

Bacillus licheniformis VO1'den α -Amilaz Üretimi için Tarımsal Endüstriyel Atıkların ve Fiziksel Faktörlerin İncelenmesi

Nurullah AKCAN^{1*}

ÖZET: Biyokütlenin değerlendirilmesi, çevre kirliliğinin önlenmesi bağlamında büyük ilgi görmektedir. Tarımsal sanayi atıkları ve yan ürünleri çok miktarda meydana gelmekte ve çürümeye bırakıldıklarında çevre kirliliğine neden olmaktadır. Katı faz fermantasyon (KFF) teknolojisinde tarımsal sanayi atıklarının kullanımı antibiyotikler, pigmentler, aromalar, amilazlar, proteazlar, selülozlar ve lipazlar gibi endüstriyel açıdan önemli enzimlerin üretiminde çeşitli avantajlar sunmaktadır. α -Amilaz, nişastanın rastgele hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Bu enzimler tekstil, kağıt, gıda, biyoyakıtlar, deterjanlar ve ilaç endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılır. Bu çalışmada, seçilen bakteri suşu, *Bacillus licheniformis* VO1, elma, kavun, muz ve portakal kabuklarının bulunduğu katı faz fermantasyon ortamlarına inoküle edildi ve test edilen katı substratlar arasında en yüksek α -amilaz üretimi elma kabuklarının bulunduğu ortamdan elde edildi. Fermantasyon süresi, fermantasyon sıcaklığı, başlangıç pH, inokülüm oranı, azot, karbon ve metal kaynaklarının etkisi ayrı ayrı incelendi. Maksimum α -amilaz üretimi 45 °C, pH 6.0 ve 48. saatte elde edildi. Elma kabuklarının bulunduğu fermantasyon ortamına eklenen çeşitli karbon ve azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde, maksimum α -amilaz üretimi sırasıyla nişasta ve maya özütü bulunan ortamlardan elde edildi. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, meyve işleme sanayinde meydana gelen elma kabuğu atıklarının katı faz fermantasyonunda (KFF) substrat olarak kullanımı ile *Bacillus licheniformis* VO1'den α -amilaz üretimi gelecekte çevresel iyileştirme süreçlerinde kullanılmak üzere potansiyel bir aday olarak düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz, *Bacillus licheniformis* VO1, biyoteknoloji, katı faz fermantasyonu.

Screening of Agro-industrial Wastes and Physical Factors for the Production of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* VO1

ABSTRACT: Evaluation of biomass is of great interest in the context of preventing environmental pollution. Agricultural industry wastes and by-products occur in large amounts and cause environmental pollution when left to decay. The use of agro-industrial wastes in solid state fermentation (SSF) technology offers several advantages in the production of antibiotics, pigments, flavors and industrially important enzymes such as amylases, proteases, lipases, cellulases and lipases. α -Amylase is an enzyme that catalyzes the random hydrolysis of starch. These enzymes are used in various biotechnological processes such as textile, paper, food, biofuels, detergents and pharmaceutical industries. In this study, the selected bacterial strain, *Bacillus licheniformis* VO1, was inoculated into solid state fermentation media containing apple, melon, banana and orange peels, and the highest α -amylase production was obtained from the apple peel medium among the tested solid substrates. Fermentation time, fermentation temperature, initial pH, inoculum size, the effects of nitrogen, carbon and metal sources were examined separately. Maximum α -amylase production was achieved at 45 °C, pH 6.0 and 48 hours. When the effect of various carbon and nitrogen sources added to the fermentation medium where apple peels are examined, the maximum α -amylase production was obtained from the media with starch and yeast extract, respectively. Considering the results obtained, the production of α -amylase from *Bacillus licheniformis* VO1 can be considered as a potential candidate for future environmental improvement processes, with the use of wastes such as apple peels in the fruit processing industry as a solid state fermentation (SSF).

Keywords: α -Amylase, *Bacillus licheniformis* VO1, biotechnology, solid state fermentation

¹Nurullah AKCAN (Orcid ID: 0000-0003-3960-95530000-0003-0516-0014), Siirt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Siirt, Türkiye.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nurullah AKCAN, e-mail: nakcan@siirt.edu.tr

GİRİŞ

Nişasta parçalayan α -amilazlar (EC 3.2.1.1) doğada yaygın olarak dağılım göstermektedir. Bu enzim nişastadaki α -1,4 glikozidik bağlarını rastgele hidroliz ederek maltoz, glukoz ve alfa dekstrinleri içeren monosakkarit ve oligosakkaritleri meydana getirmektedir (Tripathi ve ark., 2017). α -Amilazlar biyoteknolojik çalışmalarda büyük öneme sahip en önemli endüstriyel enzimler arasındadır ve dünya enzim pazarının % 25-33'ünü temsil etmektedir (Tiwari ve ark., 2015; Akatı, 2019; Msarah ve ark., 2020). α -Amilazlar doğada geniş bir şekilde dağılım göstermekle birlikte, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Genelde α -amilaz üretimi için mikroorganizmaların kullanılmasının ana yararı, makul toplu üretim kabiliyetidir, ayrıca istenen özelliklere sahip enzimleri elde etmek için kolayca manipüle edilebilir (Ahmed ve ark., 2020). Kaplıcalar gibi sıcak su kaynaklarında bakteri ve mantar içeren birçok mikroorganizmanın habitatlarına ve ekolojik işlevlerine bağlı olarak α -amilaz gibi farklı enzimler ürettiği bilinmektedir. Mikrobiyal α -amilazlar günümüz biyoteknolojisinde en önemli enzimler arasındadır ve gıda, ilaç, tekstil, deterjan vb. çeşitli endüstriyel uygulamalarda potansiyel yararlarından faydalanılmaktadır (Maria ve ark., 2019; Melnichuk ve ark., 2020; Far ve ark., 2020).

Endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte araştırma alanında en ileri avantajlara sahip yeni yöntemler her geçen gün artmaktadır. α -Amilazların üretimi esas olarak kültür sistemine (sıvı (SmF) veya katı faz fermantasyonu), biyoreaktör tasarımına ve ortam bileşimine bağlıdır (Sahnoun ve ark., 2015). Katı faz fermantasyonu (KFF), düşük miktarlarda su kullanılan ve bitki bazlı tarımsal endüstriyel atıkları enzimler, biyoyakıtlar, nanopartiküller ve diğer biyoaktif bileşikler gibi değerli ürünlere dönüştüren sürdürülebilir bir süreçtir (Oliva ve Uribe, 2020). KFF yönteminin SmF'e göre çekici bir alternatif haline gelmesini sağlayan bir dizi özelliği vardır. Literatürde tanımlanan çeşitli avantajlar biyolojik, işleme, çevresel ve ekonomik olmak üzere dört ana gruba ayrılabilir (López-Gómez, 2020). KFF işleminde kullanılacak substratın seçimi birçok tarımsal atığın incelenmesini içeren bir süreçtir. Bu işlemde kullanılan substratlar çoğunlukla tarım, gıda ve ormancılık endüstrilerinde meydana gelen mahsul atıkları, odun kırıntıları, meyve ve sebze kabukları ve diğer yenilenebilir ham maddeler gibi kalıntılardan oluşur. Bu substratlar yüksek kullanılabilirliğe sahiptir ve ucuzdur, yani üretim maliyetleri ve olumsuz çevresel etkiler (örneğin bertaraf nedeniyle) azalır (Steudler ve ark., 2019). KFF'de başlıca sıcaklık, fermantasyon süresi, nem içeriği, pH ortamı, inokülüm oranı, karbon ve azot kaynakları mikrobiyal büyümeyi ve dolayısıyla enzim üretimini kontrol ettikleri için optimize edilmelidir. Bu çalışmada, çevre kirliliğini ve ürün maliyetini azaltmak amacıyla *Bacillus licheniformis* VO1'den α -amilaz üretmek için alternatif bir karbon kaynağı olan tarımsal endüstriyel atıkların kullanımı ve enzim üretim optimizasyonu hedeflendi.

MATERYAL VE METOT

Mikroorganizma

Çalışmada biyolojik materyal olarak Bitlis, Norşin-Budaklı kaplıcalarından izole edilen *Bacillus licheniformis* VO1 (Accession number: KJ842085.1) kullanıldı. Mikroorganizma 24 saat boyunca nutrient agar katı besiyerinde 45°C'de üremeye bırakıldı ve daha sonra bir öze yardımıyla Luria broth (LB) sıvı besiyeri ortamına transfer edildi.

Substrat

Çalışmada substrat olarak elma, kavun, muz ve portakal kabukları kullanıldı. Bu bitkisel atıklar kullanım öncesi öğütüldükten sonra farklı çaplardaki elekler (500-1000-1500 ve 2000 μ m çaplı) yardımıyla elendi ve 90°C'de 3 saat kuruma işlemine tabi tutuldu.

Katı Faz Fermantasyon (KFF)

Besiyeri ortamında, kurutulmuş bitkisel atıklar (1500 μ m parça büyüklüğünde) %30 (w/v) olacak şekilde 3 g tartıldı ve 100 mL'lik erlenmayerlere bırakıldı. Üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklendi ve 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Fermantasyon ortamı 3 mL spor suspansiyonu ile inoküle edildi ve erlenmayerler 150 rpm'de 45°C'de 144 saat çalkalanmaya bırakıldı. KFF ortamındaki enzimi ekstrakte etmek için fermantasyon ortamına 10 mL çeşme suyu eklenerek 30 dk. çalkalanmaya bırakıldı. Bu süre sonunda örnekler steril sargı beziyle süzüldü ve +4°C'de 7.000 rpm'de 8 dk. santrifüjlendi. Süpernatant üzerinden α -amilaz aktivite tayini yapıldı.

α -Amilaz Aktivite Tayini

Çalışmamızda α -amilaz aktivite tayini Bernfield (1955) yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde 150 μ L enzim çözeltisi ve 200 μ L %0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M Sodyum-Fosfat tamponu pH:7.0) 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda ortama reaksiyon durdurucu olarak 400 μ L DNS (3.5 dinitro salisilik asit) çözeltisi ilave edildi ve 5 dk. kaynar su banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra reaksiyon ortamına 8 mL saf su ilave edilerek seyreltme yapıldı ve örneklerin absorpsiyon değerleri 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi. Tüm deneyler üç defa tekrarlandı ve ortalama standart sapma ile gösterildi.

Protein Miktar Tayini

Bovine serum albumin (BSA) standart olarak kullanılarak protein miktar tayini Lowry yöntemine göre ölçüldü (Lowry ve ark., 1951).

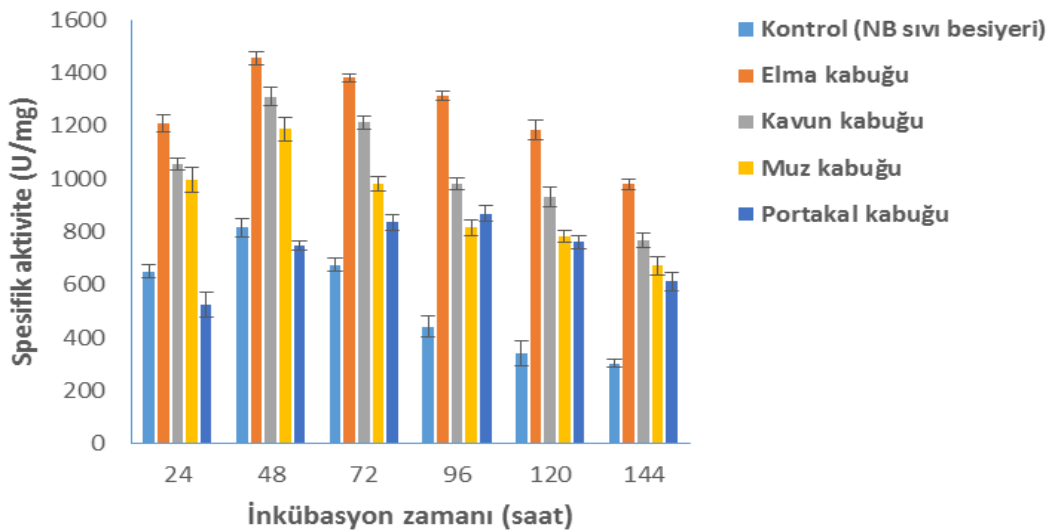
KFF'de Uygun Substratın Belirlenmesi ve Bazı Fiziksel Parametrelerin Optimum α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

Katı faz fermantasyonunda (KFF), enzim üretimi için uygun substratın belirlenmesi önemli bir etmendir. Optimum enzim üretimi için bu işlem birçok tarım atığının incelenmesini içerir. Çalışmada, *Bacillus licheniformis* VO1'den α -amilaz üretimi için substrat olarak elma, kavun, muz ve portakal kabuklarının bulunduğu fermantasyon ortamları 24 saat aralıkla 144 saat, optimum sıcaklığın belirlenmesi için uygun inkübasyon süresinde 5°C artış ile 30-70°C, optimum başlangıç pH'nın belirlenmesi için 0.1 N HCl ve NaOH kullanılarak ortam pH'sı 1 birim aralıkla 4.0-10.0 arasında ayarlandı. İnokülasyon oranının belirlenmesi için farklı miktarlarda (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve %50 (w/v)) bakteri kültürü ile inoküle edildi. Karbon ve azot kaynaklarının etkisini belirlemek için KFF ortamına %1 oranında sırasıyla nişasta, maltoz, glukoz, laktoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz ve sukroz gibi karbon kaynakları, kazein, tripton, maya özütü, üre, trizon, amonyum sülfat ve amonyum nitrat gibi organik ve inorganik azot kaynakları eklendi. Metal iyonlarının etkisini incelemek için fermantasyon ortamına 1mM konsantrasyonunda CaCl₂, ZnCl₂, CdCl₂, HgCl₂, Cu(NO₃)₂, Co(NO₃)₂ ve AlCl₃ daha önce belirlenen optimum şartlarda eklendi. α -Amilaz aktivitesi standart protokole göre yapıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

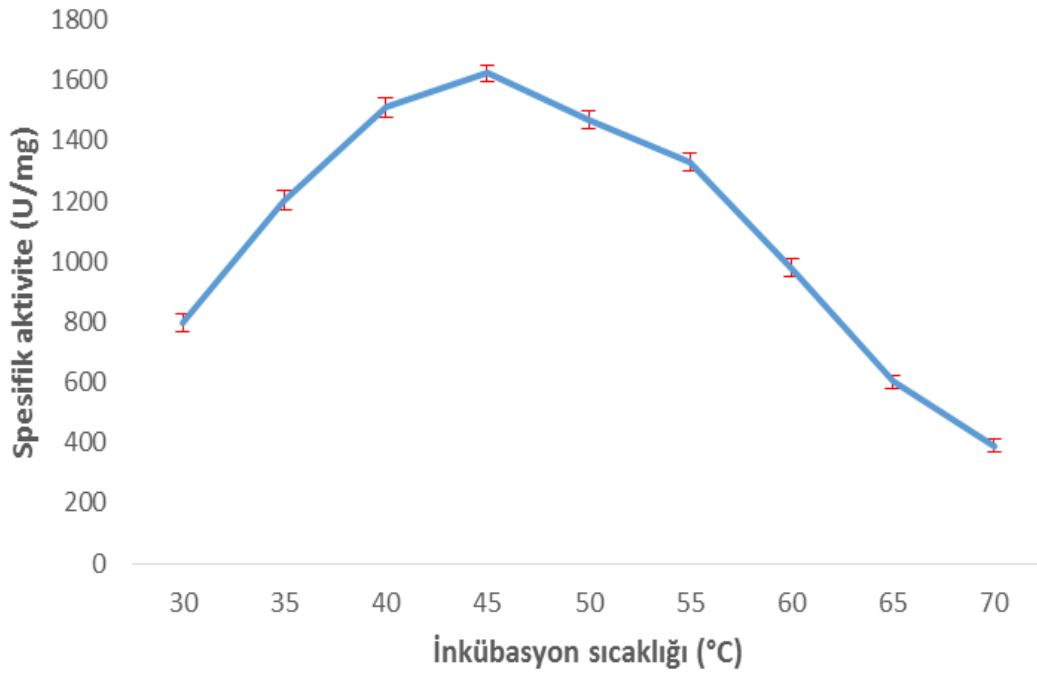
Dünyada artan nüfusa paralel olarak üretilen gıda ihtiyacının yaklaşık %35'i yok olmakta veya israf edilmektedir. Meyve işleyen fabrikaların sayısının da her geçen gün artması, atık miktarlarının fazlaşmasına ve sonuç olarak yeni atık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Türkiye, elma ve elma işleme ürünleri, üretim alanı ve miktarları bakımından dünyadaki ilk on ülke arasında yer almaktadır. Dünyadaki elma üretimi genellikle Çin, ABD ve Türkiye'de gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel ölçekte gerçekleştirilen meyve işleme uygulamalarında ortaya çıkan katı atıklardan değerli ürünlerin elde edilmesi, yalnızca çevre kirliliğinin önlenmesi konusunda değil, aynı zamanda insan

sağlığı ve ülke ekonomisi konusunda da büyük önem arz etmektedir (Sülük ve ark., 2018). Bu yönüyle elma kabuğu, meyve suyu endüstrisinde bol miktarda meydana gelen bir yan üründür ve ticari kullanım için potansiyel fırsatlar sunar. KFF'deki ideal bir substrat, mikroorganizmanın büyümesi için gerekli tüm besinleri sağlar. Substratın karbon ve azot bileşimi, tipik bir KFF işleminde kritik bir rol oynar. Karbon, mikrobiyal büyümeyi sağlayan önemli bir enerji kaynağıdır ve glikoz gibi basit moleküllerde veya nişasta gibi polimerlerde bulunabilir. Azot mikrobiyal büyüme için gerekli ikinci önemli elementtir ve çoğu zaman spesifik bir substrat üzerinde büyümeyi sağlamak veya büyümeyi arttırmak için harici bir azot kaynağının eklenmesi gereklidir (López-Gómez ve ark., 2020). KFF'de başlıca sıcaklık, fermantasyon süresi, nem içeriği, pH, inokülüm oranı, karbon ve azot kaynakları mikrobiyal büyümeyi ve dolayısıyla enzim üretimini kontrol ettikleri için optimize edilmelidir (Uygun ve Tanyildizi, 2018). KFF'de uygun substrat ve optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi enzim üretim maliyetini belirleyen önemli parametlerden biridir. KFF ortamında farklı bitkisel atıkların ve inkübasyon sürelerinin α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelendi. İnkübasyon süresinin 48. saatinde elma kabuklarının bulunduğu fermantasyon ortamında enzim üretimi maksimum değere ulaştı (Şekil 1). Artan inkübasyon sürelerinde α -amilaz üretimi kademeli olarak azalma gösterdi. Bunun nedeni inkübasyon süresinin uzamasıyla, fermantasyon ortamında enzimin denatürasyonu ve diğer ortam bileşenleriyle etkileşimi sonucu inhibisyonundan kaynaklanabilir (Abdullah ve ark., 2018).



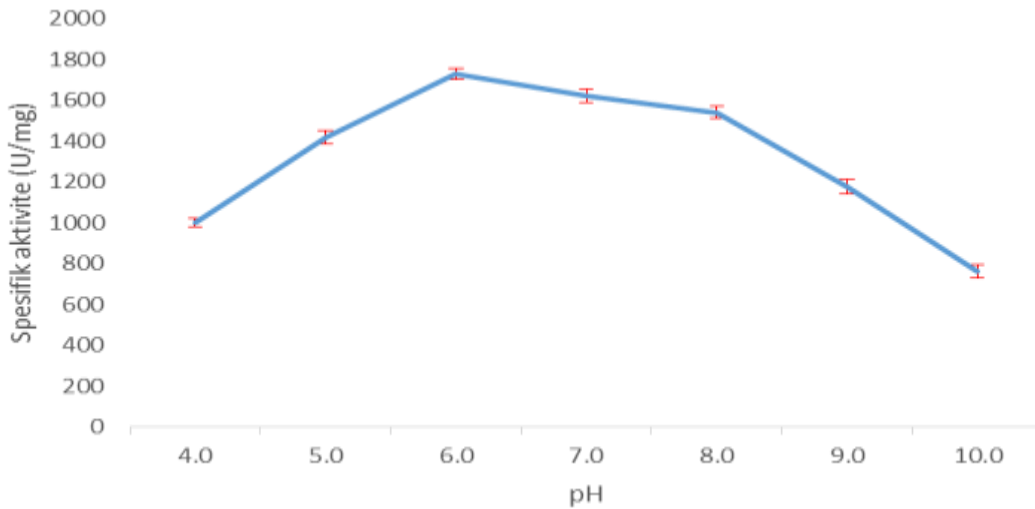
Şekil 1. İnkübasyon zamanının α -amilaz üretimi üzerine etkisi

Sıcaklık, enzim üretiminin yanı sıra mikroorganizmaların büyümesini de kontrol eden hayati önemde fiziksel bir faktördür (Abdullah ve ark., 2018). Sıcaklığın α -amilaz üretimi üzerine etkisi, organizmanın çeşitli sıcaklıklarda (30-70°C) optimize edilmiş koşullar altında inkübe edilmesiyle çalışıldı (Şekil 2). *Bacillus licheniformis* VO1 organizması, 45°C'de en yüksek α -amilaz üretimi gösterdi. İnkübasyon sıcaklığı 45°C'nin üzerine çıktığında enzim üretiminde azalma gözlemlendi. Muhtemelen yüksek sıcaklıkta bakteriyel büyüme baskılanmış ve sonuç olarak, enzim formasyonu inhibe olmuştur (Nusrat ve Rahman, 2007). Optimize edilmiş koşullar altında optimum α -amilaz üretimi önceki çalışmalarda benzer şekilde 45°C olarak rapor edilmiştir (Nwagu ve Okolo, 2011; El-Shishtawy ve ark., 2014; Issac ve Prince, 2015). Yapılan önceki çalışmalarda KFF koşullarında, maksimum α -amilaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığı sırasıyla 30, 37, 40 ve 50°C rapor edilmiştir (Raul ve ark., 2014; Simair ve ark., 2017; Salim ve ark., 2019; Pranay ve ark., 2019).



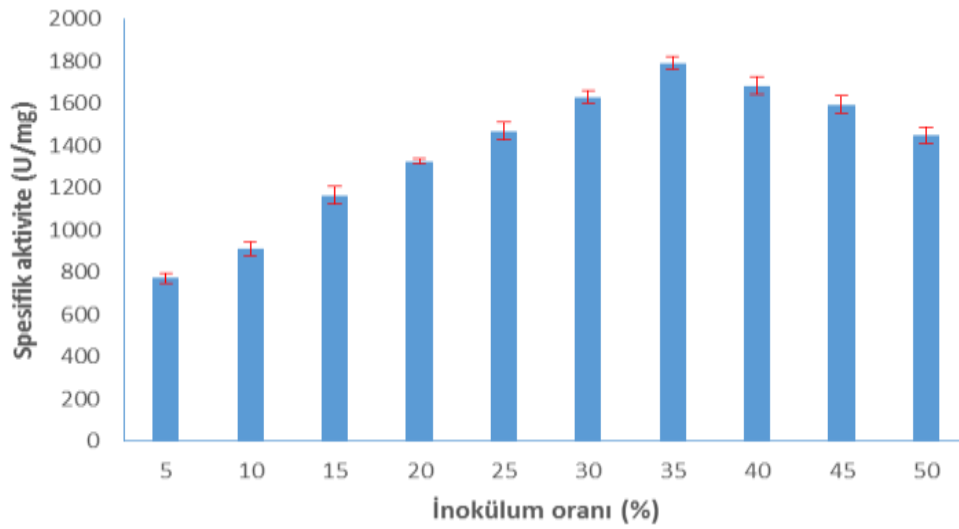
Şekil 2. İnkübasyon sıcaklığının α -amilaz üretimi üzerine etkisi

PH'nın KFF'yi etkileyen en kritik fizikokimyasal parametrelerden biri olduğu tespit edilmiştir (Mitchell ve ark., 2006; López-Gómez ve ark., 2020). Başlangıç pH'nın α -amilaz üretimi üzerine etkisini araştırmak için pH 4.0-10.0 değerlerinde çalışıldı. Şekil 3'te başlangıç pH'nın *Bacillus licheniformis* VO1'in ürettiği α -amilaz üzerine etkisi incelendiğinde maksimum enzim üretimi pH 6.0'da elde edildi. Önceki yapılan çalışmalarda optimum başlangıç pH sırasıyla 5.5, 6.5, 7.0 ve 8.0 gibi farklı değerlerde bulunmuştur (Saxena ve Singh 2011; Unakal ve ark., 2012; Alghabpoor ve ark., 2013; Issac ve Prince, 2015). Genelde *Bacillus* türlerinin çoğu 7.0 ile 9.0 arasında değişen farklı pH'larda maksimum α -amilaz üretmektedir.

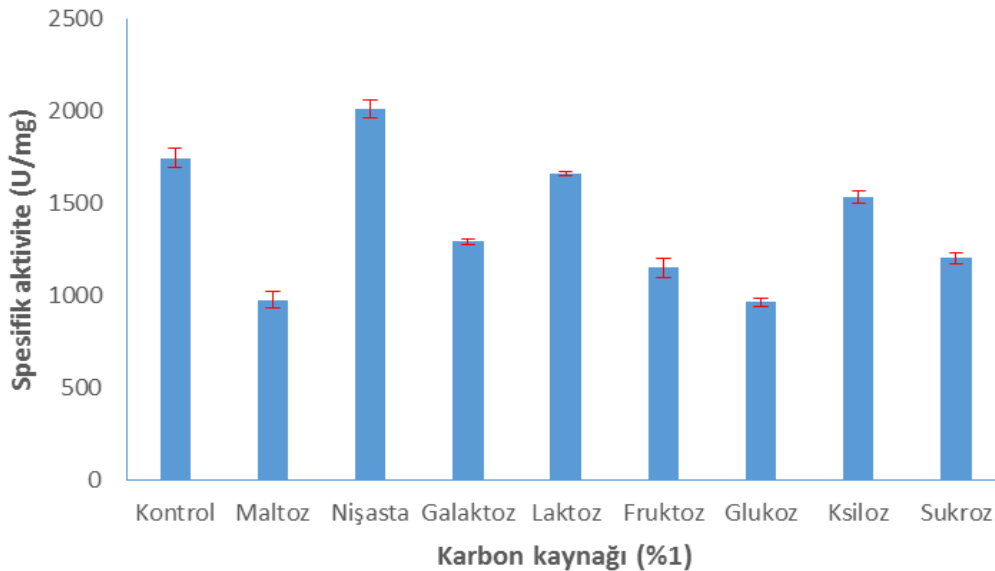


Şekil 3. Başlangıç pH'nın α -amilaz üretimi üzerine etkisi

İnokülüm oranı KFF'de α -amilaz üretimini büyük ölçüde etkilemektedir. Yapılan çalışmada *Bacillus licheniformis* VO1'den maksimum α -amilaz üretimi %35 (w/v) oranında inokülüm yapılan fermantasyon ortamından elde edildi (Şekil 4). Sonuçlarımız inokülüm oranına bağlı olarak çeşitli türlerden enzim üretimi için yapılan çalışmalar ile uyumludur (Issac ve Prince, 2015; Simair ve ark., 2017; Pranay ve ark., 2019). İnokülüm yaş ve oranı fermantasyon verimi yönünden önemli bir parametredir. Bu nedenle inokülüm oranı her zaman önemli bir fermantasyon parametresi olarak dikkate alınmalıdır.



Şekil 4. İnokülüm oranının α -amilaz üretimi üzerine etkisi

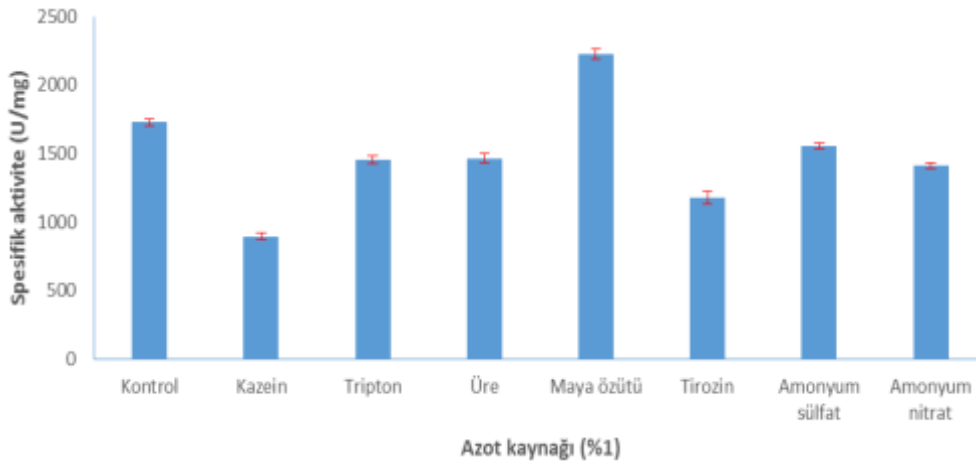


Şekil 5. Karbon kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi

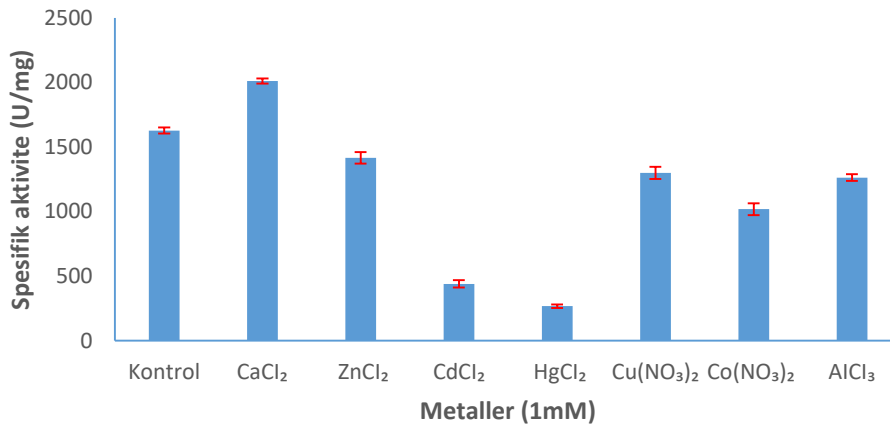
Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus licheniformis* VO1'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek enzim üretimi %1 nişasta bulunan KFF ortamında elde edildi (Şekil 5). Nişasta, amilolitik enzimlerin indüksiyonu için genel olarak kabul edilen bir besin bileşenidir (Lal ve ark., 2017). Bu sonuç, α -amilaz üretimi için nişastanın iyi bir indükleyici olduğunu rapor eden birçok çalışma ile uyumludur (Mukherjee ve ark., 2009; Maity ve ark., 2015; Pranay ve ark., 2019; Almanaa ve ark., 2020). İndüklenebilir bir enzim olan α -amilaz üretiminin nişasta varlığında fermantasyon

ortamında artması, nişastanın kademeli şekilde metabolize olmasından kaynaklanabilir (Abdullah ve ark., 2018) Öte yandan fermantasyon ortamına eklenen bazı karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda α -amilaz üretiminin azaldığı gözlemlendi. Farklı karbon kaynakları başlıca amilaz türleri olmak üzere ekstrasellüler enzimler üzerinde farklı etkilere sahiptir (Rao ve Satyanarayana, 2009).

Kültür ortamındaki azot içerikleri, mikroorganizmaların büyümesinde önemli bir role sahiptir (Far ve ark., 2020). Yapılan çalışmada, farklı organik ve inorganik azot kaynakları (maya özütü, üre, tripton, kazein, tirozin, amonyum sülfat ve amonyum nitrat) %1 konsantrasyonunda *Bacillus licheniformis* VO1'den α -amilaz üretimi üzerine etkisini incelemek üzere KFF ortamına eklendiğinde, test edilen azot kaynakları arasında maya özütü bulunan fermantasyon ortamında maksimum enzim üretimi elde edildi (Şekil 6). Bu artış maya özütünün α -amilaz üretimi için bakteriyel büyümeyi desteklemesinden kaynaklı olabilir (Dash ve ark., 2015). Bununla birlikte, gerekli olan bu azot kaynakları türden türe farklılık gösterebilir. Benzer sonuçlar önceki yapılan çalışmalarda *Bacillus* sp. (Elmansy ve ark., 2018; Pranay ve ark., 2019), *Bacillus cereus* (Vijayaraghavan ve ark., 2015) ve *Bacillus subtilis* D19 (Almanaa ve ark., 2020) elde edilmiştir.



Şekil 6. Azot kaynaklarının α -amilaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 7. Metallerin α -amilaz üretimi üzerine etkisi

Bacillus licheniformis VO1'den α -amilaz üretimi üzerine farklı metal iyonlarının etkisi incelendiğinde, 1mM konsantrasyonunda CaCl_2 eklenen KFF ortamında en yüksek enzim üretimi elde edildi (Şekil 7). α -Amilaz yapısındaki varlığı nedeniyle Ca^{2+} iyonları α -amilaz üretiminde önemli rol oynar ve bundan dolayı çoğu kültür ortamına, α -amilaz üretmek için kalsiyum klorür (CaCl_2) eklenir (Far ve ark., 2020). Benzer şekilde kültür ortamına Ca^{2+} eklendiğinde α -amilaz üretimini artırdığı yapılan farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2011; Sethi ve ark., 2016). CdCl_2 ve HgCl_2 bulunan fermantasyon ortamında α -amilaz üretimi önemli oranda baskılandı.

SONUÇ

Yıllar geçtikçe bakteri türleri, özellikle *Bacillus* cinsine ait olanlar ve ilgili cinsler endüstriyel ölçekte önem kazanmakta ve gelecek vaat eden α -amilaz üreticileri olarak ortaya çıkmaktadır. α -Amilazların çeşitli endüstriyel uygulamaları vardır. Bu açıdan bakıldığında, amilazların kullanıldığı endüstriyel alanlarda enzim üretim maliyetinin düşürülmesi ve tüketici taleplerinin karşılanması esastır. Mikroorganizmalar tarafından α -amilaz üretiminin çeşitli fizyokimyasal faktörlerden, yani kültür ortamının bileşimi, inokülüm oranı, inkübasyon süresi, pH, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı ve mineral elementlerden etkilendiği bilinmektedir. Bu çalışmada, bakteri izolatu *Bacillus licheniformis* VO1 KFF'de substrat olarak kullanılan elma, kavun, muz ve portakal kabuklarının bulunduğu ortama inoküle edildi. Uygun substrat olarak elma kabuklarının bulunduğu fermantasyon ortamında en yüksek α -amilaz üretimi elde edildi. Enzim üretimini etkileyen fermantasyon süresi, fermantasyon sıcaklığı, başlangıç pH ve inokülüm oranı gibi fiziksel parametreler incelendiğinde maksimum enzim üretimi 45 °C, pH 6.0, %35 inokülüm oranı ve 48. saatte elde edildi. Fermantasyon ortamına %1 nişasta ve maya özütü eklendiğinde α -amilaz üretiminde artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, KFF'de substrat olarak kullanılan elma kabuklarının yeni biyolojik dönüşümünün α -amilaz üretmek için uygun bir sistem olduğunu göstermektedir. Fermantasyon sonucunda kalan parçalanmış biyokütle atılabilir veya biyoetanol ve organik asitler vb. gibi diğer ürünleri üretmek için yeniden kullanılabilir. Son olarak bu süreç Türkiye'de ve diğer elma üreticisi ülkelerde bol miktarda meydana gelen bu tarımsal atıkların çevre kirliliğine neden olmasını engelleyebilir.

KAYNAKLAR

- Abdullah R, Naeem N, Aftab M, Kaleem A, Iqtedar M, Iftikhar T, Naz S, 2018. Enhanced Production of Alpha Amylase by Exploiting Novel Bacterial Co-Culture Technique Employing Solid State Fermentation. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 42: 305-312.
- Akati MY, 2019. An Overview of Amylase Production by Solid State Fermentation (SSF) since 2010. Journal of Technical Sciences, 9 (1): 1-7.
- Alghabpoor SS, Panosyan H, Popov Y, Trchounian, A, 2013. Production of Thermostable Alpha-Amylase by *Bacillus* sp. Iranian S2 using Solid State Fermentation. Electronic Journal of Natural Sciences, 20 (1): 47-50.
- Ahmed NE, El-Shamy AR, Awad HM, 2020. Optimization and Immobilization of Amylase Produced by *Aspergillus terreus* using Pomegranate Peel Waste. Bulletin of the National Research Centre, 44 (109): 1-12.
- Almanaa TN, Vijayaraghavan P, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Alyahya SA, 2020. Solid State Fermentation of Amylase Production from *Bacillus subtilis* D19 using Agro-Residues. Journal of King Saud University-Science, 32 (2): 1555-1561.
- Bernfield P, 1955. Amylases, α and β . In, Methods in Enzymology, Vol. 1, pp. 149-158. Academic Press, New York, USA.

- Dash BK, Rahman MM, Sarker PK, 2015. Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *BioMed Research International*, 2015 (ID: 859805): 1-9.
- Elmansy EA, Asker MS, El-Kady EM, Hassanein SM, El-Beih FM, 2018. Production and Optimization of α -Amylase from Thermo-Halophilic Bacteria Isolated from Different Local Marine Environments. *Bulletin of the National Research Centre*, 42 (31): 1-9.
- El-Shishtawy RM, Mohamed SA, Asiri AM, Gomaa, AM, Ibrahim, I.H, Al-Talhi HA, 2014. Solid Fermentation of Wheat Bran for Hydrolytic Enzymes Production and Saccharification Content by a Local Isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnology*, 14 (29): 1-8.
- Far BE, Ahmadi Y, Khosroushahi AY, Dilmaghani A, 2020. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10 (3): 350-358.
- Issac R, Prince R, 2015. Production of Alpha-Amylase by Solid State Fermentation using *Bacillus cereus* MTCC 7524 and *Bacillus licheniformis* MTCC 7445 from Dairy Sludge-A Comparative Study. *International Journal of Pharmtech Research*, 8: 111-117.
- Lal N, Jyoti J, Sachan P, 2017. Optimization of Carbon Sources for the Amylase Production and Growth of *Bacillus licheniformis* JAR-26 under Submerged Fermentation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 4 (1): 31-36.
- López-Gómez JP, Manan MA, Webb C, 2020. Solid-State Fermentation of Food Industry Wastes: In *Food Industry Wastes (Second Edition)*. Elsevier, pp, 135-161. London-United Kingdom.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagents. *Journal of Biology and Chemistry*, 48: 17-25.
- Maity S, Mallik S, Basuthakur R, Gupta S, 2015. Optimization of Solid State Fermentation Conditions and Characterization of Thermostable Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 5 (4): 1-7.
- María AC, Ravalan C, Andrews BA, Asenjo JA, 2019. Heterologous Expression and Biochemical Characterization of a Novel Cold-Active α -Amylase from the Antarctic Bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. *Protein Expression and Purification*, 155: 78-85.
- Melnichuk N, Braia MJ, Anselmi PA, Meini MR, Romanini D, 2020. Valorization of Two Agroindustrial Wastes to Produce Alpha-Amylase Enzyme from *Aspergillus Oryzae* by Solid State Fermentation. *Waste Management*, 106: 155-161.
- Mitchell DA, Berovic M, Krieger N, 2006. Introduction to Solid-State Fermentation Bioreactors. In: *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 33-45.
- MSarah MJ, Ibrahim I, Hamid AA, Aqma WS, 2020. Optimisation and Production of Alpha Amylase from Thermophilic *Bacillus* spp. and Its Application in Food Waste Biodegradation. *Heliyon*, 6 (6): 1-9.
- Mukherjee AK, Borah M, Rai SK, 2009. To Study The Influence of Different Components of Fermentable Substrates on Induction of Extracellular α -Amylase Synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in Solid-State Fermentation and Exploration of Feasibility for Inclusion of α -Amylase in Laundry Detergent. *Biochemical Engineering Journal*, 43 (2): 149-156.
- Nusrat A, Rahman SR, 2007. Comparative Studies on the Production of Extracellular α -Amylase by Three Mesophilic *Bacillus* Isolates. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24 (2): 129-132.
- Nwagu TN, Okolo BN, 2011. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian Soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (4): 649-658.
- Oliva RV Uribe JAG, 2020. Beyond Enzyme Production: Solid State Fermentation (SSF) as an Alternative Approach to Produce Antioxidant Polysaccharides. *Sustainability*, 495: 1-12.
- Pranay K, Padmadeo S.R., Prasad B, 2019. Production of Amylase from *Bacillus subtilis* sp. Strain KR1 Under Solid State Fermentation on Different Agrowastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21 (ID: 101300): 1-8.

- Raul D, Biswas T, Mukhopadhyay S, Das SK, Gupta S, 2014. Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation. *Biochemistry Research International*, 2014 (ID: 568141): 1-5.
- Rao UMJL, Satyanarayana T, 2009. Hyperthermostable, Ca²⁺ Independent, and High Maltose-Forming α -Amylase Production by an Extreme Thermophile *Geobacillus thermoleovorans*: Whole Cell Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159: 464-477.
- Sahnoun M, Kriaa M, Elgharbi F, Ayadi DZ, Bejar S, Kammoun R, 2015. *Aspergillus oryzae* S2 Alpha-Amylase Production Under Solid State Fermentation: Optimization of Culture Conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 73-80.
- Salim AA, Grbavcic S, Sekuljica N, Sekulic MV, Jovanovic J, Tanaskovic SJ, Lukovic N, Knezevic-Jugovic Z, 2019. Enzyme Production by Solid-State Fermentation on Soybean Meal: A Comparative Study of Conventional and Ultrasound-Assisted Extraction Methods. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66 (3): 361-368.
- Saxena R, Singh R, 2011. Amylase Production by Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Wastes Using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (4): 1334-1342.
- Sethi BK, Jana A, Nanda PK, Mohapatra PKD, Sahoo SL, Patra JK, 2016. Production of α -Amylase by *Aspergillus terreus* NCFT4269.10 Using Pearl Millet and Its Structural Characterization. *Frontiers in Plant Science*, 7 (ID: 639): 1-13.
- Silva IF, Langbehn RK, Silva RGC, Pantoja LDA, Vanzela APFC, Santos ASD, 2016. α -Amylase Production by *Bacillus Amyloliquefaciens* Utilizing Macauba Cake (*Acrocomia aculeata*) and Peach Palm Flour (*Bactris gasipaes*-Kunth) as Substrates. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34 (2): 76-82.
- Simair AA, Qureshi AS, Khushk, Ali CH, Lashari S, Bhutto MA, Mangrio GS, Lu C, 2017. Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed Research International*. 2017 (ID: 9173040): 1-9.
- Stuedler, S., Werner, A., Walther, T, 2019. It Is the Mix that Matters: Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 169: 51-81.
- Sülük K, Tosun İ, Ekinci K, 2018. Elma İşleme Atıklarının Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bertaraf Yöntemlerinin İncelenmesi. *Bilge International Journal of Science and Technology Research*, 2 (Special Issue): 98-108.
- Tiwari SP, Srivastava R, Singh CS, Shukla K, Singh RK, Singh P, Singh R, Singh NL, Sharma R, 2015. Amylases: An Overview with Special Reference to Alpha Amylase. *Journal of Global Biosciences*, 4 (1): 1886-1901.
- Tripathi AD, Joshi A, Singh SP, Shrivastava A, 2017. Production of Amylase by *Bacillus polymyxa* NCIM No. 2539 from Agroindustrial Wastes. *Applied Food Biotechnology*, 4 (2): 103-112.
- Unakal C, Kallur RI, Kaliwal BB, 2012. Production of A-Amylase Using Banana Waste by *Bacillus subtilis* under Solid State Fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 2 (4): 1044-1052.
- Uygut MA, Tanyildizi MŞ, 2018. Optimization of Alpha-Amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* Grown on Orange Peels. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42, 443-449.
- Vijayaraghavan P, Kalaiyarasi M, Vincent SGP, 2015. Cow Dung Is an Ideal Fermentation Medium for Amylase Production in Solid-State Fermentation by *Bacillus cereus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13: 111-117.
- Zhao W, Zheng J, Wang YG, Zhou HB, 2011. A Marked Enhancement in Production of Amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in Flask Fermentation Using Statistical Methods. *Journal of Central South University Technology*, 18 (4): 1054-1062.