

Katı Faz Fermantasyonunda *Bacillus licheniformis* VO7 Tarafından α -Amilaz Üretimi için Potansiyel bir Substrat: Muz Kabuğu

Nurullah AKCAN

Siirt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Siirt
Sorumlu Yazar: nakcan@siirt.edu.tr

Geliş Tarihi: 18.08.2020 Düzeltme Geliş Tarihi: 09.03.2021 Kabul Tarihi: 12.04.2021

Öz

Mikroorganizmalardan elde edilen α -amilazların biyoteknolojik potansiyeli, çeşitli endüstriyel süreçlerde olası biyolojik katalizörler olarak dünya çapında büyük ilgi görmektedir. Bu enzimler gıda, tekstil ve eczacılık gibi çeşitli endüstriyel alanlarında kullanılmaktadır ve günümüz teknolojisi için vazgeçilmez hale gelmiştir. Biyoteknoloji, daha az enerji gerektiren, yenilenebilir hammaddelere ve çevre açısından sağlıklı uygulamalara dayanan yeni endüstriyel prosesler için potansiyel sunar. Alternatif bir enerji kaynağı olan muz atığı, dünya çapında mevcudiyeti nedeniyle dikkat çekiyor. Bu biyolojik atıklar yakındaki gölet, nehir ve karada uygunsuz bir şekilde bertaraf edilerek ciddi sağlık tehlikelerine neden olur. Daha sürdürülebilir bir hammadde kullanımı arayışının bir parçası olarak, katı faz fermantasyonu (KFF) araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. KFF yöntemi, çevre kirliliğine neden olan tarımsal atıkların kullanılmasını sağlar. Bu çalışmada, *Bacillus licheniformis* VO7 muz, elma, karpuz ve portakal kabuklarının bulunduğu KFF ortamına transfer edildi. Kullanılan tarımsal atıklar arasında maksimum α -amilaz üretimi muz kabuklarının bulunduğu KFF ortamından elde edildi. Maksimum α -amilaz üretimi 50 °C, pH 6.0 ve 24. saatte 1500 μ m parça büyüklüğündeki muz kabuklarının bulunduğu ortamdan elde edildi. Bu sonuçlar ele alındığında, tüketim sonucu meydana gelen muz kabuğu atıklarının katı faz fermantasyonunda (KFF) substrat olarak kullanımı ile *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi, çevresel islah süreçlerinde kullanılmak üzere potansiyel bir aday olarak düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: α -Amilaz, *Bacillus licheniformis* VO7, katı faz fermantasyonu, muz kabuğu

A Potential Substrate for α -Amylase Production by *Bacillus licheniformis* VO7 in Solid State fermentation: Banana Peel

Abstract

The biotechnological potential of α -amylases derived from microorganisms is of great interest worldwide as possible biological catalysts in various industrial processes. These enzymes are used in various industrial fields such as food, textile and pharmacy and have become indispensable for today's technology. Biotechnology offers the potential for new industrial processes that require less energy and are based on renewable raw materials and environmentally healthy practices. Banana waste, an alternative source of energy, draws attention due to its worldwide availability. These biological wastes are improperly disposed of in nearby ponds, rivers and land, causing serious health hazards. As part of the search for a more sustainable raw material use, solid state fermentation (SFF) has become the focus of research. The SFF method enables the use of agricultural wastes that cause environmental pollution. In this study, *Bacillus licheniformis* VO7 was transferred to SFF medium containing banana, apple, watermelon and orange peels. Among the agricultural wastes used, the maximum α -amylase production was obtained from SFF medium with banana peels. The maximum α -amylase production was obtained at 50°C, pH 6.0 and at 24 hours from the environment where the banana peels with a particle size of 1500 μ m were found. Considering these results, the use of banana peel waste generated as a result of consumption as a substrate in solid state fermentation (SSF) and α -amylase production from *Bacillus licheniformis* VO7 can be considered as a potential candidate for use in environmental improvement processes.

Key words: α -Amylase, *Bacillus licheniformis* VO7, banana peel, solid state fermentation

Giriş

Doğa, inanılmaz çeşitliliği ve çok çeşitli olanaklarıyla bizi büyülüyor. Milyonlarca yıllık evrimle çeşitli organizmalar ortaya çıkmış, metabolik yollar oluşturmuş ve endüstri için oldukça ilgi çekici ürünler ortaya çıkmıştır. Bu ürünler arasında başlıca enzimler gelmektedir. Ekstraselüler enzimler, özellikle bakteri ve mantarlar tarafından oluşturulan ve karmaşık makromoleküllerin parçalanmasının veya sindirilebilirliğinin, çözünürlüğünün veya viskozitenin iyileştirilmesinin istendiği farklı endüstrilerde kullanılan biyomoleküllerdir. Doğada, bu enzimler esas olarak substrat bozunması ve besin ekstraksiyonu için kullanılır. Organizmalar, her bir spesifik substrat için özel enzim kokteylleri oluşturabilir (Stuedler ve ark., 2019).

Amilazlar, hidrolazlar grubuna aittir ve polisakkaritlerin (esas olarak nişasta) glikozit bağlarını ayırır, bu nedenle de glikosidazlar olarak sınıflandırılırlar. Bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlar gibi çeşitli organizmalar tarafından üretilirler. Esas olarak bakteri ve mantar amilazları, özellikle α -amilaz (EC 3.2.1.1), endüstri ve teknolojiye kullanılmaktadır (Antranikian, 2006; Sahm ve ark., 2013) Amilaz dünya enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturur (Mojsov, 2012). α -Amilazları da içeren endüstriyel enzim pazarı %6.6 yıllık bileşik büyüme oranı ile 2015 yılında 1.5 milyar dolar olmuştur ve %8.2 yıllık bileşik büyüme oranı ile dünya enzim pazarının 2020 yılında, 7.5 milyar dolara ulaşacağı, bu büyümenin artarak devam edeceği tahmin edilmektedir (Li ve ark., 2012; Sharma ve ark., 2019; Choudhury, 2020). α -Amilazların başlıca endüstriyel uygulama alanı gıda endüstrisidir. Bira fabrikalarında ezme işleminde, unun işlenmesinde (havali hamur veya daha yüksek derecede kahverengileştirme için), nişastanın ön işleminde ve modifikasyonunda, glikoz/maltoz şurubu ve maltodekstrin üretiminde kullanılır. Ayrıca eczanelerde veya bulaşık ve çamaşır deterjanlarında nişastalı lekelerin ve kirlerin çıkarılmasında, hayvan yemi ve biyoyakıt üretiminde de kullanılırlar (Antranikian, 2006; Mojsov, 2012; Sahm ve ark., 2013). Yüksek üretim maliyeti ve düşük verim, α -amilaz enziminin endüstriyel üretiminde temel sınırlamalardır. Bu özel enzimleri elde etmek için bazen organizmaların doğal yaşam alanlarını simüle etmek gerekir. Endüstride tercih edilen var olan sistemlerin uygulanması için bir olasılık, katı faz fermentasyonudur (KFF) (Stuedler ve ark., 2019). Bu teknik, binlerce yıldır oryantal ülkelerde "miso", "shoyu" ve "tempeh" gibi geleneksel yiyeceklerin ve batı ülkelerinde ekmek, peynir ve yoğurt üretiminde kullanılmaktadır (Sahnoun ve ark., 2015). Bu fermentasyon işleminde, mikroorganizmanın kültür

ortamında bulunan katı substrat olarak adlandırılan çözünmeyen materyaller, fiziksel destek ve besin kaynağı olarak işlev görmektedir (Holker ve Lenz, 2005). KFF genelde katı atıklardan organik gübre ve hayvan yemlerinin üretiminde, hayvan yemlerini ambarda saklama gibi biyo-kütlenin değerli katkı maddelerine dönüşümünü içeren çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanımı için diğer yöntemlere nazaran basit, düşük maliyetli ve çevre dostu teknolojik bir uygulamadır. α -Amilazın üretim maliyeti, katı faz fermentasyon (KFF) süreçleri altında enzim üretimi için substrat olarak tarım endüstrisi atıklarının kullanılmasıyla en aza indirilebilir. Bu tür tarımsal sanayi atıkları arasında şeker kamışı küspesi, buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır kepeği, yeşil nohut kabuğu, buğday samanı, pirinç samanı, pirinç kabuğu, soya kabuğu, asma budama tozu, mısır koçanı, muz atığı, çay atığı, kavak küspesi, şeker pancarı küspesi, elma posası, fıstık küspesi, hardal yağı, buğday unu, mısır unu, nişasta vb. bulunmaktadır (Naik ve ark., 2019).

Tarıma dayalı sanayiler, her yıl büyük miktarda atık ve kalıntı üretir. Bu kalıntılar uygun bertaraf prosedürü olmadan çevreye salınırsa çevre kirliliğine ve insan-hayvan sağlığına zararlı etkilere neden olabilir. Tarımsal endüstriyel atıkların çoğu arıtılmamış ve yeterince kullanılmamıştır, bu nedenle var olan bilgilere göre yakarak, boşaltarak veya plansız depolama yoluyla bertaraf edilir. Bu arıtılmamış atıklar, bir dizi sera gazını artırarak iklim değişikliği ile farklı sorunlar yaratmaktadır (Sadh ve ark., 2018). Bunun yanı sıra fosil yakıtların kullanımı da sera gazı (GHG) emisyonu üzerindeki etkiye katkıda bulunmaktadır (Bos ve Hamelinck 2014). Dolayısıyla, alternatif temizleyici ve yenilenebilir biyoenerji kaynaklarının iyileştirilmesini dikte etmek artık dünya çapında bir endişedir (Okonko ve ark., 2009). Bu atıklar ciddi bir imha sorununa neden olur (Rodríguez-Couto, 2008) Tarımsal atıkların biyoproseslerde kullanılması, alternatif substratlar sağlayabilir ve ayrıca çevresel sorunların çözülmesine ve enzimlerin üretim maliyetinin düşürülmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada, α -amilaz üretimi ve verim artışı için uygun olacak potansiyel enzim üreten mikroorganizma ve ucuz substrat bulmak için bu sınırlamanın üstesinden gelinmeye çalışılacaktır. Mevcut çalışma, KFF'de α -amilaz üretimi için potansiyel düşük maliyetli tarımsal sanayi atıklarının taranması ve enzimin optimum üretimi için fiziksel parametreleri optimize etmek üzere gerçekleştirildi. Çünkü bu fiziksel parametreler, enzimlerin optimum üretimini arttırmak, teşvik etmek ve stimüle etmek için önemlidir (Rehman ve ark., 2005). Ayrıca, enzimlerin başarılı bir şekilde üretilmesi için inkübasyon zamanı, sıcaklık, pH, substrat parça

büyüklüğü optimizasyonu gibi faktörler çok önemlidir (Melnichuk ve ark., 2020).

Materyal ve Metot

Biyolojik Materyal

Çalışmada biyolojik materyal olarak Bitlis, Norşin-Budaklı kaplıcalarından izole edilen *Bacillus licheniformis* VO7 (Accession number: KJ842090.1) kullanıldı.

Bakteri Üretimi

Nutrient Broth (NB) besiyerine, katı besiyerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 150 rpm'de 50 °C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda besiyerinden 1 mL alınarak önceden otoklavlanan KFF besiyerine ekim yapıldı.

KFF Besiyeri

Elma, portakal, muz ve karpuz kabukları kurutulduktan sonra bir doğrayıcı yardımı ile parçalandı. Daha sonra 500, 1000, 1500 ve 2000 µm'lik eleklerde elendi. 1500 µm boyunda olanlar alındı. 3 g tartılıp üzerine 10 mL 0.1 M çeşme suyu eklenip (100 mL'lik erlenmayer içerisinde) otoklavlandı.

Enzim Ekstrasyonu

24. saatten 144. saate kadar inkübasyona bırakılan, KFF besiyeri üzerine 10 mL çeşme suyu eklendi. Karıştırılıp steril gazlı bezle iyice süzöldükten sonra 7.000 rpm'de 8 dk. santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi DNS yöntemiyle tespit edildi (Bernfield, 1955). Bu yöntemde göre; 100 µL enzim çözeltisi ve 200 µL % 0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M pH 8.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmüş) 37 °C'de 30 dk. inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400 µL DNS (3,5 dinitro salisilik asit) ilave edilerek 5 dk. kaynar su banyosunda bekletildi. DNS düşük sıcaklıklarda indirgen şeker uçlarıyla reaksiyona girmediğinden, kaynar su banyosuna konuldu. 3,5 DNS sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonun durmasını sağladığı gibi aynı zamanda renk oluşumunu da sağlamaktadır. Daha sonra 3 mL distile su ile seyreltme yapılarak 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

α-Amilaz Üretimi Üzerine Çeşitli Bitkisel Atıkların ve İnkübasyon Süresinin Etkisi

Çalışmamızda, α-amilaz üretimi için substrat olarak elma, portakal, muz ve karpuz kabuklarının bulunduğu fermantasyon ortamları 144 saat inkübasyona bırakıldı ve her 24 saat sonunda üst sıvılar ekstrakte edilip α-amilaz aktivite tayini yapıldı. α-Amilaz üretimi için belirlenen en uygun bitkisel atık ve optimum inkübasyon süresi sonraki deneylerde kullanıldı.

α-Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Bacillus licheniformis VO7'den α-amilaz üretimi üzerine optimum sıcaklığın belirlenmesi için uygun inkübasyon süresinde 5°C artış ile 35-65°C aralığında enzim aktivite tayini yapıldı. Belirlenen optimum sıcaklık sonraki deneylerde kullanıldı.

α-Amilaz Üretimi Üzerine Başlangıç Ph Etkisi

α-Amilaz üretimi üzerine optimum pH'nın belirlenmesi için 0.1 N HCl ve NaOH kullanılarak ortam pH'sı 1 birim aralıkla 4.0-10.0'a ayarlandı. Daha sonra gerçekleştirilen deneyler için ortamın optimum başlangıç pH'sı kullanıldı.

α-Amilaz Üretimi Üzerine Substrat Parça Büyüklüğü Etkisi

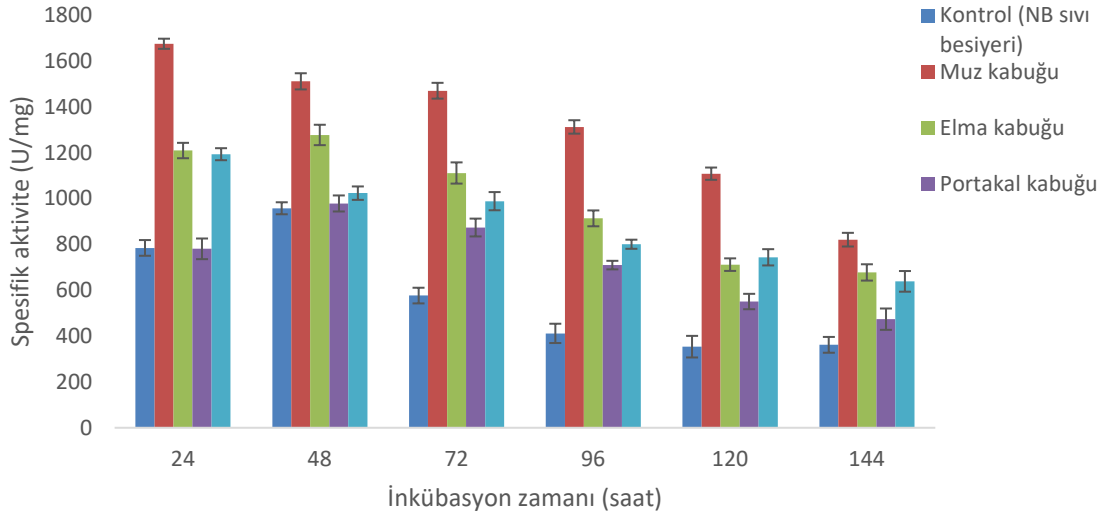
α-Amilaz üretimi üzerine optimum substrat parça büyüklüğü etkisini belirlemek için 500-1000-15000 ve 2000 µm parça büyüklüğündeki muz kabukları 3 g tartılarak 10 ml çeşme suyu ile nemlendirildi. 3 g içeren kültür erlenmayerleri (100 mL) otoklavlandı ve inkübasyona bırakılarak optimum inkübasyon süresi sonunda enzim aktivite tayini yapıldı.

α-Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek için KFF ortamına %1 oranında farklı karbon kaynakları (glukoz, galaktoz, maltoz, laktoz, fruktoz, sukroz, buğday nişastası ve mısır nişastası) eklendi. Optimum inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesi ölçüldü

α-Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Üre, trizon, maya özütü, tripton, glisin, sodyum nitrat, amonyum sülfat ve amonyum nitrat gibi organik ve inorganik azot kaynakları %1 oranında optimize edilen fermantasyon ortamına eklenerek *Bacillus licheniformis* VO7'den α-amilaz üretimi üzerine etkisi incelendi.



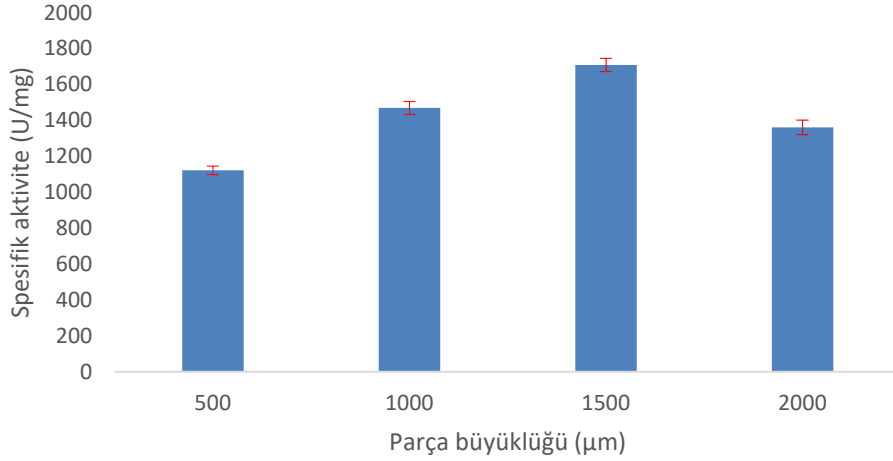
Şekil 1. Farklı tarımsal atıkların ve inkübasyon süresinin *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi.

Bulgular ve Tartışma

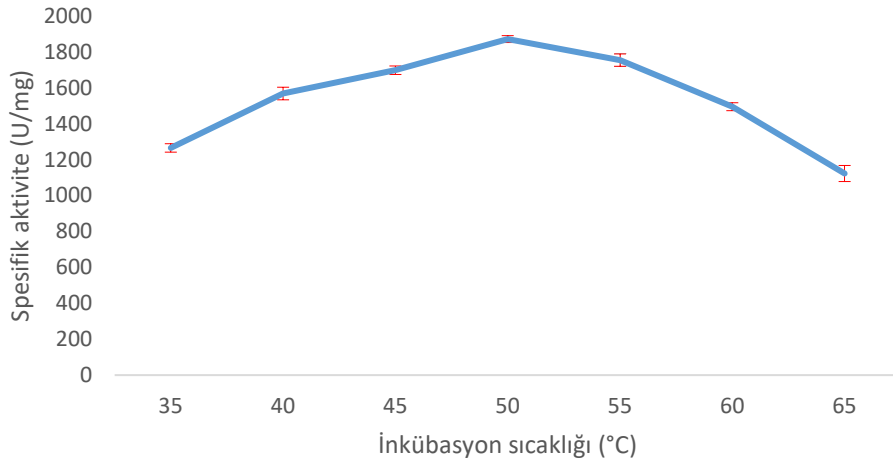
Muz (Cins: Musa) dünya çapında yüksek oranda yetiştirilmektedir. Türkiye'de muz üretimi 2018 yılında yaklaşık 500 bin tona ulaşmıştır (TÜİK, 2018). Yapılan bir çalışmaya göre 1 hektarlık araziden yapılan muz üretimi sonucunda yaklaşık 220 ton atık madde oluşmaktadır (Gabhane ve ark., 2013). Muz atık materyali, enerji gereksinimini karşılamak için biyo-yakıt (Santa-Maria ve ark., 2013; Sharma ve Mishra, 2015), etanol (Ingale ve ark., 2014; Gebregergs ve ark., 2016), biyogaz (Zhang ve ark., 2013) ve endüstriyel önemi olan enzimlerin (Vivekanand ve ark., 2011; Praveen ve Suneetha, 2014; El-Bendary ve ark., 2015; Silpa ve ark., 2018) üretiminde kullanılmıştır (Rai ve ark., 2019). Fermantasyon işleminde substrat seçimi yapılırken, substratın sadece bir besin kaynağı olmayıp aynı zamanda mikroorganizmanın büyümesi için destek işlevi göreceği göz önünde bulundurularak tarımsal kalıntıların incelenmesi dikkatli yapılmalıdır. Uygun substrat ve inkübasyon süresini tespit etmeye yönelik elma, muz, portakal ve karpuz kabuklarının substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında yapılan enzim aktivite deneylerinde en yüksek α -amilaz üretimi 24. saatte muz kabuklarının bulunduğu ortamda elde edildi (Şekil 1). Genelde, bitki bazlı katı substratlar, özellikle indükleyici moleküllerin mevcudiyeti ve daha az miktarda anti-besin maddesi içermeleri nedeniyle mikrobiyal enzim üretimi için uygundur (Raul ve ark., 2014). Muz kabuğundaki şekerler üzerinde yapılan bir çalışma, kabuğun %14,6 glikoz ve %56 sukroz içerdiğini göstermiştir (Kokab ve Asghar, 2003; Jabeen ve ark., 2017). Benzer şekilde rapor edilen birçok çalışmada muz kabuklarının substrat olarak kullanılmasıyla α -amilaz elde

edilmiştir (Noreen ve ark., 2002; Kokab ve Asghar, 2003; Krishna ve ark., 2012; Jabeen ve ark., 2017; Kavitha, 2018; Haq ve ark., 2020). Karpuz kabuklarının bulunduğu fermantasyon ortamında da 48. saatte yüksek aktivite elde edilmiştir. Ancak muz kabuklarının bulunduğu KFF ortamında 24. saatte yüksek aktivite elde edilmesi, fermantasyon süresinin ve işlem maliyetinin azalmasını sağladı ve bu nedenle sonraki deneylerde substrat olarak muz kabukları kullanıldı. KFF'de substratın partikül büyüklüğü primer ve sekonder metabolitlerin üretimini etkileyebilmektedir. Bu nedenle muz kabuğunun dört farklı (500-1000-1500 ve 2000 μ m) boyuttaki örnekleri fermantasyon ortamına substrat olarak bırakıldı ve enzim üretimine etkisi incelendi. Şekil 2'de maksimum α -amilaz üretimi 1500 μ m parça büyüklüğündeki muz kabuklarının bulunduğu KFF ortamında elde edildi. Genel olarak partikül boyutu mikroorganizmanın gelişmesinde ve KFF'de partiküller inter-intra kütle transferinde hesaba katılması gereken önemli bir faktördür (Zhang ve ark., 2017; Casciatori ve ark., 2014).

Sıcaklığın *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerindeki rolünü araştırmak için 35-65 °C aralığındaki farklı inkübasyon sıcaklıkları kullanıldı. Şekil 3'deki sonuçlar, optimum inkübasyon sıcaklığının 50°C olduğunu göstermektedir. Düşük ve yüksek sıcaklıklarda spesifik aktivitede düşüş gözlemlendi. Düşük sıcaklık bakteri büyümesi için uygun olmadığından α -amilaz üretimini azaltırken, daha yüksek sıcaklık buharlaşma yoluyla ortamın su içeriğini düşürür ve bunun sonucunda hücrelerin büyümesini etkiler, aynı zamanda yüksek sıcaklık oksijen konsantrasyonunu sınırlandırır (Bedan ve ark., 2014).



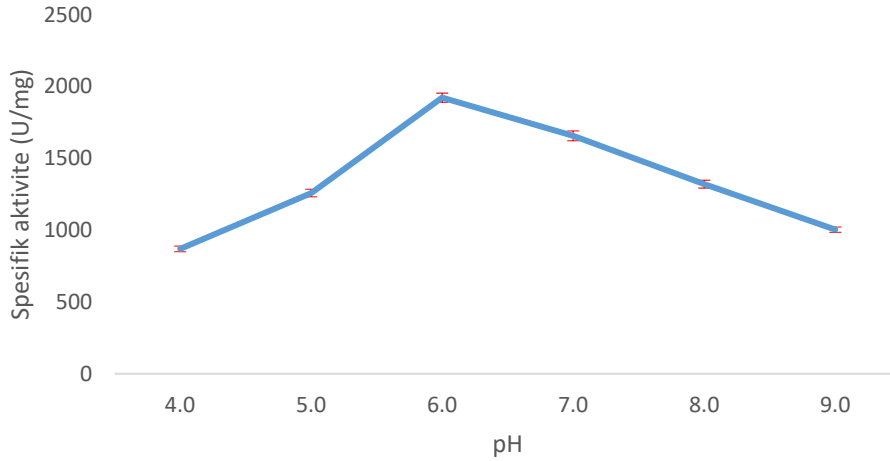
Şekil 2. Substrat parça büyüklüğünün *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi.



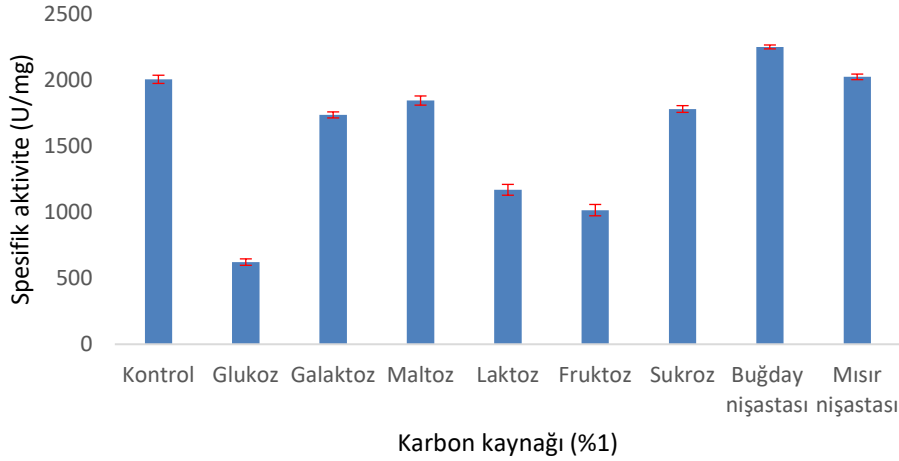
Şekil 3. İnkübasyon sıcaklığının *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi.

PH tampon çözeltisinin etkisi, enzim üretim koşullarını optimize etmek için üzerinde çalışılması gereken önemli faktörlerden biridir. Fiziksel parametrelerden fermantasyon ortamının pH'sı, mikroorganizmaların enzim salgılamasında morfolojik değişiklikleri indükleyerek önemli bir rol oynar (Nguyen ve ark., 2019). Her enzim, belirli bir pH'ta maksimum aktivite gösterir. PH'nın α -amilaz üretimindeki etkisini belirlemek için KFF ortamları ayrı ayrı (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) farklı pH

değerlerinde hazırlandı. En yüksek α -amilaz üretimi pH 6.0'da elde edildi (Şekil 4). Optimum pH'nın altında ve üstündeki değerlerde enzim üretiminin azalması enzimin protein olan üç boyutlu yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır (Moat ve ark., 2002). PH değerini optimize ederek maksimum α -amilaz üretimi elde etmeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır (Alghabpoor ve ark., 2013; Issac ve Prince, 2015; Uygut ve Tanyildizi 2018; Kannana ve Kanagaraj, 2019; Pranay ve ark., 2019).



Şekil 4. pH'nın *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi.

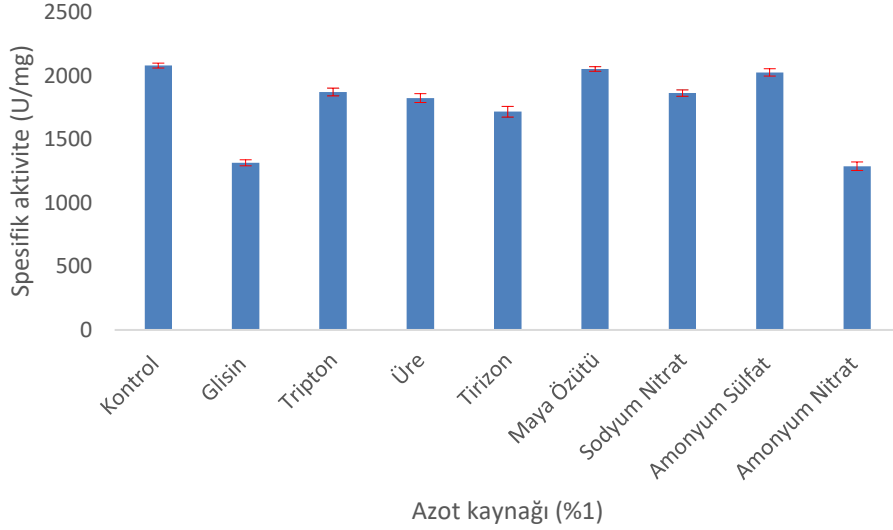


Şekil 5. Karbon kaynaklarının *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi.

Farklı karbon kaynakları KFF ortamına eklenerek α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelendi. KFF ortamına eklenen karbon kaynaklarından buğday nişastasının bulunduğu fermantasyon ortamında en yüksek enzim üretimi gerçekleşti (Şekil 5). KFF ortamına eklenen diğer karbon kaynakları enzim üretiminde önemli bir artışa neden olmadı. Fruktoz, laktoz ve glukoz gibi karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda α -amilaz üretiminde önemli oranda azalma görüldü. Ayrıca nişastanın yapısı, katı faz fermantasyonu sırasında amilolitik enzimlerin etkisiyle mikroorganizma tarafından da değiştirilir (Reyes ve ark., 2017).

Sonuç ve Öneriler

Muz kabukları çeşitli karbon bileşikleri bakımından zengindir. Modern biyoteknolojinin hedeflerinden biri de mikrobiyal hücre büyüme kültürlerinde geri dönüşüm ve tarımsal atıkların besin kaynağı olarak kullanılmasını içerir. Muz kabuklarının, KFF'de kullanımı ile *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi, enzim üretim maliyetini azaltmaya ve bu atıkların çevreyi kirletmesini önlemeye yardımcı olacaktır.



Şekil 6. Azot kaynaklarının *Bacillus licheniformis* VO7'den α -amilaz üretimi üzerine etkisi.

Mevcut nişasta bileşenlerinin oranındaki artışın, karbon katabolit represyonu ile sonuçlanması mümkündür (Gomi, 2019). Daha önceki çalışmalarda buğday nişastasının α -amilaz üretimi için iyi bir karbon kaynağı olduğu rapor edilmiştir (Farid ve Shata, 2011; Dojnov ve ark., 2015).

KFF ortamına farklı azot kaynakları (organik ve inorganik) eklenerek α -amilaz üretimi üzerine etkisi incelendi. Farklı azot kaynaklarının eklendiği KFF ortamlarında α -amilaz üretiminde belirgin bir artış gözlenmedi (Şekil 6). Sadece maya özütü ve amonyum sülfatın bulunduğu ortamlarda kontrole yakın değer elde edildi. Bu çalışmaya benzer şekilde, *B. amyloliquefaciens* (Gangadharan ve ark., 2006) ve *B. subtilis* DM-03 (Mukherjee ve ark., 2009) için kültür ortamına eklenen çeşitli azot kaynaklarının α -amilaz üretiminde önemli bir artış görülmemiştir.

Teşekkür

Çalışmada biyolojik materyal olarak kullanılan *Bacillus licheniformis* VO7 (Accession number: KJ842090.1) mikroorganizmasını Bitlis, Norşin-Budaklı kaplıcalarından izole eden Siirt Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Veysi OKUMUŞ'a katkı ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Kaynaklar

Alghabpoor, S.S., 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.

Antranikian, G. 2006. *Angewandte Mikrobiologie*. Springer, Berlin-Heidelberg.

Bedan, D.S., Aziz G.M., Al-Saady, A.J.R. 2014. Optimum conditions for α -amylase production by *Aspergillus niger* mutant isolate using solid state fermentation. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(4): 450-456.

Bernfield P, 1955. Amylases, α and β . In, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, pp. 149-158. Academic Press, New York, USA.

Bos, A.V.D., Hamelinck, C. 2014. Greenhouse gas impact of marginal fossil fuel use. Project number: BIENL14773.

Casciadori, F.P., Laurentino, C.L., Taboga, S.R., Casciadori, P.A., Thoméo, J.C., 2014. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: experimental data and effects on process performance. *Chemical Engineering Journal*, 255, 214-224.

Choudhury, A.K.R. 2020. *Introduction to enzymes*, in: Woodhead Publishing Sustainable Technologies for Fashion and Textiles, pp. 75-90.

Dojnov, B., Grujić, M., Vujčić, Z. 2015. Highly efficient production of *Aspergillus niger* amylase cocktail by solid-state fermentation using triticale grains as a well-balanced substrate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 80: 1375-1390.

El-Bendary, M.A., Moharam, M.E., Mahmoud, D.A.R. 2015. Economic production of polyethylene modifying lipase enzyme under solid state fermentation using

- banana peels and sand. *Biotechnology An Indian Journal*, 11(3): 94-101.
- Farid, M.A.F., Shata, H.M.A.H. 2011. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(4): 267-274.
- Gabhane, J., William, S.P., Gadhe, A., Rath, R., Vaidya, A.N., Wate, S. 2013. Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Management*, 34(2):498-503.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2006. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2): 269-274.
- Gebregergs, A., Gebresemati, M., Sahu, O. 2016. Industrial ethanol from banana peels for developing countries: response surface methodology. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(1): 22-29.
- Gomi, K., 2019. Regulatory mechanisms for amyolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 83(8): 1385-1401.
- Haq, I., Jatoi, I., Gill, N.P., Sangrasi, S.A, Komal, H., Ali, N. 2020. Certain extracellular productions in *Bacillus subtilis* cultures supplemented with banana waste as substrate *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 10(3): 99-107.
- Holker, U., Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3): 301-306.
- Ingale, S., Joshi, S.J., Gupte, A. 2014. Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3): 885-892.
- 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 (9): 111-117.
- Jabeen, M., Rukh, M., Ahmed, S. 2017. Optimization of α -amylase production from banana peel for different fermentation approaches. Fifth International Conference on Chemical Engineering Bioengineering. December 20-22, Dakka, pp. 185-191.
- Kannana, T.R., Kanagaraj, C. 2019. Molecular characteristic of α -amylase enzymes producing from *Bacillus licheniformis* (JQ946317) using solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20: 101240.
- Kavitha, R. 2018. Production of amylase and protease from fruit peels using *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation. *International Journal of Scientific Research and Reviews*, 7(2): 652-663.
- Krishna, P.R., Srivastava, A.K., Ramaswamy, N.K., Suprasanna, P., D'Souza, S.F. 2012. Banana peel as substrate for α -amylase production using *Aspergillus niger* NCIM 616 and process optimization. *Indian Journal of Biotechnology*, 11: 314-319.
- Kokab, S., Asghar, M. 2003. Bio-processing of banana peel for α -amylase production by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8530(4): 411-414.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3): 1-11.
- Melnichuk, N., Braia, M.J., Anselmi, P.A., Meini, M.R., 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.
- Moat, A.G., Foster, J.W., Spector, M.P. 2002 . *Microbial Physiology*, 4th ed. Wiley - Less, Inc., New York. 1: 1-28.
- Mojsov, K. 2012. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering*, 2(10): 583-609.
- Mukherjee A.K., Borah, M., Rai, S.K. 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: 149-156.
- Naik, B., Goyal, S.K., Tripathi, A.D., Kumar, V. 2019. Screening of agro-industrial waste and physical factors for the optimum production of pullulanase in solid-state fermentation from endophytic *Aspergillus* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22: 101423.

- Nguyen, K.A., Suwannarach, J.K.N., Penkhrue, W., Lumyong, S. 2019. Optimization of high endoglucanase yields production from polypore fungus *Microporus xanthopus* strain KA038 under solid-state fermentation using green tea waste. *Biology Open*, 8: bio047183.
- Noreen, R., Asghar, M., Asad, M.J., Adedayo, O. 2002. Production of α -Amylase from banana peel by *Bacillus subtilis*. *Pakistan Journal of Agricultural Science*, 39(4): 312-317.
- Okonko, I.O., Adeola, O.T., Aloysius, F.E., Damilola, A.O., Adewale, O.A. 2009. Utilization of food wastes for sustainable development. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(4): 263-286.
- 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.
- Praveen, K.G., Suneetha, V. 2014. Natural, Culinary Fruit Peels as a Potential substrate for Pectinolytic Enzyme. *International Journal of Drug Development and Research*, 6(3): 109-118.
- Rahman, R.N.Z.A., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A.B. 2005. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresource Technology*, 96(4): 429-436.
- Rai, P., Ashutosh Pandey, A., Pandey, A. 2019. Optimization of sugar release from banana peel powder waste (BPPW) using box-behken design (BBD): BPPW to biohydrogen conversion. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(47): 25505-25513.
- Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Das, K.S., Gupta, S. 2014. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation. *Biochemistry Research International*, Article ID 568141: 1-5.
- Reyes, I., Cruz-Sosa, F., Hernandez-Jaimes, C., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J. 2017. Effects of solid-state fermentation (*Aspergillus oryzae* var. *oryzae*) on the physicochemical properties of corn starch. *Starch*, 69(7-8): 1600369.
- Rodríguez-Couto, S. 2008. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*, 3(7): 859-870.
- Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S. 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5:1.
- Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.P., Takors, R. 2013. *Industrielle Mikrobiologie*. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Sahnoun, M., Kriaa, M., Elgharbi, F., Ayadi, D.Z., 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.
- Santa-Maria, M., Ruiz-Colorado, A.A., Cruz, G., Jeoh, T. 2013. Assessing the feasibility of biofuel production from lignocellulosic banana waste in rural agricultural communities in Peru and Colombia. *Bioenergy Research*, 6(3):1000-1011.
- Sharma, P., Mishra, A.A. 2015. Biofuel production from banana peel by using micro wave. *International Journal of Science, Engineering and Technology*, 3(4): 1015-1018.
- Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., Bajaj, B.K. 2019. Thermostable enzymes for industrial biotechnology, *Advances in Enzyme Technology*, 469-495.
- Silpa, D., Rao, P.B., Kumar, G.K. 2018. Production and optimization of alpha amylases using banana waste by *Bacillus licheniformis* DS3 under solid state fermentation. *International Journal of Research in BioSciences*. 7(3): 18-25.
- 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.
- TÜİK 2019. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas> (Erişim: Şubat 2019)
- Uygun, M.A., Tanyildizi, M.Ş. 2018. Determination of Effective Parameters for Alpha-Amylase Production in a Modified Rotating Drum Bioreactor. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43: 3381-3391.
- Vivekanand, V., Dwivedi, P., Pareek, N., Singh, R.P. 2011. Banana Peel: A Potential Substrate for Laccase Production by *Aspergillus fumigatus* VkJ2.4.5 in Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165: 204-220.

Zhang, Y., Wang, L., Chen, H., 2017. Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, 165: 65-73.

Zhang, C., Li, J., Liu, C., Liu, X., Wang, J., Li, S., Fan, G., Zhang, L. 2013. Alkaline pretreatment

for enhancement of biogas production from banana stem and swine manure by anaerobic codigestion. *Bioresource Technology*, 149: 353-358.