar ve Baysal 2004; Chutmanop ve ark. 2008). Fermantasyon sisteminde çalkalama sistemdeki homojeniteyi arttırır ve gradiyentleri bozar. Bakteri hücreleri substrat yüzeyine sıkıca bağlanmadıklarından, çalkalama ile başlıca hava

akımıyla ilişkili biyokütle engeli ortadan kaldırılabilir. Karmaşık moleküller olan enzimleri mekanik güce duyarlıdırlar ve uygun olmayan çalkalama hızlarında enzim denatürasyonu meydana gelebilir (Kunamneni ve ark. 2005). Düşük çalkalama hızı fermantasyon ortamında organizmanın büyümesi ve enzim üretimi için gerekli olan zayıf havalandırma oranına neden olabilir.

Joo ve ark. (2004) alkalofilik *Bacillus sp.* 103 bakterisinden ekstraselluler alkalin proteaz üretiminde maksimum enzim aktivitesi elde etmek için mikroorganizmayı 250 rpm 'de tespit etmişler. B. Elibol ve Moreira (2005) SSF koşulları altında *Teredinobacter turnirae* maksimum proteaz üretimini 120 rpm çalkalama oranında gerçekleştirilmiştir.

SSF ortamında en iyi aktivite veren substrat karışımlarının kullanılması ile yaptığımız deneylerde maksimum proteaz üretimi için %25 mısır küspesi - %5 pirinç kabuğunun (12060.6 U/mg) substrat olarak kullanıldığı SSF ortamlarında maksimum enzim üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.9.).

Yapılan önceki çalışmalarda farklı tarım atıkları farklı oranlarda karıştırılarak SSF ortamında substrat olarak kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Uyar ve Baysal 2004; Gangadharan ve ark. 2006; Chutmanop ve ark. 2008; Murthy ve ark. 2009; Tanyıldızı ve ark. 2007).

Çalışmamızda kullandığımız kurutulmuş bitkisel atıkları blendırda öğütüldükten sonra substratlar SSF besiyerinde kullanıldı. Maksimum enzim üretimi en büyük partikül (1500 μm) büyüklüğündeki substratta (13987.9 U/mg) olduğu belirlendi (Şekil 4.10.).

Mikrobiyal büyüme için substrat parça büyüklüğü oldukça önemlidir. Genel olarak küçük substrat parçacıkları mikrobiyal büyüme için geniş bir yüzey alanı sağlar ve bu nedenle arzu edilen bir faktör gibi düşünülür. Bununla birlikte çok küçük substrat parçacıkları substrat yığını oluşturabilir bu gibi hallerde en çok mikrobiyal solunum/ havalanmayı engelleyen ve bu nedenle zayıf hücresel büyüme meydana getiren olay görülür (Barrios-Gonzalez ve ark. 1993; Liu ve Tzeng 1999). Buna karşın daha büyük partiküller kullanıldığında iç kısımdaki parçalar arasındaki alan arttığından büyük parçacıklar daha etkili solunum/havalanmayı sağlayabilir, ancak mikrobiyal büyüme

için sınırlı bir alan oluşmasına neden olur. Bu nedenle belirli bir SSF işleminde parça büyüklüğünü belirlemek oldukça önemlidir (Graminha ve ark. 2008).

Genel olarak mikroorganizmaların meydana getirdiği proteazlar doğada temel ve kısmen birçok kültür şartlarında indüklenirler. Mikroorganizmaların ürettiği ekstraselüler proteazlar aynı zamanda C/N oranındaki farklardan, glukoz gibi kolay metabolize edilen şekerler ve metal iyonları gibi ortam bileşenlerinden yoğun şekilde etkilenirler (Varela ve ark. 1996; Beg ve ark. 2003). Karbon ve azot kaynakları bakterilerin üremeleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Mikroorganizmaların enzim sentezi kültür ortamında bulunan farklı aminoasit ve azot kaynaklarının bulunup bulunmaması ile ilişkilidir.

Genelde birçok mikroorganizma hücresel fonksiyonlarını sağlamak, biyokütle formasyonu ve metabolit üretimi için bir karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bakteriyel türler proteaz üretimi sırasında karbon kaynağı türüne ve konsantrasyonuna göre farklı tepkiler verirler. Ortama eklenen karbon kaynakları mikroorganizmaların beslenebilmeleri, üremeleri ve enerji üretebilmeleri için gereksinim duydukları en büyük besin kaynağıdır.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikroorganizmaların kültür edildiği SSF ortamlarına farklı karbon kaynakları ilave edilmiştir. İncelenen proteaz aktivite değerlerinde galaktoz (13900.6 U/mg) bulunan ortamlarda proteaz üretiminde artış gözlenmiştir. Benzer sonuçlar önceki çalışmalarda da mevcuttur (Naveena ve ark. 2005; Mukherjee ve ark. 2009).

Kültür ortamına eklenen karbon kaynaklarından galaktoz dışında hiçbiri proteaz üretiminde arttırıcı rol oynamamıştır. SSF ortamına eklenen karbon kaynaklarından kontrole göre galaktoz %110 proteaz üretimini artırmıştır (Çizelge 4.1.).

Proteaz üretimi ortamdaki azot ve karbon kaynaklarının varlığına sıkı bir şekilde bağlıdır. Azot ve karbon kaynaklarının her ikisi de enzim sentezi üzerinde regulatör etkiye sahiptir (Patel ve ark. 2005; Moon ve Parulekar 1991). Ortamdaki azot oranı az olunca bu oran enzim üretimi için yetersiz gelmektedir. Bununla birlikte azot oranındaki fazlalık enzim üretiminde inhibisyona neden olabilir (Kole ve ark. 1988).

Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikroorganizmanın kültür edildiği SSF ortamlarına azot kaynakları arasında amonyum klorid %105 ve et özütü %111 proteaz

aktivitesini kontrole göre arttırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Organik azot kaynaklarından (amonyum klorid ve et ekstraktı) bakteriyel suşlarda maksimum enzim üretimi sağladığı yapılan birçok çalışmada ifade edilmektedir (Jin ve ark. 1990; Cheng ve ark.1995). Et özütü ve amonyum klorid gibi azot kaynaklarının bulunduğu SSF ortamlarında enzim üretiminin artması, bakterinin besiyerindeki bu azot kaynaklarını kullanarak proteine dönüştürdüğü fikrini vermektedir. Uygun karbon ve azot kaynaklarının veya diğer besinlerin seçimi etkili ekonomik bir işlemin geliştirilmesinde çok önemli bir faktördür. Benzer sonuçlar önceki çalışmalarda da mevcuttur (Pandey ve ark. 2000; Linko ve ark. 1999; Chakraborty ve ark. 1995)

Mukherjee ve ark. (2008) *Bacillus subtilis'* ten proteaz aktivitesini en yüksek et ekstraktında tespit ettiklerini raporlamışlardır.

Mısır küspesinin substrat olarak kullanıldığı ortama eklenen karbon (galaktoz) ve azot kaynaklarının (beef extract ve amonyum khlorid) proteaz sentezini arttırmaları bu maddelerin *B.licheniformis* ATCC 14580'ne besin teşkil etmesi ve enzim üretimini olumlu yönde etkilemesi şeklinde açıklanabilir. Çalışmalarımızda tarımsal atıkların substrat olarak kullanılması ile azot ihtiyacı bu substratlardan karşılanmış olabilir. Kültür ortamında karbon kaynakları gibi tarım maddelerinin kullanımı enzim üretim maliyetini azaltmaktadır.

Mısır küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı SSF ortamlarına eklenen % 0.1 konsantrasyonundaki metal tuzları bulunan ortamlarda kültür edilen *B.licheniformis* ATCC 14580'nin ürettiği proteaz aktivite tayinlerinde $MgSO4.7H_2O$ (14884.8 U/mg) içeren ortamdan elde edilen aktivite değerleri kontrole göre daha fazla çıkmıştır. Metal tuzlarını içeren ortamlardan $CuSO_4$ içeren ortamda proteaz üretimi baskılanmıştır. Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda kültür ortamında eklenen çeşitli tuzların enzim aktivitesini arttırdığı veya inhibe ettiğine yönelik çalışmalar mevcuttur (Asgher ve ark 2007; Ramesh ve Lonsane 1989; Kumar 2003).

Metal tuzlarının kullanımının enzim üretimi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığının tespit edilmesi kullandığımız bakterinin tuz ihtiyacını substrat olarak kullanılan mısır küspesi ve çeşme suyundan karşıladığı fikrini vermektedir. Bu yönüyle

B. licheniformis ATCC 14580 ile yapılacak enzim üretim çalışmalarında üretim maliyeti azalabilir.

Thangam ve ark. (2002) alkalofilik *Alcaligenes faecalis*'ten saf olarak elde edilen alkali proteazın aktivitesinin 2 mM $CaCl_2$ ve $MgSO_4$ ile arttığı, Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları ise inhibisyona neden olduğunu raporlamışlardır.

Rao ve ark. (2009) *Bacillus circulans*'tan alkalin proteaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Ca^{+2}, Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi metal iyonlar enzim aktivitesini olumlu etkilerken Cu^{+2} nin olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamıza benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda da kültür ortamlarına eklenen metal tuzlarının ($ZnSO_4.7H_2O$**,** $FeSO_4.7H_2O$, $CaCl_2$**)** enzim üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Kıran ve ark. 2005; Leveque ve ark. 2000). İnhibisyon; ortamdaki katyonlar ile proteinlerle ilişkili katyonlar arasındaki rekabetten dolayı enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuş olabilir.

Sonuç olarak, mikroorganizmalar kullanılarak SSF ortamında enzim üretme çalışmaları son yıllarda giderek artmaya ve SmF'ye alternatif bir teknik haline gelmeye başlamıştır. Dünya genelinde artan tarımsal atıkların tekrar kullanılmaları ekolojik ve ekonomik olarak oldukça önemlidir. Bu yüzden çalışmamız sonucunda tarımsal atıkların sadece hayvan yemi vb. alanlarda kullanılamayacağını bunun yanında endüstriyel enzim üretilebileceğini ve SSF tekniğinin kullanımı ile bu atıklardan daha fazla ekonomik yarar sağlamanın da mümkün olacağını göstermiştir. Tarımsal atıkların kullanımı ile önemli çevre sorunları da çözüme ulaşılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abu Sayem, S.M., Alam, M.J., Mozammel Hoq, M.D. 2006. Process Pakistan Academi Science. 43(4): 257-262.

Adlercreutz P., Ibora L. J., Schmıdt E. Pederson S., 1994. Applied Biocatalysis. Hoawood Academic Publishers GmbH, Switzerland, 109-156.

Agrawal D., Patıdar P., Banerjee T., Patıl S. 2005. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. Process Biochemistry, 40: 1131–1136.

Akcan, N. 2009. Bazı *Bacillus* türlerinin ekstrasellüler enzimlerinin araştırılması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Alpan, L.G. 2008. Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Andrade, V.S., Sarubbo, L.A., Fukushima, Miyaji, M,. Nishimura, K., de Campos-Takaki, G. M. 2002. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as substrate. Brazilian Journal of Microbiogy, 33: 106-110.

Anwar, A., Saleemuddin, M. 1998. Alkaline Proteases: A review. Bioresource Technology, 64: 175–183.

Arda, M., 2000. Temel mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara, 548

Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. 2007. A thermostable α-amylase from moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for strach processing, Journal of Food Engineering, 79: 950-955

Bahçeci, H. 2004. Tuz Gölü bakteri izolatlarının yağ asidi metil ester analizi ve hücre dışı enzimlerin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Barrıos-Gonzalez, J., Gonzalez, H., & Mejıa, A. 1993. Ect of Particle Size, Packing Density and Agitation on Penicillin Production in Solid State Fermentation. Biotechnology Advances, 11: 539–547.

Baysal, Z., Uyar, F., Aytekin, C. 2003. Solid State Fermentation for production of α-amylase by a Thermotolerant *Bacillus subtilis* Fromhot-Spring Water. Process Biochemistry. 38: 1665–1668

Battal, M. 2004. Alkalin proteaz üreticisi yerel *Bacillus* soylarının izolasyonu, nitelendirilmesi ve enzim üretiminin optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknik Enstitüsü. Kocaeli.

Beck J., Sauvage E., Charlier P., Marchand-Brynaert J. 2008. 2-Aminopropane-1,2,3-tricarboxylic acid: Synthesis and co-crystallization with the class A β-lactamase BS3 of *Bacillus licheniformis*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 18: 3764–3768.

Beg Q.R., Gupta R. 2003 Purification And Characterization Of An Oxidation-Stable, Thiol- Dependent Serine Alkaline Protease From *Bacillus Mojavensis*. Enzyme And Microbial Thecnology. 32: 294-304

Bıschoff K.M., Liu S,. Hughes Sr. 2007. Cloning And Characterization Of A Recombinant Family Endoglucanase from *Bacillus licheniformis* Strain B-41361. Process Biochemistry 42: 1150-1154

Boyacı, M. 2000. Un Mamülleri Teknolojisi, 9: 5.

Botella C., Ory I de., Webb C., Cantero D., Blandino A. 2005. Hydrolytic enzyme production by Aspergillus awamori on grape pomace, Journal Biochemical Engineering, 26: 100-106

Cheng, S.W., Hu, M.N., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M., Tsai, Y.C. 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 59: 2239-2243.

Claus,D., Berkeley, P.H.A. 1986. Genus *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1105–1141.

Chakraborty, R., Srinivasan, M., Sarkar, S.K., Raghvan, K.V. 1995. Production of acid protease by a new *Aspergillus niger* by solid substrate fermentation. Journal of Microbial Biotechnology, 10: 17–30

Chellappan, S., Jasmin, C.; Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bhat, G. S., Chandrasekaran, M. 2006. Production, purification and partial chacraterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation, Process Biochemistry, 41: 956-961.

Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., Srinophakun, P. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal Chemical Technology and Biotechnology, 83: 1012-1018

Couto, S.R., Sanromán, M.R. 2006. Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability. Journal of Food Engineering, 76: 291-302.

Çelik, N. 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu^{+2} iyonları ile termostabilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli. 1-5.

Dağaşan L. 1997. Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzimlerin Gıda ve Hayvan Yemi Üretimindeki Uygulamaları-Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, 14-15.

Dayanandan A, Kanagaraj J, Sounderraj L, Govındaraju R, Suseela Rajkumar G. 2003 Application of an alkaline protease in leather processing an ecofriendly approacher. Journal Cleaner Production, 11: 533–611.

Economou, C. N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., Vayena , D. V. 2010. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil, Bioresource Technology , 101: 1385-1388.

El Enshasy, H., Abuoul Enein, A., Helmy, S., El Azaly, Y. 2008. Optimization of the ındustrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scales australian. Journal of Basic and Applied Sciences, 2(3): 583-593

Elıbol M., Moreıra A.R. 2005. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium Teredinobacter turnirae under solid substrate fermentation, Process Biochemistry 40: 1951–1956.

Fan-Chıng Y, Lın Ih. 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice spirit distillery by *Aspergillus niger*. Enzyme Microbiology Technology, 23: 397–402.

Farley Pc, Ikasarı L. 1992. Regulation of secretion of Rhizopus oligosporus extra cellular carboxyl proteinases. Journal Gen Microbiology, 138: 2539–2544.

Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 isolation, production and characterization. Apply Microbiology Biotechnology 45: 327-332.

Follmer, C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. Phytochemistry 69: 18-28

Fogarty, W.M Kelly, C.T. 1990. Studies on the thermostability of the α-amylase of *Bacillus caldovelox*. Microbial enzymes and biotechnology, 71–132

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M, Pandey, A., 2006. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha amylase production. Food Technology Biotechnology, 44 (2): 269–274

George S., Roju, V. Subramanion,Tv Jayaraman. K. 1997. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation Bioprocess Engineering 16: 381-382.

Gözükara E.M. 1989. Biokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 225, 577, Ankara.

Gupta R., Gıgras P., Mohapatra H., Goswamı V.K.,Chauhan B. 2003. Microbial α-amylases a biotechnological perspective ; Enzyme and Technology, 38: 1599-1616

Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Apply Microbiology Biotechnology, 59: 15–32

Graminha, E.B.N., Goncálves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R. , Gomes, E. Enzyme production by solid state fermentation: application to animal nutrition, 2008. Animal Feed Science and Technology, 144: 1–22

Haki, G.D., Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes. Bioresource Technology, 89: 17-34.

Hamilton, L.M., Kelly, T.C., Fogarty, W.M., Kelly, C.T., Bolton, D.J., Fogarty WM. 1997. Production and properties of the raw starch digesting α-amylase of *Bacillus sp*. IMD 435, Biotechnology Letters, 19: 675–712.

He L., Chen W., Lıu Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by *Bacillus licheniformis* Zju12. Microbiological Research 161: 321-326

Hmidet, N., Ali, N. E. H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., Nasri, M. 2009. Alkaline proteases and thermostable alpha amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. Journal Biochemical Engineering, 47:71-79

Jin, F., Cheng, X., Shi, Y., Zhang, C. 1990. Isolation of new thermophilic aerobic bacteria which produce thermostable alpha -amylase. Journal Gen Apply Microbiology, 36: 415- 424

Jose , J., Kurup, M., 1999. Journal of Experimental Biology, 37: 1217-1231

John, E. S. 2009. Biotechnology 5 th. ed. University of Strathclyde, 14-16.

Johnvesly, B., Naik, G. R. 2001. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process Biochemistry, 37: 139-144

Joo, H. S., Kumar, C. G. Park, G. C.; Raik, S. R.; Chang , C. S. 2004. Bleachresistant alkaline protease produced by a *Bacillus sp.* isolated from the Korean polychaete, Periserrula leucophryna. Process Biochemistry, 39: 1441-1447

Kalimuthu K., Babu Sr., Venkataraman D., Bilal M., Gurunathan S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 65: 150–153.

Karataş, H. 2008. Bazı bitki atıklarından katı faz fermantasyon (SSF) tekniği ile ekstraselüler enzim üretimi. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Kazan, D., Denizci, A.A., Kerimak Öner, M.N., Eraslan, A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE- 42. Journal Microbiology Biotechnology, 32: 335-344.

Ken McDonald, J. 1985. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. Journal The Histochemical 17: 773-785.

Klingeberg, M., Galunsky, B., Sjoholm, C., Kasche, V., Antranikian, G. 1995. Purification and properties of a highly thermostable, sodium dodecyl sulfateresistant and stereospecific proteinase from the extremely thermophilic archaeon *Thermococcus stetteri*. Apply Environment Microbiology, 61: 3098-3104.

Krısha C. Chandrasekaran M., 1996. Banana Waste As Substrate For α-Amylase Production By *Bacillus Subtilis* Cbtk 106 Under Solid-State Fermentation ; Microbial Biotechnology, 46: 106-111

Kumar, G.C., Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances, 17: 561-594

Kumar, D., Jaın, Vk., Shanker, G., Srıvastava A. 2003. Utilisation of Fruit Wastes For Citric Acid Production by Solid State Fermentation. Process Biochemistry, 38:1725-1729

Kumar, S., Sharma, N. S., Saharan, M. R., Sıngh, R. 2005 Extracellular Acid Protease From *Rhizopus Oryzae*: Purifuc ation And Characterization. Process Biochemistry, 40: 1701-1705.

Kumar, D., Savitri, N. T., Verma R., Bhalla, T.C. 2008. Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive Research Journal of Microbiology, 3(12): 661-672

Kunamnenı, A., Permaul, K., Sıngh, S. 2005. Amylase Productionin Solid State Fermentation by The Thermophilic Fungus *Thermomyces Lanuginosus*. Journal of Biosciencr Bioengineering, 100: 168–17.

Kole, M.M., Draper, I., Gerson, D.F. 1988. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Apply Microbiology Biotechnology, 28: 404–422.

Kokab, S., Asghar, M., Rehman, K., Asad, M. J., Adedyo, O. 2003. Statistical Optimization and neural modeling of amylase production from banana peel using *Bacillus subtilis* MTCC 441. International Journal of Agriculture and Biology 5 (1): 36-39

Kıran, E. Ö., Çömlekçioğlu, U., Arıkan, B. 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus sp* K-1229. Turkish Journal of Biology, 99-103.

Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J., McPherson, A. 1994. Refined Molecular Structure of Pig Pancreatic α-Amylase at 2·1 Å Resolution Journal of Molecular Biology, 235: 1560-1584

Lazim, H., Mankai, H., Slama, N., Barkallah, I., Limam, F. 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid state fementation by *Streptomyces sp.* CN902. Microbiol Biotechnology, 36: 531-537

Leighton, T.J., Doı, R.H., Warren,R.A.J., Kelln, R.A. 1973. The Relationshipof Serine Protease Activity To Rna Polymerase Modification And Sporulation İn *Bacillus Subtilis*. Journal Moleculer Biology, 76: 103-122

Leveque, E., Janecek, S., Haye, B., Belarbi, A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 26: 3–14.

Lıu, Mq., Lıu, Fg. 2008. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in Pichia pastoris and xylooligosaccharides released from xylans by it. Protein Expression and Purification, 57: 01–107

Lıu, B. L., Tzeng, Y. M. 1999. Water Content And Water Activity For The Production of Cyclodepsipeptide in Solid State Fermentation. Biotechnology Letters, 21: 657–661.

Linko, Y., Javanainen, P., Linko, S. 1999. Engineering baker's yeast: room for improvement. Trends in Food Science and Technology, 8: 339.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent ,Journal Biology Chemistry, 193: 265-275

Mazutti, M. J.P. Bender, H. Treichel, M.D. Luccio. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme and Microbial Technology, 39: 56–59

Maurer, K.H. 2004. Detergent proteases. Current opinion in biotechnology, 15: 1-5

Mahanta N., Gupta A., Khare, S.K. 2008 Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state fermentation using Jatropha curcas seed cake as substrate. Bioresource Technology. 99: 1729–1735

Mahalaxmi, Y., Satshish, T., Rao, C. S., Rrakasham, R. S. 2010. Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated *Amycolatopsis sp*. RSP3 under SSF. Process Biochemistry, 45: 47-53

Mehta, V. J., Thumar, J. T., Singh, S. P. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. Bioresource Technology, 97: 1650-1654

Mehrotra, S., Pandey, P. K., Gaur, R.; Darmwal, N. S. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. Bioresource Technology, 67: 201-203.

Moon, S., Parulekar, S. 1991. Biotechnology Bioengineering, 37: 467–83.

Mukherjee, A. K., Adhikari, H., Rai, S. K. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid state fermantation (SSF) condition using imperate Cylindrica gres and potato peel as low-cost medium : Characterization and application of enzyme in detergent formulation, Journal Biochemical Engineering, 39: 353-361

Murthy , P.S., Naidu, M.M., Srinivas, P., 2009. Production of α-amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84 (8): 1246-1249

Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N. 2008. A Note on Rising Food Prices. Advanced Biochemistry Engineer Biotechnology. 68: 61–78

Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Qurat-ul-Ain Syed. 2008. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. Food Technology Biotechnology, 46 (4) 388–394

Najafi, M.F., Deobagkar D. 2005. Purification and characterization of an extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Electronic Journal Biotechnology, 8: 197-203

Naveena, B.J., Altaf, Md., Bhadriah, K., Reddy, G. 2005. Application of solid-state fermentation to food industry. Bioresource Technology, 96 (4): 85–90

Nduwimana, J., Guenet, L., Dorval, I., Blayau, M., Le Gall, J.Y. and Le Treut, A. 1995. Proteases. Annual Biology Clinec, 53: 251-264.

Nigam P., Singh D. 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. Journal of Basic Microbiology, 34: 405-423.

Oh, Y. S., Shih, I. L., Tzeng, Y. M., Wang, S. L. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. Enzymes Microbiology Technology, 27: 3-10.

Oberoi, R., Beg, QK., Puri, S., Saxena, R.K, Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. World Journal Microbiology Biotechnology, 17: 493–497

Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. African Journal Biotechnology, 4(8): 776-779

Öztürk, S. 2007. Ülkemizde izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Pandey A., Soccol, C.R., Mıtchell, D. 2000. New Developments İn Solid State Fermentation; Bioprocesses and Products. Process Biochemistry, 35: 1153–1169

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation, Journal Biochemical Engineering, 13: 81-84.

Pandey, A. 2004. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. Concise encyclopedia of bioresource technology, 16: 578-584

Pandey, A., Sekaran, M., Renuvathani, M., 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. Bioresource Technology, 97 (1): 171-177

Pandey, A. B. Bogar, Szakacs, G., Linden, J. C., Tengerdy, R. P., 2008. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. Current Developments in Solid-state Fermentation, 33-183-189

Patel, R., Dodia, M., Sıngh, S. P. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly ısolated haloalkalophilic *Bacillus sp.* Production and optimization. Process Biochemistry , 40: 3569-3575.

Perez-Guerra N., Torrado- Agrasar A., Lopez-Macias C. and Pastrana L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation, Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry, 2(3).

Pederson H., Nıelsen J. 2000 The influence of Nitrogen sources on the α-amylase productivity of *Aspergillus Oryzae* in continuous cultures. Microbial Biotechnology, 53: 278-281

Prakasham, R. S., Rao, C. S., Sarma, P. N. 2006. Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease by *Bacillus* sp. in solid state fermentation, Bioresource Technology, 97: 1449-1453

Priest, F.G., Harwood, C.R. in Y.H. Hui., G.G. 1994. Regulation of polyglutamic acid Synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Food Biotechnology and Micro-organisms, 377–421.

Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R. 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. Current Microbiology, 44: 286–290

Qihe C., Guoqing H., Jinling W. 2007. Journal Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 and its elastase. Characterization evaluation of Food Engineering, 80: 490–496

Raimbault, M.,1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology 1:717-3458.

Rajkumar R, Kothilmozhian J, Ramasamy R. 2011. Production and characterization of a novel protease from *Bacillus sp.* RRM1 under solid state fermentation. Journal Microbiology and Biotechnology, 21(6): 627-636

Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable alpha-amylase with two peaks for pH optima by *Bacillus licheniformis* M27. Biotechnology Letters. 1989, 11: 49–52

Rahardjo Y.S.P., Korona, D., Haemers, S., Weber, F.J., Tramper , J., Rinzema, A., 2004. Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system. Letters in Applied Microbiology, 39: 504–508

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

Rao, C. S., Sathish, T., Ravichanda, P., Rrakasham, R. S. 2009. Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco friendly applications, Process Biochemistry, 44: 262-268

Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I., Chambliss, G. H. 1998. *Bacillus*, topley and Wilson's microbiology and microbial infections, systematic, bacteriology. Applied microbiology, 2: 55-193

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40: 2689–2694.

Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., 2007. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. Journal Bioscience and Bioengineering, 103: 501-508.

Schrerier, P. 1997. Enzymes and Flovour biotechnology. Advances in Biotechemical Engineering/Biotechnology, 51-72.

Sevinç, N., Demirkan, E., 2011. Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 ısolated from soil and ıts enzymatic properties. Journal Biology and Environtment. Scıence, 5(14): 95-103

Sodhı, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K., Sonı, S.K. 2005 Production of A thermostable A-amylase from *Bacillus Sp*. Ps-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process Biochemistry, 40: 525–534.

Souza, C.F.V., Rodrigues, R.C., Heck, J.X., Ayub, M.A.Z. 2008. Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83: 1306-1313

Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. Food Technology. Biotechnology. 44. 211–220.

Singhaniaa, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. Journal Biochemical Engineering, 44: 13–18

Swain, M.R., Ray, R.C. 2007. Alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* CM3 in solid state fermentation using cassava fibrous residue. Journal of Basic Microbiology, 47: 417 - 425

Sneath, P. H. A., 1986. Endospore-forming gram positive rods, and cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2: 1104-1139

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

Varela, H., Ferrari, M.D., Belobradic, L., Weyrauch, R., Loperena, M.L. 1996. Short Communication: Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. World Journal Microbiology Biotechnology. 12: 643-645

Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. J. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. Moleculer Microbiology Biotechnology, 7(4): 204-211.

Wei-Hua Chu, J. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34: 241–245

Tanyıldızı M.S., Ozer D., Elıbol M. 2007. Production of bacterial alpha-amylase by *B. amyloliquefaciens* under Solid Substrate Fermentation. Biochemical Engineering Journal 37: 294–297

Taubman, S., 1992. Genus *Bacillus*, Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356

Telefoncu A.1997 Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları. 21-27 Eylül Kuşadası Aydın- Türkiye. 1: 5-8

Thomas, T.D., Mills, O.E. 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. Journal Netherlands Milk and Dairy, 35: 255-273.

Tunail, N., Köşker, Ö. 1986. Süt mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 966: 138

Towatana, N.H., Painupong, A., Suntinanalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp.* PS-719. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87: 581-587.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sedat KAYA

Doğum Yeri: Mardin / Mazıdağı

Doğum Tarihi: 05.05.1987

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

E-Posta: biyologsedat@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise: Birlik Lisesi (Diyarbakır) 2001 – 2004

Lisans: Dicle Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi /Biyoloji Bölümü (2005-2009)

Yüksek Lisans: D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji (2009-2011)