



***Namık Kemal Üniversitesi***  
***Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi***  
***Journal of Tekirdag Agricultural Faculty***

*An International Journal of all Subjects of Agriculture*

**Sahibi / Owner**

**Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Adına**  
On Behalf of Namık Kemal University Agricultural Faculty

**Prof.Dr. Ahmet İSTANBULLUOĞLU**  
Dekan / Dean

**Editörler Kurulu / Editorial Board**

**Başkan / Editor in Chief**

**Prof.Dr. Türkan AKTAŞ**  
Ziraat Fakültesi Biyosistem Mühendisliği Bölümü  
Department Biosystem Engineering, Agricultural Faculty  
taktas@nku.edu.tr

**Üyeler / Members**

<b>Prof.Dr. M. İhsan SOYSAL</b>	Zootekni / Animal Science
<b>Prof.Dr. Servet VARIŞ</b>	Bahçe Bitkileri / Horticulture
<b>Prof.Dr. Temel GENÇTAN</b>	Tarla Bitkileri / Field Crops
<b>Prof.Dr. Sezen ARAT</b>	Tarımsal Biyoteknoloji / Agricultural Biotechnology
<b>Prof.Dr. Aydın ADİLOĞLU</b>	Toprak Bilimi ve Bitki Besleme / Soil Science and Plant Nutrition
<b>Prof.Dr. Fatih KONUKCU</b>	Biyosistem Mühendisliği / Biosystem Engineering
<b>Doç.Dr. İlker H. ÇELEN</b>	Biyosistem Mühendisliği / Biosystem Engineering
<b>Doç.Dr. Ömer AZABAĞAOĞLU</b>	Tarım Ekonomisi / Agricultural Economics
<b>Doç.Dr. Ümit GEÇGEL</b>	Gıda Mühendisliği / Food Engineering
<b>Yrd.Doç.Dr. Harun HURMA</b>	Tarım Ekonomisi / Agricultural Economics
<b>Yrd.Doç.Dr. Özgür SAĞLAM</b>	Bitki Koruma / Plant Protection
<b>Araş.Gör. Eray ÖNLER</b>	Biyosistem Mühendisliği / Biosystem Engineering

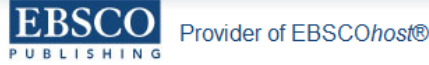
**İndeksler / Indexing and abstracting**



CABI tarafından full-text olarak indekslenmektedir / Included in CABI



DOAJ tarafından full-text olarak indekslenmektedir / Included in DOAJ



EBSCO tarafından full-text olarak indekslenmektedir / Included in EBSCO



FAO AGRIS Veri Tabanında İndekslenmektedir / Indexed by FAO AGRIS Database



INDEX COPERNICUS tarafından full-text olarak indekslenmektedir / Included in INDEX COPERNICUS



TUBİTAK-ULAKBİM Tarım, Veteriner ve Biyoloji Bilimleri Veri Tabanı (TVBBVT) Tarafından taranmaktadır / Indexed by TUBİTAK-ULAKBİM Agriculture, Veterinary and Biological Sciences Database

**Yazışma Adresi / Corresponding Address**

Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi NKÜ Ziraat Fakültesi 59030 TEKİRDAĞ

E-mail: ziraatdergi@nku.edu.tr  
Web adresi: http://jotaf.nku.edu.tr  
Tel: +90 282 250 20 00

ISSN: 1302–7050

## **Danışmanlar Kurulu / Advisory Board**

### **Bahçe Bitkileri / Horticulture**

- Prof. Dr. Ayşe GÜL** Ege Üniv., Ziraat Fak., İzmir  
**Prof. Dr. İsmail GÜVENÇ** Kilis 7 Aralık Üniv., Ziraat Fak., Kilis  
**Prof. Dr. Zeki KARA** Selçuk Üniv., Ziraat Fak., Konya  
**Prof. Dr. Jim HANCOCK** Michigan State University, USA

### **Bitki Koruma / Plant Protection**

- Prof. Dr. Cem ÖZKAN** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Ankara  
**Prof. Dr. Yeşim AYSAN** Çukurova Üniv., Ziraat Fak., Adana  
**Prof. Dr. Ivanka LECHAVA** Agricultural University, Plovdiv-Bulgaria  
**Dr. Emil POCSAI** Plant Protection Soil Conser. Service, Velenca-Hungary

### **Biyosistem Mühendisliği / Biosystem Engineering**

- Prof. Bryan M. JENKINS** U.C. Davis, USA  
**Prof. Hristo I. BELOEV** University of Ruse, Bulgaria  
**Prof. Dr. Simon BLACKMORE** The Royal Vet.&Agr. Univ. Denmark  
**Prof. Dr. Hamdi BİLGİN** Ege Üniv.Ziraat Fak. İzmir  
**Prof. Dr. Ali İhsan ACAR** Ankara Üniv. Ziraat Fak. Ankara  
**Prof. Dr. Ömer ANAPALI** Atatürk Üniv., Ziraat Fak. Erzurum  
**Prof. Dr. Christos BABAJIMOPOULOS** Aristotle Univ. Greece  
**Dr. Arie NADLER** Ministry Agr. ARO, Israel

### **Gıda Mühendisliği / Food Engineering**

- Prof.Dr.Evgenia BEZIRTOGLOU** Democritus University of Thrace/Greece  
**Assoc.Prof.Dr.Nermina SPAHO** University of Sarajevo/Bosnia and Herzegovina  
**Prof. Dr. Kadir HALKMAN** Ankara Üniv., Mühendislik Fak., Ankara  
**Prof. Dr. Atilla YETİŞEMİYEN** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Ankara

### **Tarımsal Biyoteknoloji / Agricultural Biotechnology**

- Prof. Dr.İskender TIRYAKI** Çanakkale Üniv., Ziraat Fak., Çanakkale  
**Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Ankara  
**Prof.Dr. Mehmet KURAN** Ondokuz Mayıs Üniv., Ziraat Fak., Samsun  
**Doç.Dr.Tuğrul GİRAY** University of Puerto Rico, USA  
**Doç.Dr.Kemal KARABAĞ** Akdeniz Üniv., Ziraat Fak., Antalya  
**Doç. Dr. İsmail AKYOL** Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Ziraat Fak., Kahramanmaraş

### **Tarla Bitkileri / Field Crops**

- Prof. Dr. Esvet AÇIKGÖZ** Uludağ Üniv., Ziraat Fak., Bursa  
**Prof. Dr. Özer KOLSARICI** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Adana  
**Dr. Nurettin TAHSİN** Agriculture University, Plovdiv-Bulgaria  
**Prof. Dr. Murat ÖZGEN** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Ankara  
**Doç. Dr. Christina YANCHEVA** Agriculture University, Plovdiv-Bulgaria

### **Tarım Ekonomisi / Agricultural Economics**

- Prof. Dr. Faruk EMEKSİZ** Çukurova Üniv., Ziraat Fak., Adana  
**Prof. Dr. Hasan VURAL** Uludağ Üniv., Ziraat Fak., Bursa  
**Prof. Dr. Gamze SANER** Ege Üniv., Ziraat Fak., İzmir  
**Prof. Dr. Alberto POMPO** El Colegio de la Frontera Norte, Meksika  
**Prof. Dr. Şule IŞIN** Ege Üniv., Ziraat Fak., İzmir

### **Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü / Soil Sciences And Plant Nutrition**

- Prof. Dr. M. Rüştü KARAMAN** Yüksek İhtisas Üniv., Ankara  
**Prof. Dr. Metin TURAN** Yeditepe Üniv., Müh. ve Mimarlık Fak. İstanbul  
**Prof. Dr. Aydın GÜNEŞ** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Ankara  
**Prof. Dr. Hayriye İBRİKÇİ** Çukurova Üniv., Ziraat Fak., Adana  
**Doç. Dr. Josef GORRES** The University of Vermont, USA  
**Doç. Dr. Pasquale STEDUTO** FAO Water Division Italy

### **Zootekni / Animal Science**

- Prof. Dr. Andreas GEORGOIDUS** Aristotle Univ., Greece  
**Prof. Dr. Ignacy MISZTAL** Breeding and Genetics Universit of Georgia, USA  
**Prof. Dr. Kristaq KUME** Center for Agricultural Technology Transfer, Albania  
**Dr. Brian KINGHORN** The Ins. of Genetics and Bioinf. Univ. of New England, Australia  
**Prof. Dr. Ivan STANKOV** Trakia University, Depart. of Animal Science, Bulgaria  
**Prof. Dr. Muhlis KOCA** Atatürk Üniv., Ziraat Fak., Erzurum  
**Prof. Dr. Gürsel DELLAL** Ankara Üniv., Ziraat Fak., Ankara  
**Prof. Dr. Naci TÜZEMEN** Kastamonu Üniv., Mühendislik Mimarlık Fak., Kastamonu  
**Prof. Dr. Zlatko JANJEČIĆ** University of Zagreb, Agriculture Faculty, Hırvatistan  
**Prof. Dr. Horia GROSU** Univ. of Agricultural Sciences and Vet. Medicine Bucharest,Romanya

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

<b>F. Kurtulmuş, S. Öztüfekçi, S. Şehirli</b> <b>Armut Meyvesinde Diplocarpon Mespili Lezyonlarının Görüntü İşlemeyle Analizi</b> Analyzing Diplocarpon Mespili Lesions On Pear Using Image Processing .....	1-11
<b>H. M. Velioglu, G. Çelikyurt</b> <b>Farklı Tarım Artığı Ürünlerden Fungal Ve Bakteriyel A-Amilaz Enzimi Üretiminin Optimizasyonu</b> Optimization Of Fungal And Bacterial A-Amylase Production From Different Agricultural By-Products.....	12-24
<b>G. Çınar, F. Işın, G. Armağan</b> <b>Türkiye’de Tarımsal Ürün İhracatı Yapan Firmaların Risk Tercihi Açısından İncelenmesi</b> Analysis Of The Firms That Exported Agricultural Product In Terms Of Risk Preference In Turkey .....	25-33
<b>B. Firdin</b> <b>Pamuk Yaprak Kurdu Spodoptera Littoralis (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvalarının Gelişim Evrelerinde Protein, Glikojen Ve Su Oranındaki Değişim</b> Changes In The Rate Of Protein, Glycogen And Water Of Cotton Leafworm Spodoptera Littoralis (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) During The Larval Development Stages .....	34-39
<b>M. İ. Soysal, T. Bilgen, A.Perucatti, L. Iannuzzi</b> <b>GTG Banded Karyotype Of Anatolian River Buffalo (Bubalus Bubalis, 2n=50)</b> Anadolu Mandası (Bubalus bubalis, 2n=50) GTG Bantlı Karyotipi.....	40-43
<b>N. Öner, İ. Başer, F. Öner, Ö. Sarıbaş</b> <b>Buğdayda Yaprak Analiziyle Eksikliği Belirlenen Elementlerin Yapraktan Gübrelemeyle Verim Ve Kalite Üzerine Etkileri</b> Effects On Yield And Quality Of Foliar Application Of Wheat With The Determination Of Deficient Nutrients Leaf Analyses .....	44-51
<b>T. Cengiz</b> <b>Konut Satın Alımında Kentsel Açık-Yeşil Alanlar Ve Sosyal Donatı Elemanlarının İncelenmesi: Çanakkale Kent Merkezi Örneği</b> Influence Of Urban Green Spaces And Social Reinforcement Elements In Home Purchasing: The Case Of Çanakkale City, Turkey.....	52-60
<b>M. Gür, C. Şen</b> <b>Trakya Bölgesinde Doğal Bir Merada Tespit Edilen Baklagiller Ve Buğdaygiller Familyalarına Ait Bitkilerin Bazı Özellikleri</b> Some Properties Of The Vegetation On Grazing, Protected And Abandoned Natural Rangelands .....	61-69
<b>S. Erdoğan Bayram, Ö. L. Elmacı, B. Miran</b> <b>An Evaluation On Strawberry Production In Terms Of Plant Nutrition And Farmer Applications: Evidences From Gediz River Basin, Turkey</b> Bitki Besleme Ve Çiftçi Uygulamaları Açısından Çilek Üretimi Üzerine Bir Değerlendirme: Gediz Havzası Örneği, Türkiye .....	70-79
<b>B. Kaptan</b> <b>Prevalence Of Listeria Spp And L. Monocytogenes İn Home Made Pottery Cheese</b> Ev Yapımı Küp Peynirinde Listeria Spp Ve L. Monocytogenes Yaygınlığı.....	80-87
<b>N. Pouyafard, E. Akkuzu, Ü. Kaya</b> <b>Kıyı Ege Koşullarında Yetiştirilen Ayvalık Zeytin Fidanlarında Su Stresine Bağlı Bazı Fizyolojik Ve Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi</b> Determination Of Some Physiologic And Morphologic Changes Of Young Olive (Cv Ayvalık) Trees Under Different Water Stress İn Coastal Part Of Aegean Region .....	88-98
<b>İ. H. Çelen</b> <b>Hava Emişli Yelpeze Hüzmeli Püskürme Memelerinde Püskürtme Dağılımının İlerleme Hızına Bağlı Olarak Değişimi</b> The Change Of The Spray Distribution On Air Inlet Fan Spray Nozzles Depending On Different Forward Speeds .....	99-106
<b>M. E. Gündoğmuş, T. Uyar</b> <b>Kestane Bahçelerinde Gelir Yöntemine Göre Değerleme: Aydın İli Nazilli İlçesi Örneği</b> Land Valuation Of Chestnut Orchards By Income Capitalization Method: A Case Study İn Nazilli District Of Aydın Province.....	107-117

## Farklı Tarım Artığı Ürünlerden Fungal ve Bakteriye $\alpha$ -Amilaz Enzimi Üretiminin Optimizasyonu\*

H. M. Velioğlu<sup>1,\*</sup>

G. Çelikyurt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

<sup>2</sup>Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

Sorumlu yazar: E-posta: mvelioğlu@nku.edu.tr

Bu çalışmada bakteriyel ve fungal alfa amilaz üretimi cevap yüzeyi yöntemi ile modellenmiştir. Üretimde besin bileşeni olarak süne zararı görmüş buğday ve kırık pirinç kullanılmıştır. Elde edilen model denklemlerine ait  $R^2$  değerleri bakteriyel enzimin süneli buğday ve kırık pirinçten üretildiği çalışmalar için sırasıyla 0,719 ve 0,621, fungal enzimin süneli buğday ve kırık pirinçten üretildiği çalışmalar için sırasıyla 0,965 ve 0,922 olarak belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ve optimizasyon verileri neticesinde *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* ile süneli buğdaydan  $\alpha$ -amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesinin 33,27°C, 77 saat ve 0,39 g/100 ml süneli buğday varlığında elde edileceği model tarafından tahmin edilmiştir. Aynı bakteri kullanılarak ve substrat olarak kırık pirinç varlığında en yüksek enzim aktivitesinin ise bileşen miktarı ve sıcaklık değerleri süneli buğday kullanılan deneme parametreleri ile aynı olmak kaydıyla 86. saatte en yüksek değere ulaşacağı model tarafından tahmin edilmiştir. *Aspergillus foetidus* kullanılarak süneli buğdaydan ve kırık pirinçten  $\alpha$ -amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesine sıcaklığın 33,27°C, ortama ilave edilen süneli buğday veya kırık pirinç oranının 6,11 g/100ml olduğu ve fermentasyonunu 105. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:**  $\alpha$ -amilaz, optimizasyon, cevap yüzeyi yöntemi.

### Optimization of Fungal and Bacterial $\alpha$ -Amylase Production from Different Agricultural By-products

In the present study, the production of bacterial and fungal  $\alpha$ -amylase was modelled using response surface methodology. The substrates used in the study were suni-bug damaged wheat and broken rice. The final model equations have the  $R^2$  values as 0.719 and 0.622 for bacterial  $\alpha$ -amylase from wheat and rice, and, 0.965 and 0.922 for fungal  $\alpha$ -amylase from wheat and rice, respectively. According to the results of the study and the data obtained from the optimization the highest enzyme activity reached from the experiments with *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* using suni-bug damaged wheat at 33.27°C, 0.39 g/100 ml substrate and at 77<sup>th</sup> h. On the other side the highest enzymatic activity with same bacteria but different substrate, broken rice, was observed for the parameters as follows; 86<sup>th</sup> h, 33.27°C and 0.39 g/100 ml substrate. The results for fungal enzyme from *Aspergillus foetidus* showed that the fermentation parameters were same for both wheat and rice. The independent variables, temperature, time and substrate quantity, 33.27°C, 105<sup>th</sup> h and 6.11 g/100 ml substrate resulted the highest enzymatic activity.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, optimization, response surface methodology.

\*Bu çalışma NKUBAP.00.24.AR.13.14 nolu proje ile Namık Kemal Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

#### Giriş

$\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1), hayvansal, bitkisel veya mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilebilen ve ticari olarak oldukça değerli kabul edilen bir enzimdir.  $\alpha$ -Amilaz, bir endoenzimdir ve nişasta molekülünün iç kısımlarındaki  $\alpha$ -1,4-glukozidik bağlarını (hem amiloz hem de amilopektindeki) gelişi güzel olarak hidrolize etmektedir.  $\alpha$ -amilazlar viskozitede azalmalara neden olduğu için "sıvılaştırıcı enzim" adıyla da anılabilmektedir.

Hidroliz sonunda oluşan temel ürünler dekstrinlerdir. Bu nedenle,  $\alpha$ -amilaza "dekstrijenik enzim" adı da verilebilmektedir (Saldamlı, 1998). Hayvansal  $\alpha$ -amilaz üretimi için sığır ve domuz pankreası, bitkisel  $\alpha$ -amilaz üretimi için ise arpa maltı en bilinen kaynaklardır (Saldamlı, 1998).  $\alpha$ -amilaz üretme yeteneğindeki küflerden en bilinenleri *Aspergillus ozyae*, *A. niger*, *A. foetidus*, *Rhizomucor miehei* ve *R. pusillus* dur. Bakteriye  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan türlerin en önemlileri ise *Bacillus sp.*, *Endomyces fibuliger*, *Paenibacillus*

*macerans*, *P. polymyxa* ve bazı *Thermoanaerobacter* türleri olarak sıralanabilir (Anon., 2013). Sıvı ortam fermentasyonunda  $\alpha$ -amilaz üretimini etkileyen fizikokimyasal faktörler; ortam bileşimi, pH, fosfat konsantrasyonu, inokulumun yaşı, sıcaklık, havalandırma, karbon kaynağı ve nitrojen kaynağı olarak sıralanabilir (Gupta ve ark., 2003). Yüksek miktarda mikrobiyal  $\alpha$ -amilaz üretimi amacıyla genetik manipulasyonlar ve besin ortamı mühendisliği sıklıkla başvurulan yollar olarak bilinmektedir. Rekombinasyon işlemleri enzim üretimini arttırabilmekte ancak genelde stabil olmamaktadır. Bu sebeple besin ortamının değiştirilmesi ve optimize edilmesi yoluyla enzim üretiminin arttırılması daha uygun bir strateji olarak kabul edilmektedir (Tanyıldızı ve ark., 2005). Bu amaçla birçok tarım artık veya atığı madde ucuz  $\alpha$ -amilaz üretimi için substrat olarak kullanılmıştır. Bajpai ve ark. (1992) tarafından yapılan çalışmada peynir altı suyu bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimi için besin ortamı olarak kullanılmış ve optimum üretim koşulları; peynir altı suyu içerisinde %2 mısır nişastası, %3 mısır gluteni, %0,1  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , %0,1  $KH_2PO_4$ , %0,2 NaCl ve %0,02  $CaCl_2$  olarak belirlenmiştir. Çalışmada ortamın pH değeri 7,0'a ayarlanmış ve 30 saatlik üretim sonucunda en yüksek enzim aktivitesi değerine ulaşılmıştır. Krishnan ve Chandra (1982) tarafından yapılan çalışmada *B. licheniformis* kullanarak bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretiminde besin ortamı olarak farklı yağlı tohum küspelerini kullanmışlardır. Yerfıstığı, hardal, susam, pamuk çekirdeği, keten tohumu ve hindistan cevizi küspelerinin kullanıldığı araştırmada yerfıstığı ve hardal tohumu küspelerinin en yüksek  $\alpha$ -amilaz üretimini sağladığı bildirilmiştir. Benzer şekilde ticari üretimde genel olarak kullanılmayan laktoz, kazein, fruktoz, nişasta işleme atık suyu veya buğday kepeğinin  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılması denemelerinin yapıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur (Gupta ve ark., 2003). Mevcut çalışmada besin ortamı olarak kullanılan kırık pirinç çeltik işleyen fabrikaların bir yan ürünüdür ve genellikle hayvan yemi üretiminde kullanılmaktadır (Hoseneş, 1994). Bu yan ürünün daha değerli bir ürün olan  $\alpha$ -amilaz enzimi üretiminde değerlendirilebilmesi ekonomik anlamda önemli bir fayda yaratacaktır.

Buğdayın olgunlaşma periyodundaki iklim koşullarına bağlı olarak süne (*Eurygaster* spp., *Aelia* spp.) hasarı görmesi, buğdayın verimini, gluten kalitesini, işlenebilme kalitesini etkilemektedir (Duraklı-Velioğlu, 2012). Süne

zararına uğramış buğday unlu mamüller endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmakta ve genelde üretim amacıyla kabul görmemektedir. Hayvan yemi üretiminde veya atık olarak değerlendirilen süne zararı görmüş buğdayın biyoteknolojik yolla  $\alpha$ -amilaz üretiminde değerlendirilebilmesi ülkemiz un ve unlu mamüller sektörü açısından önemli faydalar sağlayacaktır. Biyoteknolojik üretimin optimize edilmesi en uygun koşullarda en yüksek faydanın sağlanması açısından oldukça önemlidir. Birçok mikrobiyal proses gibi  $\alpha$ -amilaz üretimi de farklı araştırmacılar tarafından değişik yöntemler kullanılarak modellenmiştir. Tanyıldızı ve ark. (2005) tarafından besin ortamındaki nişasta, gliserol, maya ekstraktı ve pepton miktarının *Bacillus subtilis*'in  $\alpha$ -amilaz üretimine etkileri cevap yüzeyi yöntemi ile modellenmiştir. Çalışmada  $\alpha$ -amilaz üretimini etkileyen bağımsız değişkenler olarak ortamdaki nişasta 5-15 (g/l), gliserol 5-15 (v/v), maya ekstraktı 1,5-4,5 (g/l) ve pepton 2,5-7,5 (g/l) aralığında test edilmiştir. Dey ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada *Bacillus circulans* tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz miktarının ortamdaki makro besin elementlerinin konsantrasyonu ile nasıl değiştiğini cevap yüzeyi yöntemi ile optimize etmişlerdir. Soya küspesi, maya ekstraktı ve buğday kepeği konsantrasyonlarının bağımsız değişken olarak değerlendirildiği çalışmada, soya küspesi enzim üretimini arttırma yönünde en etkili bileşen olarak belirlenmiş olup, optimum besin ortamı bileşiminde soya küspesi 4,84 g/100ml, maya ekstraktı 1,58 g/100ml ve buğday kepeği 2,84 g/100 ml olarak bildirilmiştir.

Bir diğer çalışmada *Aspergillus niger* kullanarak  $\alpha$ -amilaz üretiminde inkübasyon sıcaklığı, başlangıç substrat nem değeri ve inokulum miktarı bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve üretimin optimizasyonu cevap yüzeyi yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Francis ve ark., 2003). Ticari olarak kesikli kültür yöntemiyle üretilen ve besin ortamı hammaddesi olarak mısır veya patates nişastası kullanılan  $\alpha$ -amilaz yaklaşık 5 günlük bir fermentasyon süresi sonunda saflaştırma aşamasına alınmaktadır. Bu süreçte üretimde kullanılan suşlara bağlı olarak 40°C'ye kadar sıcaklık ve etkili havalandırmanın önemi literatürde belirtilmiştir (Tosun, 2015). Bu çalışmanın amacı, cevap yüzeyi yöntemi kullanarak  $\alpha$ -amilaz üretiminin modellenmesi ve farklı tarım artıklarından enzim üretiminde optimum koşulların belirlenmesidir.

## Materyal ve Yöntem

### Mikroorganizmalar

Bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimi amacıyla *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (DSM no: 1060) ve fungal  $\alpha$ -amilaz üretimi için *Aspergillus foetidus* (DSM no: 734) cinsi mikroorganizmalar vakumla kurutulmuş halde Leibniz Enstitüsü Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (DSMZ) temin edilmiştir. Kuru haldeki *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* örneği 30°C'de Nutrient Broth (NB) içerisinde çözülerek deney tüpleri içerisinde yatık olarak hazırlanmış Nutrient Agar (NA) besiyerine inoküle edilmiş, besiyerleri 30°C etüv içerisinde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Deneysel çalışmalarda inokülasyon amaçlı kullanılacak bakteri sporu çözültisi yatık agarlar içerisine 10 ml peptonlu su ilave edilmesi ve çalkalamalı inkübatörde 30 dk çalkalanması sonucu elde edilmiştir (Milner ve ark., 1996). Kuru haldeki *A. foetidus* örneği peptonlu su içerisinde çözülerek yatık agar şeklinde hazırlanan PDA (Potato Dextrose Agar) üzerine inoküle edilerek 30°C'deki etüvde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Deneysel çalışmalarda inokülasyon amaçlı kullanılacak küf sporu çözültisi PDA üzerindeki 7 günlük küf kolonileri üzerine 10 ml peptonlu su ilave edilmesi ve çalkalamalı inkübatörde 30 dk çalkalanması sonucu elde edilmiştir (Hang ve ark., 1975). Kullanılan inokulantlar en az  $1 \times 10^7$  cfu/ml mikroorganizma içerecek şekilde hazırlanmıştır.

### Besin ortamı bileşimi

Bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimi için hazırlanan sıvı besin ortamı bileşiminde kırık pirinç (1-5 g/100ml aralığında) veya süne zararı görmüş buğday (1-5 g/100ml aralığında) ana bileşen olarak kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda mikro element olarak kullanılan  $\text{CaCl}_2$  tüm denemelerde 0,001 g/100 ml, köpük giderici olarak kullanılan Triton-X 0,01 ml/100ml oranında kullanılmıştır. Ortam pH değeri 7,0 olarak ayarlanmıştır. Fungal  $\alpha$ -amilaz üretimi için hazırlanan sıvı besin ortamı bileşiminde kırık pirinç (1-5 g/100ml aralığında) veya süne zararı görmüş buğday (1-5 g/100ml aralığında) ana bileşen olarak kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda mikro element olarak

kullanılan  $\text{MgSO}_4$  tüm denemelerde 0,05 g/100 ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g/100 ml ve köpük giderici olarak kullanılan Tween 80 0,1 ml/100 ml oranında kullanılmıştır. Ortam pH değeri 5,5 olarak ayarlanmıştır.

### Fermentasyon şartları (süre, sıcaklık, karıştırma hızı)

Herhangi bir proses sonucunda elde edilen çıktı veya çıktılara, girdilerin etkisinin incelenebilmesi için her bir girdinin en alt ve en üst değerleri ve bu değerler arasında alabileceği ara değerlerin tek tek araştırılması gerekmektedir. Prosesin detaylı şekilde incelenebilmesi için tasarlanan deneyler girdilerin olabilecek her seviyesi için fikir vermeli ve herhangi bir deney noktası ihmal edilmeden proses modellenenmelidir. Cevap yüzeyi yöntemi, sonucu birden fazla değişken tarafından etkilenen problemlerin ya da proseslerin modellenmesi, analiz edilmesi ve sonucun optimizasyonu için kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin birleşimi olarak tanımlanmaktadır. Proje kapsamında fungal ve bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimini etkileyeceği öngörülen fermentasyon ortamı sıcaklığı, fermentasyon süresi ve besin ortamında kullanılan tarımsal artık miktarı prosese ait değişkenler olarak değerlendirilmiş ve prosesin çıktısı olarak kabul edilen ortamda oluşan  $\alpha$ -amilazın aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Besin ortamına eklenecek tarımsal artıkların deneme aralığı daha önce belirtildiği gibi %1-5 olarak seçilmiş olup, cevap yüzeyi yönteminin kullanıldığı optimizasyon çalışmalarında fungal ve bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimi için 28-32°C sıcaklık aralığı denemesi yapılmıştır. Fungal  $\alpha$ -amilaz için 5-7 gün, bakteriyel  $\alpha$ -amilaz için 2-4 günlük fermentasyon süre aralıkları denenmiştir. Fungal  $\alpha$ -amilaz üretim denemesinde 200 rpm, bakteriyel  $\alpha$ -amilaz denemesinde 300 rpm çalkalama hızında denemeler planlanmıştır. Cevap yüzeyi yöntemi ile  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan deney planları Çizelge 1-4'de verilmiş olup, çalışma kapsamında üç faktörlü merkezi birleşik tasarım modeli ile 6 tanesi merkez deney noktalarında olmak üzere 20 farklı deneme tamamen rastgele sıralama ile planlanmıştır.

Çizelge 1. Kırık pirinçten bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan deney planı

Table 1. Experimental design for the production of bacterial  $\alpha$ -amylase from broken rice

Deneme	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Kırık pirinç (g/100ml ortam)
13	26,73	72,00	3,25
1	28,00	48,00	1,50
4	28,00	96,00	5,00
8	28,00	96,00	1,50
9	28,00	48,00	5,00
5	30,00	72,00	3,25
6	30,00	72,00	3,25
11	30,00	72,00	3,25
12	30,00	72,00	3,25
19	30,00	72,00	3,25
17	30,00	72,00	0,39
16	30,00	111,19	3,25
18	30,00	72,00	6,11
15	30,00	32,81	3,25
20	30,00	72,00	3,25
2	32,00	96,00	1,50
3	32,00	48,00	5,00
7	32,00	48,00	1,50
10	32,00	96,00	5,00
14	33,27	72,00	3,25

Çizelge 2. Süneli buğdaydan bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan deney planı

Table 2. Experimental design for the production of bacterial  $\alpha$ -amylase from suni-bug damaged wheat

Deneme	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Süneli buğday (g/100ml ortam)
13	26,73	72,00	3,25
1	28,00	48,00	1,50
4	28,00	96,00	5,00
8	28,00	96,00	1,50
9	28,00	48,00	5,00
5	30,00	72,00	3,25
6	30,00	72,00	3,25
11	30,00	72,00	3,25
12	30,00	72,00	3,25
19	30,00	72,00	3,25
17	30,00	72,00	0,39
16	30,00	111,19	3,25
18	30,00	72,00	6,11
15	30,00	32,81	3,25
20	30,00	72,00	3,25
2	32,00	96,00	1,50
3	32,00	48,00	5,00
7	32,00	48,00	1,50
10	32,00	96,00	5,00
14	33,27	72,00	3,25



Çizelge 3. Kırık pirinçten fungal  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan deney planı

Table 3. Experimental design for the production of fungal  $\alpha$ -amylase from broken rice

Deneme	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Süneli buğday (g/100ml ortam)
13	26,73	144,00	3,25
9	28,00	120,00	5,00
8	28,00	168,00	1,50
1	28,00	120,00	1,50
4	28,00	168,00	5,00
12	30,00	144,00	3,25
11	30,00	144,00	3,25
6	30,00	144,00	3,25
5	30,00	144,00	3,25
17	30,00	144,00	0,39
19	30,00	144,00	3,25
20	30,00	144,00	3,25
16	30,00	183,19	3,25
15	30,00	104,81	3,25
18	30,00	144,00	6,11
10	32,00	168,00	5,00
7	32,00	120,00	1,50
3	32,00	120,00	5,00
2	32,00	168,00	1,50
14	33,27	144,00	3,25

Çizelge 4. Süneli buğdaydan fungal  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan deney planı

Table 4. Experimental design for the production of fungal  $\alpha$ -amylase from suni-bug damaged wheat

Deneme	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Süneli buğday (g/100ml ortam)
13	26,73	144,00	3,25
9	28,00	120,00	5,00
8	28,00	168,00	1,50
1	28,00	120,00	1,50
4	28,00	168,00	5,00
12	30,00	144,00	3,25
11	30,00	144,00	3,25
6	30,00	144,00	3,25
5	30,00	144,00	3,25
17	30,00	144,00	0,39
19	30,00	144,00	3,25
20	30,00	144,00	3,25
16	30,00	183,19	3,25
15	30,00	104,81	3,25
18	30,00	144,00	6,11
10	32,00	168,00	5,00
7	32,00	120,00	1,50
3	32,00	120,00	5,00
2	32,00	168,00	1,50
14	33,27	144,00	3,25

## Enzim eldesi

250 ml'lik erlenler içerisinde bileşimi daha önce verilen ve saf su, kırık pirinç veya süneli buğday ve diğer kimyasal bileşenler karıştırılarak hazırlanan besin ortamı 121°C'de 15 dk boyunca otoklavda steril edilerek oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra %2 oranında küf veya bakteri sıvı kültürü ile inoküle edilmiştir.

Çalkalamalı inkübatörde belirlenen süre, sıcaklık ve karıştırma hızında inkübe edilen ortamlar vakit kaybedilmeden enzim içeren sıvı kısmın alınabilmesi için bir sonraki aşamaya alınmıştır. Besin ortamının sıvı kısmında bulunan enzimin aktivite tayinini yapabilmek için erlen içerisindeki tüm besin ortamı soğutmalı santrifüje alınarak 5000 rpm de 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifüjlenmiş ve sıvı kısım alınarak enzim analizine geçilmiştir.

## Amilaz aktivite tayini

Çalışmada kullanılan yöntem nişastanın parçalanması sonucu açığa çıkan indirgen grupların 3,5-dinitrosalisilik asit ile indirgenmesi prensibi ile yapılan yöntemdir. pH 6,9 ve 25°C sıcaklıkta, bir birim çözünür nişastadan bir mikromol indirgen grup (maltoz olarak hesaplanan) ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Analizde kullanılan kimyasallar; 0,02 M sodyum fosfat tampon, 2 N sodyum hidroksit, dinitrosalisilik asit renk maddesi, %1'lik nişasta çözeltisidir. Analizde, 0,5 ml enzim çözeltisi 0,5 ml saf su ile karıştırılarak 25°C de 3-4 dk bekletilmiştir. Ardından 0,5 ml nişasta çözeltisi

eklenen ortam 3 dk inkübasyona bırakılarak 1 ml DNS çözeltisi ilave edilmiştir. Kaynar su banyosunda 5 dk inkübe edilen karışım oda sıcaklığına soğutulmuş, 10 ml saf su eklenerek 540 nm absorbens ölçülmüştür. Sıvı fermentasyon ortamında bulunan enzim miktarı IU/ml SmF olarak hesaplanmıştır.

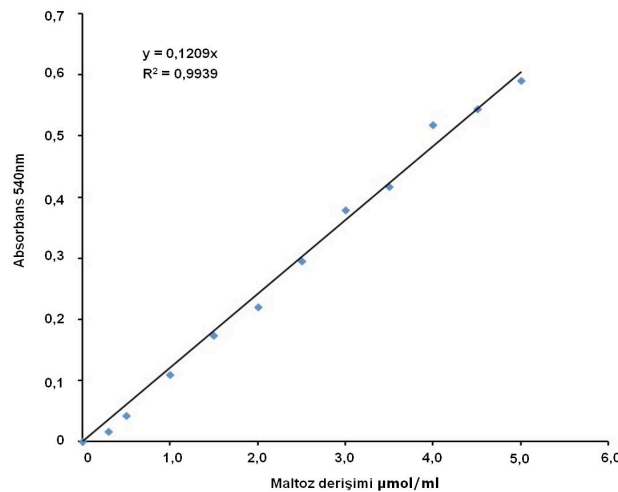
## İstatistik analizler

Deney dizaynının yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde Minitab® 17.1.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Enzim üretimine ait model denklemlerinin determinasyon katsayıları ( $R^2$ ) hesaplanarak istatistiki olarak önemsiz lack of fit ( $P < 0,05$ ) değerine sahip denklemler sonuç kısmında verilmiştir.

## Bulgular ve Tartışma

### Enzim miktarı

Analize ait kalibrasyon grafiği Şekil 1'de verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen grafiğe ait determinasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,9939 olarak bulunmuştur. Beklendiği gibi, ölçüm yapılan örneğin ml'sinde bulunan  $\mu\text{mol}$  cinsinden maltoz miktarı arttıkça gözlenen absorbens değeri de doğrusala yakın şekilde artmaktadır. Bir uluslararası birim (International Unit, IU) amilaz, analiz koşullarında dakikada maltoz cinsinden 1  $\mu\text{mol}$  indirgen şeker açığa çıkaran enzim miktarıdır. Bu miktar sıvı fermentasyon ortamında çalışılıyorsa IU/ml SmF (sıvı fermentasyon ortamı, submerged fermentation) şeklinde ifade edilmektedir (Singh ve Gupta, 2014).



Şekil 1. Maltoz çözeltisine ait kalibrasyon grafiği

Figure 1. Calibration curve for maltose solution

### **Bacillus amloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens ile süneli buğdaydan α-amilaz üretimi**

Süneli buğday kullanarak bakteriden α-amilaz enzimi üretimi için, cevap yüzeyi yönteminde kodlanmamış proses parametreleri ile ulaşılan denklem Eşitlik-1'de (E1) verilmiştir.

$$y = -77,1 + 3,42X_1 + 0,45X_2 + 7,88X_3 - 0,04X_1^2 - 0,002X_2^2 - 0,04X_3^2 - 0,003X_1X_2 - 0,25X_1X_3 - 0,01X_2X_3 \quad (E1)$$

Bu model denklemden elde edilecek cevap yani bağımlı değişken  $y$  ile gösterilmiş olup sıvı fermentasyon ortamının 1 ml'sinde bulunan α-amilazın IU cinsinden aktivitesidir. Denemeye ait bağımsız değişkenler olan sıcaklık (°C), süre (saat) ve besin ortamındaki bileşen miktarı (g/100ml) ise sırasıyla  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  ile gösterilmiştir.

Model denklemin  $R^2$  değeri 0,719 olarak belirlenmiş olup yüzey grafikleri Şekil 2'de sırasıyla verilmiştir. Sürenin sabit tutulduğu grafik (a) incelendiğinde fermentasyon ortamında artan süneli buğday miktarının, beklenilen aksine, enzim aktivitesi üzerinde negatif etkili olduğu görülmektedir. Benzer durum sıcaklığın sabit olduğu grafikte de (c) bulunmaktadır. Mikroorganizmaya sağlanan besin miktarı artarken ortamda ölçülen enzim aktivitesinin azalması, süneli buğdayın belirli bir seviyeden sonra amilaz üretimi üzerine represif etki yaptığını düşündürmektedir. Benzer bulgulara ulaşan İnceoğlu ve ark. (2014) tarafından bildirildiğine göre *Penicillium* türleri ile sıvı ortamda α-amilaz üretimi çalışmasında, fermentasyon ortamına eklenen glukoz miktarı 10mg/ml seviyesini aştığında enzim üretimi baskılanmaktadır.

Deney tasarımı yapılırken kullanılan süre aralığında bir optimum noktaya ulaşıldığı görülmektedir. Grafikler (b ve c) incelendiğinde enzim aktivitesinin fermentasyonun başlangıcından itibaren arttığı, tepe noktaya ulaştıktan sonra geçen zamanla beraber enzim aktivitesinde düşüş meydana geldiği görülmektedir. Süneli buğday kullanarak *Bacillus sp.* tarafından α-amilaz üretiminde en yüksek enzim aktivitesinin 77. saatte gözlemlendiği ve bu andan itibaren ortamdaki enzim aktivitesinin düşmeye başladığı belirlenmiştir. Divakaran ve ark. (2011) tarafından *Bacillus licheniformis* kullanılarak buğday unu da dahil farklı substratlarla yapılan α-amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesi 3. gün sonunda (72

saat) tespit edilmiş olup bizim çalışmamızla uyumlu gözükmektedir.

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini gösteren grafikler (a ve b) incelendiğinde ise deney tasarımının yapıldığı aralıkta bir optimum noktaya ulaşılamamış olmasına karşın ortamdaki süneli buğday oranı sabitken sıcaklığın enzim aktivitesi üzerinde daha az etkili olduğu anlaşılmaktadır. Süre parametresi 72 saat olarak sabit tutulduğunda (a) ise sıcaklık en üst değere (33,26°C) yaklaştıkça enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Proje kapsamında kullanılan *Bacillus amloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (DSM no: 1060) için DSMZ tarafından önerilen inkübasyon sıcaklığı 30°C olmasına karşın deney dizaynının en üst seviyesi olan sıcaklık değerinin dahi enzim aktivitesini maksimize edebilmek için düşük kaldığı görülmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından 30-45°C aralığında yapılan çalışmalar ve tespit edilen optimum sıcaklık noktaları, ileriki çalışmalarda sıcaklık aralığının daha geniş tutulması gerektiğini ortaya koymaktadır (Divakaran ve ark., 2011; Hashemi ve ark., 2013; El-Shisawy ve ark., 2014).

### **Bacillus amloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens ile kırık pirinçten α-amilaz üretimi**

Kırık pirinç kullanarak bakteriden α-amilaz enzimi üretimi için, cevap yüzeyi yönteminde kodlanmamış proses parametreleri ile ulaşılan denklem Eşitlik-2'de (E2) verilmiştir.

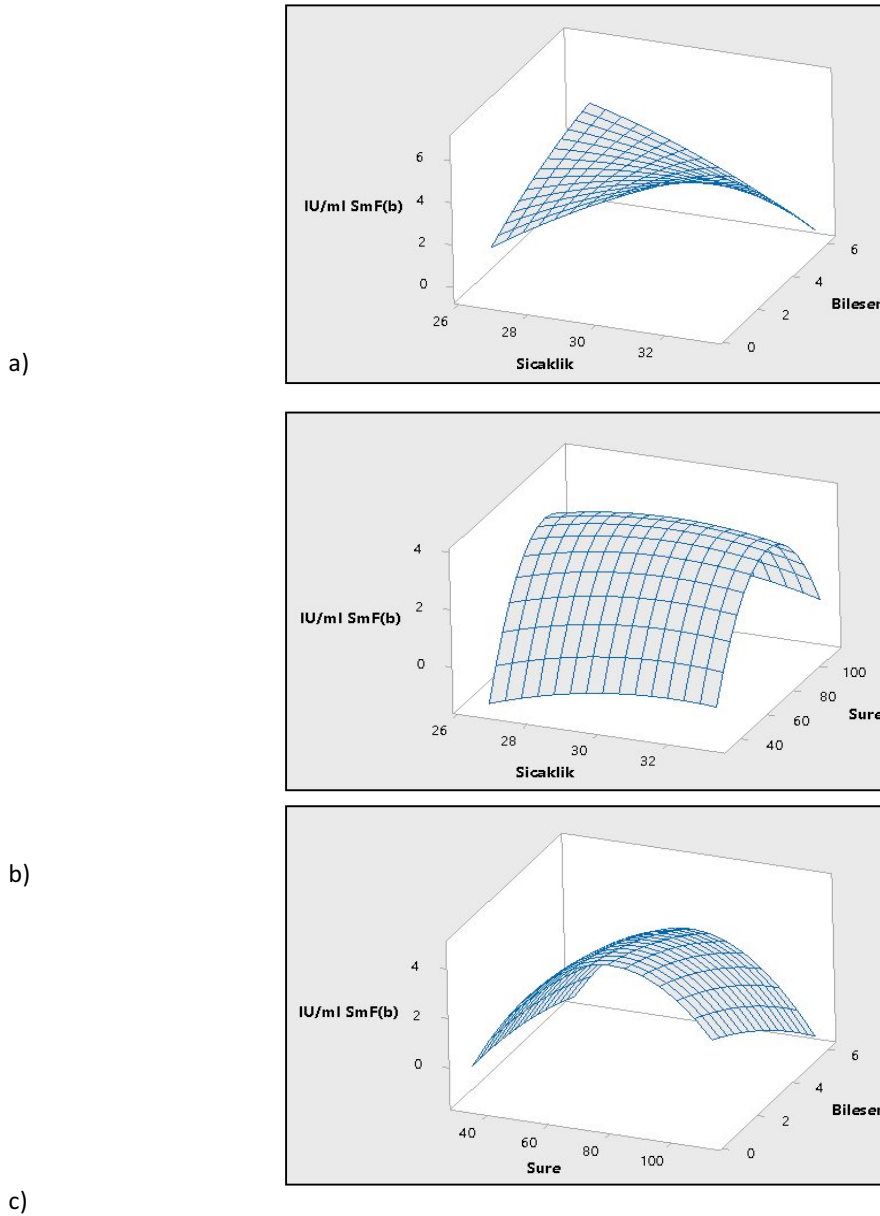
$$y = -142,3 + 8,31X_1 + 0,16X_2 + 7,80X_3 - 0,13X_1^2 - 0,002X_2^2 - 0,06X_3^2 - 0,004X_1X_2 - 0,22X_1X_3 - 0,01X_2X_3 \quad (E2)$$

Model denklemin  $R^2$  değeri 0,621 olarak belirlenmiş olup yüzey grafikleri Şekil 3'de sırasıyla verilmiştir. Elde edilen model denkleminde ait  $R^2$  değeri diğer üç denklemden düşüktür. Bu durum modelin çalışılan parametre aralıklarındaki tahmin başarısını düşürmektedir. Mevcut çalışma sonuçları incelendiğinde süneli buğdaydan enzim üretimi denemelerindeki verilere benzer şekilde çalışılan parametre aralığında besin ortamına ilave edilen bileşen miktarı arttıkça enzim aktivitesinde düşüş belirlenmiştir (grafik a ve c). Bir önceki kısımda yapılan açıklamaya benzer şekilde ortamda bulunan fazla miktardaki kırık pirinç bakterinin enzim üretimini baskıladığı sonucuna ulaşılmaktadır. Grafikler (b ve c) ele alındığında çalışılan parametre aralığında sürenin optimum noktası olarak 86. saat belirlenmiştir. Sıcaklık için ise yine süneli buğday denemesinde olduğu gibi

optimum noktanın deneme aralığı dışında olduğu ve optimum noktanın bu deneme deseni için en yüksek değer olan 33,27°C olduğu tespit edilmiştir.

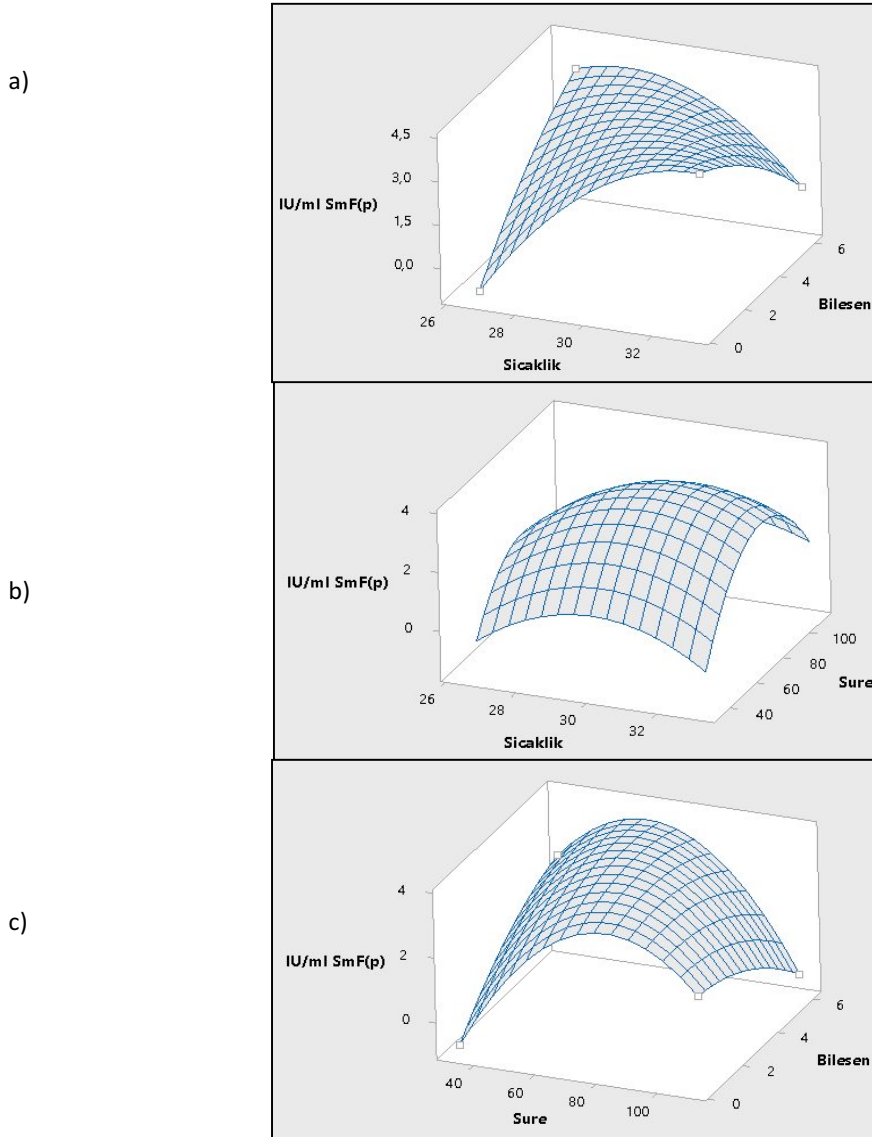
Elde edilen model denklemler incelendiğinde bakteriyel üretime ait  $R^2$  değerlerinin fungal üretim model denklemlerinden düşük olduğu görülmektedir. Bakteriler genel olarak küflere

göre ortam şartlarına daha duyarlı mikroorganizmalar olduğundan, proses parametrelerinde ve fermentasyon şartlarında oluşan küçük değişimlere daha büyük tepkiler verebilmektedir. Denemelerin tamamı kontrollü şartlarda yapılmış olmasına karşın inkübasyon sırasındaki küçük sıcaklık değişimleri modellerin regresyon katsayısını olumsuz etkilemiş olabilir.



Şekil 2. Süneli buğdaydan bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimine ait, (a) sabit süre, (b) sabit bileşen, (c) sabit sıcaklık yüzey grafikleri

Figure 2. Surface diagram for the production of bacterial  $\alpha$ -amylase from suni-bug damaged wheat, (a) constant time, (b) constant component, (c) constant temperature



Şekil 3. Kırık pirinçten bakteriyel  $\alpha$ -amilaz üretimine ait, (a) sabit süre, (b) sabit bileşen, (c) sabit sıcaklık yüzey grafikleri

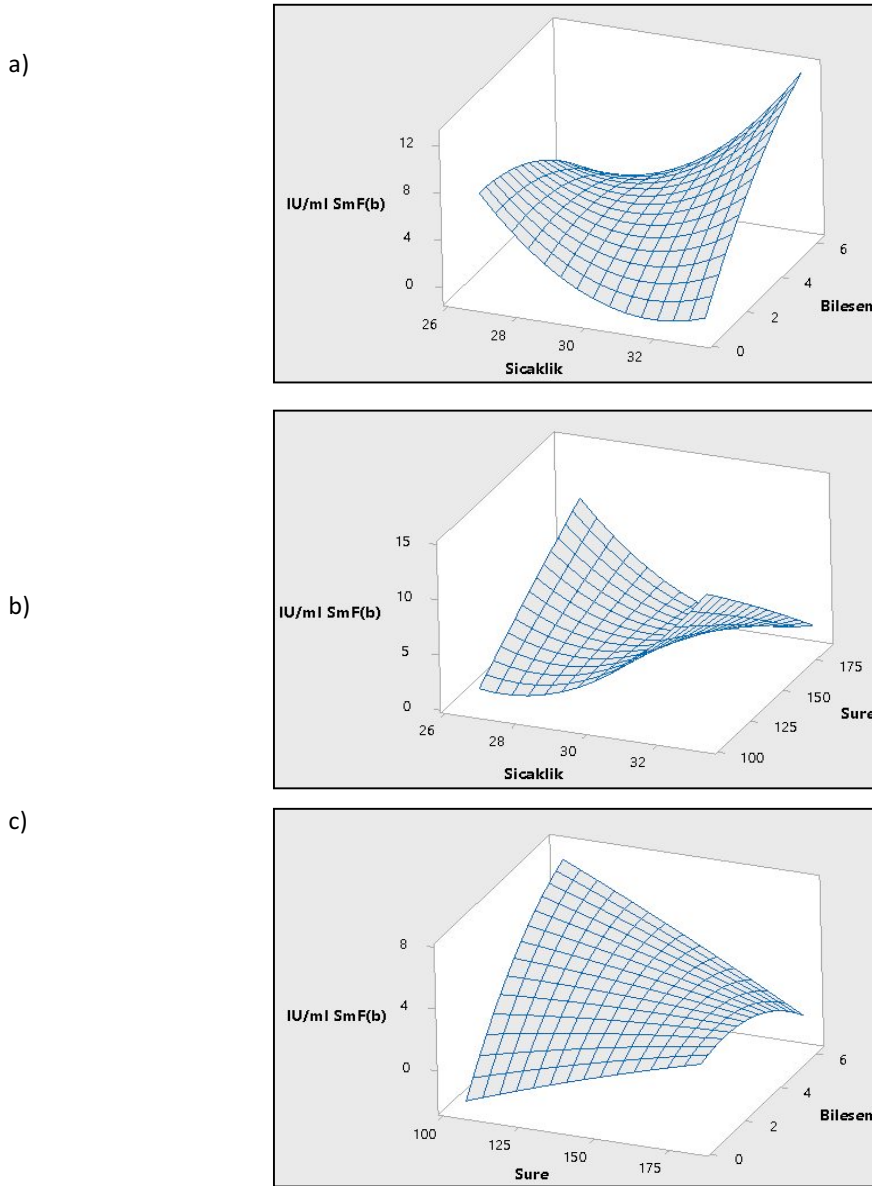
Figure 3. Surface diagram for the production of bacterial  $\alpha$ -amylase from broken rice, (a) constant time, (b) constant component, (c) constant temperature

#### ***Aspergillus foetidus* ile süneli buğdaydan $\alpha$ -amilaz üretimi**

Süneli buğday kullanarak küften  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi için, cevap yüzeyi yönteminde kodlanmamış proses parametreleri ile ulaşılan denklem Eşitlik-3'de (E3) verilmiştir.

$$y = 166,4 - 16,26X_1 + 1,28X_2 - 9,17X_3 + 0,34X_1^2 - 0,17X_3^2 - 0,004X_1X_2 + 0,5X_1X_3 - 0,03X_2X_3 \quad (E3)$$

Model denklemin  $R^2$  değeri 0,965 olarak belirlenmiş olup yüzey grafikleri Şekil 4'de sırasıyla verilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesi değerine sıcaklığın 33,27°C, ortama ilave edilen süneli buğday oranının 6,11 g/100ml olduğu ve fermentasyonunu 105. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. Süneli buğdaydan fungal  $\alpha$ -amilaz üretimine ait, (a) sabit süre, (b) sabit bileşen, (c) sabit sıcaklık yüzey grafikleri

Figure 4. Surface diagram for the production of fungal  $\alpha$ -amylase from suni-bug damaged wheat, (a) constant time, (b) constant component, (c) constant temperature

Kalaiarasi ve Parvatham (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Aspergillus awamori* kullanılarak alfa amilaz üretimi optimizasyonunda en yüksek enzim aktivitesi değerine fermentasyonun 96. saatinde ulaşıldığı bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada *Aspergillus niger* kullanılarak endoglukonaz ve selulaz enzimlerinin fermentasyonla üretimi modellenmiştir. 35°C inkübasyon sıcaklığına gerçekleştirilen çalışmada en yüksek

endoglukonaz enzimi üretimi fermentasyonun 94. saatinde belirlenmiştir (Santos ve ark., 2013). Sonuçlar incelendiğinde üç parametrenin aynı anda optimum olduğu noktanın çalışılan deney noktalarında tespit edilememiş olduğu görülmektedir. Mevcut deneme deseninde cevap yüzeyi yönteminden elde edilen denklemin tahmin başarısı yüksektir ( $R^2$  0,965) ancak daha

ileri optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

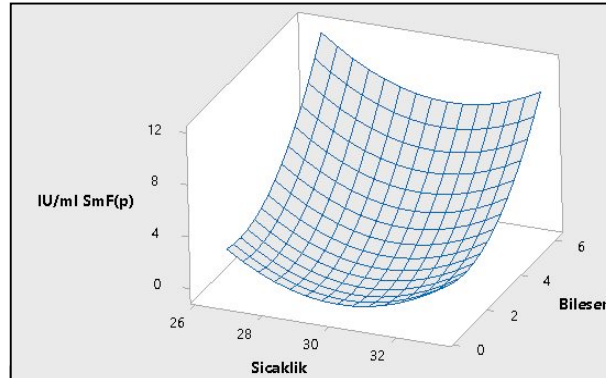
### ***Aspergillus foetidus* ile kırık pirinçten $\alpha$ -amilaz üretimi**

Kırık pirinç kullanarak küften  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi için, cevap yüzeyi yönteminde kodlanmamış proses parametreleri ile ulaşılan denklem Eşitlik-4'de (E4) verilmiştir.

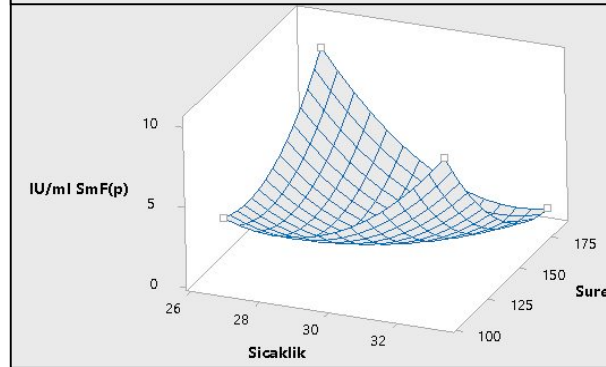
$$y = 143,9 - 11,83X_1 + 0,43X_2 + 3,45X_3 + 0,26X_1^2 + 0,001X_2^2 + 0,37X_3^2 - 0,03X_1X_2 - 0,05X_1X_3 - 0,02X_2X_3$$

(E4)

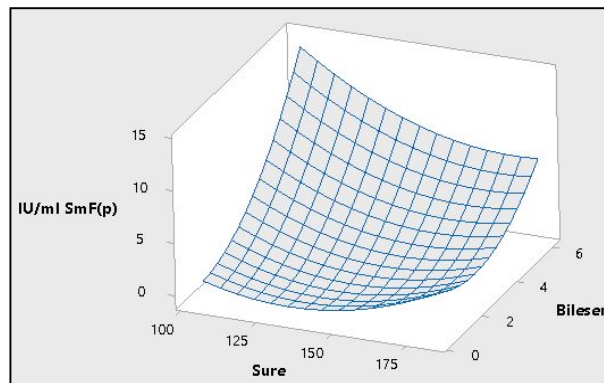
a)



b)



c)



Model denklemin  $R^2$  değeri 0,922 olarak belirlenmiş olup yüzey grafikleri Şekil 5'de sırasıyla verilmiştir. Besin bileşeni olarak kırık pirinç kullanılan çalışmada da en yüksek enzim aktivitesi sonucuna 105. saatte ulaşılmıştır. Sıcaklık ve ortama eklenen bileşen miktarları deneme deseninde öngörülen ve denemesi yapılan aralığın dışında gözükmemektedir. Buna karşın elde edilen model denkleminin tahmin başarısı yüksek olup deneme aralığında optimizasyon başarılı kabul edilebilir.

Şekil 5. Kırık pirinçten fungal  $\alpha$ -amilaz üretimine ait, (a) sabit süre, (b) sabit bileşen, (c) sabit sıcaklık yüzey grafikleri

Figure 5. Surface diagram for the production of fungal  $\alpha$ -amylase from broken rice, (a) constant time, (b) constant component, (c) constant temperature

## Sonuç

Araştırmadan elde edilen sonuçlar ve optimizasyon verileri neticesinde *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* ile süneli buğdaydan  $\alpha$ -amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesinin 33,27°C, 77 saat ve 0,39 g/100 ml süneli buğday varlığında elde edileceği model tarafından tahmin edilmiştir. Aynı bakteri kullanılarak ve substrat olarak kırık pirinç varlığında en yüksek enzim aktivitesinin ise bileşen miktarı ve sıcaklık değerleri süneli buğday kullanılan deneme parametreleri ile aynı olmak kaydıyla 86. saatte en yüksek değerine ulaşacağı model tarafından tahmin edilmiştir. *Aspergillus foetidus* kullanılarak süneli buğdaydan ve kırık pirinçten  $\alpha$ -amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesine sıcaklığın 33,27°C, ortama ilave edilen süneli buğday veya kırık pirinç oranının 6,11 g/100ml olduğu ve fermentasyonunu 105. saatte ulaşıldığı tespit edilmiştir. Genel olarak küf ile yapılan üretimlerde bakteriyeye göre daha yüksek enzim aktivitesi değerine ulaşıldığı görülmüştür. Küf kullanarak süneli buğdaydan elde edilebilen en yüksek deneysel enzim aktivitesi değeri 11,81 IU/ml ortam, kırık pirinçten elde edilebilen en yüksek deneysel enzim aktivitesi değeri 10,67 IU/ml ortam olarak belirlenmiştir. Bu değerler bakteri kullanılan çalışmada süneli buğday ve kırık pirinç için sırasıyla 5,20 ve 4,99 IU/ml ortam olmuştur. Çalışma sonuçlarına göre hem bakteriyel hem de fungal  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılan mikroorganizmaların optimum enzim üretme sıcaklığı 28-32°C aralığının üstündedir. Mevcut araştırma bu aralıktaki optimizasyon için yeterli olmasına karşın, kullanılacak suşların özellikleri de dikkate alınarak, 30-40°C aralığının optimizasyon çalışmalarında denenmesi faydalı olacaktır.

## Kaynaklar

Anonim, 2013. Leibniz Enstitüsü Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonu, <http://dsmz.de>, Erişim: 08.02.2013.

Bajpai, P., R.K. Gera and P.K. Bajpai, 1992. Optimization studies for the production of  $\alpha$ -amylase using cheese whey medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (8), 679-683.

Dey, G., A. Mitra, R. Banerjee and B.R. Maiti, 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 227-231.

Divakaran, D., A. Chandran and R.P. Chandran, 2011. Comparative study on production of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (4), 1397-1404.

Duraklı-Velioğlu, S. 2012. Sıvı besiyerinde *Monascus purpureus*'un kırmızı pigment üretiminin yapay sinir ağları kullanılarak optimizasyonu ve pigmentin stabilitesinin belirlenmesi. Doktora Tezi, NKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.

El-Shistawy, R.M., S.A. Mohamed, A.M. Asiri, A.M. Gomaa, I.H. Ibrahim and H.A. Al-Talhi, 2014. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnology*, 14-29.

Francis, F., A. Sabu, K.M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs and A. Pandey, 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 107-115.

Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami and B. Chauhan, 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38 (11), 1599-1616.

Hashemi, M., S.M. Mousavi, S.H. Razavi and S.A. Shojaosadati, 2013. Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus* sp. KR-8104  $\alpha$ -amylase at different pH and temperatures. *Industrial Crops and Products*, 43, 661-667.

Hoseney, R.C. 1994. Principles of cereal science and technology, American Association of Cereal Chemists, Inc., Second Edition, 159-163, USA.

Inceoglu, F.E., B. Balkan and Z. Yarkin, 2014. Determination of the effects of initial glucose on the production of alpha-amylase from *Penicillium* sp under solid-state and submerged fermentation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28 (1), 96-101.

Kalaiarasi, K. and R. Parvatham, 2015. Optimization of process parameters for alpha-amylase production under solid-state fermentation by *Aspergillus awamori* MTCC 9997. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 74(5), 286-289.

Krishnan, T. and A.K. Chandra, 1982. Effect of oilseed cakes on  $\alpha$ -amylase production by



- Bacillus licheniformis* CUMC305. Applied Environmental Microbiology, 44(2), 270-4.
- Saldamlı, İ. 1998. Enzimler, Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, ss:259-336.
- Santos, T.C., G.A. Filho, A.C. Oliveira, T.J.O. Rocha, F.P.P. Machado, R.C.F. Bonomo, K.I.A. Mota and M. Franco, 2013. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. Food Science and Biotechnology, 22, 1-7.
- Singh, S. and A. Gupta, 2014. Comparative fermentation studies on amylase production by *Aspergillus flavus* TF-8 using Sal (Shorea robusta) deoiled cake as natural substrate: Characterization for potential application in detergency. Industrial Crops and Prodcuts, 57, 158-165.
- Tanyildizi, M.S., D. Özer and M. Elibol, 2005. Optimization of  $\alpha$ -amilaz production by *Bacillus* sp. Using response surface methodology. Process Biochemistry, 40, 2291-2296.
- Tosun, H. 2015. Biyoteknoloji Ders Notları, Celal Bayar Üniversitesi. (Erişim: 09/09/2015). <http://www2.bayar.edu.tr/muhendislik/gida/docs/databank/unite6enzimteknolojisi.pdf>