

**KATI FAZ FERMENTASYONU (KSF) TEKNİĞİ ile *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den
 α -AMİLAZ ÜRETİMİ**

**α -AMYLASE PRODUCTION FROM *Bacillus subtilis*
ATCC 6051 WITH SOLID STATE
FERMENTATION (SSF)**

***Sedat KAYA¹, Yusuf ÖNEN², Fikret UYAR², Nurullah AKCAN³**

¹Muş Alparslan Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarları Koordinatörlüğü, 49100 Muş

²Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 21280 Diyarbakır,

³Siirt Üniversitesi, Erur Meslek Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, 56100 Siirt

ÖZET

Enzimler genelde biyoteknolojide, endüstride, yiyecek, tekstil, kağıt, tıp ve eczacılık gibi alanlarda kullanılmaktadır. Enzimler; bitkisel, hayvansal kaynaklardan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, kültür ortamında kolay çoğalmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Bu çalışmadaki amacımız Katı Faz Fermentasyon yöntemi ile *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den α -amilaz üretimi ile ilgili parametrelerin optimizasyonu ile ilgili çalışmalar yapmaktır. Enzim üretimi için en iyi inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve pH'sı belirlendi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH sırasıyla 50 °C ve 6.5 olarak tespit edilmiştir. Enzim için uygun inokulum (ekim) miktarı % 30, başlangıç nem miktarı % 20 olarak tespit edilmiştir. Enzim için en iyi ekstraksiyon medyumu çeşme suyu olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Katı faz fermentasyonu (SSF), *Bacillus subtilis*, α -Amilaz, Pirinç kabuğu

ABSTRACT

The usages of enzymes are used in biotechnology, industry, food, textil, paper, medicine and pharmaceutical. Enzymes obtained from microorganisms are produced by microorganisms have some advantages when compared with enzymes produced by plants or animals, they have considerably higher catalytic activity, they don't from undesirable by-products, they are more stable and relatively cheap, and they can be obtained much quantity. The main goal of the present study is to realize the optimization parameters of the α -amylase obtained from *Bacillus subtilis* ATCC 6051 by solid phase fermentation method. The best incubation temperature, incubation time and pH were determined for optimum enzyme activity. Enzyme showed optimum activity at 50 °C and ph 6.5. Amount of inoculum and initial moisture content suitable for enzyme production were found to be 30 % and 20 % respectively. The tap water was the best extraction medium.

Key Words: Solid State Fermentation (SSF), *Bacillus subtilis*, α -Amylase, Rice husk

* Sorumlu Yazar/Corresponding author: Sedat KAYA, Muş Alparslan Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarları Koordinatörlüğü, 49100, Muş, Tel: 05077643851, s.kaya@alparslan.edu.tr

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Kıran ve ark. 2006). Nişastanın hidrolizinde merkezi bir rol üstlenen amilazlar; nişastanın glikoz, maltoz, maltotrioz, oligosakarit (alfa-limit dekstrin) ve alfa 1-6 glikozidik bağları gibi ürünlere parçalanmasını sağlayan büyük öneme sahip hidrolitik enzimlerdir (Gubta ve ark. 2003, Taniguchi ve Honnda 2009). α -Amilazlar düz amiloz molekülü ve dallanmış amilopektin molekülündeki α -1,4 glikozidik bağlarını parçalayan ekstraselüler enzimlerdir (Kandra 2003, Vıshnu ve ark. 2006).

Katı faz fermantasyonu (SSF) genel olarak suyun olmadığı veya az olduğu ortamda katı (nemli) materyal üzerinde mikroorganizmaların gelişimi olarak tanımlanır (Pandey ve ark. 2000, Singhanian ve ark. 2009, Hashemi ve ark. 2010). Enzim üretimi geleneksel olarak SmF (Submerged Fermentation) ile yapılmaktadır. Ancak daha sonra Solid State Fermentation (SSF)'in bulunması ile birçok araştırmacı enzim üretimi için SSF'i kullanmaya başlamıştır. Pandey ve ark. (2001) enzim üretim işlemlerinde, SSF'in SmF'ye göre oluşan ürünün daha fazla olması ve daha ekonomik olması yönünden SSF'i kullanmışlardır. Ayrıca SSF'in SmF'e göre daha fazla kullanılması sadece bu avantajlara bağlı olmayıp aynı zamanda SmF'ye uygun olmayan endüstriyel atıkların SSF'te kullanılması ve SmF'de ciddi problem oluşturan katabolik represyon ve proteazlar tarafından proteinlerin yıkımı çoğunlukla SSF'te az oranda veya hiç meydana gelmediğinden kullanım alanı SmF'ye göre gittikçe artmaktadır (Kar ve ark. 2010).

Bugün çevremiz büyük bir değişim içerisindedir ve teknolojik gelişmelerdeki süreklilik bu yarışta katalizör rol oynamaktadır. SSF'te substrat kaynağı olarak ekonomik değeri olmayan tarımsal sanayi artıkları kullanılır. Bu çalışmadaki amacımız Katı Faz Fermantasyon yöntemi

ile *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den α -amilaz üretimi ile ilgili parametrelerin optimizasyon çalışmalarını yapmaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Biyolojik Materyal

Yaptığımız çalışmada ticari olarak Microbiologist inc.'ten temin edilen *Bacillus subtilis* ATCC 6051 biyolojik materyal olarak kullanıldı.

2.2. Katı Besiyeri

8 g Nutrient Broth (Oxoid) ve 16 g agar (Merck), 1000 ml saf suya tamamlanarak çözüldükten sonra otoklava bırakıldı.

2.3. Nutrient Broth (NB) Besiyeri

8 g NB, 1000ml saf suya tamamlanıp çözünme işlemi tamamlandıktan sonra otoklava bırakıldı.

2.4. Luria Broth (LB) Besiyeri

10 g maya özütü, 5 g NaCl (Merck), 5 g tripton, 1000 ml saf suya tamamlanıp çözünmesi sağlandıktan sonra otoklava bırakıldı.

2.5. SSF Besiyeri

Pamuk küspesi, mısır küspesi, mercimek kabuğu, pirinç kabuğu, buğday kepeği ve arpa sapı kurutulularak blendırdan geçirildi. Farklı gözenek büyüklüğündeki eleklerden geçirilerek 500, 1000 ve 1500 μ m, olmak üzere üç farklı parça büyüklüğünde substratlar elde edildi. 1500 μ m büyüklüğünde olanlar alındı. 100 ml'lik erlenmayer içerisinde hacim % 30 olacak şekilde 3 g tartılıp üzerine 10 ml çeşme suyu eklendi. 121°C'de 15 dk otoklavda bekletilerek steril edildi. Soğuduktan sonra 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden % 30 inokulum besi yerine katılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

2.6. Tampon Çözeltiler

30 ml 0.1 M Na_2HPO_4 ve 19 ml 0.1M NaH_2PO_4 hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler bir beher içerisinde karıştırıldıktan sonra hacimleri

saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2.7. Nişastanın Hazırlanması

% 0.5'lik nişasta 0.1M pH 7.0 sodyum fosfat tamponu içinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı.

2.8. Alkalın Çözeltisi

% 4 Na₂CO₃, % 4 Na-K tartarat, % 2 CuSO₄.5H₂O Bir beherde 100 ml için %4 oranında Na₂CO₃ hazırlandı. Ayrı tüplerde hazırlanan Na-K tartarat ve CuSO₄'ten 1'er ml ilave edilerek karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Alkalın çözeltisi protein miktar tayininde kullanıldı.

2.9. Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

Bir beherde 20 g 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS veya DCA), 400 ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandı. Başka bir beherde 32 g NaOH çözeltisi 300 ml saf suya tamamlanarak çözünmesi sağlandı. DNS karıştırıcıda karışmaya devam ederken üzerine yavaş yavaş NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Üzerine 600 g Na-K tartarat azar azar eklendi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı. Bernfeld reaktifi α -amilaz enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı.

2.10. Bakteri Üretimi

NB ve LB sıvı besiyerlerine katı besi yerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 37°C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakıldı. 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakteri kolonilerinden SSF besiyerine ekim yapıldı.

2.11. SSF Besiyerinden Enzim Üretimi

SSF besiyeri 120. saate kadar inkübasyona bırakıldı. 24 saatte bir SSF besi yeri üzerine 10 ml çeşme suyu eklenip 30 dk çalkalandıktan sonra karışım steril gazlı bezle süzüldü. Süzüntü santrifüj tüpüne aktarılarak soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Üst sıvı enzim aktivite tayinlerinde kullanıldı.

2.12. α -Amilaz Enzim Aktivite Tayini

α -Amilaz enzim aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı (Bernfeld 1955). Bu yöntemde göre 150 μ l enzim çözeltisi ve 200 μ l % 0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M, pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda çözünmüş) 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 400 μ l DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) çözeltisi ilave edilerek 5 dk kaynar su banyosunda bekletildi. DNS, sıcakta indirgen şeker uçlarıyla tepkimeye girerek reaksiyonun durmasını ve renk oluşumunu sağlar. Örnekler soğuduktan sonra üzerine 8 ml saf su ilave edilerek seyreltme yapıldı. Daha sonra vorteksten geçirildi ve 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Bir enzim ünitesi deney şartları altında 1 μ mol nişastayı 30 dk'da maltoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

2.13. Protein Miktar Tayini

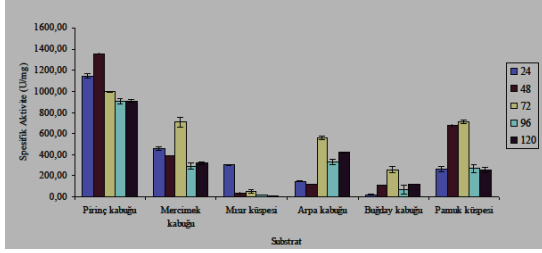
Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry 1951). Tüplere 2.5 ml alkalın çözeltisi konulduktan sonra üzerine 25 μ l enzim ve 225 μ l saf su ilave edildi. Örnekler 15 dk 40 °C'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 250 μ l Folin Reaktifi (FCR) ilave edilerek 30 dk karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen Bovin Serum Albumin'den (BSA) bir seri standart çözelti hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Enzim Üretimi Üzerine Substratın Et-kisi

Çalışmada SSF'te *Bacillus subtilis* ATCC 6051'in üremesi için pamuk küspesi, mısır küspesi, pirinç kabuğu, buğday kepeği, mercimek kabuğu ve arpa sapı gibi çeşitli endüstriyel atıklar kullanılarak bakteri için uygun substrat kaynağı belirlenmeye çalışıldı. Bakterimiz için en iyi substrat kaynağı olarak 48. saatte pirinç

kabuğunda elde edildiğinden çalışmalara pirinç kabuğu kullanılarak devam edildi. Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi en iyi aktivite 1349.5 U/mg değerinde pirinç kabuğunda elde edilmiştir. Kullandığımız katı substratlardan en iyi aktiviteyi pirinç kabuğu vermesinin nedeni besin içeriğinin daha fazla olması ya da kullandığımız *Bacillus subtilis* ATCC 6051'in bu substrata karşı özel bir spesifitesinin olabileceği düşünüldü.



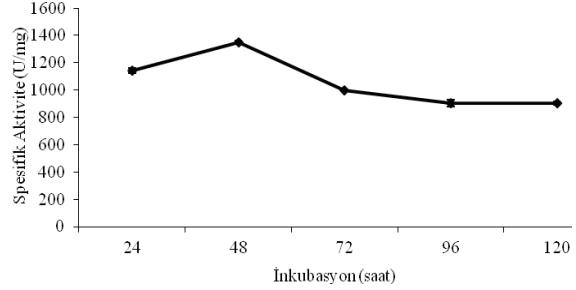
Şekil 3.1. Uygun Substratın Tespiti

Mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu için fermantasyon sistemine uygun katı substratın belirlenmesi oldukça önemlidir. SSF'te yaygın olarak kullanılan ve birçok araştırmacı tarafından uygun olarak belirlenen substratların başında pirinç ve buğday kabuğu darı, mısır, muz kabuğu, manyok, kahve samanı ve patates artıkları gibi tarımsal ürünler başta gelmektedir (Krishna ve ark. 1996).

3.2. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

SSF katı substrat kaynağı olarak pirinç kabuğu seçildikten sonra uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi için 120. saate kadar her 24 saatte bir enzim aktivite tayinine bakıldı. α -Amilaz için en uygun inkübasyon süresi 48. saatte 1349.5 U/mg değerinde maksimum aktivite tespit edildi. Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi 48. saat olarak tespit edilmiş bu saatten sonra ise enzim aktivitesinde düşüş meydana gelmiştir. Gangadharan ve ark. (2006) mikrobiyal büyümenin düşmesinin nedeni ortamda substratın bitmesinden dolayı mikroorganizmanın durgunluk evresine girmesi ve dolayısıyla ortamda oluşan sekonder meta-

bolitlerin oluşturduğu kontaminasyonun aktiviteyi düşürdüğünü ve enzim üretiminin azalttığını bildirmişlerdir.

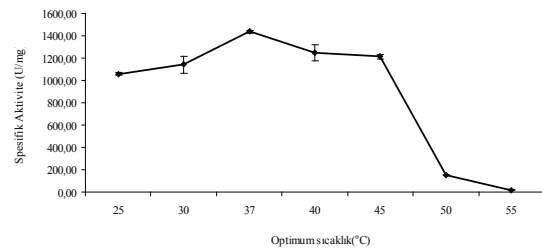


Şekil 3.2. İnkübasyon Saatinin Belirlenmesi

Baysal ve ark. (2008) fermantasyon ortamında meydana gelen diğer bileşiklerin etkileşim sonucu oluşan denatürasyonun, aktiviteyi ve dolayısıyla enzim üretimini düşürdüğünü ifade etmişlerdir. SSF'te inkübasyon süresinin kısalığı hem zamandan tasarruf açısından hem de bakterinin daha az kontamine olması açısından önemlidir.

3.3. Enzim Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

Enzim üretiminde optimum sıcaklığı belirlemek için SSF besiyerleri hazırlandı. Besiyerlerin her birisi 25, 30, 37, 40, 45, 50 ve 55 °C olmak üzere farklı inkübasyon sıcaklıklarına bırakıldı. 48. saatte örneklerin üst sıvısından gerçekleştirilen enzim aktivite tayininde en iyi enzim aktivitesi için optimum inkübasyon sıcaklığının 37°C'de 1436.0 U/mg değerinde maksimum aktivite tespit edildi (Şekil 3.3). Ancak sıcaklığın yükselmesiyle enzim üretiminde düşüş gözlemlendi. 55°C'de herhangi bir aktiviteye rastlanamadı.

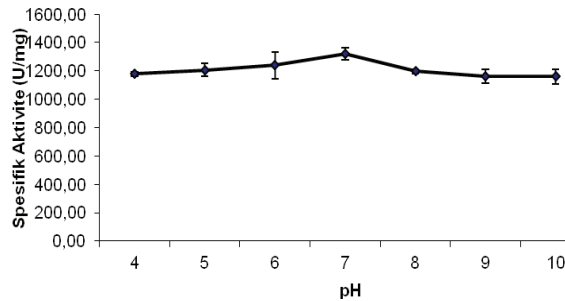


Şekil 3.3. Optimum Sıcaklık Tespiti

Yapılan çalışmalarda kullanılan *Bacillus* tiplerinin optimum büyüme sıcaklıkları 25-37 °C arasında değişmektedir. Kunamneni ve ark. (2005) SSF tekniğiyle termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus*'ten 50 °C'de, Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.*'den α -amilazı 37°C'de maksimum elde ettiklerini bildirmişlerdir.

3.4. Enzimin Optimum Başlangıç pH'sının Belirlenmesi

Enzimin optimum pH'sını belirlemek için pirinç kabuğu içeren SSF besi yerine çeşme suyunun pH'sı 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olmak üzere çeşitli pH'larda ayarlanarak 10 ml ilave edildi. Çalkalayıcıda 48 saat sonra enzim aktivite tayinine bakıldı. Şekil 3.4.'te görüldüğü gibi enzim için maksimum aktivite pH 7'de 1372.7 U/mg olarak elde edildi. Bu yüzden çalışmalarda pH'sı 7.0 çeşme suyu kullanıldı.

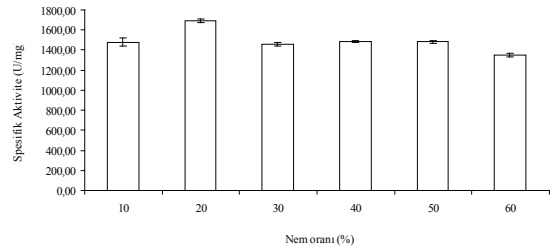


Şekil 3.4. Optimum pH'in Belirlenmesi

Genellikle mantarlar hafif asidik pH'larda iyi ürerken bakteriler ise daha çok nötr pH'larda iyi üreme göstermektedirler (Gupta ve ark. 2003). Rıaz ve ark. (2003) *Bacillus subtilis* GCBUCM-25'ten elde ettikleri α -amilaz'ın optimum başlangıç pH'sını 7.5, Asgher ve ark. (2005) *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri α -amilaz'ın optimum başlangıç pH'sını 8 ve Michelin ve ark. (2010) *Paecilomyces variotii*'den elde ettikleri α -amilazın optimum başlangıç pH'sını 4.0 olarak bulmuşlardır.

3.5. Enzim Üretimi Üzerine Substrat (Nem) Miktarının Belirlenmesi

SSF besiyerine, besi yeri hacminin %10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ı olacak şekilde sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 g pirinç kabuğu ilave edildi. Üzerine 10 ml çeşme suyu eklendikten sonra yapılan aktivite tayini sonucunda enzim için en iyi aktivite 1488.7 U/mg değerinde % 20 nem miktarındaki pirinç kabuğunda elde edildi (Şekil 3.5).

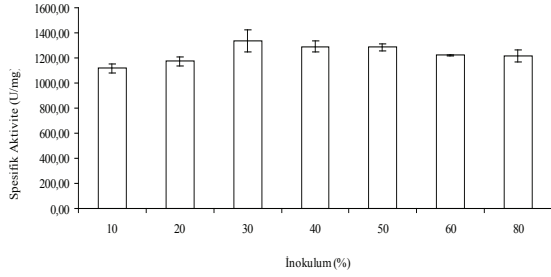


Şekil 3.5. Uygun Substrat Miktarının Belirlenmesi

Baysal ve ark. (2008) SSF'te nem miktarının artması katı substratların porositlerini azalttığından dolayı oksijen transfer işlemini engeller. Nem miktarının az olması ise substratın çözünürlüğünü düşürmesinde ve dolayısıyla substratın istenilen düzeyde kabarmamasında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Baysal ve ark. (2008) SSF tekniğiyle *Bacillus sp.*'den alkalın α -amilaz üretiminde % 30 ve Kar ve ark. (2010) SSF tekniğiyle *Streptomyces erumpens* MTCC 7317'den termostabil α -amilaz üretiminde % 60 nem miktarını kullanmışlardır.

3.6. Enzim Üretimi Üzerine İnokülüm (Ekim) Miktarının Belirlenmesi

SSF besi yerlerine besi yeri hacminin %10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 80 olacak şekilde 600 nm'de 0.6 OD'ye gelen bakterilerden 1000 μ l'den 8000 μ l'ye kadar değişen miktarlarda ekim yapıldıktan sonra örnekler inkübasyona bırakıldı. Enzim aktivitesi sonucunda maksimum aktivite 1333.7 miktarında % 30 tespit edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İnokülüm (Ekim) Miktarının Belirlenmesi

Rıaz ve ark. (2003) *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri α -amilaz enzimi için inokülüm miktarı % 4 olarak belirtmişlerdir. İnokülüm hacmi katı ortamdaki biyomas üretim miktarını belirler. Bakteri büyümesi ve α -amilaz aktivitesi açısından inokülüm miktarı oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Rıaz ve ark. (2003) Pandey ve ark. (2004) inokülüm miktarının fazla olması bakteriyel büyümeyi artırabilir, ancak ortamdaki substrat miktarının çok çabuk tükenmesinden ötürü bakterinin ölüm fazına girebileceğini ve ortamda oluşan kontaminasyondan dolayı enzim aktivite değerinin de düşmesine neden olacağını belirtmişlerdir. Gangadharan ve ark. (2006) *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842'den α -amilaz üretiminde 1 ml ekim ile 52.587 U/gr değerinde maksimum enzim üretmişlerdir. Ekim miktarının artması, fermentasyon ortamındaki sınırlayıcı besinlerden dolayı enzim üretimini negatif yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Modern biyoteknolojinin ışığında şu anda α -amilazlar biyofarmakolojik uygulamalardaki önemi artmaktadır. Bu çalışmada α -amilazların gıda, tekstil, kağıt, deterjan, şeker şuruplarının üretiminde, siklodekstrin

üretiminde, farmakoloji gibi uygulama alanlarındaki üretimleri açısından önemli olan birçok parametrenin SSF kullanılarak optimizasyonları sağlanması amaçlanmıştır. Bu alanlarda kullanılan α -amilazlar dünya enzim piyasasının %30'unu oluşturur.

Amilazlarla ilgili son çalışmalara bakıldığında, enzimin daha düşük sıcaklık değerlerinde aktif olma ve yüksek sıcaklıkta ve stabil pH'larda Ca^{2+} iyonlarından bağımsız aktif olabilen enzimlere yönelik çalışmalar hız kazanmaktadır. Enzimin düşük sıcaklıklarda aktif olması özellikle deterjan sanayisinde etkili olup lekelerin uzaklaştırılmasında yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmadan daha düşük sıcaklıklarda işlevin gerçekleşmesine olanak sağlar. Burada önemli olan daha az elektrik kullanımı ile yüksek oranda tasarrufa gidilmesidir. *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den elde edilen α -amilazın 15-20°C sıcaklıklarında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Endüstriyel alanlarda kullanılan α -amilazlar daha çok mikroorganizmalardan sağlanmaktadır. Çalışmada kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6051'in bu özelliğe sahiptir. Endüstriyel üretimde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajları uzun zamandır savunulmaktadır.

SSF'te katı substrat kaynağı olarak kullanılan endüstriyel atıkların hem maliyet açısından hem de bunların geri dönüşümü yoluyla çevresel zirai kirliliğin önlenmesi açısından oldukça önemli yararlar sağlamaktadır. Bu yüzden SSF çevresel ve gıda mikrobiyolojisi alanında oldukça önem kazanmıştır. Ayrıca bu substratların doğada çok fazla olması ve her zaman kolay bir şekilde karşılanabilmesi çalışmalara engel oluşturabilecek zaman ve para gibi önemli sorunlara çözüm oluşturabilmektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada özellikle çevrede çok fazla kirliliğe neden olan tarımsal atıklarının kullanılması biyolojik açıdan çevre kirliliğine önemli oranlarda katkı sağlanabilmekte ayrıca biyoteknolojide bilimsel çalışma-

larda önemli bir sorun olan maliyete de çözüm sunabilmektedir. Bu çalışmada SSF tekniği ile ticari olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den amilaz üretmek için özellikle Karacadağ yöresine ait pirinç kabuğu substrat kaynağı olarak kullanılması, bu atıkların yüksek oranda geri dönüşümü açısından ekolojik olarak çevre kirliliğinin önüne geçilebilecektir. Elde edilen enzimin sıcaklık ve pH özelliklerinden dolayı kağıt, deterjan, gıda ve tekstil gibi alanlarda kullanılabilirliği düşünülmektedir. Dünya genelinde artan tarımsal atıkların tekrar kullanılmaları ekolojik ve ekonomik olarak oldukça önemlidir. Birçok tarımsal atığın hayvan yemi vb. alanlarda kullanılabilirliği bilinen bir gerçektir. Fakat SSF tekniği kullanılarak bu atıklardan, ticari önemi olan enzimler üretmede kullanılması daha ekonomik ve daha ekolojik yarar sağlanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Baysal, Z., Uyar, F., Doğru M., Alkan, H.. *Production of Extracellular Alkaline α -Amylase by Solid State Fermentation with a Newly Isolated Bacillus sp.* *Biochemistry&Biotechnology*, 38, 184-190, 2008.
- [2] Bernfeld, P.. *Enzymes carbohydrate metabolism, In Methods In Enzymology Academic Press*, 17, 149-158, 1955.
- [3] Gangadharan, D. K., Sivaramkrishnan, S., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. Pandey A: *α -Amylases from microbial sources an Overview on recent developments.* *Food Technol Biotechnol*, 44, 173-184, 2006.
- [4] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami V.K., Chauhan, B. 2003. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective.* *Process Biochem.* 38, 1599-1616, 2006.
- [5] Hashemi, M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., Khajeh, K., Safari.M. *Development of a solid-state fermentation process for production of an alphaamylase with potentially interesting properties* *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 3, 333-337, 2010.
- [6] Hashemi, M., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A. *Mathematical modeling of biomass and amylase production kinetics by Bacillus sp. In solid-state fermentation based on solid dry weight variation* *Biochemical Engineering Journal*, 53, 159-164, 2011.
- [7] Kandra, L. *α -Amylases of medical and industrial importance;* *Journal of Molecular Structure (Teochem)* 666-667 p. 487-498, 2003.
- [8] Kar, S., Data, T.K., Ray, R.C. *Optimization of Thermostable α - Amylase Production by Streptomyces erumpens MTCC 7317 in Solid-state Fermentation Using Cassava Fibrous Residue,* *Brazilian Archives of Biology and Technology an International journal* 53, 301-309, 2010.
- [9] Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları,* *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9, 1, 2006.
- [10] Krishna, C., Chandrasekaran M., *Banana Waste As Substrate For α -Amylase Production By Bacillus Subtilis Cbt 106 Under Solid-State Fermentation ;* *Microbial Biotechnology*, 46: 106-111, 1996.
- [11] Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. *Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus,* *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 168-171, 2005.
- [12] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., *Protein measurement with the folin phenol reagent,* *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- [13] Michelin, M., Silva, T. M., Benassi, V. M., Peixoto-Nogueira, S. M., Moraes, L.A., Leão, J. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. *Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus Paecilomyces variotii,* *Carbohydrate Research* ,345, 2348-2353, 2010.
- [14] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. *Solid state fermentation for the production of industrial enzymes,* *Current Science*, 77, 149-162 *The application of enzymes in industry,* 274-373, 1999.
- [15] Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. *New developments in solid state fermentation: I – Bioprocesses and products.* *Process Biochem* 35, 1153-1169, 2000.

- [16] Pandey A, C.R., Soccol, J.A.R., Leon, Nigam, P. *Solid-state fermentation in biotechnology*. New Delhi: Asiatech Publishers Inc. 2004.
- [17] Pandey, A. Ricardo, C. Larroche, C. *Current Developments in Solid-state Fermentation Springer Science Business Media*, 144, 1–22, 2008.
- [18] Rıaz, N., Haq , H.K., Qadder, M.A. *Characterization of α -Amylase by Bacillus subtilis International Journal of Agriculture & Biology*, 3–249–252, 2003.
- [19] Serin, B. *Katı faz tekniğiyle (solid state fermentation; SSF) tekniğiyle Bacillus circulans'tan α -amilaz ve β -galaktosidaz üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 47s, 2009.
- [20] Shukla, J., Kar, R. *Potato peel as a solid state substrate for thermostable amylase production by thermophilic Bacillus isolates World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 417–422, 2006.
- [21] Singhaniaa, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., Pandey, A. *Recent advances in solid-state fermentation Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18, 2009.
- [22] Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., Soni, S. K. *Production of a thermostable α -amylase from Bacillus PS-7 by solid state fermentation and its synergitic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, Process Biochemistry*, 40, 525-534, 2005.
- [23] Taniguchi, H., Honda, Y. *Ishikawa Prefectural University, Nonoichi, Elsevier Inc. All rights reserved. Defining Statement*, 159-179, 2009.
- [24] Vishnu, C., Navenna, B. J., Altaf, MD., Venkateshwear, M., Reddy, G., *Amylopullulanase A novel enzyme of L. amylophilus GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid, Enzyme Microb Technol*, 38, 545–550, 2006.
- [25] Xu, H., Sun, L., Zhao, D., Zhang, B., Shi, Y., Wu, Y., *Production of α - amylase by Aspergillus oryzae AS-3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as Substrate, Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 529–535, 2008.
- [26] Xu, Y. A., Liu, X.D. *novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated Bacillus sp. YX-1: purification and characterization, Biore-source Technology*, 99, 4315-4320, 2008.