

SÜNMEŞ EKMEKTEN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* SUŞLARININ PEPTİDAZ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ VE PEPTİDAZ ÜRETİMİ İÇİN BAZI KÜLTÜR ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

Fundagül EREM^{1,2}, Muharrem CERTEL^{1,*}

¹ Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

² Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Zonguldak, Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada daha önceki bir çalışmada sünmüş ekmelelerden izole edilen 14 adet *Bacillus* suşunun, 30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C'de peptidaz üretme potansiyellerinin belirlenmesinin ardından, peptidaz aktivitesi en yüksek olan iki suş için en uygun enzim üretim besiyeri bileşimi ve koşullarının bir kerede bir faktör yaklaşımı ile optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla en iyi aktivite değerini sağlayan karbon ve azot kaynağı ile karbon/azot oranı, çalkalama hızı ve ön kültür besiyeri seçimi maliyet unsuru da göz önünde bulundurularak tespit edilmiştir. En iyi karbon ve azot kaynağının sırasıyla glukoz ve maya ekstraktı olduğu saptanmıştır. Ayrıca karbon/azot oranının 1:5, çalkalama hızının 250 rpm olması durumunda ve ön kültür hazırlanması için enzim üretim ortamı ile aynı besiyeri kullanıldığında daha yüksek peptidaz aktivitesi değeri elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Peptidaz, Bir kerede bir faktör yaklaşımı

DETERMINATION OF PEPTIDASE PRODUCTION POTENTIAL OF *BACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM ROPEY BREAD AND OPTIMISATION OF SOME CULTURE CONDITIONS FOR PEPTIDASE PRODUCTION

ABSTRACT

In this study, peptidase production potential of 14 *Bacillus* species isolated from ropey breads in a previous study, was determined at 30, 37, 50 and 55 °C. Then, optimum enzyme production medium composition and conditions for two of the strains which were found to have the highest peptidase activity were optimised with one factor at a time approach. For this purpose, carbon source, nitrogen source, carbon/nitrogen ratio, agitation rate and pre-culture medium which ensure the best peptidase activity were determined by considering the cost-effectiveness. The best carbon and nitrogen source was determined as glucose and yeast extract, respectively. Furthermore, higher peptidase activity was obtained with a carbon/nitrogen ratio of 1:5, agitation rate of 250 rpm and with the utilization of enzyme production medium for preparing pre-culture.

Keywords: *Bacillus*, Peptidase, One factor at a time approach

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğinde olan, protein yapısındaki maddelerdir. Hücredeki işlevlerinin yanı sıra hücre dışında da aktivite gösterebilen enzimler ticari olarak bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir [1].

Mikrobiyal enzimlere karşı artan ilgi bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlerin dünyadaki talebi karşılayamamasının bir sonucudur. Bunun yanı sıra mikrobiyal kökenli enzimlerin diğer kaynaklara tercih edilmelerinin nedeni biyoteknolojik uygulamalar için gerekli olan özelliklerin neredeyse tamamına sahip olmalarıdır. Daha geniş bir ifade ile mikroorganizmaların oldukça dinamik bir

*Sorumlu Yazar: certel@akdeniz.edu.tr

Geliş Tarihi: 01 Kasım 2017 Yayın Tarihi: 17 Ağustos 2018

metabolizmaya sahip olması, mikrobiyal enzimlerin katalitik aktivitelerinin bitkisel ve hayvansal enzimlere göre çok daha yüksek olması, ortama kolay uyum sağlayabilmeleri, derin ya da yüzey kültür fermentasyonu ile kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, besin isteklerinin az olması, bulunabilirliklerinin mevsimsel faktörlere bağlı olmaması, hem çevresel hem de genetik olarak kolaylıkla idare edilebilmeleri, üretimi artırmak için suş geliştirmenin mümkün olması mikrobiyal kökenli enzimlerin tercih edilmesinde önemli rol oynamaktadır [2, 3]. Mikrobiyal enzimler daha güvenilir, stabil ve ucuz olup fazla miktarda üretilebilmekte, aktiviteleri sonucu istenmeyen yan ürün oluşturmamaktadır [4]. Ayrıca ideal olmayan koşullarda depolandıklarında bile aktivitelerinde meydana gelen kayıp, bitkisel ve hayvansal enzimlerde oluşan kayıplardan daha az olmaktadır [5]. Ticari olarak üretilen ve kullanılan enzimlerin çok büyük bir kısmı, mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmekte ve endüstriyel enzim kullanımı tüm dünyada büyük bir hızla artmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin biyoteknolojik süreçler eliyle üretilmeleri ve çeşitli matrikslere bağlanarak daha kararlı kılınmaları, enzimlerin endüstriyel kullanımındaki artışın temel nedenleri arasındadır [3, 5].

Enzim ürettiği bilinen birçok mikroorganizma olmasına rağmen, üretimde ticari olarak kullanılabilen, genel olarak güvenli olduğu kabul edilen (GRAS), toksik ve patojen olmayan çok az sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi büyümeleri ve sporlaşmaları sırasında birçok enzimi sentezleyen, ticari olarak bulunabilen enzimlerin yaklaşık %60'ının karşılandığı *Bacillus* türleridir. Dünya enzim pazarının yaklaşık %20'lik bir kısmını *Bacillus* türlerinden elde edilen termostabil proteolitik enzimler, bunların çoğunluğunu ise deterjan endüstrisinde (%35) kullanılan peptidazlar oluşturmaktadır [6-8].

Enzim sistematüğinde hidrolazlar grubu altında yer alan peptidazlar (EC 3.4), proteinlerin peptid bağlarının hidrolizini katalizleyerek protein ya da büyük polipeptidleri kısa peptitlere ya da serbest amino asitlere dönüştüren bir enzim grubudur [9,10]. Peptidaz, proteaz, proteolitik enzim gibi farklı şekillerde ifade edilebilmelerine karşın Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğı-Terimleme Komitesi (NC-IUBMB), bu enzimlerin peptidaz olarak isimlendirilmesini önermektedir.

Sünme, sıcak ve nemli iklime sahip bölgelerde ekmeklerde görülen, *Bacillus* türü bazı bakterilerin neden olduğu bir bozulmadır. Ekmeğe kullanılan hammadde ve ekipmanlar aracılığı ile bulaşıp pişirme sırasında spor oluşturarak canlılığını sürdüren ve uygun koşullar olduğu zaman da vejetatif hale geçen bakteri, amilaz ve peptidaz salgılayarak ekmek içinde sıvılaşmaya neden olmaktadır [11-13]. Bu durumdan yola çıkarak sünme etmeni *Bacillus* türü bakterilerin peptidaz üretme potansiyelinin yüksek olabileceğı düşünölmüş ve bu çalışmada, söz konusu durumun tespiti ve aktivitesi en yüksek olan suş/suşların peptidaz üretiminin, enzim üretim ortamı bileşimi ve bazı üretim koşullarının ayarlanması suretiyle optimizasyonu amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Araştırma kapsamında kullanılan *Bacillus* suşları, Erem [14] tarafından sünme (rope) hastalığı oluşmuş ekmeklerden izole edilip klasik testler ve API test kitleri ile tanılanmıştır. Ayrıca bu suşların hemolitik (Hbl) ve hemolitik olmayan (Nhe) enterotoksinleri üretmedikleri de tespit edilmiştir (yayınlanmadı). Karşılaştırma sağlaması açısından *B. subtilis* RSK 244 ve *B. subtilis* RSK 246 suşları Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilmiş; *B. subtilis* PY22 ve BK07 suşları ise daha önceki bir çalışmada [15] kullanılmış olup araştırmacı tarafından sağlanmıştır.

2.2. Metod

2.2.1. Optik yoğunluk (OD) ölçümü

Beg ve Gupta [16] tarafından bildirilen besi ortamının modifiye edilmesi ile oluşturulmuş, Tablo 1’de bileşimi verilen fermentasyon ortamından alınan örnek, steril suyla seyreltilmiş ve kör olarak steril besiyeri kullanılarak 600 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans değeri 0.4’ün üzerine çıktığında OD ve hücre yoğunluğu arasındaki linear ilişki ortadan kalktığından, seyreltmeler en fazla 0.4 absorbans verecek şekilde ayarlanmıştır.

2.2.2. Ham enzim çözeltisinin hazırlanması

Fermentasyon ortamından (Tablo 1) alınan örneğin 20000g 4 °C’de 15 dak. santrifüjlenmesi ile elde edilen supernatant, ham enzim çözeltisi olarak analizlerde kullanılmıştır.

2.2.3. *Bacillus* suşlarının peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesi

Peptidaz üretiminin tespiti için *Bacillus* izolatları Nutrient Broth’da 37 °C’de 18 saat olmak üzere 250 rpm çalkalama hızında geliştirilerek ön kültür hazırlanmış, ardından bu ön kültürden temel sıvı besi ortamına (Tablo 1) başlangıç yoğunluğu 0.1 OD olacak şekilde aktarım yapılmıştır. Daha sonra 3 gün farklı sıcaklıklarda fermentasyon yapılmış ve fermentasyon süresince 24 saatte bir örnek alınıp OD ölçümü yapılmış ve ham enzim çözeltisine peptidaz aktivitesi testi uygulanmıştır.

Fermentasyonlar 30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C’de, 50 ml besiyeri içeren 250 ml’lik engelli cam erlenlerde çalkalamalı inkübatörde (Sartorius Certomat IS, Almanya) 250 rpm hız ile yapılmıştır. Daha önce ön denemelerle, bakterilerin bu sıcaklıklarda gelişme gösterip göstermedikleri optik yoğunluk ölçümü ile takip edilmiş ve fermentasyonun gerçekleştirileceği sıcaklık derecelerine buna göre karar verilmiştir.

Tablo 1. *Bacillus* türlerinin peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesi için fermentasyonda kullanılan temel sıvı besi ortamının bileşimi

Glukoz	2 g/L
Maya ekstraktı	10 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	3 g/L
Na ₂ SO ₄	2 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g/L

Fermentasyon denemeleri iki tekerrürlü olarak yapılmış, her bir fermentasyonda her bir bakteri için iki erlen olacak şekilde iki paralelli çalışılmıştır.

2.2.4. Peptidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peptidaz aktivitesinin belirlenmesi için Anson [17] ve Cupp-Enyard’ın [18] metodu modifiye edilmiş; substrat olarak kazein kullanılarak, mevcut peptidaz varlığında kazeinin parçalanması sonucu açığa çıkan serbest tirozinin spektrofotometrede (Biochrom Libra, Cambridge-İngiltere) 660 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Bunun için; bir tanesi kör olmak üzere 3 adet 3 ml’lik test tüpüne %0.65’lik (w/v) kazein çözeltisinden¹ 1 ml aktarılmış ve 37 °C’de 5 dak. bekletilmiştir. Ardından kör dışındaki tüplere farklı miktarlarda (en fazla 200 µl olacak şekilde) ham enzim çözeltisi² ilave edilip vorteks

¹ pH 7.5 olan 50 mM potasyum fosfat tamponu ile taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

² Gerekli olduğu durumlarda ham enzim çözeltisi, pH’sı 7.5 olan 5 mM kalsiyum asetat içeren 10 mM sodyum asetat tamponu ile seyreltilerek kullanılmıştır.

(Vortex Genie 2, ABD) ile karıştırılarak 37 °C’de 10 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için bütün tüplere 1 ml 110 mM triklorasetik asit (TCA)¹ ilave edilmiş, kör dahil olmak üzere bütün tüplere son enzim çözeltisi miktarı 200 µl olacak şekilde ham enzim çözeltisi eklenmiş ve tüpler vorteks ile karıştırılarak 37 °C’de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 10000g 4 °C’de 10 dak. santrifüjlendikten sonra 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 400 µl supernatant paralelli olarak aktarılmış, üzerlerine 1 ml 500 mM sodyum karbonat (Na₂CO₃) ve 200 µl 0.5 M Folin Ciocalteu ilave edilmiş ve vorteks ile karıştırılarak tekrar 37 °C’de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler tekrar 10000g 4 °C’de 5 dak. santrifüjlenmiş ve spektrofotometre küvetine 1 ml supernatant aktarılarak 660 nm’de absorbans ölçülmüştür.

Hesaplamaların yapılabilmesi için öncelikle L-tirozin standardı ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bunun için 1.1 mM L-tirozin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden farklı tüplere 0-100 µl arasında değişen farklı hacimlerde aktarım yapılmış ve toplam hacmi 400 µl’ye tamamlayacak şekilde saf su eklenmiştir. Ardından 1 ml 500 mM Na₂CO₃ ve 200 µl 0.5 M Folin Ciocalteu ilave edilmiş ve karıştırılarak 37 °C’de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda spektrofotometre küvetine 1 ml aktarılarak 660 nm’de absorbans ölçülmüştür. Hazırlanmış olan tüplerdeki mg cinsinden tirozin miktarına karşılık ölçülen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Peptidaz aktivitesinin hesaplanması ise aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır:

$$\text{Peptidaz Aktivitesi} = \frac{\text{Açığa çıkan tirozin miktarı} \times \text{Analizdeki toplam hacim}}{\text{Reaksiyon süresi} \times \text{Enzim miktarı} \times \text{Küvete aktarılan örnek hacmi}} \quad (1)$$

Peptidaz aktivitesi = ünite/ml

Açığa çıkan tirozin miktarı = mg (L-tirozin kalibrasyon eğrisine göre hesaplanır)

Analizdeki toplam hacim = 2.2 ml

Reaksiyon süresi = 10 dak.

Enzim miktarı = 10 dakikalık reaksiyon öncesinde ilave edilen enzim miktarı (ml)

Küvete aktarılan örnek hacmi = 1 ml

Bir ünite enzim aktivitesi; kazeinin parçalanması ile 37 °C’de 1 dakikada 1 mg ml⁻¹ tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.2.5. Peptidaz üretimi için kültür koşullarının belirlenmesi

2.2.5.1. Ön kültürün hazırlanması ve fermentasyon koşulları

İnokülasyon için ön kültür, bakterilerin Nutrient Broth’da 37 °C 250 rpm’de 18 saat geliştirilmesi ile elde edilmiş ve enzim üretiminin gerçekleştirileceği 50 ml besiyeri içeren 250 ml’lik erlenlere başlangıç OD 0.1 olacak şekilde (v/v) aktarılmıştır. Her bir suş, bir önceki aşamada belirlenen en iyi peptidaz aktivitesi gösterdiği sıcaklıkta (K1 30 °C, K10 37 °C’de) 250 rpm’de 48 saat fermentasyona bırakılmış ve 24 saatte bir örnek alınarak OD ve peptidaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.2. Peptidaz üretimi için en uygun karbon kaynağının belirlenmesi

Mevcut bakterilerin peptidaz üretme kapasitelerinin belirlenmesinin ardından aktivite açısından en uygun bulunan iki suş (K1, K10) için karbon kaynağı testi uygulanmıştır. Karbon kaynağının seçilmesi, bir kerede bir faktörün (one-factor-at-a-time/OFAT) değiştirilmesi yaklaşımına göre yapılmış, bu amaçla Tablo 1’de verilen temel sıvı besi ortamındaki glukoz yerine aynı oranda sakkaroz, nişasta, arabinoz, ksiloz, mannitol ve sorbitol içeren besiyerlerinden yararlanılmıştır. Bundan sonra yapılan tüm fermentasyonlarda besiyerine, kullanılan karbon kaynağının birim fiyatı ile

¹ 6.1 N stok TCA’nın 1:55 oranında saf su ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

o karbon kaynağı ile elde edilen peptidaz aktivitesi karşılaştırılarak aktivite-maliyet dengesi açısından en uygun karbon kaynağı ilave edilmiştir.

2.2.5.3. Peptidaz üretimi için en uygun azot kaynağının belirlenmesi

Karbon kaynağının seçilmesinin ardından, seçilen karbon kaynağı kullanılarak aktivite açısından en uygun olan azot kaynağı belirlenmiştir. Bunun için bir kerede bir faktörün (one-factor-at-a-time/OFAT) değiştirilmesi yaklaşımına göre Tablo 1’de verilen temel sıvı besi ortamındaki maya ekstraktı yerine aynı oranda kazein, pepton ve yeast nitrogen base (YNB, maya nitrojen bazı) kullanılmıştır. Bundan sonra yapılan tüm fermentasyonlarda besiyerine, kullanılan azot kaynağının birim fiyatı ile o azot kaynağı ile elde edilen peptidaz aktivitesi karşılaştırılarak aktivite-maliyet dengesi açısından en uygun azot kaynağı ilave edilmiştir.

2.2.5.4. Peptidaz üretimi için çalkalama hızının belirlenmesi

Daha önceki aşamalarda seçilen karbon ve azot kaynağını içeren besiyerlerine inokülasyon yapıldıktan sonra fermentasyon 100, 180 ve 250 rpm’de gerçekleştirilmiştir. En iyi aktivite değerinin elde edildiği çalkalama hızı sonraki aşamalarda kullanmak üzere seçilmiştir.

2.2.5.5. Peptidaz aktivitesi üzerine karbon kaynağı/azot kaynağı oranının belirlenmesi

Tespit edilen karbon ve azot kaynakları, oranları 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 2:5, ve 2:1 olacak şekilde besiyerine ilave edilmiş ve fermentasyon gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.6. Ön kültür hazırlamada kullanılan besiyerinin etkisi

Peptidaz üretimi için ön kültür hem Nutrient Broth’a hem de önceki aşamalarda üretim için belirlenmiş bileşenleri (karbon, azot, C/N oranı) içeren sıvı besi ortamına Nutrient Agar’da gelişmiş birer koloninin aktarılması suretiyle hazırlanmış ve 37 °C 250 rpm’de 18 saat inkübe edilmiş ardından fermentasyon ortamına inokülasyon yapılmıştır.

2.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Farklı karbon ve azot kaynaklarının peptidaz aktivitesi üzerine etkisi SAS istatistik programı (SAS Instutue Inc. SAS System 9.0) kullanılarak varyans analiziyle (ANOVA) test edilmiş, önemli bulunan varyasyon kaynaklarının etki düzeyleri ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya koyulmuştur.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Peptidaz Aktivitesi En Fazla Olan *Bacillus* Suşlarının Belirlenmesi

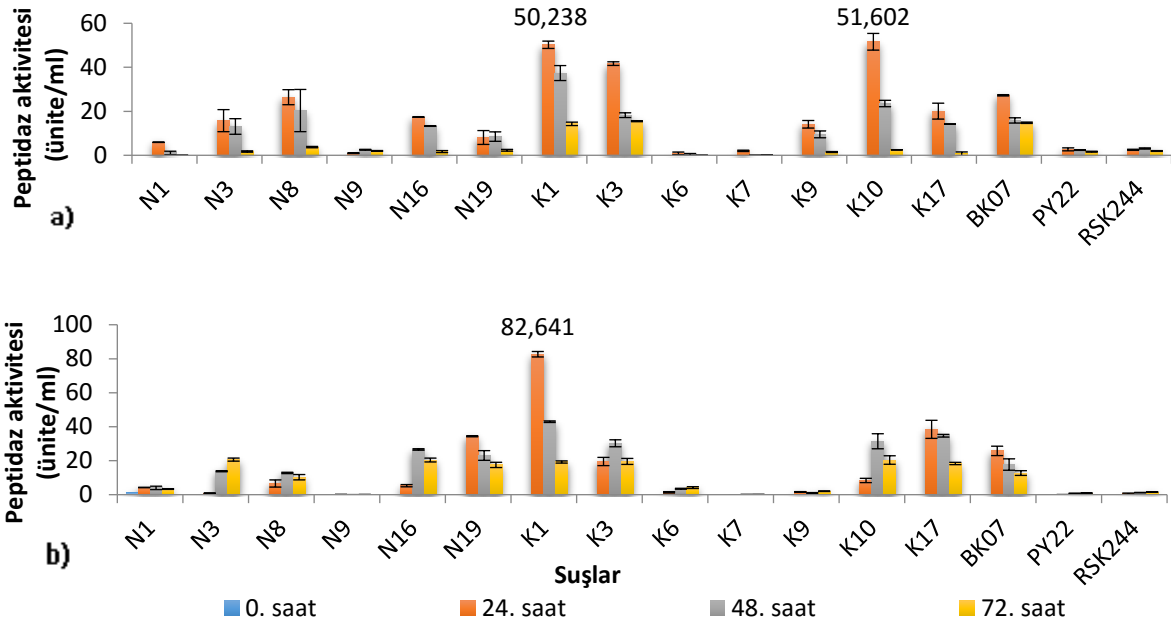
Peptidaz üretimi için aktivitesi en yüksek olan suşların seçimi, bu suşların dört farklı sıcaklıkta (30 °C, 37 °C, 50 °C ve 55 °C) fermentasyona tabi tutulması suretiyle yapılmıştır. Farklı sıcaklıkların denemeye dahil edilmesindeki amaç, mevcut suşların gelişebildikleri, daha da önemlisi peptidaz aktivitesi gösterebildikleri sıcaklık alt ve üst sınırlarını tespit edebilmektir.

Fermentasyonlar yapılırken Erem vd’nin [14] izole ettiği suşlar dışında, standart olarak kabul edilebilecek suşlar da (PY22 olarak kodlanan *Bacillus subtilis* 168 ve RSK244 olarak kodlanan *Bacillus subtilis*) karşılaştırma kolaylığı sağlaması açısından araştırmaya dahil edilmiştir. Araştırmada kullanılan BK07 de Erem [19] tarafından izole edilmiş ve *B. subtilis* olduğu Karakaş [15] tarafından bildirilmiştir.

Fermentasyon denemelerine öncelikle yüksek sıcaklıktan (55 °C) başlanmış, bu sıcaklıkta 72 saatlik fermentasyon süresince bakterilerin az da olsa gelişebildikleri (Tablo 2) ancak peptidaz aktivitesi gösteremedikleri tespit edilmiştir. Bunun üzerine daha yüksek sıcaklıklar araştırmaya dahil edilmemiş ve 50 °C’de fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Bu sıcaklıkta elde edilen OD değerleri, 55 °C’de fermentasyon sırasında belirlenen OD değerlerine göre daha yüksek olmasına rağmen, bakterilerin bu sıcaklıkta da peptidaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Daha sonra optimum mezofilik sıcaklık olan 37 °C ve bakterilerin iyi gelişebildikleri bilinen 30 °C’de fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Her iki sıcaklıkta da bakterilerin peptidaz üretebildikleri tespit edilmiştir.

Peptidaz aktivitesi testine ait sonuçlar incelendiğinde, 37 °C’de en yüksek aktiviteye sahip türlerin K10 (51.602 ünite/ml) ve K1 (50.238 ünite/ml) olduğu Şekil 1a’da görülmektedir. Fermentasyona her suş aynı OD değerinde (0.1) başlamış ancak 72 saatlik süre zarfında suşların gelişme düzeyleri doğal olarak farklı olmuş ve farklı OD değerleri elde edilmiştir. Benzer şekilde, 30 °C’de gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar incelendiğinde (Şekil 1b) en yüksek peptidaz aktivitesine K1 (82.641 ünite/ml) kodlu suşun sahip olduğu görülmektedir.

Araştırmaya dahil edilen tüm sıcaklık derecelerine ait elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmanın bundan sonraki kısımlarına K1 ve K10 ile devam edilmiştir. Standart suş olmaları bakımından PY22 ve RSK 244 kodlu suşların da peptidaz aktiviteleri tespit edilmiş ancak aktivitelerinin diğer suşlara nazaran çok düşük kalması sebebiyle (Bkz. Şekil 1a ve Şekil 1b) bundan sonraki aşamalarda kullanılmalarına karar verilmiştir.



Şekil 1. a) 37 °C’de b) 30 °C’de fermentasyona bırakılan suşların peptidaz aktivitesi (ünite/ml) sonuçları

Tablo 2. Farklı sıcaklıklarda fermentasyona bırakılan *Bacillus* izolatlarının optik yoğunluk değişimleri

Suşlar		N1	N3	N8	N9	N16	N19	K1	K3
30° C	24. saat	8.01 ± 0.10	4.01 ± 0.04	1.54 ± 0.03	2.31 ± 0.04	4.42 ± 0.05	2.85 ± 0.08	2.11 ± 0.03	4.10 ± 0.05
	48. saat	5.44 ± 0.03	2.17 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.99 ± 0.00	3.12 ± 0.01	1.52 ± 0.05	0.92 ± 0.01	3.55 ± 0.04
	72. saat	3.01 ± 0.11	1.49 ± 0.60	0.53 ± 0.01	1.46 ± 0.01	3.32 ± 0.00	2.24 ± 0.01	0.56 ± 0.02	3.56 ± 0.15
37° C	24. saat	7.23 ± 0.06	2.12 ± 0.04	0.64 ± 0.00	1.52 ± 0.10	3.96 ± 0.10	1.13 ± 0.03	2.18 ± 0.00	4.30 ± 0.05
	48. saat	3.41 ± 0.17	1.60 ± 0.01	0.84 ± 0.06	2.08 ± 0.03	3.44 ± 0.10	1.48 ± 0.12	1.44 ± 0.17	3.41 ± 0.12
	72. saat	2.88 ± 0.07	1.80 ± 0.03	0.50 ± 0.01	2.68 ± 0.01	3.45 ± 0.04	1.30 ± 0.01	0.95 ± 0.02	3.97 ± 0.08
50° C	24. saat	0.56 ± 0.02	1.22 ± 0.02	1.15 ± 0.01	1.61 ± 0.04	1.92 ± 0.06	1.76 ± 0.05	0.54 ± 0.01	2.10 ± 0.02
	48. saat	0.52 ± 0.00	1.30 ± 0.02	0.21 ± 0.01	1.44 ± 0.02	1.05 ± 0.02	0.80 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.00
	72. saat	0.43 ± 0.00	0.46 ± 0.00	0.17 ± 0.00	1.43 ± 0.02	0.26 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.23 ± 0.00
55° C	24. saat	0.16 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.75 ± 0.01	1.60 ± 0.02	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	-	0.16 ± 0.05
	48. saat	0.20 ± 0.00	0.87 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.47 ± 0.02	0.15 ± 0.08	0.09 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.19 ± 0.08
	72. saat	0.11 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.32 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Suşlar		K6	K7	K9	K10	K17	BK07	PY22	RSK244
30° C	24. saat	3.95 ± 0.04	3.72 ± 0.02	8.45 ± 0.00	4.48 ± 0.11	2.42 ± 0.07	3.05 ± 0.07	3.61 ± 0.09	3.51 ± 0.04
	48. saat	2.37 ± 0.00	1.87 ± 0.01	4.94 ± 0.12	3.87 ± 0.07	1.11 ± 0.00	1.99 ± 0.06	2.40 ± 0.06	2.08 ± 0.02
	72. saat	1.51 ± 0.03	1.48 ± 0.08	5.40 ± 0.40	3.61 ± 0.04	1.11 ± 0.01	2.33 ± 0.10	1.36 ± 0.05	1.14 ± 0.04
37° C	24. saat	2.35 ± 0.05	2.39 ± 0.07	2.44 ± 0.03	3.61 ± 0.10	2.58 ± 0.07	2.89 ± 0.03	2.69 ± 0.08	3.34 ± 0.07
	48. saat	1.56 ± 0.06	1.56 ± 0.00	1.43 ± 0.07	3.53 ± 0.14	1.38 ± 0.02	4.57 ± 0.05	0.55 ± 0.12	0.58 ± 0.01
	72. saat	1.03 ± 0.05	1.15 ± 0.01	0.92 ± 0.01	3.41 ± 0.06	1.15 ± 0.03	3.34 ± 0.04	0.50 ± 0.00	0.61 ± 0.01
50° C	24. saat	1.39 ± 0.04	1.56 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.86 ± 0.00	1.36 ± 0.01	1.85 ± 0.02	0.50 ± 0.00	0.45 ± 0.00
	48. saat	0.65 ± 0.00	0.46 ± 0.02	0.65 ± 0.05	0.25 ± 0.00	0.57 ± 0.00	0.80 ± 0.03	0.19 ± 0.00	0.26 ± 0.00
	72. saat	0.54 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.57 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.17 ± 0.00
55° C	24. saat	1.46 ± 0.13	2.06 ± 0.18	0.24 ± 0.01	TE	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.08	1.41 ± 0.08	2.15 ± 0.25
	48. saat	2.19 ± 0.14	0.80 ± 0.17	TE	TE	TE	0.19 ± 0.02	1.05 ± 0.01	1.90 ± 0.10
	72. saat	0.94 ± 0.00	0.42 ± 0.01	0.03 ± 0.00	TE	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.58 ± 0.01	1.83 ± 0.05

T.E.: Tespit edilemedi.

K1 (GenBank erişim numarası: MH045777) ve K10 suşlarının nükleotid dizimleri REFGEN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara) tarafından 16S mikrobiyal tanımlama yöntemi ile primer olarak 27F ve 1492R kullanılarak belirlenmiş, suşlar *Bacillus amyloliquefaciens* FE-K1 ve *Bacillus amyloliquefaciens* FE-K10 (%99) olarak tanımlanmıştır. K1 ve K10 suşları için nükleotid dizimleri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. K1 ve K10 suşlarının nükleotid dizilimleri

<p>K1 GTCGGCTGGCGCGTGCTATACTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTG GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGG TGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAA AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTG GGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC GACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGAT GAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGTACA TCCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCTCCGCGGAGAGTACAGGTTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGATGT TGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTATGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTACAAACCGG AGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGAACAAGGGGACGCGAAA CCGCGAGGTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGA GTTAACCTTTGGAGCCAGCCCGGAAGGTGGACAGAGATTGG</p>
<p>K10 CGCGGCTGGCGCGTGCTATACTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTG GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGG TGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAA AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTG GGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC GACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGAT GAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAARAACCTTACCAGGCTTGTACAT CCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCTCCGCGGAGAGTACAGGTTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTACAAACCGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGAACAAGGGGACGCGAAA CGGAGGTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGA GTTAACCTTAGGAGCCAGCCCGGAAGGTGTACAGAGATTGG</p>

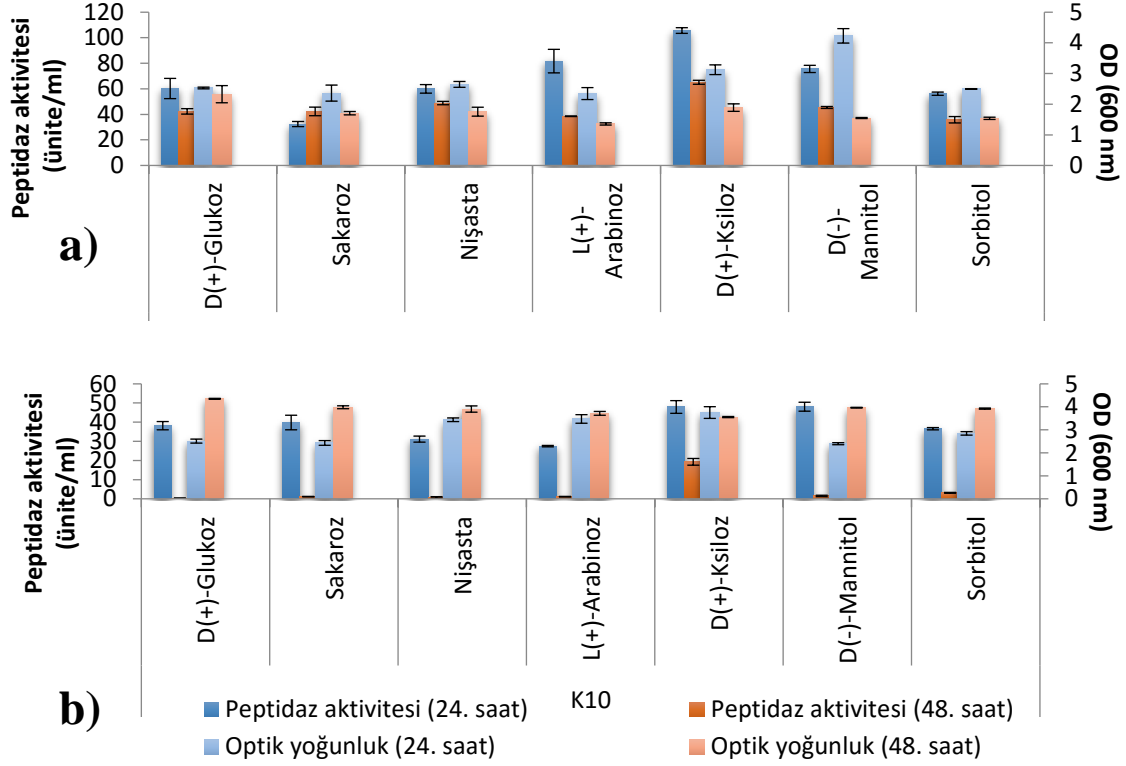
3.2. Seçilen *Bacillus* Türleri için Tespit Edilen Kültür ve Enzim Üretim Koşulları

3.2.1. Peptidaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

Aynı tür bakteri grubu içinde her bir suşun besin isteği, fermentasyonla üretilmek istenen bileşene de bağlı olmak üzere farklılık arz etmektedir. Farklı *Bacillus* türleri ile peptidaz üretiminin yapıldığı bazı çalışmalarda denenilen kaynaklar arasından en yüksek peptidaz aktivitesine nişasta [20], sakkaroz [21], laktoz ve glukoz karışımı [22], fruktoz [23, 24], glukoz [25, 26], ksiloz [27], arabinoz [28, 29] gibi farklı karbon kaynakları ile ulaşılmıştır. Çalışmalardan birinde enzim aktivitesini artıran bir karbon kaynağının diğer bir çalışmada enzim üretimini baskılayabildiği görülmüştür. Bu amaçla, bu çalışmada peptidaz üretiminde kullanılan suşlar için 7 farklı karbon kaynağı değerlendirilerek bu kaynakların peptidaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının K1 ve K10 suşlarının gelişimi ve peptidaz aktivitesi üzerine olan etkisi Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, genel olarak, aktivite değerlerinin 24. saatte daha yüksek olup 48. saatte azaldığı görülmektedir. Aksi durum sadece K1 için sakkaroz kullanıldığında

gerçekleşmiş, 48. saatte aktivite artmıştır. OD değerindeki değişim de K1 için benzer şekilde gerçekleşerek 48. saatte azalmıştır. Ancak K10 için OD değeri genellikle 48. saatte artış göstermiştir.



Şekil 2. a) K1 ve b) K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi (X±StdH)

Bu çalışmada suşlar açısından genel bir profil elde etmek için farklı kaynakların taranması amaçlanmış, en yüksek peptidaz aktivitesine K1 için ksiloz (105.67±2.22 ünite/ml), K10 için mannitol (48.08±2.33 ünite/ml) kullanıldığında ulaşılmıştır. Bu durumda, üretim için bu karbon kaynaklarının seçilmesi en yüksek aktivitenin elde edilmesi açısından mantıklı görünse de maliyet unsurunun da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Tablo 4’de hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilen, >%98 saflıktaki farklı karbon kaynakları için birim fiyatlar verilmiştir. Özellikle ksiloz, peptidaz üretimi açısından K1 başta olmak üzere, her iki suş için de iyi bir kaynak olmasına rağmen ekonomik açıdan olumsuzluk yaratmaktadır. Dolayısıyla diğer kaynaklar arasından seçim yapılması daha uygun görülmüştür.

Tablo 4. Farklı karbon kaynakları için birim fiyat listesi

Karbon kaynağı	(TL/kg)*
D(+)-Glukoz	169.91
Sakaroz	540.43
Nişasta**	830.71
L(+)-Arabinoz	4012.00
D(+)-Ksiloz	2171.44
D(-)-Mannitol	580.56
Sorbitol	304.90

*1 Euro=4 TL kabul edilerek fiyatlar yaklaşık olarak verilmiştir.

** Çözünür patates nişastası

***Farklı firmaların 1 kg’lık ambalajları (>%98 saflıkta) karşılaştırılarak en uygun fiyatlı olanlar değerlendirmeye alınmıştır.

Peptidaz üretiminde ekonomik karbon kaynağının seçimi için birim fiyatları diğer kaynaklara göre daha yüksek olan arabinoz ve ksiloz devre dışı bırakıldıktan sonra aktivite verilerine¹ varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve peptidaz aktivitesi açısından karbon kaynakları arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) düzeyde farklılık bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. K1 ve K10 suşlarının karbon kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

	Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F değeri
K1	Karbon Kaynağı	4	484.71	13.87**
	Hata	5	34.96	
K10	Karbon Kaynağı	4	75.32	6.86*
	Hata	5	10.98	

(*) $p<0.05$ seviyesinde farklılık ifade eder.

(**) $p<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Tablo 6'da Duncan Çoklu Karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Buna göre K1 suşu için en düşük enzim aktivitesi değeri gösteren sakkaroz çıkarıldıktan sonra diğer kaynaklar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu suş için hem iyi bir aktivite değeri elde edilen hem de en ucuz kaynak olan glukozun tercih edilebileceği görülmektedir. Nişasta kullanıldığı zaman da benzer bir aktivite elde edilmiştir. Ayrıca çok daha ucuz fiyattan nişasta bulmak da mümkündür. Ancak nişastanın amilaz üretimini de teşvik edebileceği düşünüldüğünden (sünmüş ekmeğin durumuna bakıldığında, *Bacillus* türleri ekmeğe nişastayı parçalamak için amilaz salgılamaktadır. Bu durumda, sünmüş ekmeğin izole edilen suşların nişasta varlığında amilaz salgılaması da olasıdır. Bu çalışmanın devamında, elde edilen peptidazın saflaştırılması düşünüldüğünden ortamda amilaz aktivitesinin de olmasının saflaştırma işlemini zorlaştıracağı düşünülmüştür), glukozun kullanılmasına karar verilmiştir. K10 suşu için nişasta en düşük aktivite değerine neden olduğundan, mannitol de en yüksek aktiviteyi sağlmasına rağmen fiyatı nedeni ile tercih edilmemiştir. Glukoz ve sakkaroz arasında da istatistiksel açıdan bir fark olmadığından, glukoz K10 için karbon kaynağı olarak seçilmiştir.

Tablo 6. K1 ve K10 suşlarının karbon kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ($X \pm \text{StdH}$)

	K1**	K10*
D (+)-Glukoz	60.26 ^a ± 7.92	38.17 ^b ± 2.16
Sakkaroz	32.42 ^b ± 2.00	39.83 ^{ab} ± 3.81
Nişasta	59.98 ^a ± 3.33	31.17 ^b ± 1.58
D (-)-Mannitol	75.58 ^a ± 2.82	48.08 ^a ± 2.33
Sorbitol	56.21 ^{ab} ± 1.27	36.59 ^b ± 0.60

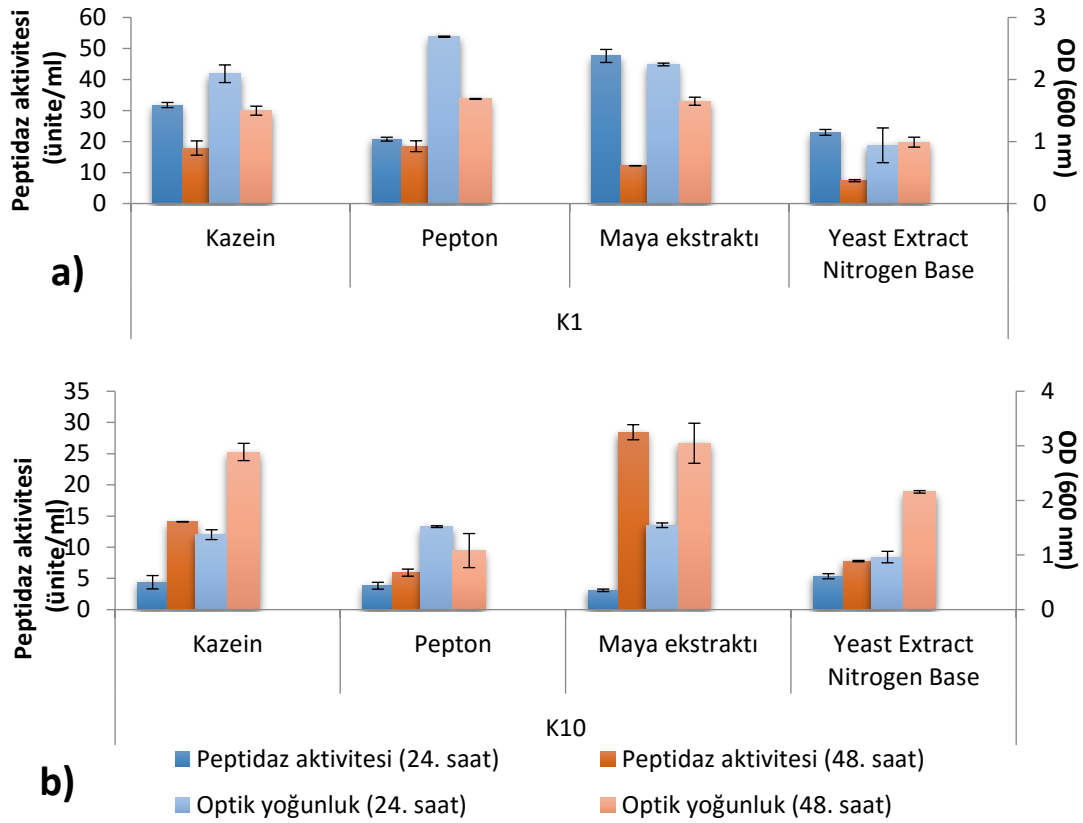
*Karşılaştırmalar $p<0.05$ seviyesinde yapılmıştır.

**Karşılaştırmalar $p<0.01$ seviyesinde yapılmıştır.

3.2.2. Peptidaz aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Bilindiği üzere farklı azot kaynaklarının bakterinin gelişimi ve ürün üretimi üzerine olan etkisi farklı olabilmektedir. Hatta aynı kaynak, aynı bakteri grubundaki farklı alt türleri bile farklı düzeylerde etkileyebilmektedir. *Bacillus* türleri kullanılarak peptidaz üretiminin gerçekleştirildiği bazı çalışmalarda en yüksek peptidaz aktivitesi değerlerine pepton [20], sığır ekstraktı [30], soya küspesi [31-33], kazamino asit [34] gibi azot kaynakları ile ulaşılmıştır. Bu çalışmada da 4 farklı azot kaynağı kullanılarak bu kaynakların peptidaz üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir (Şekil 3).

¹ Her iki suş için de 24. saat aktivite değerleri daha yüksek olduğundan istatistiksel hesaplamalar bu veriler için yapılmıştır.



Şekil 3. a) K1 ve b) K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

K1 suşu için 24. saat verileri incelendiğinde, pepton kullanıldığında en yüksek OD değerine ulaşıldığı ancak en düşük peptidaz aktivitesi (20.77 ± 0.62 ünite/ml) değerinin elde edildiği görülmektedir. En yüksek aktivite değerine ise diğer kaynaklara göre yaklaşık 2 kat fark ile maya ekstraktı (47.59 ± 2.10 ünite/ml) kullanıldığında ulaşılmıştır. Hem aktivite hem de OD değerleri genel olarak 48. saatte azalmış, yalnızca YNB kullanıldığında OD değerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Nitekim peptidaz üretimini teşvik eden kültür koşulları ile bakteri gelişimini teşvik eden kültür koşullarının birbirinden farklı olabileceği bildirilmiştir [35].

Azot kaynaklarının K10 üzerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 3), pepton dışında, 48. saat OD ve peptidaz aktivitesi değerlerinin daha yüksek olduğu, maya ekstraktının yine en iyi aktivite değerini (28.430 ± 1.2 ünite/ml) sağlayan kaynak olduğu belirlenmiştir. Aynı sürede en düşük aktivite değeri (5.9 ± 0.57 ünite/ml), K1 suşunda olduğu gibi pepton kullanıldığında tespit edilmiştir.

Sonuçlar K1 ve K10 için en uygun azot kaynağının maya ekstraktı olduğunu göstermiştir. Ekonomik açıdan da bir değerlendirme yapmak için öncelikle kullanılan kaynakların birim fiyatları incelenmiş, en pahalı kaynağın YNB, en ucuz kaynağın ise pepton olduğu görülmüştür (Tablo 7).

Tablo 7. Farklı azot kaynakları için birim fiyat listesi

Azot kaynağı	(TL/kg)*
Kazein	367.34
Pepton	229.84
Yeast ekstrakt	287.30
YNB**	429.04

*1 Euro=4 TL kabul edilerek fiyatlar yaklaşık olarak verilmiştir.

** Yeast extract nitrogen base (maya nitrojen bazı)

***Farklı firmaların 1 kg'lık ambalajları (>%98 saflıkta) karşılaştırılarak en uygun fiyatlı olanlar değerlendirmeye alınmıştır.

Peptidaz üretimi için hem ekonomik hem de en uygun aktivite değerini sağlayan azot kaynağının seçilebilmesi için aktivite değerlerine varyans analizi uygulanmıştır. K1 için 24. saat, K10 için ise 48. saat verileri daha yüksek aktivite değeri sağlamıştır. Bu nedenle varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testi K1 için 24. saat, K10 için ise 48. saat verilerine uygulanmıştır. Veri analizlerine göre azot kaynakları arasında peptidaz aktivitesi üzerine olan etkileri bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.01$) farklılık olduğu tespit edilmiş, varyans analizi sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. K1 ve K10 suşlarının azot kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları		SD	KO	F değeri
K1 (24. saat)	Azot Kaynağı	3	296.85	93.14**
	Hata	4	3.19	
K10 (48. saat)	Azot Kaynağı	3	208.12	66.80**
	Hata	4	3.12	

(**) $p<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Tablo 9'da Duncan Çoklu Karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. K1 suşu için maya ekstraktının en yüksek aktivite değerini sağladığı ve istatistiksel olarak da diğer kaynaklardan önemli derecede ($p<0.05$) farklılık gösterdiği görülmektedir. En ucuz kaynak olan peptona göre iki kattan fazla aktivite değeri sağlaması ve aralarında çok büyük bir fiyat farkı olmaması sebebiyle üretim çalışmalarında K1 için maya ekstraktının kullanılması uygun bulunmuştur. Benzer şekilde bir inceleme K10 suşu için daha yüksek aktivite değeri elde edilen 48. saat verileri için yapıldığında, maya ekstraktının en iyi kaynak olduğu görülmektedir. En ucuz kaynak olan pepton ile aralarındaki fiyat farkının fazla olmaması ve peptona göre 5 kattan fazla aktivite değeri sağlaması sebebiyle azot kaynağı olarak maya ekstraktının kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 9. K1 ve K10 suşlarının azot kaynaklarına bağlı peptidaz aktivitesi ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ($X\pm StdH$)

24. saat	K1*	K10**
Kazein	31.77 ^b ± 0.83	4.39 ^a ± 1.07
Pepton	20.77 ^c ± 0.62	3.83 ^a ± 0.54
Maya ekstraktı	47.60 ^a ± 2.10	3.09 ^a ± 0.20
YNB***	22.95 ^c ± 0.94	5.35 ^a ± 0.41
48. saat	K1**	K10**
Kazein	17.90 ^{ab} ± 2.29	14.09 ^b ± 0.03
Pepton	18.49 ^a ± 1.74	5.93 ^b ± 0.57
Maya ekstraktı	12.22 ^{bc} ± 0.02	28.43 ^a ± 1.21
YNB***	7.37 ^c ± 0.35	7.77 ^b ± 0.12

*Karşılaştırmalar $p<0.05$ seviyesinde yapılmıştır.

**Karşılaştırmalar $p<0.01$ seviyesinde yapılmıştır.

*** Yeast extract nitrogen base

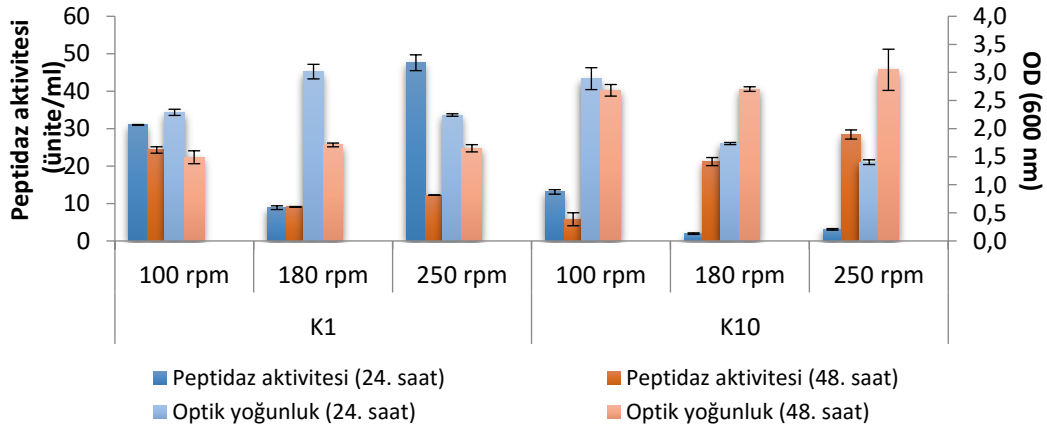
3.2.3. Peptidaz aktivitesi üzerine çalkalama hızının etkisi

Aerobik fermentasyon proseslerinde oksijen, organizmanın metabolik yolunu etkileyerek ürün üretimi üzerinde önemli rol oynayan faktörlerden biridir [36]. Oksijenin fermentasyon sıvısındaki

çözünürlüğünün düşük olması ya da hızlı gelişen mikroorganizmaların oksijen alım oranlarının yüksek olması gibi nedenlerle, çözünmüş oksijen konsantrasyonu aerobik fermentasyonlar için sınırlayıcı bir parametredir [37]. Bu durumda mikroorganizmanın gelişme koşullarına bağlı olarak bazı proseslerde yüksek oksijen transferine ihtiyaç duyulurken, bazı proseslerde ise kontrollü bir oksijen transferinin sağlanması gerekmektedir [36]. Oksijen transfer hızı, çalkalama hızı ve havalandırma oranına bağlı olmaktadır. Engelli erlenlerde çalkalamalı inkübasyon yoluyla yapılan fermentasyonlarda, mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu orandaki oksijeni sağlamanın en basit yolu doğru çalkalama hızını seçmektir. Bu şekilde aynı zamanda besin maddelerinin homojen karışması ve dolayısıyla besin transfer hızı da ayarlanmış olmaktadır [38]. Çalkalama hızı gereğinden fazla hızlı olduğu zaman da hücrenin zarar görmesine ya da enzimin denatüre olmasına neden olduğundan [30] doğru çalkalama hızının seçilmesi önem arz etmektedir.

Şekil 4’de K1 ve K10 suşları için fermentasyonun 24. ve 48. saatlerinde tespit edilen peptidaz aktivitesi ve OD değerlerinin çalkalama hızına bağlı olarak değişimi gösterilmiştir. Daha önceki aşamalarda bir yandan en iyi peptidaz aktivitesi sağlarken diğer yandan ekonomik olan besin kaynağını seçebilmek için veriler istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuş ve aralarında peptidaz aktivitesi açısından farklılık bulunmayan kaynaklardan en ekonomik olanı tercih edilmiştir. Bu aşamada ise çalkalama hızları arasındaki farklılık enerji açısından çok büyük ekonomik farklılık yaratmayacağından, peptidaz aktivitesi açısından istatistiksel bir değerlendirme yapılmamış ham veriler göz önünde bulundurularak yüksek aktivite değerini sağlayan çalkalama hızının seçimi yoluna gidilmiştir.

Daha önceki analizler göz önünde bulundurulduğunda K1 suşunun 24., K10 suşunun ise 48. saatte daha yüksek peptidaz aktivitesi verdiği bilinmektedir. Şekil 4 incelendiğinde K1 için bu koşulun değişmediği, her üç çalkalama hızında da 24. saatte daha yüksek aktivite ve OD değeri elde edildiği görülmektedir. K10 için ise 100 rpm’de 24. saatte, 180 ve 250 rpm’de ise 48. saatte hem aktivite hem de OD değeri daha yüksek olmuştur.



Şekil 4. K1 ve K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine çalkalama hızının etkisi

Peptidaz üretimi ile bakteri gelişimi arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğunu belirleyen araştırmacılar [39] olduğu gibi peptidaz üretiminin bakteri gelişiminden bağımsız olduğunu savunan araştırmacılar da [40,41] bulunmaktadır. Şekil 4 bu açıdan incelendiğinde K1’in en yüksek OD’ye 180 rpm’de ulaştığı ancak bu çalkalama hızında en düşük peptidaz aktivitesinin elde edildiği görülmektedir. Diğer iki çalkalama hızında OD değerleri çok benzer olmasına rağmen 250 rpm’de daha yüksek aktivite elde edilmiştir. Bu durumun farklı çalkalama hızında bakterinin oksijen alım ve besine ulaşma hızı farklı olacağından, aynı OD değerine ulaşmasına rağmen, gelişme eğrisinde farklı fazda olmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim literatürde peptidaz üretiminin logaritmik fazın sonunda ve durağan fazda daha fazla olduğunu bildiren kaynaklar bulunmaktadır [5, 35]. Bakteri gelişimini

teşvik eden kültür koşullarıyla enzim üretimini teşvik eden koşulların birbirinden farklı olduğunu savunan araştırmacılar da mevcuttur [35, 42]. Dolayısıyla, duruma, peptidaz üretiminin bakteri gelişiminden bağımsız olmasından ziyade farklı kültür koşullarında gelişim eğrisinin daha farklı şekillenebileceği olgusuyla yaklaşmanın daha makul olabileceği düşünülmektedir. K10 suşu için de durumu K1’de olduğu gibi yorumlamak mümkündür.

Her iki suş için de 250 rpm’lik çalkalama hızının, peptidaz aktivitesini artırma açısından, daha etkili olduğu gözlenmiş ve çalışmalara 250 rpm çalkalama hızı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

3.2.4. Peptidaz aktivitesi üzerine karbon kaynağı/azot kaynağı oranının etkisi

Hücre dışı peptidaz üretiminin karbon/azot (C/N) oranı (w/w) değişiminden önemli ölçüde etkilendiği bilinmektedir [5,43]. Her bir organizma ya da suşun gelişimi ve ürün üretimi için fizikokimyasal ve besinsel ihtiyacı farklı olabileceğinden [44] her bir çalışmada, kullanılan suşlar açısından C/N oranının da belirlenmesi ürün üretiminde en iyiye ulaşmak açısından fayda sağlamaktadır. Nitekim Beg vd [45] *Bacillus mojavensis* ile alkali peptidaz üretimi gerçekleştirdikleri bir çalışmada 2 mg/ml glukoz karşılık 12 mg/ml kazamino asit kullanımının en iyi C/N oranı olduğunu, Wu vd [46] ise *Bacillus* sp. B001 suşuyla peptidaz üretiminin optimizasyonunu yaptıkları çalışmada karbon ve azot kaynakları olarak 19.6 g/l mısır unu ile 6.2 g/l soya peptonu kullanımının ideal olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla kullanılan kaynağa ve bakteri suşuna göre ideal C/N oranının değiştiği görülmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada da K1 ve K10 suşları için uygun C/N oranı tespit edilmiştir.

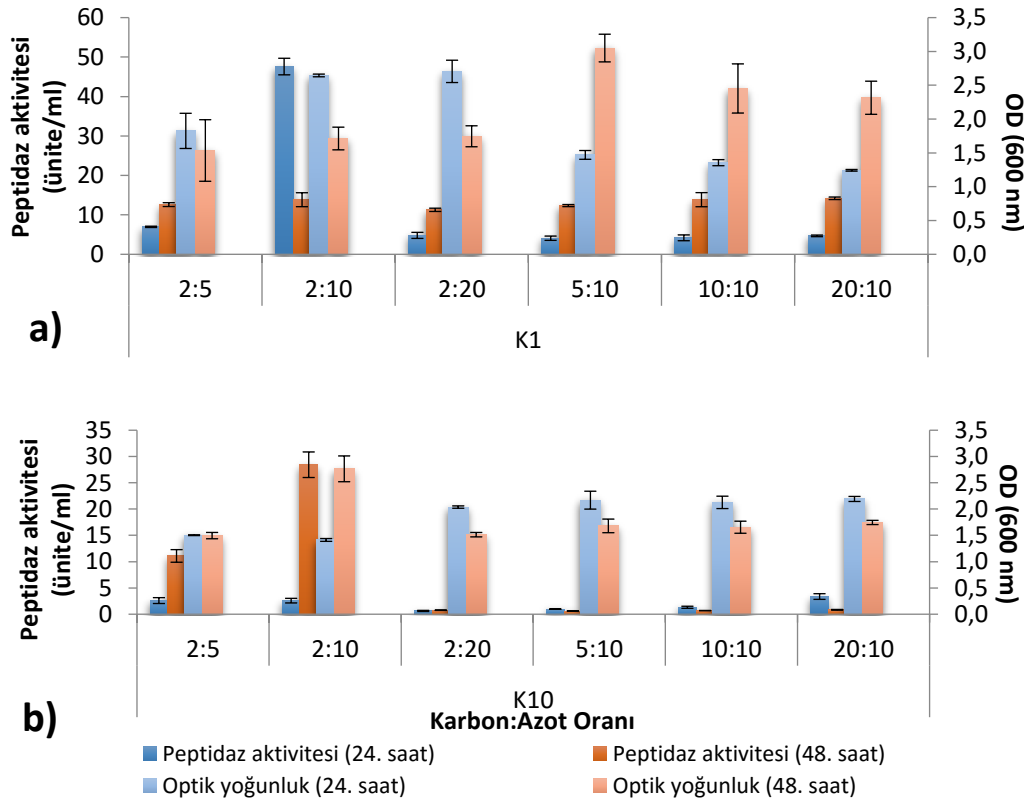
K1 ve K10 suşlarının 24. ve 48. saatteki peptidaz üretimleri ve OD değerleri üzerine farklı C/N oranının etkisi Şekil 5’de gösterilmiştir. Şekilde x-ekseninde verilen C/N oranları aynı zamanda fermentasyonun gerçekleştirildiği besiyerine (Bkz. Tablo 1) ilave edilen karbon ve azot kaynağı miktarlarını (g/L cinsinden) gösterdiğinden, sadeleştirilmeden verilmiştir. Şekil bu açıdan incelendiğinde ilk üç oranda karbon kaynağı (glukoz) miktarının sabit tutulup azot kaynağı (maya ekstraktı) miktarının değiştirildiği, son üç oranda ise tam tersine azot kaynağı miktarı sabit tutulup karbon kaynağı miktarının değiştirildiği görülmektedir. Şekil 5’deki OD değerlerine bakıldığında K1 suşunun OD değerinin karbon miktarı sabitken 24. saatte, azot miktarı sabitken ise 48. saatte daha fazla olduğu gözlenmiştir. K10 suşunun OD değeri ise 2:5 oranında farklı fermentasyon sürelerinde sabitken; 2:10 oranında zamanla artmış, diğer oranlarda ise zamanla azalmıştır. Ortamdaki besin miktarının değişmesi muhtemelen bakteri gelişiminin de farklı şekilde gerçekleşmesine yol açmıştır.

Şekil 5a’ya göre peptidaz üretimi açısından, K1 için karbon miktarı sabitken azot oranının 10 g/l’den daha az veya daha fazla olmasının 24. saat peptidaz aktivitesinde beş kattan fazla azalmaya neden olduğu gözlenmektedir. Maya ekstraktının 10 g/l’den az olması durumunda aktivitenin azalmasını, bakterinin zaten az olan azot kaynağını parçalayıp kullanabileceği besin formuna dönüştürmesi için daha az enzime ihtiyaç duyması şeklinde açıklamak mümkündür. Fazla miktardaki azotlu bileşenler de enzim aktivitesini baskılayabildiğinden [47], 20 g/l maya ekstraktı kullanıldığı zaman peptidaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Çünkü ortamda bakterinin kullanabileceği azotlu madde bulunduğundan, bakteri peptidaz üretmeye gerek duymamaktadır. Azot miktarı sabitken de besiyerine 2 g/l’den fazla karbon kaynağı ilavesi yine peptidaz aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Karbonhidrat konsantrasyonunun yüksek olması durumunda da enzim üretiminin baskılanabildiği bildirilmiştir [44]. Bu açıdan bakıldığında, besiyerine karbon kaynağı olarak glukozun ilave edilmiş olmasının katabolit represyonuna¹ yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Ortamda besin kaynağı olarak kolaylıkla metabolize edilebilir glukoz olması nedeniyle bakteri öncelikle glukozu kullanma yoluna gitmiş ve peptidaz üretimi bu nedenle baskılanmış olabilir. Şekil 5a’dan da görüldüğü gibi karbon kaynağı miktarı artırıldığı zaman (5:10, 10:10, 20:10), normalde 24. saatte daha yüksek aktivite veren K1

¹ Katabolit represyonu, basitçe, katabolit varlığında enzim sentezinin baskılanması olarak tanımlanmaktadır [48].

suşu, 48. saatte daha yüksek aktivite vermeye başlamıştır. Bu da zamanla glukozun tükenmesi nedeniyle artık azot kaynağını kullanmak için bakterinin peptidaz üretmeye başlaması ile açıklanabilir. Muhtemelen fermentasyon süresi uzatılırdı, peptidaz aktivitesinde artış gözlenebilirdi. Literatürde katabolit represyonunun genellikle α -amilaz, β -glukanaz, ksilanaz ve selülaz gibi sakkarolitik (şeker parçalayabilen) enzimlerle ilişkili olduğu vurgulanmasına rağmen, peptidaz üretimiyle ilişkili olduğu yönünde kaynaklar da mevcuttur. Sunitha vd [47] katabolit represyonuna karşı dayanıklı (glukoz kullanımı engellenmiş) *Thermoactinomyces* sp. E79'un mutant suşu ile yabani suşa göre iki kat fazla aktiviteye sahip alkali peptidaz üretimi sağlamışlardır. Duruma daha farklı bir bakış açısıyla yaklaşmak da mümkündür. *Bacillus* gibi sporlu bakterilerde peptidaz salgılanmasının, besin maddelerindeki azalmayla birlikte, vejetatif hücrelerin spor haline dönüşmesiyle ilgili olabileceği bildirilmiştir [49, 50]. Katabolit represyonunun ise *Bacillus subtilis*'in şekerleri kullanımıyla ilgili olan enzimlerinin, trikarboksilik asit döngüsündeki ilk üç enzimin ve sporlaşmanın başlamasını sağlayan enzimlerin transkripsiyonu düzenlediği ve glukoz varlığında sporlaşmanın gerçekleşmesi için kilit rol oynayan ve ekstraselüler peptidaz üretiminin düzenlenmesiyle ilişkili olan Spo0A proteininin baskılanmasına neden olduğu ifade edilmektedir [51]. Ancak literatürde, sporlaşma ve peptidaz üretiminin aynı anda olmasına rağmen, aralarında bir ilişki olmadığını ileri süren yayınlar da bulunmaktadır [52]. Eğer sporlaşma ve peptidaz üretimi arasında ilişki olduğu kabul edilirse, fazla glukoz varlığında sporlaşma gerçekleşmeyeceği için peptidaz üretiminin de engellenebileceği düşünülebilir.

K10 için de sonuçların K1 ile benzerlik arz ettiği, besiyerinde 2 g/l glukoz karşılık 10 g/l maya ekstraktı kullanıldığı durumda en iyi peptidaz aktivitesi seviyesine ulaşıldığı Şekil 5b'de görülmektedir. Daha yüksek miktarda glukoz ve maya ekstraktı kullanımı aktivitenin neredeyse tamamen kaybolmasına neden olmuştur.



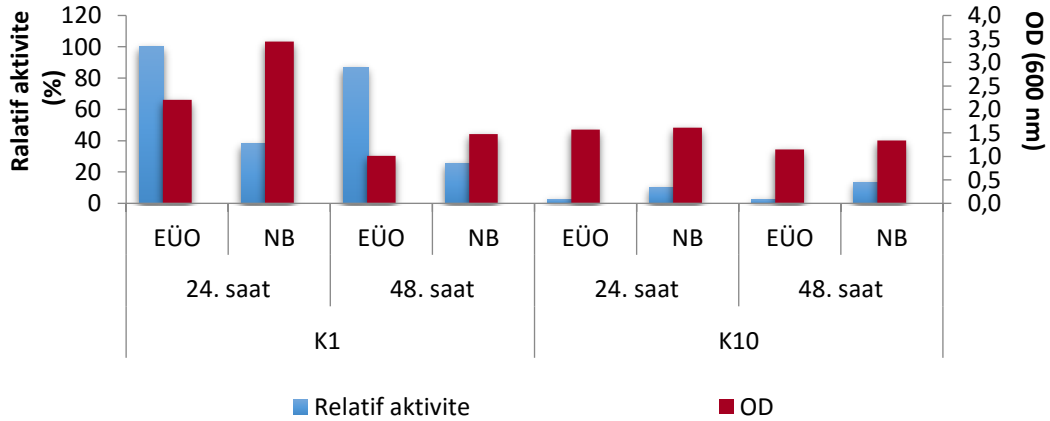
Şekil 5. a) K1 ve b) K10 suşlarının peptidaz aktivitesi değeri üzerine farklı karbon kaynağı / azot kaynağı (g/g) oranının etkisi

Çalışma sonuçları, denemeye dahil edilen oranlar arasından temel besi ortamında kullanılmış olan 2 g/l karbon kaynağına karşılık 10 g/L azot kaynağının, peptidaz üretimi açısından her iki suş için de en uygun C/N oranı olduğunu gösterdiğinden fermentasyon denemelerine bu oranda karbon ve azot kaynağı içeren besi ortamı ile devam edilmiştir.

3.2.5. Peptidaz aktivitesi üzerine ön kültür hazırlamada kullanılan besiyerinin etkisi

Çalışmanın şu ana kadarki kısmında ön kültür sürekli Nutrient Broth (NB) ile hazırlanmış, inkübasyon sonunda, belirlenen bileşenleri içeren enzim üretim ortamına (EÜO) inokülasyon yapılmıştır. Ancak enzim üretim ortamı aynı zamanda ön kültür ortamı olarak kullanılırsa, asıl fermentasyon sırasında bakterinin zaten alışık olduğu ortama adaptasyon süresinin kısalabileceği, enzim üretimini daha erken ve kolay başlatabileceği düşünülmüş ve ön kültür besiyerinin peptidaz aktivitesi üzerine etkisi tespit edilmiştir.

Şekil 6’da iki farklı ön kültür ortamında çoğaltılmış K1 ve K10 suşlarının asıl fermentasyon ortamına aktarılmasından sonra elde edilen peptidaz aktivitesi ve OD değerleri gösterilmiştir. Şekilde peptidaz aktivitesi değeri relatif olarak verilmiş, bunun için K1 suşu için EÜO, ön kültür besiyeri olarak kullanıldığı zaman elde edilen aktivite değeri (19.64 ünite/ml) %100 kabul edilip diğer aktivite değerleri bağıl olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, ön kültür besiyeri olarak EÜO kullanıldığında, peptidaz aktivitesi açısından K1 için artış, K10 için azalış olduğunu göstermiştir. K1’in aktivite değerinde ön kültür besiyeri olarak EÜO’nun NB’ye göre 2 kattan fazla artış sağlamış olması nedeniyle, bundan sonraki olası çalışmalarda K1 suşu için ön kültür besiyeri olarak EÜO kullanılmasının uygun olacağı görülmüştür.



Şekil 6. Suşların peptidaz aktivitesi değeri üzerine ön kültür besiyerinin etkisi

4. SONUÇ

K1 ve K10 suşları ile peptidaz üretimi açısından kültür koşullarının belirlenmesi için yapılan analizler, peptidaz üretimi için en uygun enzim üretim ortamının, çalışmanın en başında belirlenmiş olan temel besi ortamı (Bkz. Tablo 1) olduğunu göstermiştir. Bunun dışında fermentasyon 250 rpm çalkalama hızında yapıldığında, bakteri gelişim ortamında karbon/azot kaynağı oranı açısından 2 g/l glukozaya karşılık 10 g/l maya ekstraktı (1:5) bulunduğu daha yüksek peptidaz aktivitesi değeri elde edilmiştir. Ayrıca ön kültür, enzim üretim ortamı ile hazırlandığında K1 suşunun aktivite değerinde artış, K10 suşunun aktivite değerinde ise azalış saptanmıştır. Genel olarak aktivite değerinin daha fazla olması nedeniyle K1 öncelikli olmak üzere, her iki suş için de ileri düzeyde yapılabilecek optimizasyon çalışmaları ile peptidaz aktivitesi değerinin daha fazla artırılabilirliği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Koordinasyon Birimi tarafından 2010.03.0121.020 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Temiz A. Enzimler. In: Saldamlı İ, editor. Gıda Kimyası. Ankara, Türkiye: Hacettepe Üniversitesi yayınları, 1998. ss. 259-336.
- [2] Adrio JL, Demain AL. Microbial cells and enzymes: a century of progress. In: Barredo JL, editor. Microbial Enzymes and Biotransformations, Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 2005. pp. 1-28.
- [3] Illanes A. Enzyme Production. In: Illanes A, editor. Enzyme Biocatalysis Principles and Applications, Netherlands: Springer, 2008. pp. 57-106.
- [4] Kıran ÖE, Çömlekçioglu U, Dostbil N. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 2006; 9 (1): 12-19.
- [5] Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl Microbiol Biot 2002; 60: 381-395.
- [6] Beg QK, Saxena RK, Gupta R. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. Process Biochem 2002; 37: 1103-1109.
- [7] Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biot 2002; 59: 15-32.
- [8] Westers L, Westers H, Quax WJ. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochim Biophys Acta 2004; 1694: 299-310.
- [9] Barrett A. Proteolytic Enzymes: nomenclature and classification. In: Reynon B, Bond JS, editors. Proteolytic Enzymes, New York: Oxford University Press, 2001; pp. 1-22.
- [10] Salleh AB, Razak CNA, Rahman RNZRA, Basri M. Chapter 2, Protease: introduction. In: Salleh AB, Razak CNA, Basri M, editors. New Lipases and Proteases, New York: Nova Science Publishers, 2006. pp 23-39.
- [11] Volavsek PJA, Kirschner LAM, von Holy A. Accelerated methods to predict the rope-inducing potential of bread raw materials. S Afr J Sci 1992; 88:99-102.
- [12] Sorokulova IB, Reva ON, Smirnov VV, Lapa SV, Urdaci MC. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. Lett Appl Microbiol 2003; 37: 169-173.
- [13] Smith JP, Dafias DP, El-Khoury W, Koukoutsis J, El-Khoury A. Shelf life and safety concerns of bakery products – a review. Crit Rev Food Sci 2004; 44: 19-55.

- [14] Erem F, Certel M, Karakaş B. Identification of *Bacillus* species isolated from ropey breads both with classical methods and API identification kits. J Fac Agric Akdeniz Univ 2009; 22(2):201–210.
- [15] Karakaş B. *Bacillus subtilis*'den α -amilaz geninin klonlanması ve *Pichia pastoris* mayasında ekspresyonu. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Turkey, 2009.
- [16] Beg QK, Gupta R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. Enzyme Microb Tech 2003; 32: 294-304.
- [17] Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J Gen Physiol 1938; 22: 79-89.
- [18] Cupp-Enyard C. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. J Vis Exp 2008; 19.
- [19] Erem F. Normal ve kepekli ekmeklerde sünme etmeni *Bacillus* türlerinin belirlenmesi ve sünme üzerine kinetik çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Turkey, 2007.
- [20] Puri S, Beg QK, Gupta R. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. Curr Microbiol 2002; 44: 286-290.
- [21] Sinha P, Singh RK, Srivastva R, Sharma R, Tiwari SP. Characterization and optimization of alkaline protease enzyme produced by soil borne bacteria. Trends in Life Sciences 2013; 2 (2): 38-46.
- [22] Mabrouk SS, Hashem AM, El-Shayeb NMA, Ismail AMS, Abdel-Fattah AF. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. Bioresource Technol 1999; 69: 155-159.
- [23] Sangeetha R, Geetha A, Arulpandi I. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. Internet J Microbiol 2008; Volume 5 Number 2
- [24] Sevinç N. Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye, 2010.
- [25] Mehrotra S, Pandey PK, Gaur R, Darmwal NS. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. Bioresource Technol 1999; 67: 201-203.
- [26] D'costa B, Khanolkar D, Dubey SK. Partial purification and characterization of metalloprotease of halotolerant alkaliphilic bacterium *Bacillus cereus* from coastal sediment of Goa, India. Afr J Biotechnol 2013; 12 (31): 4905-4914.
- [27] Suganthi C, Mageswari A, Karthikeyan S, Anbalagan M, Sivakumar A, Gothandam KM. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. Genet Eng Biotechnol 2013; 11: 47-52.
- [28] Yang JK, Shih IL, Tzeng YM, Wang SL. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme Microb Tech 2000; 26: 406-413.

- [29] Akcan N, Ucar F. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. Eurasian J Biosci 2011; 5: 64-72.
- [30] Shafee N, Aris SN, Rahman RNZA, Basri M, Salleh AB. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. J Appl Sci Res 2005; 1(1): 1-8.
- [31] Chu WH. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. J Ind Microbiol Biot 2007; 34: 241-245.
- [32] Guangrong H, Dehui D, Weilian H, Jiabin J. Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with a statistical method. Afr J Biotechnol 2008; 7 (8): 1115-1122.
- [33] Hindhumathi M, Vijayalakshmi S, Thankamani, V. Optimization and cultural characterization of alkalophilic protease producing *Bacillus* sp. GPA4. Research in Biotechnology 2011; 2 (4): 13-19.
- [34] Patel R, Dodia M, Singh SP. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. Process Biochem 2005; 40: 3569-3575.
- [35] Bhunia B, Basak B, Dey A. A review on production of serine alkali protease by *Bacillus* spp. J Biochem Tech 2012; 3 (4): 448-457.
- [36] Çalık P, Çalık G, Özdamar TH. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. Enzyme Microb Tech 1998; 23: 451-461.
- [37] Thiry M, Cingolani D. Optimizing scale-up fermentation process. Trends Biotechnol 2002; 20 (3): 103-105.
- [38] Nadeem M, Qazi JI, Baig S. Effect of aeration and agitation rates on alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* UV-9 mutant. Turk J Bioch 2009; 34 (2): 89-96.
- [39] Beheshti Maal K, Emtiazi G, Nahvi I. Increasing the alkaline protease activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus polymyxa* simultaneously with the start of sporulation phase as a defense mechanism. Afr J Biotechnol 2011; 10 (19): 3894-3901.
- [40] Razak CNA, Tang SW, Basri M, Salleh AB. Preliminary study on the production of extracellular protease from a newly isolated *Bacillus* sp. (No.1) and the physical factors affecting its production. Pertanika J Sci Technol 1997; 5 (2): 169-177.
- [41] Genckal H, Tari C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme Microb Tech 2006; 39:703-710.
- [42] Oskouie SFG, Tabandeh F, Yakhchali B, Eftekhari F. Enhancement of alkaline protease production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design. Afr J Biotechnol 2007; 6 (22): 2559-2564.
- [43] Ibrahim ASS, Al-Salamah AA. Optimization of media and cultivation conditions for alkaline protease production by alkaliphilic *Bacillus halodurans*. Res J Microbiol 2009; 4 (7): 251-259.

- [44] Ou JF, Zhu MJ. An overview of current and novel approaches for microbial neutral protease improvement. *Int J Modern Biol Med* 2012; 2 (1): 1-31.
- [45] Beg QK, Sahai V, Gupta R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochem* 2003; 39: 203-209.
- [46] Wu J, Deng A, Shi N, Liu S, Liang Y, Wen, T. A salt, detergent, and solvent tolerant protease from *Bacillus* sp. B001: Low-cost, easy-purified, and enhanced production by raw material based culture strategy. *Adv Biosci Biotechnol* 2013; 4: 1039:1048.
- [47] Prakasham RS, Rao CS, Rao RS, Sarma PN. Alkaline Protease Production by an Isolated *Bacillus circulans* under Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Waste: Process Parameters Optimization. *Biotechnol Progr* 2005; 21 (5): 1380-1388.
- [48] Sunitha K, Park YS, Oh TK, Lee JK. Synthesis of alkaline protease by catabolite repression-resistant *Thermoactinomyces* sp. E79 mutant. *Biotechnol Lett* 1999; 21: 155-158.
- [49] Hanlon GW, Hodges NA. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J Bacteriol* 1981; 147 (2): 427-431.
- [50] O'hara MB, Hageman JH. Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* 1990; 172 (8): 4161-4170.
- [51] Bierbaum G, Karutz M, Weuster-Botz D, Wandrey C. Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. *Appl Microbiol Biot* 1994; 40 (5): 611-617.
- [52] Fleming AB, Tangney M, Jorgensen PL, Diderichsen B, Priest FG. Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Appl Environ Microb* 1995; 61 (11): 3775-3780.