

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2015 -DR-006

Aspergillus fumigatus HBF125 EKSTRASELÜLER
 α -AMİLAZİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU

Öznur KOÇ

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Öznur KOÇ tarafından hazırlanan “*Aspergillus fumigatus* HBF125 Ekstraselüler α -Amilazının Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı tez, 09/07/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye : Prof. Dr. Tülin AYDEMİR	CBÜ
Üye : Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI	ADÜ
Üye : Doç. Dr. H. Halil BIYIK	ADÜ
Üye : Doç. Dr. Kubilay METİN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

09/07/2015

Öznur KOÇ

ÖZET

***Aspergillus fumigatus* HBF125 EKSTRASELÜLER α -AMİLAZININ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Öznur KOÇ

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kubilay METİN

2015, 190 sayfa

Çalışmamızda, 91 fungusun sıcaklık sınırları ve endüstriyel enzimlerinin taraması yapıldı. Termotolerant ve termofilik funguslardan en iyi amilaz aktivitesi gösteren *Aspergillus fumigatus* HBF125 suşu seçildi. Bu fungusun kültür koşullarının optimizasyonu yapıldı. *A. fumigatus* HBF125 suşunun en yüksek enzim üretimi için 7 günlük sporulasyon ortamı, %5 inokulum oranı, sıcaklık 35 °C, başlangıç pH 5.0 ve karbon kaynağı %1.5 kepek olarak bulundu. Optimum büyüme ortamında *A. fumigatus* HBF125 tarafından üretilen ekstraselüler amilaz, nişasta affinite kromatografisi ile %4.7 verimle 54.4 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 160 kDa olarak hesaplandı. Enzimin iki alt ünitesi olduğu; molekül ağırlıklarının 86.2 ve 73.8 kDa olduğu hesaplandı. Optimum sıcaklığı 60 °C, optimum pH'sı 5.5 olarak bulundu. Enzimin geniş pH (pH 4.0-8.0) ve sıcaklık (25-60 °C) aralığında stabil olduğu saptandı. Amilazın Km değeri 1.45 mg/mL, Vmax değeri ise 909 U/mL bulundu. Ayrıca amilazın geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu saptandı. Enzim aktivitesinin N-bromo suksinamid varlığında kuvvetli bir şekilde inhibe olduğu, bu nedenle katalitik işlemde triptofan kalıntılarının önemli rol oynadığı ileri sürüldü. Tween 20 gibi deterjanlardan enzim aktivitesinin etkilenmediği, ancak 1,4-dioksan ve n-propanol tarafından enzimin inhibe olduğu saptandı. Enzim Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} ve Ba^{2+} tarafından aktive edilirken, Hg^{2+} tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildi. Enzimin tuz toleransının çok iyi olduğu belirlendi. Amilazın metalloenzim olduğu saptandı.

Anahtar sözcükler: Termotolerant fungus, enzim üretimi, saflaştırma, karakterizasyon.

ABSTRACT

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR α -AMYLASE FROM *Aspergillus fumigatus* HBF125

Öznur KOÇ

PhD Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Kubilay METİN
2015 190 pages

In our study, screening of industrial enzymes and temperature limits of the 91 fungi was done. *Aspergillus fumigatus* HBF125 strain was chosen as the best one showing amylase activity from thermotolerant and thermophilic fungi. Culture conditions was optimized for this fungus. The best enzyme production from *A. fumigatus* HBF125 strain was determined in medium including: 7 days sporulation medium, 5% inoculum ratio, temperature 35 °C, starting pH 5.0 and 1.5% bran as carbon source. Extracellular amylase produced by *A. fumigatus* HBF125 in optimal growth medium was purified 54.4 fold with a recovery of 4.7% using starch affinity chromatography. Molecular weight of enzyme was found to be about 160 kDa by SDS-PAGE method. Those two subunits of molecule weight of the enzyme was found to be 86.2 and 73.8 kDa. The temperature and pH for maximum activity of the enzyme were 60 °C and 5.5, respectively. In a wide range of pH and temperature of the enzyme was found to be stable. It was found that the Km and Vmax of amylase were 1.45 mg/mL and Vmax 909 U/mL. In addition, the amylase exhibited broad substrate specificity. The enzyme activity was markedly inhibited in the presence of NBS suggesting that tryptophan residues play an important role in the catalytic process. The enzyme activity was not affected by detergents as Tween 20, but it was found inhibited by 1,4-dioxan and n-propanol. The enzyme by Hg²⁺ was strongly inhibited while Mn²⁺, Co²⁺, Ca²⁺ and Ba²⁺ were activated. The salt tolerance of the enzyme was found to be very good. The amylase was found to be metalloenzyme.

Keywords: Thermotolerant fungi, enzyme production, purification and characterization.

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışma süresince deneyim ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik çalışmalarımda beni her zaman destekleyen ve çalışmalarımızın her aşamasında büyük bir özveri ile katkılarını sunan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Kubilay METİN'e, doktora tez izleme komitesinde yer alan ve değerli bilgileriyle çalışmamıza katkılar sunan Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a ve Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmalarım boyunca fungus seçimi, tanılanması ve üretim aşamaları boyunca tecrübeleriyle beni yönlendiren Sayın Doç. Dr. H. Halil BIYIK' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Sayın Dr. Z. Burcu BAKIR'a, Yüksek lisans öğrencileri Nilay Ezgi ÇAKAR'a ve Sedef SOYAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda yardımcı olan Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya ve Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Fungusların moleküler tanısını yapan Yüksek lisans öğrencisi Kazım Şahin KARASÜLEYMANOĞLU'na ve Doktora öğrencisi Doğan TUNCAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla bana güç veren ve hayatıma anlam katan canım kızım Elif KOÇ'a ve canım oğlum Eren KOÇ'a, manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan sevgili annem Durnatel KOÇ, babam Asker KOÇ, ablam İlknur AKSOY'a ve akademik çalışmalarımda ve yaşantımda her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili hayat arkadaşım Bülent KOÇ'a sonsuz teşekkür ederim. Uzakta olmalarına rağmen manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme sonsuz teşekkürler.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-11013 no'lu proje ile araştırmamızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırması Projeleri Başkanlığına Teşekkür ederim.

Öznur KOÇ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xxi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Amilazlar.....	3
1.2.1. Amilazların Tarihi.....	3
1.2.2. Amilazların Sınıflandırılması.....	4
1.2.3. Amilazların Yapısı	6
1.2.4. Amilaz Enziminin Kaynakları.....	8
1.2.4.1. Mikrobiyal amilazlar	8
1.2.4.1.1. Bakteriyel amilazlar	8
1.2.4.1.2. Fungus ve maya amilazları.....	9
1.2.4.2. Bitkisel amilazlar	10
1.2.4.3. Hayvansal α -amilazlar.....	10
1.2.5. Amilaz Üretimi.....	11
1.2.5.1 Fizikokimyasal parametreler	11
1.2.6. α -Amilazların Biyokimyasal Özellikleri	13
1.2.7. Amilaz Aktivitesi Ölçüm Metotları.....	14
1.2.7.1. Nişasta-İyot renk yoğunluğunun azalması	15

1.2.7.1.1. Dekstrinleşme aktivitesinin belirlenmesi.....	15
1.2.7.1.2. Sandstedt Kneen ve Blish (SKB) metodu.....	15
1.2.7.1.3. Indian pharmcopoeia metodu	15
1.2.7.2. Dinitrosalisilik asit (DNS) metodu	16
1.2.7.3. Renkli substratın yıkımı.....	16
1.2.7.4. Nişasta substratının viskositesinin azalması.....	16
1.2.7.4.1. Falling number (düşme sayısı) analizi.....	16
1.2.7.4.2. Amilograf/Farinograf test	17
1.8. Amilaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları	17
1.8.1. Ekmek ve Kabartma Endüstrisi	18
1.8.2. Nişasta Endüstrisi	19
1.8.3. Tekstil Endüstrisi.....	21
1.8.4. Kağıt Endüstrisi	21
1.8.5. Deterjan Endüstrisi	22
1.8.6. Medikal ve Klinik Kimya Analizleri	23
1.8.7. İçecek Endüstrisi	23
1.8.8. Etanol Üretimi	24
1.9. Nişasta	24
1.10. Çalışmanın Kapsamı ve Amacı	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	27
2.1. Amilazların Kültür Koşulları.....	27
2.1.1. Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	27
2.1.2. Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	27
2.1.3. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	28
2.1.4. Amilaz Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi.....	29
2.1.5. Amilaz Üretimi Üzerine İnokulum Yaşı ve İnokulum Miktarının Etkisi.....	30

2.1.6. Amilaz Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	31
2.2. Amilazların Saflaştırılması.....	32
2.3. Amilazların Aktivite ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi	35
2.4. Amilazların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi.....	36
2.5. Amilazların Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	38
2.6. Amilazların Substrat Özgüllüğü.....	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Materyaller	43
3.1.1. Kimyasallar	43
3.1.2. Mikroorganizma	44
3.2. Yöntemler.....	44
3.2.1. Fungusların Sıcaklık Sınırının Belirlenmesi	44
3.2.2. Kalitatif Lipolitik, Amilolitik, Proteolitik, Selüloolitik ve Üreolitik Aktivite Tayini	44
3.2.2.1. Lipolitik aktivite tayini	44
3.2.2.2. Amilolitik aktivite tayini	45
3.2.2.3. Proteolitik aktivite tayini	45
3.2.2.4. Selüloolitik aktivite tayini	46
3.2.2.5. Üreolitik aktivite tayini	46
3.2.3. Aflatoksin Testi.....	46
3.2.4. Seçilen Fungusların Toksin Üretme Yeteneklerinin Görüntülenmesi	47
3.2.5. Mikroorganizmanın seçimi	47
3.2.5.1. Sporulasyon ve kültür ortamı	47
3.2.5.2. İnce tabaka kromatografisi (TLC).....	48
3.2.5.3. Ham enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	49
3.2.5.4. Ham enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	49
3.2.5.5. Enzimlerin elektroforetik olarak görüntülenmesi.....	50

3.2.6. Fungusdan Genomik DNA İzolasyonu.....	50
3.2.6.1. İzole edilen fungusların moleküler tanılanması.....	50
3.2.7. Amilaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini	51
3.2.8. Maltoz Standart Grafiği ve Hazırlanışı.....	52
3.2.9. Kültür ortamının Redüktör Şeker Tayini.....	53
3.2.10. Protein Tayini	54
3.2.10.1. Commasie Brilliant Blue G-250 çözeltisinin hazırlanışı	54
3.2.10.2. Protein standart grafiğinin hazırlanışı.....	54
3.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125'in Amilaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	56
3.3.1. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	56
3.3.2. Amilaz Üretimi Üzerine Ortam pH'sının Etkisi.....	56
3.3.3. Amilaz Üretimi Üzerine İnokulum Yaşının Etkisi	57
3.3.4. Amilaz Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi	57
3.3.5. Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	58
3.3.5.1. Amilaz üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı oranının belirlenmesi	58
3.3.6. Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi	58
3.3.7. <i>A. fumigatus</i> HBF125'in Büyüme Eğrisi ve Enzim üretimi	59
3.3.7.1. Kültür ortamına salınan enzim üretiminin elektroforetik olarak izlenmesi	59
3.3.7.2. Proteaz aktivitesinin ölçümü	60
3.3.7.3. Amilazın proteolitik hidrolizinin saptanması	60
3.3.8. Ham Nişasta Adsorpsiyonu	60
3.3.9. Amilazın Saflaştırılması	61
3.3.9.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	62
3.3.9.2. Diyaliz	62

3.3.9.3. Ultrafiltrasyon	63
3.3.9.4. Nişasta affinite kolon kromatografisi	63
3.3.10. Elektroforez ve Zimografi.....	64
3.3.10.1. Amilazın molekül ağırlığının belirlenmesi	64
3.3.10.2. PAGE ve SDS-PAGE için gerekli çözeltiler.....	64
3.3.10.3. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı.....	67
3.3.10.4. Jelin boyanması.....	67
3.3.10.5. Zimografi.....	67
3.3.10.6. Amilazın molekül ağırlığının hesaplanması.....	67
3.4. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125 Amilazının Karakterizasyonu	68
3.4.1. Amilaz Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	68
3.4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	68
3.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	68
3.4.4. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	69
3.4.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi	69
3.4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	69
3.4.7. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	70
3.4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlar ve EDTA'nın Etkisi	70
3.4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denaturantların Etkisi.....	72
3.4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi	73
3.4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi.....	75
3.4.12. Enzim Aktivitesi Üzerine CaCl ₂ Etkisi	75
3.4.13. Enzimin Tuz Toleransı	75
3.4.14. Verilerin Değerlendirilmesi	75
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	76
4.1. Fungusların Sıcaklık Sınırının Belirlenmesi	76

4.2. Kalitatif Lipolitik, Amilolitik, Proteolitik, Selüloolitik ve Üreolitik Aktivite Tayini	78
4.3. Aflatoksin	81
4.4. Seçilen Fungusların Toksin Üretme Yeteneklerinin Görüntülenmesi	83
4.5. Mikroorganizmanın Seçimi	84
4.5.1. Amilaz Kültür Ortamında Enzim Üretimi	84
4.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	86
4.5.3. Ham Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi	87
4.5.4. Enzimlerin Elektroforetik Olarak Görüntülenmesi	88
4.6. Fungusun Moleküler Tanısı.....	89
4.7. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125'in Amilaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	90
4.7.1. Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	91
4.7.2. Enzim Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi	94
4.7.3. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Yaşının Etkisi	97
4.7.4. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi.....	99
4.7.5. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi	102
4.7.5.1. Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı oranının belirlenmesi	105
4.7.6. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi	107
4.7.7. <i>A.fumigatus</i> HBF125'in Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi	111
4.7.7.1. Kültür ortamına salınan enzim üretiminin elektroforetik olarak izlenmesi	115
4.7.7.2. Amilazın proteolitik hidrolizinin saptanması	115
4.8. Ham Nişasta Adsorpsiyonu	118
4.9. Amilazın Saflaştırılması	119
4.9.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	119
4.9.2. Nişasta Affinite Kolon Kromatografisi	121

4.9.3. Elektroforez ve Zimografi.....	124
4.10. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125 Amilazının Karakterizasyonu	129
4.10.1. Amilaz Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	129
4.10.2. Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	131
4.10.3. Amilaz Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	133
4.10.4. Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	138
4.10.5. Amilaz Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	140
4.10.6. Amilaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	143
4.10.7. Amilazın Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi.....	144
4.10.8. Amilaz Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	146
4.10.9. Amilaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör ve Denaturantların Etkisi.....	151
4.10.10. Amilaz Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi.....	155
4.10.11. Amilaz Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi	157
4.10.12. Amilaz Aktivitesi Üzerine CaCl ₂ Etkisi	159
4.10.13. Amilazın Tuz Toleransı.....	161
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	163
KAYNAKLAR	167
ÖZGEÇMİŞ	187

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
APS	Amonyum persülfat
β	Beta
BSA	Sığır serum albumini
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
cm	Santimetre
CMC	Sikloheksil-N-(2-morfolionetil)-karboimid metil-p-toluen sulfonat
Da	Dalton
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
G	Gün
g	Gram
g	Yer çekimi ivmesi
HBF	Halil Bıyık Fungus
IU	Uluslararası enzim ünitesi
IAA	İodoasetamid
ITS	Internal Transcribed Spacer
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis- Menten sabitesi
L	Litre
MEA	Malt ekstrakt agar
mL	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar

μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NBS	N-bromo suksinamid
nm	Nanometre
Ort	Ortalama
OD	Optik yoğunluk
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
[S]	Substrat Konsantrasyonu
S.H.	Standart Hata
SH grubu	Sülfidril grubu
sp.	Tür
TEMED	N,N, N',N'- Tetrametiletildiamin
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TCA	Trikloro asetik asit
U	Enzim ünitesi
UV	Ultraviyole
V_{max}	Maksimum enzim aktitesi
vd.	ve diğerleri
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nişastayı parçalayan farklı enzimlerin fonksiyonları	5
Şekil 1.2. Amilazların üç boyutlu yapısı	7
Şekil 1.3. Yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi	20
Şekil 1.4. Amiloz ve Amilopektinin kimyasal yapısı.....	25
Şekil 3.1. Standart maltoz grafiği.....	53
Şekil 3.2. Makro protein standart grafiği (5-200 µg)	55
Şekil 3.3. Mikro protein standart grafiği (1-10 µg).....	56
Şekil 4.1. Lipolitik aktivite.....	80
Şekil 4.2. Amilolitik aktivite.....	80
Şekil 4.3. Proteolitik aktivite.....	80
Şekil 4.4. Selüloolitik aktivite.....	81
Şekil 4.5. Üreolitik aktivite.....	81
Şekil 4.6. Aflatoksin test	82
Şekil 4.7. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi görüntüsü	86
Şekil 4.8. <i>A. fumigatus</i> HBF125 ve HBF126 ham amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	87
Şekil 4.9. <i>A. fumigatus</i> HBF125 ve HBF126 ham amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	88
Şekil 4.10. Ham enzim PAGE zimogram görüntüsü	89
Şekil 4.11. <i>A. fumigatus</i> HBF125 ITS gen bölgesinin dizileri ile en yüksek homoloji gösteren GENBANK'daki dizilerle elde edilmiş neighbor joining ağacı	90
Şekil 4.12. Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	92
Şekil 4.13. Kültür ortamında meydana gelen sporlanma	92
Şekil 4.14. Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisi	95
Şekil 4.15. Enzim üretimi üzerine inokulum yaşının etkisi	97
Şekil 4.16. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi	99
Şekil 4.17. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi	105

Şekil 4.18. Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı (kepek) oranının etkisi	107
Şekil 4.19. Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi	108
Şekil 4.20. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125'in zamana bağlı büyüme eğrisi ve enzim üretimi	113
Şekil 4.21. Kültür ortamında günlük enzim üretiminin görüntülenmesi	115
Şekil 4.22. Amilazın proteolitik hidrolizi	116
Şekil 4.23. <i>A. fumigatus</i> HBF125 proteazının nişasta affinite kolon kromatografisi ile saflaştırılması	117
Şekil 4.24. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilazının nişasta affinite kolon kromatografisi ile saflaştırılması	122
Şekil 4.25. Saflaştırma adımlarının PAGE ve zimogram görüntüleri	127
Şekil 4.26. Saflaştırma adımlarının SDS-PAGE ve zimogram görüntüleri	128
Şekil 4.27. SDS-PAGE protein standart eğrisi	129
Şekil 4.28. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	130
Şekil 4.29. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi... ..	132
Şekil 4.30. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (25, 40, 50, 60 ve 70 °C) stabilitesi	137
Şekil 4.31. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (70 ve 80 °C) stabilitesi	137
Şekil 4.32. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	139
Şekil 4.33. α -Amilazın farklı pH'lardaki stabilitesi	141
Şekil 4.34. α -Amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Linewear-Burk Grafiği)	144
Şekil 4.35. α -Amilaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi... ..	150
Şekil 4.36. α -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatüranların etkisi	154
Şekil 4.37. α -Amilaz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	156
Şekil 4.38. α -Amilaz aktivitesi üzerine deterjanların etkisi	159
Şekil 4.39. α -Amilaz aktivitesi üzerine CaCl ₂ etkisi	160
Şekil 4.40. α -Amilazın tuz toleransı	162

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Glikozid hidrolaz aile 13 enzimleri.....	4
Çizelge 1.2. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler ve kullanım alanları.....	18
Çizelge 2.1. Mikroorganizmaların amilaz üretimi için kullanılan farklı karbon kaynakları	27
Çizelge 2.2. Mikroorganizmaların amilaz üretimi için kullanılan farklı azot kaynakları	28
Çizelge 2.3. Mikroorganizmaların amilaz üretme sıcaklıkları	29
Çizelge 2.4. Mikroorganizmaların amilaz üretme pH'ları	30
Çizelge 2.5. Mikroorganizmaların amilaz üretimi için kullanılan inokulum miktarları	31
Çizelge 2.6. Mikroorganizmaların amilaz üretim süreleri	32
Çizelge 2.7. Amilazların saflaştırma yöntemleri ve molekül ağırlıkları	33
Çizelge 3.1. Amilaz kültür ortamı.....	48
Çizelge 3.2. Ham enzim aktivitesi için standart deney ortamı içeriği.....	48
Çizelge 3.3. ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı.....	51
Çizelge 3.4. Amilaz enzim aktivitesi için standart deney karışımı	52
Çizelge 3.5. DNS çözeltilisinin bileşenleri.....	52
Çizelge 3.6. Redüktör şeker miktarının ölçümü.....	53
Çizelge 3.7. Kültür ortamının redüktör şeker miktarının tayini	54
Çizelge 3.8. Proteaz standart deney ortamı bileşenleri	60
Çizelge 3.9. Diyaliz torbasının ön işleminden geçirilişi	63
Çizelge 3.10. Ayırma jelinin (%7.5) içeriği	66
Çizelge 3.11. Yoğunlaştırma jelinin (%4) içeriği	66
Çizelge 3.12. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı	71
Çizelge 3.13. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı	71
Çizelge 3.14. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı	72

Çizelge 3.15. 1 mM inhibitör ve denatüran içeren deney ortamı	73
Çizelge 3.16. 5 mM inhibitör ve denatüran içeren deney ortamı	73
Çizelge 3.17. %10 organik çözücü içeren deney ortamı	74
Çizelge 3.18. %20 organik çözücü içeren deney ortamı	74
Çizelge 4.1. Fungusların sıcaklık tarama sonuçları	76
Çizelge 4.2. Kalitatif enzim tarama sonuçları	79
Çizelge 4.3. Aflatoksin test sonuçları	82
Çizelge 4.4. Toksin üretme yeteneklerinin belirlenmesi	83
Çizelge 4.5. Fungusların amilaz kültür ortamında enzim üretme yeteneklerinin karşılaştırılması	85
Çizelge 4.6. Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	93
Çizelge 4.7. Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisi	96
Çizelge 4.8. Enzim üretimi üzerine inokulum yaşının etkisi	98
Çizelge 4.9. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi	101
Çizelge 4.10. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi	104
Çizelge 4.11. Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı (kepek) oranının etkisi	106
Çizelge 4.12. Enzim üretimi üzerine azot kaynağı oranının etkisi	110
Çizelge 4.13. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125'in büyüme eğrisi	114
Çizelge 4.14. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilazının farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı	118
Çizelge 4.15. Amonyum sülfat çöktürme basamakları	120
Çizelge 4.16. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilazının saflaştırma adımları	123
Çizelge 4.17. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin zamanının etkisi	130
Çizelge 4.18. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	132
Çizelge 4.19. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (25, 40 ve 50 °C) stabilitesi	135

Çizelge 4.20. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (60, 70 ve 80 °C) stabilitesi	136
Çizelge 4.21. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ..	139
Çizelge 4.22. α -Amilazın farklı pH'lardaki stabilitesi	142
Çizelge 4.23. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125 α -amilazının farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite %	142
Çizelge 4.24. <i>A. fumigatus</i> HBF125 α -amilazının substrat spesifitesi	145
Çizelge 4.25. <i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125 α -amilazının farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi	149
Çizelge 4.26. α -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatürantların etkisi	153
Çizelge 4.27. α -Amilaz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	156
Çizelge 4.28. α -Amilaz aktivitesi üzerine deterjanların etkisi	158
Çizelge 4.29. α -Amilaz aktivitesi üzerine CaCl ₂ etkisi	160
Çizelge 4.30. α -Amilaz aktivitesi üzerine NaCl etkisi	162

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler globuler proteinlerdir ve diğer proteinlerde olduğu gibi üç boyutlu yapıları amino asit zincirlerinin katlanmasıyla oluşur. Enzimlerin yapı ve özellikleri kendilerine özgü amino asit dizileri tarafından belirlenir.

Enzimler tüm canlılarda pek çok biyokimyasal reaksiyondan sorumludur. Enzimler farklı fonksiyonları ile biyokimyasal reaksiyonları hızlandırır ve reaksiyon sonunda değişime uğramadan çıkarlar. Bu katalitik özellikleri enzimleri benzersiz kılmaktadır. Yüksek seçici özellikleri ile biyokatalizör olan enzimler yüzyıllardır yiyecek endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca tekstil, deterjan, ilaç ve kâğıt gibi diğer pek çok endüstride de önemli bir rol oynarlar.

Enzimler mevcut kimyasal süreçleri hızlandırır ve reaksiyon tamamlandıktan sonra tekrar serbest kalarak, başka bir reaksiyonu başlatabilirler. Pek çok enzim endüstride çoğunlukla bir kez kullanılır ve katalitik eylemden sonra atılır. Katalitik özellik gösteren bazı RNA enzimleri (ribozimler) hariç, bilinen bütün enzimler protein yapısında veya bir kısmı protein olan biyomoleküllerdir. Bir veya daha fazla polipeptit zincirlerinden oluşmalarından dolayı, proteinlerin tipik özelliklerini gösterirler. Bazı enzimler katalitik fonksiyonları için, kofaktör veya koenzim olarak bilinen, protein olmayan küçük moleküllere gereksinim duyar (Mojsov, 2012).

Enzimler genellikle ılımlı sıcaklıklarda aktiftirler. Belirli bir sıcaklığın üzerinde enzimlerin üç boyutlu yapısı bozulmaktadır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği belli bir pH değerleri vardır. Ekstrem pH değerlerinde elektrostatik etkileşimlerden etkilenir ve inaktif olurlar. Enzimatik işlemleri etkileyen diğer önemli faktörler de enzim ve substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, deterjanlar, metal iyonları, şelatörler gibi katkı maddeleri ve mekanik streştir.

Enzimlerin etki ettiği moleküle “substrat” denir ve enzimler substratı ürün veya ürünlere dönüştürür. Enzimler substratlara özgüdürler. Enzimlerin adlandırılmaları etkilediği maddenin isminin sonuna -az (-ase) eki getirilerek yapılır.

Enzimlerin primer yapısı genomun ilgili genlerince belirlenir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Nişastayı basit şekerlere yıkan amilazlar, proteinleri yıkan proteazlar, selülozu parçalayan selülazlar, yağları yağ asidi ve gliserole parçalayan lipazlar yaygın olarak bilinen enzimlerdir.

Bir hücrede her reaksiyon türü için farklı bir enzim vardır. Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olarak isimlendirilen 6 grupta bulunurlar. Enzimlerin temel özelliği katalitik fonksiyonlarıdır. Enzimlerin sınıflandırılması katalitik fonksiyona göre yapılır. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) keşfedilen binlerce enzimi düzenlemek ve sistematik olarak kullanılacak bir adlandırma sistemi oluşturmak için, 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonunu (E.C.) kurmuştur.

E.C. sınıflandırma sistemine göre enzimler temel fonksiyonlarına göre 6 sınıfa ayrılmıştır:

E.C.1. Oksidoredüktaz: Oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.

E.C.2. Transferazlar: Fonksiyonel grupları transfer eder.

E.C.3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini katalizler.

E.C.4. Liyazlar: Hidrolizleme ve oksitleme dışında çeşitli bağları kırar.

E.C.5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki izomerleşme değişimlerini katalizler.

E.C.6. Ligazlar: İki molekül arasında kovalent bağ oluşturur.

Her enzim EC ile başlayan 4 farklı numara ile ifade edilir. İlk numara katalitik fonksiyona dayanan enzim sınıfını gösterir. İkinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını gösterir. ATP:glukoz fosfotransferazın kod numarası (EC numarası) 2.7.1.1 dir. Birinci rakam, tepkimenin tipi veya sınıf adını (2; transferaz); ikinci rakam, donörün ilgili grubunu belirten alt sınıfını (7; fosfotransferaz); üçüncü rakam, akseptörün ilgili grubunu (1; -CH-OH); dördüncü rakam akseptör olan substratını (1; glukoz) ifade eder (Nelson ve Cox, 2004).

1.2. Amilazlar

Bütün α -amilazlar (E.C. 3.2.1.1) hidrolaz sınıfında olan ve nişasta yıkıcı enzimlerdir. Başlıca α -1,4-glikozidik bağları etkileyerek nişastadan glukoz, maltoz ve maltotrioz gibi düşük molekül ağırlıklı ürünler oluştururlar. Nişasta yıkıcı amilolitik enzimler gıda, fermantasyon, tekstil, kağıt, ilaç, şeker sanayisi gibi değişen bir çok biyoteknolojik uygulamalarda büyük önem taşımaktadır. Nişastanın şeker, şurup ve dekstrin dönüşümü nişasta işleme endüstrisinin büyük bölümünü oluşturmaktadır (Gupta vd., 2003). Mikroorganizmaların çeşitli endüstriyel enzimlerin üretilmelerinde önemli katkıları vardır. Endüstriyel enzimlerin dünya pazarında 2010 yılında 2 milyar dolar olduğu tahmin edilmiş ve yıllık %3.3 oranında ortalama büyüme göstereceği öngörülmüştür (Naidu ve Saranraj, 2013). Amilazlar dünya enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturan önemli enzimler arasındadır ve biyoteknolojide büyük önem taşımaktadır (Nguyen vd., 2002; Rajagopalan ve Krishnan, 2008; Reddy vd., 2003). Enzimlerin endüstriyel üretimi, üretim ortamında düşük maliyetli tarımsal ürünler kullanılarak daha az maliyetle yapılabilir (Rajagopalan ve Krishnan 2008).

1.2.1. Amilazların Tarihi

Amilaz terimi Yunanca bir kelime olan ve nişasta anlamına gelen "Amilon" kelimesinden türemiştir. Amilazların tarihi, Kirchoff'un 1811'de nişasta parçalayan ilk enzimi keşfetmesiyle başlamıştır (Gupta vd., 2003). 1833 yılında Anselme Payen ve Jean-Francois Persoz, arpadan nişastanın parçalanmasından sorumlu enzimi izole etmiş ve "diastaz" olarak isimlendirmişlerdir. "Diastasis" Yunanca bir kelime olup ayırma anlamına gelmektedir. Magendie tarafından 1846 yılında amilaz kanda bulunmuş ve 1867 yılında da Foster tarafından ilk kez hayvanlarda kantitatif olarak ölçülmüştür. 1916 yılında Stocks, kan ve idrarda amilaz aktivitesinin çeşitli pankreatik düzensizlikler için hassas ve güvenilir bir test olduğunu bildirmiştir (Salt ve Schenker, 1976). 1930'lara gelindiğinde Ohlsson malttaki nişasta sindiren enzimlerin, enzim reaksiyonu sonucunda ürettikleri anomerik şeker tiplerine göre α ve β amilazlar olarak sınıflandırılmasını önermiştir (Gupta vd., 2003). Endüstriyel ilk enzim üretimi daha sonra sindirim bozukluklarını tedavi etmek amacıyla ilaç olarak kullanılan ve 1984 yılında fungal bir kaynaktan elde edilen amilazdır (Mojsov, 2012).

1.2.2. Amilazların Sınıflandırılması

Amilazlar glikozid hidrolaz grubu 13 (GH-13) olarak isimlendirilen gruba dâhildir. Amilaz ailesi enzimleri, geniş bir uygulama alanına sahip olmalarından dolayı büyük bir öneme sahiptir (Henrissat, 1991). En çok bilinen amilazlar α -amilaz (EC 3.2.1.1), β -amilaz (EC 3.2.1.2) ve glukoamilazdır (EC 3.2.1.3) (Janeček, 2009). Primer ve tersiyer yapıları birbirlerinden farklı olan bu enzimlerin, ayrıca katalitik merkezleri ve reaksiyon mekanizmaları da farklıdır. Bu nedenle farklı glikozid hidrolaz grupları içinde sınıflandırılırlar. Bu sınıflar GH13- α -amilazlar, GH14- β -amilazlar ve GH15-glukoamilazlardır (Henrissat, 1991). Sekans benzerliğine dayanılarak yapılan glikoliz hidrolazların sınıflandırılmasında 85 farklı aile tanımlanmıştır. Henrissat'ın (1991) bildirdiğine göre, α -amilaz ailesi veya aile 13 glikozid hidrolazlara ait nişasta hidrolizleyen enzimlerin çoğu amino asit sekans benzerliğine göre sınıflandırılır (Henrissat, 1993). α -Amilaz ailesi, transferaz ve izomerazları içeren yaklaşık 30 farklı özgülükte enzim bulunduran glikozid hidrolazların en geniş ailesidir (Çizelge 1.1). Enzimlerin büyük kısmı nişastaya etki etmektedir.

Çizelge 1.1. Glikozid hidrolaz aile 13 enzimleri (Reddy vd., 2003; Mojsov, 2012).

Enzim	EC numarası	Ana substrat
Amilosukraz	EC 2.4.1.4	Sukroz
Sukroz fosforilaz	EC 2.4.1.7	Sukroz
Glukan dallandıran enzim	EC 2.4.1.18	Nişasta, glikojen
Siklomaltodekstrin glikoziltransferaz	EC 2.4.1.19	Nişasta
Amilomaltaz	EC 2.4.1.25	Nişasta, glikojen
Maltopentahidrolaz	EC 3.2.1.-	Nişasta
Alfa-amilaz	EC 3.2.1.1	Nişasta
Oligo-1,6-glukozidaz	EC 3.2.1.10	1,6-alpha-D-glukozidik bağları içeren bazı oligosakkaritler
Alfa-glukozidaz	EC 3.2.1.20	Nişasta
Amilopullulanaz	EC 3.2.1.41	Pullulan
Siklomaltodekstrinaz	EC 3.2.1.54	Doğrusal ve siklo maltodekstrin
Isopullulanaz	EC 3.2.1.57	Pullulan
Isoamilaz	EC 3.2.1.68	Amilopektin
Maltotetrahidrolaz	EC 3.2.1.60	Nişasta
Glukodekstranaz	EC 3.2.1.70	Nişasta
Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	EC 3.2.1.93	Trehaloz
Maltoheksohidrolaz	EC 3.2.1.98	Nişasta
Maltogenik amilaz	EC 3.2.1.133	Nişasta
Neopullulanaz	EC 3.2.1.135	Pullulan
Malto-oligosil trehaloz hidrolaz	EC 3.2.1.141	Trehaloz
Malto-oligosil trehaloz sentaz	EC 5.4.99.15	Maltoz

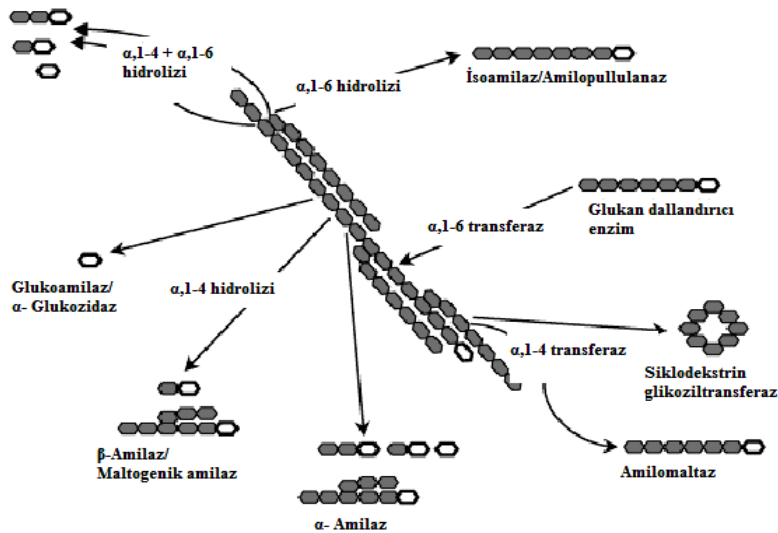
Nişastanın yıkımından sorumlu amilaz enzimleri basit olarak da dört grupta sınıflandırılabilir (Van der Maarel vd., 2002).

1. Endoamilazlar: Nişasta içindeki α -1,4 bağlarını hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda α -anomerik ürünler oluşturur (α -amilaz).

2. Ekzoamilazlar: Nişasta molekülündeki α -1,4 veya α -1,6 bağlarını redükleyici olmayan uçtan başlayarak hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda α - veya β -anomerik ürünler oluştururlar (β -amilaz, glukoamilaz).

3. Dal kırıcı enzimler: Nişasta (amilopektin) ve dallanmış polisakkaritlerin sadece α -1,6 bağlarını hidroliz etmek için özgülüdürler ve bu enzimlerin katalizi ile uzun zincirli polisakkaritler oluşur (isoamilaz, pullanaz).

4. Transferazlar: Donör molekülün α -1,4 glikozidik bağını ayırır ve ayrılan bu parçayı yeni bir glikozidik bağ ile glikozidik bir akseptöre bağlar (amilomaltaz, siklodekstrin glikoziltransferaz).



Şekil 1.1. Nişastayı parçalayan farklı enzimlerin fonksiyonları (Van der Maarel vd., 2002).

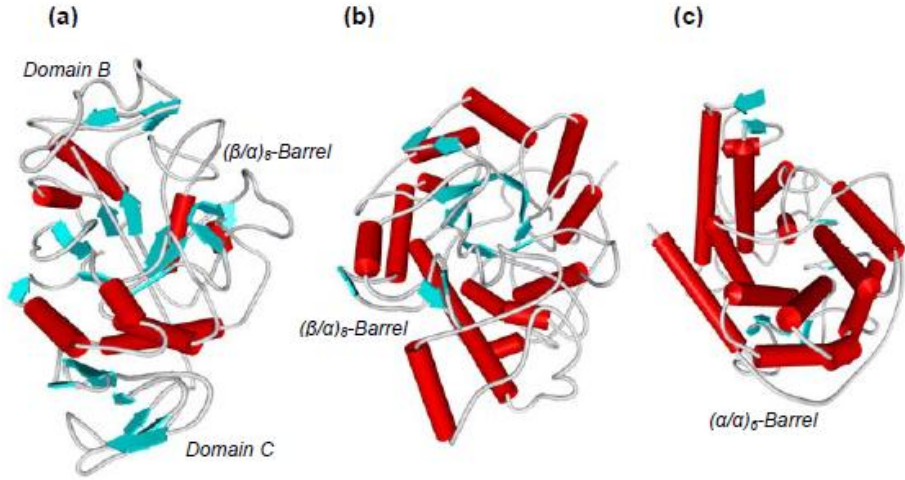
1.2.3. Amilazların Yapısı

Memeli ve bakteri α -amilazları üzerinde yapılan X-ışını çalışmaları sonucunda A, B ve C olarak isimlendirilen üç bölge içerdiklerini göstermiştir (Şekil 1.2).

A bölgesi, molekülün çekirdeği olarak $(\alpha/\beta)_8$ TIM-barrel formundan oluşur ve üç aktif amino asit kalıntısı içermektedir (Asp231, Glu261 ve Asp328). Glu261'in reaksiyon mekanizmasında hidrojen vericisi olduğu düşünülmekte ve Asp231'in ise iyi bir nükleofil olduğu saptanmıştır. Bu bölge aynı zamanda molekülün katalitik bölgesidir ve N-terminal kısmını içermektedir. B ve C bölgeleri tahminen TIM-barrel bölgesinin karşılıklı yanlarında yerleşmişlerdir.

B bölgesi TIM-barrel yapısının üç sarmal ve üç plaka formunun arasında yerleşmiştir (Reddy vd., 2003; Nielsen ve Borchert, 2000). B bölgesi düzensiz ve zengin β -yapısına sahiptir ve de yapısı ve büyüklüğü α -amilaz ailesinin çeşitli üyeleri arasında önemli ölçüde değişir. B bölgesi substrat bağlanma bölgesini içerir ve muhtemelen α -amilazlar arasında substrat özgülüğündeki farklılıklardan ve stabiliteden sorumludur.

C bölgesi, Yunan anahtar motifini içeren β -sandviç bölgesidir ve amino asit dizisinin C-terminal kısmından oluşur (Nielsen ve Borchert, 2000). Memeli α -amilazları birkaç disülfid köprüsü içerirken, bakteri enzimlerinde genellikle bu yoktur. Antartika deniz suyunda gelişen ve bir bakteri olan *Alteromonas haloplanctis*'in α -amilazı dört disülfid köprüsü içermesiyle memeli amilazlarına benzerlik gösterir (Nielsen ve Brochert, 2000). En çok bilinen amilolitik enzimler α -amilaz (EC 3.2.1.1), β -amilaz (EC 3.2.1.2) ve glukoamilazdır (EC 3.2.1.3). Primer ve tersiyer yapıları birbirlerinden farklı olan bu enzimlerin ayrıca katalitik merkezleri ve reaksiyon mekanizmaları da farklıdır (Janeček, 2009).



Şekil 1.2. Amilazların üç boyutlu yapısı. (a) GH13 *Aspergillus oryzae* α -amilazı (b) GH14 soya fasulyesi β -amilazı (c) GH15 *Aspergillus awamori* glukoamilazı (Janeček, 2009).

α -Amilazlarda kalsiyum iyonlarının bulunduğu ve A ile B bölgesi arasındaki yüzeyde yer aldığı ve ayrıca aktif enzimin stabilitesini sağladığı bilinmektedir. Kalsiyum iyonları, kataliz olayına doğrudan doğruya katılan aktif bölgenin çok uzağında olmasına rağmen, kataliz olayında yapısal bir öneme sahiptir. α -Amilazların yapılarında bir veya daha fazla kalsiyum iyonu bulunabilir (Nielsen ve Brochert, 2000).

Birkaç α -amilazın aktif bölgede klorür iyonları içerdiği bilinmektedir. Klorür iyonlarının, aktif bölge içindeki hidrojen verici amino asit kalıntılarının pKa'sını yükselterek enzimin katalitik verimini arttırdığı tahmin edilmektedir. Klorür iyonları, özellikle memeli α -amilazında bulunur. Bunun yanı sıra klorür iyonları *Alteromonas haloplanctis* bakterisinin psikrofilik α -amilazında da bulunmuştur (Aghajari vd., 1998). Korunmuş kalsiyum iyonlarının afinitesinin klorürün bağlanmasıyla önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir ve bu nedenle klorür iyonunun bağlanması, aynı zamanda aktif bölge etrafında konformasyonel değişikliklere neden olur. Klorür içeren α -amilazların ilginç bir özelliği de A ve C bölgeleri arasındaki iç yüzeyde serin proteazlardaki gibi Glu-His-Ser üçlüsü vardır. Aghajari ve arkadaşları (1998) bu üçlünün otoproteolitik parçalama yeteneğine sahip olduğunu öne sürmüş olsalar da, henüz kanıtlanmış bir bilgi yoktur.

1.2.4. Amilaz Enziminin Kaynakları

Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi pek çok kaynaktan elde edilebilirler. Mikrobiyal amilazlar günümüzde büyük miktarda ticari olarak üretilir. Nişasta işleme endüstrisinde mikrobiyal enzimler, kimyasal hidrolizin yerini tamamen almıştır.

1.2.4.1. Mikrobiyal amilazlar

Mikrobiyal amilazların geniş bir endüstriyel uygulamaya sahip olmasının nedeni, bitki ve hayvan α -amilazlarından daha stabil olmalarıdır. Mikroorganizmalardan üretilen amilazların kullanımının ana avantajı ekonomik üretim kapasitesi ve istenilen özellikteki enzimlerin elde edilebilmesinin kolay olmasıdır. Bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olması gerekmektedir (Wiseman, 1987).

Endüstriyel kaynaklı enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987).

1.2.4.1.1. Bakteriye amilazlar

α -Amilazlar mikroorganizmaların farklı türleri tarafından üretilirler. Fakat amilazların ticari uygulamaları için genellikle *Bacillus* genusu kullanılmaktadır. *Bacillus* genusu endüstriyel öneme sahip amilazlar ve proteazlar gibi ekstraselüler enzimleri büyük miktarda üretir.

Bakteri amilazları birkaç karakteristik avantajından dolayı fungal amilazlara göre tercih edilirler. Başlıca *B. subtilis*, *B. stearthermophilus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* gibi *Bacillus* sp. soyları iyi amilaz üreticileri olarak kullanılırlar. Elde edilen enzimin gıda, fermantasyon, tekstil ve kağıt endüstrilerinde uygulama alanları bulunur (Souza vd., 2010).

Termostabilite endüstriyel enzimlerde istenilen bir özelliktir. Termofilik organizmalardan elde edilen termostabil enzimler stabilitelelerinden dolayı bir dizi endüstriyel uygulamalarda kullanılırlar. Nişasta endüstrisinde, glukoz ve maltoz şuruplarını elde etmek için bu enzimler kullanılmaktadır. Nişastanın yüksek sıcaklıklarda jelatinleştirilmesi (100-110°C) ve sıvılaştırması (80-90°C) için termofilik ve termostabil α -amilazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Sindhu vd., 1997; Reddy vd., 2003). *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* en iyi bilinen termostabil amilaz üreticileridir ve çeşitli uygulamalar için ticari olarak üretilir ve kullanılırlar (Souza vd., 2010). Termofiller tarafından üretilen enzimlerin kullanılması ile mezofillerin oluşturduğu kontaminasyon riskini azaltma avantajı oluşturur. Halofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler yüksek tuz oranlarında stabil oldukları için, yüksek tuz konsantrasyonları gerektiren sert endüstriyel işlemlerde kullanıma uygundur (Sundarram vd., 2014).

1.2.4.1.2. Fungus ve maya amilazları

α -Amilazlar birkaç fungus ve mayadan elde edilmiştir. Fungus ve bakteri kaynaklı enzimlerin endüstriyel işlemlere uygunluğu bilinmektedir. Amilaz üreten mezofilik funguslarla ilgili birkaç çalışma vardır. Bu çalışmalar ticari ölçekte üretim yapan uygun özellikte fungusu seçmek ve kültürel koşulların özelliğini belirlemek için yapılmıştır (Gupta vd., 2003). Fungal kaynaklar çoğunlukla *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi karasal kaynaklar ile sınırlıdır. *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* gibi ipliksi funguslar endüstride yaygın olarak kullanılan enzimleri önemli miktarda üretirler. *Aspergillus oryzae* ticari olarak α -amilaz üretiminde kullanılır ve sitrik asit ile asetik asit gibi organik asitler ve soya sosu gibi gıda maddelerinin üretiminde büyük ölçüde kullanılır. *Aspergillus niger* amilaz üretiminde önemli hidrolitik kapasiteleri vardır. Asit toleransları ile bakteri kirliliğini önler (Souza vd., 2010). *Aspergillus* genusunun *A. flavus*, *A. tamarie*, *A. fumigatus* ve *A. kawachii* gibi farklı türleri de amilaz üretimi için sıklıkla kullanılır (Hussain vd., 2013)

Fungal amilazlar GRAS (Generally Recognized As Safe: Genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde kabul gördüğü için, diğer mikrobiyal kaynaklara göre tercih edilirler (Gupta vd., 2003; Mobini-Dehkordi ve Javan, 2012). Fungal amilazlar 40 ile 60 °C arasında etkilidir ve optimum sıcaklıkları 50 °C'dir (Kumar vd., 2013). Ökaryotik organizmalar arasında sadece birkaç fungus türü 45 ile 55

°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilme yeteneğine sahiptir. Minimum ve maksimum büyüme sıcaklıkları temel alınarak bu tür mantarlar termofilik ve termotolerant türler olarak ayırt edilirler. Termofilik funguslar, en düşük 20 °C, en yüksek 60 °C, en iyi ise 40-55 °C arasında üreyebilirken, termotolerant funguslar ise en iyi 25-40 °C arasında ve 50 °C de ise yavaş üreyebilmektedir (Halil ve Kalkancı, 2008). Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* iyi bir amilaz üreticisidir (Mobini-Dehkordi ve Javan, 2012). Amilaz üretiminde kullanılan mayalar *Saccharomyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Filobasidium capsuligenum*' dur (Mojsov, 2012).

1.2.4.2. Bitkisel amilazlar

Her bitki enzimatik aktiviye sahiptir, fakat bazı bitkiler enzim kaynağı açısından zengindir. Ananas (bromelain), papaya (papain), incir (ficin) ve arpa (amilaz) bunlardan bazılarıdır. Bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilmektedir. Toksik olmayan bu yiyeceklerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır. Bu sınıftaki en önemli enzim arpa tohumlarından elde edilen malt amilazıdır. Bu enzim bira üretimi ve ekmek yapımında kullanılmaktadır (Tatar, 2007). β -amilaz (α -1,4-glukan maltohidrolaz, E.C. 3.2.1.2) genellikle bitki orjinli olup, birkaç mikrobiyal soy tarafından da üretilir. Amiloz, amilopektin ve glikojen moleküllerini indirgen olmayan ucundan başlayarak hidrolizleyen ekzoamilazdır. Glikozidik bağların hidrolizi sonucunda maltoz (β anomerik formu) oluşur. β -Amilaz, amilopektin içindeki α -1,6-glikozidik bağlarına tamamen etki etmemesi sonucunda ise degradasyonu tamamen bitmeyen molekülden %50-60 maltoz ve β -limit dekstrin oluşur (Gupta vd., 2003). β -Amilaz bazı bitki tohumları ve tatlı patatesten elde edilmiştir. Meyvenin olgunlaşması aşamasında, nişastayı maltoza parçalayarak meyvede tatlılık oluşmasına neden olmaktadır. Endüstride aynı zamanda bira ve damıtma sanayinde fermentasyon için kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek maltoz şuruplarının üretiminde kullanılmaktadır (Sundarram vd., 2014).

1.2.4.3. Hayvansal α -amilazlar

Hayvanlarda α -amilazlar nişasta, glikojen ve dekstrin içindeki α -1-4 glikozidik bağlarını hidrolizler. α -Amilazların farklı dokularda farklı izoenzimleri bulunur. Hayvansal kaynaklardan enzimler yaygın olarak domuz, öküz ve sığırların mide, pankreas veya karaciğerlerinden izole edilebildiği için, insan yiyeceklerinin

hazırlanmasında da uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Kullanılan bu enzimler amilazlar, lipazlar ve proteazları içermektedir. En iyi bilinenleri tripsin, kimotripsin, pepsin, renin ve tek bir enzim olmayıp amilaz, lipaz ve proteaz enzimlerinin karışımından oluşan pankreatindir (Cichoke, 1999). İnsan vücudunda da enzimler salgılanır ve üretilir. Amilazların insanlarda iki izoformu bulunur; aktif bölge yakınındaki bazı amino asit yer değiştirmelerinden dolayı farklı aktivite gösteren tükürük amilazı (pityalin) ve pankreatik amilaz (McDowall, 2006).

1.2.5. Amilaz Üretimi

Enzimler binlerce yıldır peynir, yoğurt, bira ve şarap gibi yiyecek ve içeceklerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Renge vd., 2012). Endüstride enzimler için talep arttıkça etkin üretim teknikleri ve endüstriyel uygulamalara uygun (ham nişastayı yıkan enzimler gibi) daha iyi özelliklere sahip enzimlerin geliştirilmesine olan ilgi artmıştır. α -Amilaz üretimine çeşitli fizikokimyasal faktörlerin etkisi, batık veya derin kültür fermentasyonu (SmF; Submerged Fermentation) ile katı substrat fermentasyonu (SSF; Solid-State Fermentation) kullanılarak araştırılır. SmF amilazların endüstriyel üretimi için öncelikle seçilen metottur. Bu metodun seçilmesinin nedeni kontrol edilebilen fizikokimyasal parametrelerdir (Sivaramakrishnan vd., 2006; Souza vd., 2010; Hussain vd., 2013). Bu fizikokimyasal faktörlerin en önemlileri büyüme ortamının bileşimi, ortam pH'sı, fosfat konsantrasyonu, inokulum yaşı, sıcaklık, havalandırma, karbon ve azot kaynaklarıdır. *Bacillus* türleri α -amilazın çok önemli kaynakları olarak bilinir ve SmF veya SSF enzim üretimi için kullanılır. Fungus soylarının üretimi ve spesifik kültür kondisyon denemeleri birkaç tane mezofilik fungus türünde çalışılmıştır (Sivaramakrishnan vd., 2006).

1.2.5.1. Fizikokimyasal parametreler

Amilaz üretiminde fruktoz, glukoz, galaktoz, sukroz, dekstroz içeren karbon kaynakları, endüstriyel atıklar (hurma şurubu ve melas) ve tarımsal atıklar (şeker kamışı küspesi ve pirinç kabuğu) kullanılır (Hussain vd., 2013).

Mısır maserasyon sıvısı (corn steep liquor), kazein, yeast ekstrakt (maya özütü), tripton, amonyum nitrat, potasyum nitrat, sodyum nitrat ve amonyum klorür gibi

organik ve inorganik azot kaynakları temel kültür ortamında amilaz üretimi için kullanılır (Souza vd., 2010; Hussain vd., 2013).

Fosfat, α -amilaz üretimi ve organizmanın büyümesini etkilediği gibi mikroorganizmaların primer ve sekonder metabolitlerinin sentezinde de önemli görevler alır. Ueno ve arkadaşlarının (1987) bildirdiğine göre 0.2 M fosfat, *A. oryzae*'nin konidia ve enzim üretimini önemli bir şekilde arttırmıştır. Hillier ve arkadaşlarının (1997) bildirdiğine göre benzer şekilde *B. amyloliquefaciens*'in, düşük fosfat seviyelerinde α -amilaz üretmediği ve hücre yoğunluğunun şiddetle düştüğü bulunmuştur. Buna karşılık yüksek fosfat konsantrasyonları *B. amyloliquefaciens*'in enzim üretimini engellemiştir.

Büyüme ortamına eklenen metal iyonları mikroorganizmanın büyümesini ve daha iyi enzim üretimini sağlamaktadır. Metal iyonları amilaz üretiminde önemli rol oynamaktadır. Bunun nedeni ise amilazların metalloenzim olmalarıdır. Aktivite, yapısal bütünlük ve stabilite için Ca^{2+} iyonlarına gerek duyarlar (Gupta vd., 2003; Sivaramakrishnan vd., 2006; Hussain vd., 2013).

Büyüme ortamının pH'sı, enzim salgılanması ve organizmanın morfolojik değişmesine neden olan önemli fizyolojik parametreler arasındadır. Organizmanın büyümesi boyunca değişiklik gösteren pH, ortamdaki ürün stabilitesini etkiler. Daha önce yapılan çalışmalar ile fungusların optimum büyümeleri için hafif asidik pH, bakterilerin optimum büyümesi için nötral pH gerektiği bulunmuştur (Sivaramakrishnan vd., 2006). Pek çok fungusun amilaz üretimi ve büyümesi için optimum pH aralığının pH 5.0 ile 6.0 olduğu bildirilmiştir (Khoo vd., 1994).

Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi organizmanın büyümesi ile ilgilidir. Bu nedenle optimum sıcaklık mikroorganizmanın mezofilik ve termofilik oluşuna bağlıdır. Termostabilite endüstriyel enzimlerde istenilen bir özelliktir. Termostabil enzimler termofilik organizmalardan izole edilir ve stabilitelelerinden dolayı ticari uygulamalarda kullanılırlar. Nişastanın yüksek sıcaklıklarda jelatinleştirilmesi (100-110°C) ve sıvılaştırılması (80-90°C) için termofilik ve termostabil α -amilazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Reddy vd., 2003).

Fungal fermentasyonlarda çalkalama derecesi, oksijen transfer sıklığı ve karıştırma da etkilidir. Çalkalama misel morfolojisi ve üretim şeklini etkilemektedir. Yüksek

çalkalama hızlarında misel büyümesi zarar gördüğü için, enzim üretiminin azalmasına sebep olur (Gupta vd., 2003; Naidu ve Saranraj, 2013).

İnokulum miktarı amilaz üretimi için önemli bir faktördür. Yüksek inokulum miktarları doğal bir inhibitördür. *Aspergillus* sp. A3 amilazı ile yapılan çalışmada inokulum miktarı olarak %10, *Fusarium solani* glukoamilazı ile yapılan çalışmada ise inokulum miktarı %15 olarak bulunmuştur (Ellaiah vd., 2002; Bhatti vd., 2007). *Bacillus subtilis* amilazı ile yapılan çalışmada inokulum miktarı arttıkça enzim üretiminin azaldığı bildirilmiştir (Jogezai vd., 2011). *Paenibacillus amylolyticus* α -amilazı ile yapılan çalışmada yüksek inokulum miktarlarında enzim üretiminin azalmasının; çok fazla miktarda olan hücreler için ortamda besinin azalmasına veya toksik metabolitlerin hızla birikmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (Ikram-ul-haq vd., 2012).

Ekstraselüler enzimlerin üretimindeki değişim, enzim sistemindeki ayrı bileşenlerin indüksiyon zamanındaki farklılıktan, substrat hidrolizi sonucunda oluşan ürünlerin inhibisyonundan ve kültür koşulları boyunca pH'da meydana gelen değişiklikler ile proteazlardan kaynaklanabilir. Abou Dohara ve arkadaşlarına göre (2011) inkübasyon süresi, büyümeye bağlı amilaz üretimiyle ilişkilidir. *A.oryzae* L-glutaminaz üretimi için inokulum yaşı olarak 4 günlük sporulasyon ortamı kullanıldığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmada inokulum yaşı arttıkça, mikrobiyal gelişimin ölüm fazına girip enzim üretiminin azalmasıyla sonuçlandığı belirtilmiştir (Prasanna ve Raju, 2012).

1.2.6. α -Amilazların Biyokimyasal Özellikleri

Amilazların enzimatik ve fizikokimyasal özellikleri çeşitli mikroorganizmalardan geniş olarak araştırılmış ve tarif edilmiştir (Gupta vd., 2003).

α -Amilazın substrat spesifitesi mikroorganizmalar arasında farklılık gösterir. Amilazlar amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz dahil olmak üzere diğer substratlar ile karşılaştırıldığında, nişastaya karşı yüksek spesifite gösterirler (Sharma ve Satyanarayana, 2013).

α -Amilazlar geniş pH aralığında aktivite gösterirler ve optimum pH'ları 2 ile 12 arasında değişir (Wanderley vd., 2004). Bakteri ve fungus amilazlarının optimum pH'ları asidik ve alkali aralıkta değişir. α -Amilazlar genellikle pH 4.0 ile 11.0

arasında stabildir. Bununla birlikte dar bir aralıkta stabiliteye sahip α -amilazlarda bildirilmiştir (Gupta vd., 2003; Sharma ve Satyanarayana, 2013).

α -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık mikroorganizmaların büyümesine bağlıdır. Birçok faktör termostabiliteyi etkiler. Bu faktörler kalsiyum varlığını, substratı ve diğer stabilizerleri içerir. Termostabil amilazlar endüstriyel işlemlerde, kontaminasyon riskini azaltması, harici soğutma maliyetinin azaltılması, substratların daha iyi çözülmesi, pompalama ve karıştırmaya izin veren düşük vizkoziteden dolayı kullanım avantajlarına sahiptir (Naidu ve Saranraj, 2013).

α -Amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasındadır. En düşük değer *Bacillus caldolyticus* için 10 kDa, en yüksek değer *Chloroflexus aurantiacus* için 210 kDa olarak bildirilmiştir (Gupta vd., 2003; Ratanakhanokchai vd., 1992). Bazı α -amilazların moleküler ağırlığını karbohidrat kısımları yükseltir. Bakteri proteinlerinin glikozilasyonu azdır (Lin vd., 1998).

Birçok metal katyonları, genellikle ağır metal iyonları, sülfidril grup ajanları, N-bromosüksinimid, p-hidroksilmerkuribenzoik asit, iyodoasetat, EDTA ve EGTA α -amilazı inhibe ederler. α -Amilaz, metalloenzimdir, çünkü yapısında en az bir Ca^{2+} iyonu bulunur. α -Amilazın kalsiyuma ilgisi diğer iyonlardan daha kuvvetlidir. Ca^{2+} , elektrodializ ve EDTA ilave edilerek amilazlardan uzaklaştırılır. Kalsiyumsuz enzimler, Ca^{2+} iyonları ortama eklendiği zaman yeniden aktive olurlar (Gupta vd., 2003).

1.2.7. Amilaz Aktivitesi Ölçüm Metotları

Amilazlar substrat olarak çözünür nişasta ve modifiye nişasta kullanılarak ölçülürler. α -Amilazlar nişasta içindeki α -1,4 glikozidik bağların hidrolizini katalizleyerek glukoz dekstrin ve limit dekstrin üretir. Reaksiyon substrat ile reaksiyona giren iyot rengindeki azalma veya indirgeyici şeker miktarındaki artış ile izlenir. Amilaz aktivitesinin belirlenmesi için çeşitli metotlar kullanılır. Bunlar nişasta-iyot renk yoğunluğunun azalması, redüktör şekerin artması, renkli substratın yıkımı, nişasta süspansiyonunun yoğunluğunun azalması temellerine dayanır.

1.2.7.1. Nişasta-İyot renk yoğunluğunun azalması

Nişasta formları iyotla kompleks mavi renk oluşturur ve nişastanın hidroliziyle birlikte kırmızı kahverengi halini alır (Hollo ve Szeitli, 1968). Bu özelliğe dayanılarak amilazların kantitatif ölçümü için çeşitli prosedürler geliştirilmiştir. Bu metoda amilazın dekstrinleşme aktivitesi iyot renk reaksiyonundaki azalma ile belirlenir.

1.2.7.1.1. Dekstrinleşme aktivitesinin belirlenmesi

Dekstrinleşme aktivitesinin belirlenmesi için, substrat olarak çözünür nişasta kullanılır ve reaksiyonu sonlandırmak için seyreltik HCl, iyot çözeltisine eklenir. 620 nm de absorbansdaki azalma substrat kontrolüne karşı ölçülür (Fuwa, 1954). Absorbansdaki yüzde birlik azalma bir enzim ünitesi olarak kabul edilir. Bu deneydeki ana kısıtlama ise Luria broth, tripton, pepton, corn steep liquor ve tiyol gibi bileşikler içeren ortam bileşenlerinin nişasta iyot kompleksini etkilemesidir. Bakır sülfat ve hidrojen peroksit ortam bileşenleri ile etkileşerek nişasta iyot kompleksinin rengini korur.

1.2.7.1.2. Sandstedt Kneen ve Blish (SKB) metodu

SKB metodu, fırıncılık sektöründe kullanılan amilazların aktivitesinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan yöntemdir (Sandstedt vd., 1939) . Ticari amilazların gücü SKB ünitesi cinsinden ifade edilir ve nişasta iyot renk değişiminin ölçülmesi prensibine dayanır. SKB yöntemi, Miller metodu ve Wohlgenuth metodunun modifiye edilmesi ile oluşur. Dinitrosalisilik asit metodu ile bazı hidrolitik enzimler ölçülebilirken, SKB metodu ile sadece alfa amilaz aktivitesi ölçülmektedir (Biazus vd., 2009).

1.2.7.1.3. Indian pharmacopoeia metodu

Bu metotta, birim hacimdeki enzim ile sindirilen nişastanın gram cinsinden miktarı amilaz aktivitesi hesaplanmasında kullanılır. Bu metod, tampon ile belirli oranlarda seyreltilmiş enzim örneklerinin nişasta ile 1 saat 40 °C'de muamele edilmesine dayanır. Bu çözeltiler daha sonra iyot ile muamele edilir. Tüplerde herhangi bir renk görülmediği zaman, sindirilen nişastanın gram cinsinden amilaz aktivitesi hesaplanır. Metot tohumlardaki amilaz aktivitesini ölçmek için kullanılır (Gupta vd., 2003).

1.2.7.2. Dinitrosalisilik asit (DNS) metodu

Bu metot nişastanın amilaz ile hidrolizi sonucunda oluşan redüktör şeker miktarının artışının ölçülmesine dayanır (Bernfeld, 1955). Bu metodun dezavantajı DNS belirteci bileşenleri tarafından glikozun yıkımı ve üretilen rengin yavaşça kaybolmasıdır.

1.2.7.3. Renkli substratın yıkımı

Bu metotda, alternatif substrat olarak Cibacron Blue F3 G-A (Dhawale vd., 1982) veya Remazol brilliant Blue R (Ceska vd., 1969) gibi boyalarla kovalent bağlanmış nişasta kullanılır. Bu substratların sentezi iki önemli adım içermektedir. Çözünür nişasta boya kullanılarak alkali koşullarda renklendirilir. Bu işlemde boya molekülü ve nişasta arasında kovalent bağlar oluşur. Renkli nişasta, eklenen 1,4-bütandiol diglisit eter ile çapraz bağlanır. Bu suda şişen çözünmez bir ağ oluşturur. Çözünmez nişasta türevlerinin enzimatik hidrolizi ile boyanmış çözünür nişasta hidrolizatları oluşturur. α -Amilaz belirlenmesinde basit ve hassas bir metottur. Fakat artan glukoz miktarı, dekstrin ile nişastanın kontaminasyonuna bağlı olarak hatalı sonuçlar verir.

1.2.7.4. Nişasta substratının vizkositesinin azalması

Bu metot genellikle fırıncılık sektöründe unun kalitesini değerlendirmek için kullanılır. Amilaz aktivitesini hesaplanması için değil, hamurun reolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. Falling number testi (düşme sayısı) ve Amilograf veya Farinograf test bu kategoriye giren metotlardır.

1.2.7.4.1. Falling number (düşme sayısı) analizi

Falling number (düşme sayısı) analizi, α -amilaz aktivitesinin belirlenmesinde Dünya'da kabul görmüş en etkili yöntem olup, Perten Instruments tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir (Perten, 1984). Düşme sayısı (FN) yöntemi, 100 °C'de un-enzim preparatları içindeki tahıl amilaz aktivitesini değerlendirmek için standardize edilmiş ve buğday kırması veya unlarda diastatik aktiviteyi belirlemede kullanılan bir yöntemdir (Sundarram vd., 2014). Bu yöntem ile unda var olan amilaz enziminin aktivitesi belirlenmektedir. Amilaz aktivitesinin az olması, maya hücreleri tarafından kullanılabilir şeker miktarının yetersiz olmasına, bu da ekmek hacminin düşük olmasına sebep olmaktadır. Enzim aktivitesi çok

yüksek olduğunda ise ekmeğin içi gözenek yapısı bozulmakta, ekmeğin hacmi istenilen düzeyde olmamakta ve ekmeğin içi yapışkan özellik göstermektedir. Düşme sayısının saptanması ile enzim aktivitesi belirlenmekte, buradan hesaplanan sıvılaştırma sayısı yardımıyla farklı amilaz aktivitesine sahip un karışımların oranları veya amilaz katkı düzeyleri bulunabilmektedir.

1.2.7.4.2. Amilograf/Farinograf test

Amilograf, önceden programlanan bir ısıtma sisteminde un-su veya nişasta-su karışımının kıvamı ve viskozitesini ölçen, genelde unun alfa-amilaz aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan yazıcı bir alettir. Değirmencilik ve fırıncılık sektöründe unun diastatik aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Çalışılan endüstrinin amacına göre; unun malt veya mantar amilazı gibi α -amilazlar eklenerek, dengeli bir enzim aktivitesine ulaşılabilir. Un özellikleri ve α -amilaz eklenmesi Amilograf ile kontrol edilebilir ve ayarlanabilir (www.brabender.com).

1.8. Amilaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları

α -Amilaz en eski ve en önemli endüstriyel enzimlerden biridir. İlk kez 1984'te sindirim bozuklukları hastalıklarında yardımcı ilaç olarak kullanılmıştır. Biyoteknolojideki yeni gelişmelerle α -amilazın uygulama alanları medikal, analitik kimya, deterjanlar, tekstil, şeker, kağıt endüstrisi gibi bir çok alanda da yaygınlaşmaktadır (Çizelge 1.2). Bugün büyük miktarlarda mikrobiyal α -amilazlar farklı endüstriyel uygulamalar için pazarlanmaktadır. Nişasta endüstrisindeki temel uygulamaları sayesinde amilazlar dünya enzim tüketiminin %30'unu oluşturmaktadır (Syu ve Chen, 1997). α -Amilazların ticari uygulamalarının öneminin anlaşılmasında Godfrey ve West'in (1997) araştırmaları ön ayak olmuştur (Gupta vd., 2003).

Çizelge 1.2. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler ve kullanım alanları

Endüstri	Enzim sınıfı	Uygulama Alanı
Deterjan (çamaşır, bulaşık)	Amilaz	Nişasta lekelerinin uzaklaştırılması
	Lipaz	Yağ lekelerinin uzaklaştırılması
	Selüloz	Temizleme, rengin parlaklaştırılması
	Proteinaz	Protein lekelerinin uzaklaştırılması
Nişasta ve yakıt	Amilaz	Nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonu
	Glukoamilaz	Sakkarifikasyon
	Pullulanaz	Sakkarifikasyon
	Glukoz izomeraz	Glukozun fruktoza dönüşümü
Besin	Proteaz	Sütün pıhtılaşması, lezzet kontrolü
	Lipaz	Peynir lezzet kontrolü
	Pektinaz	Meyveli ürünler
Ekmek endüstrisi	Amilaz	Bayatlama önleyici ajan vb.
	Lipaz	Hamurun işlenebilirliğinde kolaylık sağlar
	Proteaz	Yoğurma ve işleme zorluğunu gidermede kullanılır
	Fosfolipaz	Ekmeğin daha iyi kabarmasını sağlar

1.8.1. Ekmek ve Kabartma Endüstrisi

Malt ve mikrobiyal α -amilazlar yüzyıllardır kabartma endüstrisinde kaliteli ürünler yapmakta kullanılmıştır (Hamer, 1995). Bu enzimler ekmeğin rengini, yumuşaklığını ve kabarma hacmini arttırmak için kullanılır. Bugün lipoksigenaz glukoz oksidaz, sellulaz, pentsanaz, pullulanaz, ksilanaz, lipaz, proteaz ve amilazlar gibi birçok enzim preparatı çeşitli amaçlar için ekmek endüstrisinde kullanılır. Fakat α -amilazların tekrar kullanılma özellikleri yoktur. Günümüzde; kabartmada kullanılan α -amilazlar, fungus ve bakteri gibi mikrobiyal enzimleri ve arpa maltının tohum enzimleridir. İngiltere ve Amerika fungal α -amilazların GRAS statüsünde olduğuna hemfikir olduktan sonra, İngiltere 1963'den ve Amerika 1955'den bu yana ekmeklere katılmasına izin vermiştir. Fungal α -amilazlar bakteri amilazlarına tercih edilirler. Aktivitelerin kontrolünün zorluğu nedeniyle bakteri amilazları raf-ömrü uzatma alanı dışında sınırlı bir kullanıma

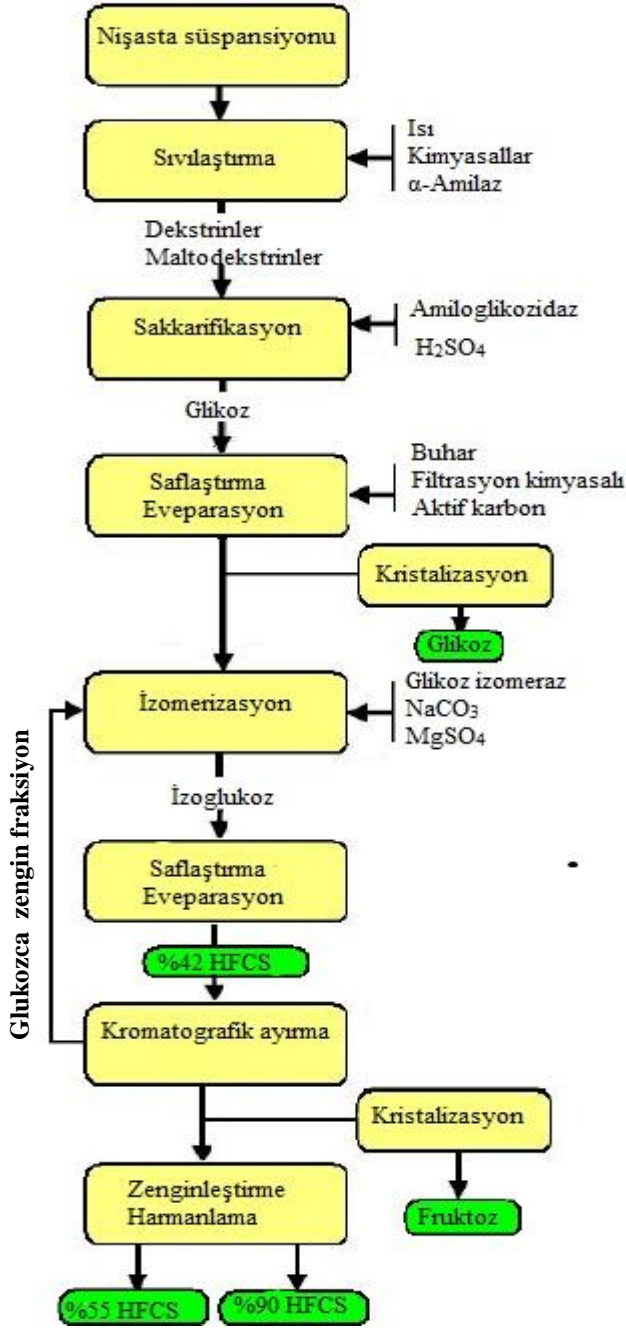
sahiptir. Fungal amilazlar farklı alanlarda dünyanın her yerinde kullanılırlar. Yüksek aktiviteye sahip fungal α -amilazının una eklenmesi ve kabartma işlemlerinde kullanılması yaygındır. Una α -amilaz katılması, yalnızca fermantasyon oranını arttırıp hamurun yoğunluğunu azaltmakla kalmaz (ki bu durum ürünün hacmini ve yapısını olumlu etkiler) aynı zamanda hamura ek bir şeker girdisi sağlayarak ekmeğin kızarma kalitesini, dış kabuk rengini ve tadını arttırır. α -Amilaz ekmek yapımında ekmeğin bayatlamasını geciktirmesini ve raf ömrünü iki üç gün daha uzatmasından dolayı yaygın kullanılmaktadır. Glukoz şurubundan elde edilen yüksek tatlılıktaki fruktoz şurupları pasta yapımında kullanılmaktadır (Gupta vd., 2003).

Ekmek içeriğine eklenen ürünler; şekerler, tuzlar, antioksidanlar (askorbik asit veya potasyum borat), yağ granülleri, lesitin, şeker esterleri, monogliseridler/digliseridler, emülsifiyerler, süt tozu, enzim/enzimlerin kombinasyonları, küçük şekerler ve kimyasallardır. Genellikle hamur ıslahında kullanılan enzimler, amiloglukozidazlar, β -amilazlar, maltogenik amilazlar, dallanma yapıcı ve dallanma kırıcı enzimler, α -amilazlar gibi bayatlamayı önleyici ajanlardır. Pullulanaz ve α -amilaz kombinasyonu bayatlamayı önleyici özelliğinden dolayı kullanılır (Spendler ve Jorgensen, 1997).

1.8.2. Nişasta Endüstrisi

Yüksek sıcaklıklarda yapılan şekerleştirme yöntemlerinde genellikle yüksek termostabiliteye sahip mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (Peixoto vd., 2003). α -Amilazların ana kullanım alanları fruktoz ve glukoz gibi hidrolizatların üretilmesi olmaktadır. Nişasta, yüksek fruktozlu mısır şuruplarına (HFCS) dönüştürülür (Şekil 1.3). Nişastanın şekere enzimatik dönüşümü, üç basamaklı bir işlemdir. Yüksek substrat çözünürlüğü sağlamak için genellikle 60 °C ve üstündeki sıcaklıklarda gerçekleşir ve bu şekilde mikrobiyal kontaminasyon da önlenmiş olur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001). İlk basamak olan sıvılaştırma basamağını, sakkarofikasyon basamağı ve en son olarak izomerleştirme basamağı izler (Parker vd., 2010). Yüksek tatlılaştırma özelliğinden dolayı, alkollü içecekleri tatlandırıcı maddeler içecek endüstrisinde büyük miktarda kullanılır. Proseslerin hepsinde, nişasta sıvılaştırılması için yüksek termostabiliteli α -amilazların kullanılması gerekir (Van Der Maarel vd., 2002).

Yüksek fruktozlu mısır şurupları (HFCS), başta tatlandırıcılar olmak üzere lezzet arttırıcılar ve fermentasyon substratları olarak besin endüstrisinde uygulama alanları bulurlar.



Şekil 1.3. Yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi (Karaoğlu, 2014)

1.8.3. Tekstil Endüstrisi

Kimyasal yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen alternatif yöntemlerden birisi de tekstil işlemlerine enzim kullanımudur. Tarihi olarak endüstriyel tekstil işlemlerinde enzim uygulamaları 1857 yılında baskı öncesi kumaşlardan malt ekstraktın uzaklaştırılmasında kullanılmasıyla başlar. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işlem sayesinde ipliğin yüzeyi düzeltilir ve gerilmelere karşı direnci artar. Bu tabakaların büyüklüğü için kullanılan materyaller tamamen farklıdır. Nişasta bu iş için çok cazip gelmektedir. Çünkü dünyanın her bölgesinde ucuz ve kolay elde edilebilir, aynı zamanda da kolaylıkla taşınabilir. Yapılan bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir (Kıran vd., 2006). Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Çünkü α -amilaz liflere etki etmeden seçilen kısımdaki parçaları ortadan kaldırır. Nişasta pastası içindeki, yıkamayla çıkan ve suda çözünen dekstrinleri gelişi güzel parçalar. Sağlam liflerin yapımı için tekstil fibrillerinin haşıllanması çözünmeleri önlemek için α -amilazlar kullanılır. Bu işlemlerden sonra kumaş ağartma ve boyama işlemlerine geçilir (Hendriksen vd., 1999).

Özellikle termostabil bakteriyal amilazların endüstriyel boyutta üretilmeye başlanması tekstil sanayi için yeni ufuklar açmıştır. Amilazlar dışında selülaz enzimleri de son yıllarda tekstil sanayinde uygulama alanları bulmuştur.

1.8.4. Kağıt Endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, dünyada enzim kullanabilecek en büyük pazarlardan birisi olarak kabul edilmektedir. Hayat standardının artmasına paralel olarak dünya kağıt ihtiyacı giderek artmakta, çevre dostu ve etkili üretim prosesleri daha da önem kazanmaktadır. Artan hamur verimi, gelişmiş lif özellikleri, iyileştirilmiş geri kazanma ve çevre problemleri, kağıt endüstrisinde enzim kullanılmasını doğuran sebeplerin başında gelmektedir. Enzimlerin, kağıt ve kağıt hamuru üretiminde kullanılabilmesi üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar oldukça artmıştır (Karademir vd., 2002). Kağıt kaplamak için yüksek molekül ağırlıklı ve düşük yoğunluklu nişasta üretimi için α -amilazların kullanılması önerilmiştir. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde α -amilazların

kullanılması, kağıt kaplamak için nişastanın modifiye edilmesi ile olmaktadır. Tekstil ve kağıtların aharlama işlemleri sırasında nişasta, kağıdı meydana gelecek mekanik zararlardan korur (Hussain vd., 2013). Aharlaştırma kağıdın kuvvetliliğini ve sertliğini arttırmak için yapılır. Ayrıca üretimi biten kağıtların kalitesini arttırmada, kağıdın iyi kaplanması ve silinebilme özelliğini düzeltmede kullanılır. Nişasta bitmiş kağıt için iyi bir kaplama ajanıdır. Nişasta pastası transfer edilen iki makara arasından geçen kağıtlarda nişasta birikir ve aharlama preslerinde nişasta kağıda eklenir. Bu prosesler 45-60 °C sıcaklıklarda gerçekleşir. Nişastanın değişmeyen yoğunluğu, bu bölüm sonunda tekrar kullanılması için gereklidir. Fabrikalarda farklı kağıt cinsleri için nişasta yoğunluğunun çeşitli özelliklerinden yararlanır. Nişastanın doğal yoğunluğu bir kez veya devamlı proseslerde α -amilazların polimerleri kısmen parçalaması ile düzeltilmekte ve kağıt aharlamak da yüksek miktarda kullanılmaktadır (Gupta vd. 2003).

1.8.5. Deterjan Endüstrisi

Termostabil α -amilaz enziminden deterjan endüstrisinde de yararlanılmaktadır. İlk endüstriyel enzimin 1975 yılında deterjan uygulamalarında kullanıldığı ortaya çıkmıştır. Bu uygulama ile insanların ufukları açılmış ve kimyasal katalizin yerine enzimatik kataliz uygulaması fikri doğmuştur. Deterjan endüstrisinde ekstrem koşullarda dayanıklılığını ve aktivitesini koruyan enzimlere gerek duyulmaktadır. Alkali pH, yüksek sıcaklık, surfaktan maddelerin varlığı enzim aktivitesini inhibe eder. Denaturantlara tolere edebilen termofilik enzimler bu amaçla deterjan endüstrisinde kullanılır (Fujiwara, 2002; Şimşek, 2006).

Modern yoğun deterjanların içeriğinde birden fazla enzim bulunabilir. Deterjanlardaki enzim uygulamalarının ana avantajı, enzim içermeyen deterjanlara göre daha yumuşak koşullar sağlamaktır. İlk otomatik bulaşık yıkama deterjanları çok sert oluşu, tahta bulaşıklar ve hassas porselenlere uygun olmayışı ve bu bulaşıklarla yemek yenildiği zaman midede hasarlara neden olduğundan dolayı, deterjan endüstrisinde daha verimli ve yumuşak solüsyonların araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Enzimler düşük yıkama sıcaklıklarına izin verirler. α -Amilazlar 1975'den beri toz çamaşır deterjanlarında kullanılır. Günümüzde, bütün sıvı deterjanların %90'ı α -amilaz içerir ve otomatik bulaşık deterjanları için α -amilaz talebi artmaktadır (Gupta vd., 2003).

Doğal formulu α -amilazlar, genellikle deterjan formüllerinin içeriğinde bulunan, oksidantlara karşı hassastır. Ev deterjanlarındaki oksidantlara karşı stabilite proteaz gibi diğer enzimler kullanılarak çözümlenmeye çalışılmıştır. Son zamanlarda, Novozymes ve Genencore International iki büyük deterjan enzimi sağlayan firmanın bilim adamları, α -amilazın beyazlatma stabilitesini protein mühendisliği kullanarak geliştirmişlerdir (www.novozymes.com). Bu şirketler birbirinden bağımsız olarak oksidasyona hassas amino asitleri diğer amino asitler ile değiştirmişlerdir. *B. licheniformis* amilazında, 197. pozisyondaki metionin yerine lösinin konulması sonucunda amilazın oksidatif bileşiklere karşı direnci geliştirilmiştir. Oksidasyon stabilitesinde yapılan gelişme, mutant enzimin depolama stabilitesini ve deterjan formülü içeriğindeki beyazlatıcılarda iyi çalışmasını sağlamıştır. Genencore International ve Novozyme, sırasıyla Duramyl® ve Purafect OxAM® ticari ismiyle iki yeni ürün piyasaya sürmüştür (Gupta vd., 2003).

1.8.6. Medikal ve Klinik Kimya Analizleri

Biyoteknolojide yeni gelişmeler, amilaz uygulama yelpazesi analitik, medikal ve klinik kimya gibi diğer pek çok alanda genişlemiştir. İlaç ve klinik alanlarda amilazların kullanıldığı birçok işlem vardır. Klinik kimya da kapsamlı olarak çalışılmıştır. Amilazlar, tükürük bezi ve pankreatik hastalıkların (parotitis, akut pankreatitis) önemli bir indikatörüdür. Bundan başka α -amilazlar hiperlipemia, obezite ve diyabet tedavisinde ilaç amacıyla kullanılmaktadır. Şekerin metabolik hastalıklardaki işlevine merakın artmasıyla, amilolitik enzimlerin inhibitörlerine başvurulması ve verimli çalışan ilaçların araştırılması teşvik edilmektedir (Kandra, 2003).

1.8.7. İçecek Endüstrisi

Meyve suyu endüstrisinde alfa amilaz enzimi özellikle armut ve elma sularının üretilme aşamasında berraklaştırma işleminde kullanılırlar. Meyve suları yapılırken toplanılan meyvelerin tam olgunlaşmamış olanlarındaki nişasta oranı oldukça yüksektir ve bu meyve suyunda bulanıklığa neden olur. Bu sorunun çözümü alfa amilaz enzimi ile mümkündür.

Meyve suyu endüstrisinde enzimlerin kullanılması, verimin arttırılması, filtrasyonun zenginleştirilmesi, stabilite ve berraklığın arttırılması, acılığın giderilmesi ve meyve dehidrasyon hızının arttırılması gibi çok farklı uygulama alanlarına sahiptir (Bozkurt Uludağ, 2000).

Mikrobiyal enzimler kullanılarak düşük kalorili biralar üretilebilmektedir. Fungal alfa-amilazlar daha çok maltoz ve dekstrin üretiminde kullanılırken, glukoamilazlar ise doğrusal ve dallanmış dekstrinlerden glukoz üretir. Kullanılan enzimlerden biri *Aspergillus niger*'den elde edilen glukoamilazdır. Bu enzim karbohidrat kalıntılarını glukozla hidrolizler. Ham madde olarak alkol üretmek amacı ile kullanılan nişasta içeren maddeler amiloglukozidaz ve alfa amilaz enzimleri ile muamele edilirler. Ortamda bulunan nişasta polimeri yeterince parçalandıktan sonra ortama fermentasyon amacı ile maya aşılanaarak işleme devam edilir. Oluşan glukoz daha sonra hemen %100 karbondioksit ve alkole fermente olur. Bundan dolayı düşük kalorili biralar normal olanlara oranla %15-50 daha az kalori içerirler (www.novozymes.com).

1.8.8. Etanol Üretimi

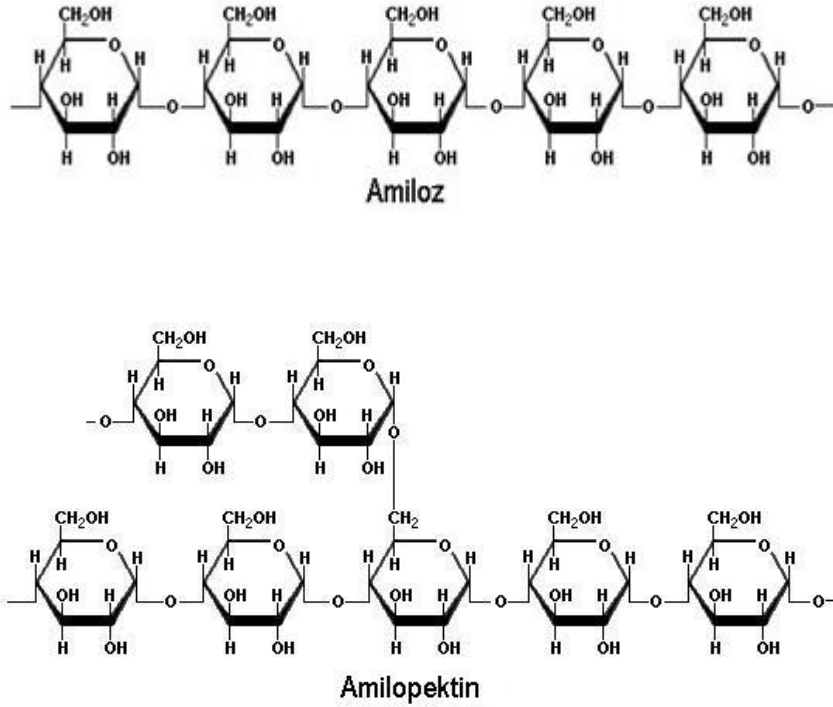
Etanol çok kullanılan bir biyolojik yakıttır. Etanol yenilenebilir tarımsal bitkiler ve ürünlerinden üretilebilir. Etanol üretimi için, dünyanın pek çok yerinde kolay ulaşılabilir ve ucuz olmasından dolayı substrat olarak nişasta kullanılır. Şeker *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalar tarafından fermentasyon ile etanole dönüştürülür (Mojsov, 2012).

1.9. Nişasta

Diyetteki karbohidratların ana kaynağı olan nişasta, bitkilerde yumru, bakliyat ve tohumların amiloplastlarında ve kloroplastlarda granül olarak oluşturulur ve depolanır. Bir polisakkarit olan nişasta, glukoz moleküllerinin α -D-(1,4) ve α -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmuştur.

Nişasta iki yapısal bileşen olan amiloz ve amilopektinden oluşur. Amiloz, glukoz monomerlerinin α -D-(1,4) glikozidik bağıyla bir araya gelmesiyle oluşmuş doğrusal bir polimerdir ve nişastanın %15-20'sini oluşturur (Şekil 1.4). Amilopektin ise glukoz monomerlerinin α -D-(1,4) ve α -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bir araya gelmesi ile oluşmuş büyük bir moleküldür ve nişastanın ana bileşenidir (Şekil 1.4). Amiloz iyotla mavi renkte bir kompleks oluştururken amilopektin ise menekşe renkli kompleks meydana getirir (Bamforth, 2003; Bıçak ve Ekmekçi, 2005; Nugent, 2005; Sajilata vd., 2006).

Nişasta yaygın, ucuz ve doğal sürdürülebilir bir hammadde olarak kullanılır. Dünya çapında haşıl maddesi olarak kullanılanların %75'i nişasta ve turevleridir. Tıbbi ve klinik alanlardaki pek çok işlemede amilaz uygulamalarını gerektirir.



şekil 1.4. Amiloz ve Amilopektinin kimyasal yapısı (<http://mkk.szie.hu>)

1.10. Çalışmanın Kapsamı ve Amacı

Termotolerant ve termofilik funguslar gunmzde pek çok biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamada önemli rol oynamaktadırlar. Bu fungusların metabolitleri büyük bir potansiyele sahiptir. Örneğin, gıda, tekstil ve kağıt sanayinde termofilik enzimler sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla beraber, özellikle yüksek sıcaklıklarda ve çeşitli koşullarda diğer organizmalardan daha stabil olmalarından dolayı termofilik fungusların amilazlarına olan ilgi daha da artmaktadır. Bu alışma ile ülkemizin biyolojik kaynaklarının endüstriyel potansiyelleri ve ileri de yapılacak olan pek çok bilimsel çalışma için temel teşkil edebilecek verilerin toplanması amaçlanmıştır. Bu alışma sonucunda gıda, deterjan, ilaç, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi pek çok biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilecek potansiyele sahip bir enzim elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen ve Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında saklanan stok fungus kültürleri kullanılarak termotolerant ve termofilik olan fungusların sıcaklık sınırları belirlenecektir. Belirlenen termotolerant ve termofilik funguslar endüstriyel olarak önemli olan amilolitik, proteolitik, lipolitik, üreolitik ve selüloolitik enzimler bakımından taranacak ve en iyi amilolitik aktivite gösteren suş seçilecektir. Bu enzimin en iyi üretiminin gerçekleştiği kültür koşulları belirlenerek, enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Taranan funguslarda amilolitik aktivite tespiti yapılmazsa ekonomik açıdan önemli olan proteolitik, lipolitik, üreolitik ve selüloolitik enzimlerden en iyi zon çapı olan enzim ile çalışmaya devam edilmesi düşünülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Amilazların Kültür Koşulları

2.1.1. Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

α -Amilazlar fruktoz, glukoz, maltoz, galaktoz, sukroz, laktoz, dekstroz olmak üzere pek çok karbon kaynağından, hurma şurubu ve melas gibi endüstriyel atıklardan ve şeker kamışı küspesi, pirinç kabuğu gibi tarımsal atıklardan üretilebilir (Bhutto ve Umar, 2011; Hussain vd., 2013). Çizelge 2.1 de amilaz üretimi için kullanılan farklı karbon kaynakları özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Mikroorganizmaların amilaz üretimi için kullanılan farklı karbon kaynakları

Mikroorganizma	Karbon kaynağı	Kaynak
<i>Penicillium rugulosum</i>	Galaktoz	Tiwari vd., 2007
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Buğday kepeği	Balkan ve Ertan, 2007
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Mısır nişastası	Niazi vd., 2010
<i>Bacillus licheniformis</i>	Buğday nişastası	Hmidet vd., 2010
<i>Clostridium thermosulfuregenes</i> SVM17	Buğday kepeği	Mrudula vd., 2011
<i>Aspergillus niger</i> ML-17 <i>Rhizopus oligosporus</i> ML-10	Maltoz	İrfan vd., 2012
<i>Bacillus licheniformis</i>	Laktoz	Sankaralingam vd., 2012
<i>Bacillus</i> sp.	Glukoz	Vasanth ve Hemashenpagam, 2012
<i>Aspergillus</i> sp. (AS-2a) <i>Mucor</i> sp. (MS-3) <i>Rhizopus</i> sp. (RS-6b).	Patates unu	Ominyi Matthias, 2013
<i>Aspergillus</i> spp.	Pirinç kepeği	Gautam vd., 2013
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> P-001	Mısır unu	Deb vd., 2013
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mısır	Ratnasri vd., 2014
<i>B. amyloliquefaciens</i> (MTCC 1270)	Buğday kepeği	Saha vd., 2014
<i>Aspergillus oryzae</i>	Buğday kepeği	Sivaramakrishnan vd., 2007

2.1.2. Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Mısır maserasyon sıvısı (corn steep liquor), kazein, yeast ekstrakt, tripton, amonyum nitrat, potasyum nitrat, sodyum nitrat ve amonyum klorür gibi organik ve inorganik azot kaynakları kültür ortamında amilaz üretimi için kullanılır (Souza

vd., 2010; Hussain vd., 2013). Çizelge 2.2' de amilaz üretimi için kullanılan azot kaynakları özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Mikroorganizmaların amilaz üretimi için kullanılan farklı azot kaynakları

Mikroorganizma	Azot kaynağı	Kaynak
<i>Clostridium</i> sp.	Soya unu	Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 1996
<i>Bacillus</i> sp.	Maya özütü	Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003
<i>Mucor</i> sp	Arjinin	Vahidi vd., 2005
<i>Penicillium rugulosum</i>	Pepton	Tiwari vd., 2007
<i>Aspergillus niger</i> JGI 24	Et özütü	Varalakshmi vd., 2009
<i>Discosia</i> sp.	Sodyum nitrat	Hegde vd., 2011
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK96	Kazein	Akcan vd., 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pepton	Oziengbe ve Onilude, 2012
<i>Aspergillus niger</i>	Amonyum nitrat	Sundar vd., 2012
<i>Cylindrocephalum</i> sp. (Ac-7)	Sodyum nitrat	Sunitha vd., 2012
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> P-001	Tripton ve amonyum nitrat	Deb vd., 2013
<i>A. oryzae</i>	Maya özütü	Shah vd., 2014

2.1.3. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık mikroorganizmanın büyümesini ve metabolitleri üretmesini etkileyen, organizmadan organizmaya farklılık gösteren önemli bir çevresel faktördür (Deb vd., 2013). Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi organizmanın büyümesi ile ilgilidir. Bu nedenle optimum enzim üretim sıcaklığı mikroorganizmanın mezofilik ve termofilik oluşuna bağlıdır (Gautam vd., 2013). İnkübasyon sıcaklığı sadece mikroorganizmanın büyümesini değil, aynı zamanda biyolojik aktivitelerini de etkiler (Puri vd., 2013). Çizelge 2.3'de amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili kaynaklar özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Mikroorganizmaların amilaz üretme sıcaklıkları

Mikroorganizma	Üretim sıcaklığı (°C)	Kaynak
<i>Aspergillus fumigatus</i> NTCC1222	35	Singh vd., 2013
<i>Aspergillus niger</i> -ML-17	30	Irfan vd., 2012
<i>Rhizopus oligosporus</i> -ML-10	35	
<i>Discosia</i> sp.	30	Hegde vd., 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	60	Oziengbe ve Onilude, 2012
<i>Aspergillus niger</i> (BTM-26)	30	Abdullah vd., 2014
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	Puri vd., 2013
<i>Bacillus</i> sp.K-12	42	Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003
<i>Aspergillus</i> spp.	25	Gautam vd., 2013
<i>Aspergillus niger</i>	28	Sundar vd., 2012
<i>Mucor</i> sp	30	Mohapatra vd., 1998
<i>Aspergillus</i> sp. A3	30	Ellaiah vd., 2002
<i>Penicillium fellutanum</i>	30	Kathiresan ve Manivannan, 2006
<i>Aspergillus niger</i>	30	Gupta vd., 2008
<i>Aspergillus flavus</i>	30	Fadahunsi ve Garuba, 2012
<i>Bacillus</i> sp.	50	Teodoro ve Martins, 2000
<i>Aspergillus japonicus</i>	25	Pasin vd., 2014

2.1.4. Amilaz Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

Büyüme ortamının pH'sı, enzim salgılanması ve organizmanın morfolojik değişmesine neden olan önemli fizyolojik parametreler arasındadır. Organizmanın büyümesi boyunca değişiklik gösteren pH, ortamdaki ürün stabilitesini etkiler (Gupta vd., 2003). Çok düşük veya yüksek pH değerleri ekstraselüler enzimlerin stabilitesini etkiler ve hızlı bir şekilde denaturasyonuna neden olur (Shah vd., 2014). Pek çok fungusun amilaz üretimi ve büyümesi için optimum pH aralığının pH 5.0 ile 6.0 olduğu bildirilmiştir (Khoo vd., 1994). Çizelge 2.4'de amilaz üretimi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili kaynaklar özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Mikroorganizmaların amilaz üretme pH'ları

Mikroorganizma	Üretim pH	Kaynak
<i>Aspergillus oryzae</i>	7.0	Shah vd., 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i> NTCC1222	6.0	Singh vd., 2013
<i>Fusarium soloni</i>	5.0	Bhatti vd., 2007
<i>Penicillium janthinellum</i> (NCIM 4960)	5.0	Sindhu vd., 2009
<i>Aspergillus niger</i>	5.0	Gupta vd., 2008
<i>Aspergillus niger</i> -ML-17	5.0	Irfan vd., 2012
<i>Rhizopus oligosporus</i> -ML-10	6.0	
<i>Discosia</i> sp.	7.0	Hegde vd., 2011
<i>Aspergillus niger</i> (BTM-26)	5.0	Abdullah vd., 2014
<i>Aspergillus niger</i>	7.0	Sundar vd., 2012
<i>Aspergillus</i> sp. A3	5.0	Ellaiah vd., 2002
<i>Aspergillus japonicus</i>	5.5	Pasin vd., 2014
<i>Bacillus licheniformis</i>	7.0	Sankaralingam vd., 2012
<i>Bacillus licheniformis</i>	7.0	Oziengbe ve Onilude, 2012
<i>Bacillus</i> sp.	7.0	Teodoro ve Martins, 2000
<i>Bacillus</i> sp.	7.5	Mishra vd., 2014
<i>Bacillus</i> sp. DLB 9	9.0	Kaur ve Vyas, 2012

2.1.5. Amilaz Üretimi Üzerine İnokulum Yaşı ve İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarının azlığı veya çokluğu amilaz üretimini azaltır. Başlangıçtaki mikrobiyal yük büyümeyi ve primer metabolitlerin üretimini etkilerken, küçük inokulum miktarları fungusların lag dönemini uzatabilir. Belli bir seviyeye kadar aşılama boyutundaki artış genellikle büyümeyi ve büyüme ile ilgili faaliyetleri arttırır, fakat sonra besin kısıtlamasından dolayı mikrobiyal aktivitede azalma oluşur (Shah vd., 2014). İnokulum miktarı amilaz üretimi için önemli bir faktördür. Yüksek inokulum miktarları doğal bir inhibitördür. Çizelge 2.5'de amilaz üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi ile ilgili kaynaklar özetlenmiştir.

A. oryzae L-glutaminaz üretimi için inokulum yaşı olarak 4 günlük sporulasyon ortamı kullanıldığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmada inokulum yaşı arttıkça, mikrobiyal gelişimin ölüm fazına girip enzim üretiminin azalmasıyla sonuçlandığı belirtilmiştir (Prasanna ve Raju, 2012).

Bacillus subtilis amilazı ile yapılan çalışmada inokulum miktarı arttıkça enzim üretiminin azaldığı bildirilmiştir (Jogezai vd., 2011).

Paenibacillus amylolyticus α -amilazı ile yapılan çalışmada, yüksek inokulum miktarlarında enzim üretimindeki azalmanın, çok fazla miktardaki hücreler nedeniyle ortamdaki besinin azalmasına veya toksik metabolitlerin hızla birikmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (Ikram-Ul-Haq vd., 2012).

Çizelge 2.5. Mikroorganizmaların amilaz üretimi için kullanılan inokulum miktarları

Mikroorganizma	İnokulum miktarı (%)	Kaynak
<i>Aspergillus</i> sp. A3	10	Ellaiah vd., 2002
<i>Fusarium soloni</i>	15	Bhatti vd., 2007
<i>Aspergillus awamori</i>	2	Prakasham vd., 2007
<i>Aspergillus niger</i>	1	Suganthi vd., 2011
<i>Aspergillus niger</i> -ML-17	5	Irfan vd., 2012
<i>Rhizopus oligosporus</i> -ML-10	10	
<i>Aspergillus oryzae</i> Mutant ve doğal strain	10	Roheena Abdullah ve Javid, 2011
<i>Bacillus cereus</i> MTCC 1305	10	Singh vd., 2010
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> P-001	1	Deb vd., 2013

2.1.6. Amilaz Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

İnkübasyon periyodu enzim üretimlerinde çeşitlilik gösterir. Kısa inkübasyon periyotları ekonomik açıdan ucuz enzim üretimleri için potansiyel oluşturur (Ratnasri vd., 2014). İnkübasyon zamanı substrat kullanımı ve enzim üretiminde önemli rol oynamaktadır (Puri vd., 2013). Çizelge 2.6'da amilaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi ile ilgili kaynaklar özetlenmiştir.

Aspergillus niger BAN 3E amilaz üretimi için farklı substratlar kullanılmış ve her substrat için maksimum amilaz üretiminin farklı inkübasyon sürelerinde olduğu bulunmuştur. Susam tohumu küspesinde inkübasyonun 4. gününde (22.5 U/mg), yerfıstığı küspesinde inkübasyonun 6. gününde (311 U/mg), siyah gram kepeğinde inkübasyonun 5. gününde (86 U/mg) maksimum amilaz üretimi olduğu bildirilmiştir (Suganthi vd., 2011).

Çizelge 2.6. Mikroorganizmaların amilaz üretim süreleri

Mikroorganizma	İnkübasyon zamanı (Gün)	Kaynak
<i>Penicillium fellutanum</i>	4	Kathiresan ve Manivannan, 2006
<i>Penicilum rugulosum</i>	3	Tiwari vd., 2007
Fungal izolat 6	10	Tripathy vd., 2011
Fungal izolat 8	4	
<i>Aspergillus japonicus</i>	4	Pasin vd., 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	Ratnasri vd., 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i> NTCC 1222	6	Singh vd., 2014
<i>Aspergillus niger</i> (BTM-26)	3	Abdullah vd., 2014
<i>Aspergillus oryzae</i>	3	Shah vd., 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	Nwagu ve Okolo, 2011
<i>Aspergillus niger</i>	5	Gupta vd., 2010
<i>Bacillus brevis</i> MTTC 7521	1.5	Ray vd., 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	3	Sivaramakrishnan vd., 2007

2.2. Amilazların Saflaştırılması

Saflaştırma işleminde öncelikle saflaştırılacak enzimin ne için gerekli olduğuna karar verilmelidir. Genel olarak analitik ve ilaç sanayi çalışmaları için az ama saflık derecesi yüksek enzim kullanımı gerekmektedir. Sanayide kullanım için ise çok ama saflık derecesi fazla olmayan enzim kullanımı gerekmektedir.

Saflaştırma işlemlerinde enzimin kaynağı (bitki, insan, hayvan veya mikroorganizma) ve yapılacak işlem de önemlidir. Saflaştırma işlemleri maliyet olarak çok yüksek olmakta ve uzun süre gerekmektedir. Saflaştırma çalışmalarında kullanılan malzeme ve kimyasal maddeler çok pahalıdır. Malzemenin seçimi çok iyi planlanıp eldeki imkânlara göre yapılmaya çalışılmalı, kullanılabilecek alternatif yollar, araçlar ve kimyasal maddeler belirlenmelidir.

Saflaştırma katsayısı ve verim kullanılan yöntemlere göre büyük farklılık göstermektedir. Saflandırmada kullanılan tekniklerin sayısı arttıkça, enzimin veriminde büyük kayıplar olabileceği bilinmektedir. Ayrıca kromatografik metotlar pahalı ve oldukça zaman alıcı tekniklerdir. Bu nedenlerden dolayı saflaştırmanın kısa zamanda, tek bir adımda ve ucuz olan metotlarla yapılması tercih edilmektedir. Çizelge 2.7’de amilazların saflaştırma yöntemleri ve molekül ağırlıkları ile ilgili kaynaklar özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. Amilazların saflaştırma yöntemleri ve molekül ağırlıkları

Organizma	Yöntem	Saflaştırma katsayısı/ Verim (%)	Molekül ağırlık (kDa)	Kaynak
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Ultrafiltrasyon, (NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE selüloz, Hidroksiapatit, HPLC	810/9	210	Ratanakhanokchai vd., 1992
<i>A. flavus</i> LINK	% 50-90 (NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE-Sefadeks A50 (pH 6.5)	13.8/70	52.5	Khoo vd., 1994
<i>Bacillus stearothermophilus</i> DSM 2358	Sonikasyon, Triton X-100 ile plazma membran ekstraksiyonu	-	58, 98,184	Egelseer vd., 1995
<i>Cryptococcus</i> sp. S2	Ultrafiltrasyon, α-Siklodekstrin Sefaroz 6B (pH 7.0)	140/78	66	Iefuji vd., 1996
<i>Aspergillus flavus</i>	Nişasta affinite, Aseton çöktürmesi	262.32/0.57	75	Abou-Zeid, 1997
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	Sonikasyon, hücre fraksiyonlaması	-	140	Matzke vd.,1997
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPB-G	Ultrafiltrasyon, β-Siklodekstrin Sefaroz 6B (pH 4.5), Sefadeks G-100 (pH 4.5)	5/2	54.1	De Moraes vd., 1999
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG 18010T	Ultrafiltrasyon, DEAE selüloz kolonu (pH 7.2), Sefadeks G-200	28.3/6.2	135	Aguilar vd., 2000
<i>Streptomyces</i> sp. No.4	Nişasta adsorbsiyon metodu, Afinite kromatografisi, İyon değişim kromatografisi	126/2	56, 77	Primarini ve Ohta, 2000

Çizelge 2.7. Amilazların saflaştırma yöntemleri ve molekül ağırlıkları (devamı)

Organizma	Yöntem	Saflaştırma katsayısı/ Verim (%)	Molekül ağırlık (kDa)	Kaynak
<i>Vibrio</i> sp.	Nişasta affinite kromatografisi	163.5/78	52.48	Najafi ve Kembhavi, 2005
<i>Bacillus subtilis</i> AX20	% 70(NH ₄) ₂ SO ₄ , Sefadex G-50, DEAE selüloz kolonu (pH 9.0), Nişasta kolonu, Sefakril S-400 Kolonu	37.5/24.2	149	Najafi vd., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Nişasta affinite	230/51	58	Mendu vd., 2005
<i>Bacillus brevis</i> MTCC 7521	%50 (NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE selüloz kolonu (pH 6.0)	41.1/5.46	205	Ray vd., 2008
<i>Penicillium citrinum</i> HBF62	Nişasta affinite kromatografisi	18/82	65	Metin vd., 2010
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Sefadex jel filtrasyon kromatografisi, İyon değişim kromatografisi	8.138/58	94.5	Satheesh Kumar vd., 2010
<i>Bacillus</i> sp. DM-15	-	-	126	Ozcan vd., 2010
<i>Panicum sumatrense</i>	DEAE-selüloz, Sephadex G-150	10.15/29	46	Usha vd., 2011
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Diyaliz	-	135, 145	Abou Dobra vd. 2011
<i>Aspergillus oryzae</i> S2	Evaporasyon, Aseton çöktürmesi, Jel filtrasyon kromatografisi ve İyon değişim kromatografisi	12/81.41-16/58.56	50, 42	Sahnouna vd., 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	Soğuk asit uygulaması, Sefadex G-150	6.4/42.16	39.4	Olufunke ve Azeez, 2013
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Diyaliz, Sephadex G-100, DEAE-selüloz	46/65	63	Fincan ve Enez, 2014
Misvak bitkisi	DEAE-Sefaroz, Sefakril S-200	-	14, 74, 16, 30, 20	Mohamed vd., 2014

2.3. Amilazların Aktivite ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Enzimin üç boyutlu yapısını oluşturan zayıf bağlar (hidrojen, iyonik ve moleküler bağlar) ve özellikle disülfid bağlarının azlığı veya çokluğu enzimin pH ve sıcaklık stabilizasyonu için önemli rol oynadığı bilinmektedir (Shenoy vd., 1985).

Aspergillus flavus α -amilazının 50 °C'da 1 saat stabil olduğu, optimum pH'sının 6.0 ve sıcaklığının ise 55 °C olduğu, enzimin pH 5.0 ile 8.5 aralığında stabil olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994).

Aspergillus carbonarius amilazının 20 dk inkübasyondan sonra 30 °C ile 80 °C arasında aktivitesinin %85'ini, 90 °C'da ise %65'ini gösterdiği bulunmuştur. (Okolo vd., 2000).

Termofilik *Geobacillus stearothermophilus* α -amilazının 2 saat inkübasyondan sonra 50 ve 60 °C de stabil olduğu, 70 °C ise aktivitesinin %50'sini gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin pH 6.0, 7.0 ve 8.0 de aktivitesini %67, 52 ve 50 oranında koruduğu bulunmuştur (Fincan ve Enez, 2013).

Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* α -amilazının 50 °C'da 1 saat stabil olduğu, enzimin yarı ömrünün 55 °C'da 25 dk ve 60 °C'da 12 dk olduğu, %1'lik nişasta varlığında 60 °C'da 1 saat tamamen stabil olduğu bulunmuştur Optimum sıcaklığının 65-70 °C arasında olduğu ve optimum pH'sının 6.0 olduğu bulunmuştur (Aquino vd., 2003).

Rhizopus microsporus var. *rhizopodiformis* amilolitik aktivitesinin sıcaklık stabilitesinin oldukça yüksek olduğu, 60 °C'da 120 dk sonra enzim aktivitesinin %50'sinin geri kazanıldığı, 65 °C'da stabil olmadığı fakat ortama %1'lik nişasta eklendiği zaman termal inaktivasyondan korunduğu bulunmuştur (Peixoto vd., 2003).

Bacillus licheniformis NH1 α -amilazının optimum sıcaklığının 90 °C olduğu, 80 ve 100 °C de ise aktivitesinin %79 ve 92'sini gösterdiği saptanmıştır. Amilazın 1 saat boyunca 70 °C stabil olduğu, 80 °C de aktivitenin sadece %24'ünü gösterdiğini, 85 ve 90 °C ise 30 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu bulunmuştur. 90 °C de ortama 5 mM Ca²⁺ ilave edildiğinde enzimin yarı ömrünün 15 dakika olduğu, kalsiyum yokluğunda ise 3 dakika olduğu saptanmıştır.

Kalsiyum varlığında termal inaktivasyona karşı amilaz termostabilitesinin geliştiği ve bunun da enzimin A ve B domain köprüleri arasındaki ana kalsiyum bağlanma bölgesindeki Ca-Na-Ca metal üçlüsü ile etkileşime girmesi sonucunda olduğunu bildirmişlerdir (Hmidet vd., 2010).

Aspergillus tamarii α -amilazının 65 °C'da birkaç saat tamamen aktif olduğu, enzimin yarı ömrünün 70 °C'da 30 dakika olduğu ve 75 °C'da ise stabil olmadığı bulunmuştur. Yüzde 1'lik nişasta ile inkübe edildiğinde enzimin yarı ömrünün 70 °C'da 70 dakika ve 75 °C'da 40 dakika olduğu bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F₁ glukoamilazı ve α -amilazının optimum pH ve sıcaklıklarının sırasıyla 6.0/5.0 ile 70/60 °C olduğu bulunmuştur. Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F₁ glukoamilazı ve α -amilazının pH 4.0'da oda sıcaklığında 24 saat tamamen stabil oldukları, pH 5.0 ve 6.0 arasında ise %80'inin geri kazanıldığı bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

Termofilik bakteri *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazının 60 °C'ye kadar aktivitesinde önemli bir kayıp olmadığı, 70 °C'da 2 saat inkübasyondan sonra aktivitenin %50'sinden fazlasının geri kazanıldığı bildirilmiştir. Saflaştırılan enzimin pH 4.0 ile 7.0 arasında aktivitesinin %50 den fazlasını koruduğu, yüksek pH değerlerinde ise önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Satheesh Kumar vd., 2010).

2.4. Amilazların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

Birçok metal katyonları, genellikle ağır metal iyonları, sülfidril grup ajanları, N-bromosüksinimid, p-hidroksilmerkuribenzoik asit, iyodoasetat, BSA, EDTA ve EGTA'nın α -amilazı inhibe ettiği bildirilmiştir (Gupta vd., 2003).

Bacillus licheniformis AI20 tarafından üretilen α -amilazın aktivitesi üzerine etanol, metanol, isopropanol, aseton gibi çözücüler ile gliserol gibi kimyasalların, Triton X-100, Tween-20 ve Tween 85 gibi deterjanlar ve SDS gibi sürfaktanların etkisi çalışılmıştır. Enzim, %10 oranında denenen çözücülere karşı büyük bir kararlılık göstermiş, %20 konsantrasyonda ise bazı çözücüler (etanol, metanol, isopropanol) enzim aktivitesinde hafif bir düşüşe neden olmuştur. Aseton ve gliserolün ise enzim aktivitesini etkilemediği saptanmıştır. Deterjanların %0.25

oranında denenen konsantrasyonunda enzim aktivitesinin stabil olduğu, Triton X-100, Tween-20 ve Tween 85 %0.5 ve 1'lik konsantrasyonda ise aktivitede sırasıyla %16, 27, 41 ve %25, 28, 42 oranında bir kayba neden olduğu bulunmuştur. Anyonik sürfaktan SDS'nin %1 konsantrasyonda enzim aktivitesinde %35'lik bir azalma gösterdiği saptanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013).

Glukoamilazlar ile yapılan çalışmalarda genelde katalitik merkezde nişastanın hidrolizinden sorumlu amino asitler olarak histidin, triptofan, tirozin ve glutamik asidin bulunduğu bildirilmiştir (Shenoy vd., 1985; Williamson vd., 1997; Reilly, 1999; Sauer vd., 2000; Juge vd., 2002; Sutthirak vd., 2005; Ševčík vd., 2006).

Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* 15.8'in glukoamilazı ve α -amilazı 1 mM β -merkaptöetanol tarafından tamamen inhibe edilmiş ve disülfit bağlarının varlığı gösterilmiştir (Cereia vd., 2006).

Bacillus licheniformis NH1 α -amilazının 1 saat 40 °C de %1 oranında Tween-20 ve Triton X-100 ile muamele edildiği ve bu süre sonunda aktivitede herhangi bir kayıp olmadığı bildirilmiştir. %10'luk SDS varlığında ise aktivitede %20 oranında bir azalma olduğu, %1'lik sodyum perborat (okside edici ajan) varlığında ise 1 saat sonunda %43 oranında kayıp olduğu bildirilmiştir. 1mM PMSF ve 10 mM β -merkaptöetanol'ün enzim aktivitesini etkilemediği bulunmuştur (Hmidet vd., 2010).

Streptomyces sp. No.4'ün amilazlarının (A1 ve A2) 1mM β -merkaptöetanol tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Pirimarini ve Ohta, 2000).

Natronococcus sp. α -amilazının %1'lik SDS ve 1 M üre varlığında aktivitesinin %80 ve 74 oranında inhibe olduğu, 1 mM PMSF'nin inhibitör etkisi göstermediği, N-bromosüksinamidin ise %73 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre enzimin aktif merkezinde triptofan olduğu bulunmuştur (Kobayashi vd., 1992).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626'nın glukoamilaz ve α -amilazının 10 mM üre tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Nguyen vd., 2002).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F₁'in glukoamilaz ve α -amilaz aktivitesinin 2 mM SDS tarafından aktive edildiği, üre tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

Thermus sp. α -amilazının üre ile etkilenmediği, SDS ile %63 oranında inhibe edildiği bulunmuştur (Shaw vd., 1995). *Clostridium perfringens* Type A α -amilazı 10 mM SDS tarafından inhibe edilmiştir (Shih ve Labbé, 1995).

Bacillus subtilis DM-03'ün α -amilazı PMSF ve SDS tarafından inhibe edilmiş, ürenin 2 M konsantrasyonundan etkilenmezken, 8 M konsantrasyonunda %78 oranında inhibe edildiği bulunmuştur (Das vd., 2004).

Aspergillus carbonarius amilazı 2 mM N-bromosüksinamid tarafından %49 oranında inhibe edilmiştir (Okolo vd., 2000).

Thermomyces lanuginosus α -amilazı CMC (1-Sikloheksil-3-(2-morfolinil-4-etil)-karboimid) ve N-bromosüksinamid tarafından inhibe edilmiş ve bu sonuçlara göre enzimin aktif merkezinde karboksil grupları ve triptofan amino asidinin olduğu ileri sürülmüştür (Petrova vd., 2000).

Termofilik bakteri *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazının SDS, Triton X-100, Tween-20 ve Tween-80 tarafından etkilenmediği ve stabil olduğu, üre tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. Amilaz aktivitesi üzerine sürfaktanların etkisinin çok düşük oranda olduğu ve enzimin deterjan sektöründe kullanıma uygun olduğu bildirilmiştir. Üre denaturasyonunun ise enzimin bileşimindeki hidrofobik amino asit residülerinden dolayı olduğu bildirilmiştir (Satheesh Kumar vd., 2010).

2.5. Amilazların Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapılarının oluşumunda ve aktif merkezde substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar.

Metal iyonları katalitik işleme farklı yollarla yardımcı olurlar; (a) substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağlarlar, (b) oksidasyon sayılarındaki dönüşümlü değişimlerle redoks reaksiyonlarına katılırlar (c)

substratın negatif yükünü elektrostatik olarak kararlı hale getirirler. Divalent iyonların şelatlayıcı ajanı olan EDTA, metallo-proteinlerin ve aktivasyonları için divalent katyonlara ihtiyaç duyan enzimlerin bir inhibitörüdür (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

Termofilik bakteri *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazının aktivitesi üzerinde 1 mM metal iyonları ile 20, 40 ve 60 mM şelatlayıcı ajan olan EDTA'nın etkisi çalışılmıştır. EDTA'nın 40 ve 60 mM da enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği ve bu sonucun da enzimin metale bağımlı olduğunu gösterdiği belirtilmiştir. 1 mM Ca^{2+} iyonu varlığında enzim aktivitesinin önemli oranda arttığı, denenen diğer metal iyonlarının (Mg^{2+} , Hg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) ise enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. Kalsiyumun yüksek deney sıcaklıklarında enzimin stabilizasyonunu sağladığı ve bunun da aktiviteyi arttırdığı bildirilmiştir (Satheesh Kumar vd., 2010).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F₁'in GA aktivitesi 2 mM Mn^{2+} (%63), Co^{2+} (%51), Ca^{2+} (%27), Fe^{2+} (%15) ve Zn^{2+} (%11) tarafından aktive edildiği, Ba^{2+} (%3) tarafından etkilenmediği, EDTA (%43) ve Hg^{2+} (%83) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur. Aynı fungusun α -amilazının 2 mM Co^{2+} (%78), Mn^{2+} (%24), Zn^{2+} (%13), Ca^{2+} (%11) ve Fe^{2+} (%8) tarafından aktive edildiği, Ba^{2+} (%11), EDTA (%46) ve Hg^{2+} (%90) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

Aspergillus carbonarius nişasta hidrolizleyen amilazının 2 mM Fe^{2+} ve Co^{2+} tarafından aktive edildiği, Ca^{2+} gibi divalent veya Na^+ gibi monovalent katyonlara aktivite için gereksinim göstermediği bulunmuştur. Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} ve EDTA'nın enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Okolo vd., 2000).

Scytalidium thermophilum α -amilaz aktivitesinde 1 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Na^+ iyonlarının %4-8 oranında bir artışa sebep olduğu, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} ve NH_4^+ sırasıyla %47, 17, 12 ve 12 oranında, özellikle Hg^{2+} ile Cu^{2+} ise %85 ile 75 oranında inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. On mM konsantrasyonda ise aktivitede Na^+ iyonunun %10'luk bir artış gösterdiği, Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^+ iyonlarının yaklaşık olarak %18'lik inhibisyona ve özellikle Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının ise %93, 96 ve 100'lük inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Aquino vd., 2003).

Maya *Cryptococcus flavus*'un α -amilaz aktivitesinde 4 mM Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının sırasıyla %4, 5, 15, 30, 71, 80 ve 100 azalmaya sebep olduğu saptanmıştır (Wanderley vd., 2004).

Aspergillus tamarii α -amilazının 10 mM Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} tarafından %90-98 oranında inhibe edildiği, Ba^{2+} tarafından %23 oranında aktive edildiği ve denenen diğer metal iyonları tarafından önemli bir şekilde etkilenmediği bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Streptomyces sp. No.4 amilazları (Amilaz 1 ve 2) üzerine 1 mM metal iyonlarının etkisi incelenmiş, Amilaz 1'in Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} tarafından çok azda olsa aktive edildiği, Ni^{2+} ve Mn^{2+} 'dan etkilenmediği, Sn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} (%100) ve EDTA tarafından inhibe edildiği bulunmuştur. Amilaz 2'nin ise, denenen tüm metal iyonları ile inhibe olduğu, EDTA'nın ise aktivitede %13'lük bir artışa neden olduğu bulunmuştur (Primarini ve Ohta, 2000).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 α -amilazının 10 mM'lık Zn^{2+} ve Co^{2+} tarafından inhibe edildiği, Mn^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının aktiviteyi etkilemediği, Ca^{2+} , Ba^{2+} ve EDTA tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Nguyen vd., 2002).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* α -amilazının 5 mM Cu^{2+} ve Fe^{3+} iyonları tarafından %90 oranında inhibe edildiği, bunun da muhtemelen enzimin aktif bölgesindeki karboksil gruplarıyla kompleks oluşturduğu, Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} ve Cd^{2+} 'un ise enzimi aktive ettiği bulunmuştur (Petrova vd., 2000).

Mucor sp. amilazı Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ve Hg^{2+} 'nın yüksek konsantrasyonlarında (25 mM) inhibe olurken, Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} tarafından daha az inhibe edildiği, 25 mM Mg^{2+} enzimi etkilemediği, 5 mM EDTA'nın enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Mohapatra vd., 1998).

Bacillus licheniformis AI20 α -amilazının Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'un 0.1mM konsantrasyonunda aktivitesinin etkilenmediği, 1mM konsantrasyonda ise Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Cu^{2+} 'nın %8-9 oranında bir kayba neden olduğu, 10 mM konsantrasyonda Cu^{2+} ve Zn^{2+} 'nın sırasıyla %75 ve 45 oranında aktivitede kayba neden olduğu bulunmuştur. Hg^{2+} 'nın 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Enzimin %0.25 konsantrasyonda

EDTA ve EGTA tarafından sırasıyla %45 ve 35 oranında inhibe olduğu bulunmuştur (Abdel-Fattah vd., 2013).

Bacillus licheniformis NH1 α -amilazının aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının 2 mM konsantrasyonda etkisine bakılmış ve Ca^{2+} , Ba^{2+} ve Fe^{2+} 'in enzim aktivitesini etkilemediği saptanmıştır. Mg^{2+} 'un enzim aktivitesini çok az etkilediği (%7), Hg^{2+} ve Zn^{2+} 'nin enzimi tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Şelat ajanı olan EDTA'nın ise enzim aktivitesini inhibe ettiği ve bunun sonucu olarak *Bacillus licheniformis* NH1 α -amilazının metale bağımlı enzim olduğu saptanmıştır (Hmidet vd., 2010).

2.6. Amilazların Substrat Özgüllüğü

Streptomyces sp. tarafından üretilen üç farklı α -amilazın (Amilaz 1, 2 ve 3) amiloz için yüksek afiniteye sahip olup K_m değerleri sırasıyla 0.2, 0.3 ve 0.2 mM, maltotrioza karşı zayıf afiniteye sahip olup K_m değerleri sırasıyla 8.2, 8.0 ve 8.2 mM olarak bulunmuştur (McMahon vd., 1999).

Bacillus subtilis KIBGE HAS mikroorganizmasından saflaştırılmış α -amilazın optimum koşullar altında çözünür nişasta substratı ile K_m değeri 2.68 mg/mL ve V_{max} 1773 U/mL olarak hesaplanmıştır (Bano vd., 2011).

Bacillus licheniformis AI20 α -amilazının K_m değeri 0.709 mg/mL ve V_{max} 454 mU/mg olarak hesaplanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013).

Termofilik bakteri *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazının K_m değeri 2.9 mg/mL ve V_{max} 7936 U/mL olarak hesaplanmıştır (Satheesh Kumar vd., 2010).

Bacillus licheniformis ATCC 6346 tarafından üretilen ham ve saflaştırılmış α -amilazın substrat özgüllüğüne bakılmış, ham enzimin amiloz, amilopektin, pektin, kitin, ksilan ve maltoz'a karşı sırasıyla %119.3, 77.7, 25.5, 27.4, 5.7 ve 20.3 aktivite gösterdiği, çözünür nişasta ile karşılaştırıldığında ise selüloz, pullulan ve sukroza karşı aktivite göstermediği bulunmuştur. Saflaştırılan amilazın ise amiloz, amilopektin, pektin, kitin, ksilan ve maltoz'a karşı sırasıyla %107.42, 60.02, 19.64, 21.17, 0 ve 20.3 aktivite gösterdiği bulunmuştur. Amilazın selülozu hidroliz etmemesinin yapısında bulunan β -1,4 bağlarından kaynaklandığı belirtilmiştir.

Enzimin nişasta, amilopektin ve amiloza karşı hidrolizleme yeteneğinin olduğu, maltoza karşı ise yavaş olduğu bildirilmiştir (Vengadaramana vd., 2011)

Aspergillus tamarii α -amilazının nişasta, amilopektin ve amilozu hidrolizleme oranının yüksek olduğu, glikojen ve pullulanı çok yavaş hidrolizlediği, siklodekstrinleri (α ve β) hidrolizleyemediği bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake* α -amilazının substrat spesifitesi için farklı polisakkaritler kullanılmış, en iyi hidrolizlenen substratın çözünür nişasta olduğu, daha sonra sırası ile amiloz A, amiloz, amiloz B ve glikojen olduğu bulunmuştur. *Tricholoma matsutake* α -amilazı α -1,6 bağlarını ve siklik polisakkaritleri (α ve β -siklodekstrin), α -1,4, α -1,6 ve α -1,3 bağlarını da içeren pullulanı hidrolizleyemediğini göstermiştir (Kusuda vd., 2003).

Bacillus subtilis ve onun mutant türevleri tarafından üretilen α -amilazın K_m değerleri sırası ile 1.08 ve 1.43 (mg/mL), V_{max} değerleri ise 100 ve 151 (U/mL) olarak bulunmuştur (Demirkan, 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Kimyasallar ve Mikroorganizma olmak üzere iki başlık altında verilecektir.

3.1.1. Kimyasallar

Coomassie Brilliant Blue G-250, çözünebilir nişasta, azokazein, pepton, maltoz, $AlCl_3$, glukoz, glutatyon, $MnSO_4 \cdot H_2O$, N,N'-metilen bis-akrilamid, proteinaz K, borik asit, NaF, sığır serum albumini, standart protein karışımı [domuz miyosini, 200 kDa), β -galaktozidaz (*E.coli*, 116 kDa), fosforilaz B (tavşan kası, 97 kDa), albumin (sığır albumini, 66 kDa), albumin (yumurta, 45 kDa), karbonik anhidraz (sığır eritrosit, 29 kDa)], Tween 40, Tween 80, safra tuzu, alüminyum silika jel, fenol kırmızısı, corn step liquor, brochial epitelium cell, mısır nisastası, tripan blue, selüloz, MES, yeast nitrojen baz, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) **Sigma firmasından**; agar-agar, akrilamid, amonyum persülfat, amonyum sülfat, aseton, $BaCl_2$, brom fenol mavisi, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CoCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, etanol, etilen diamin tetra asetik asit ($EDTA-C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, gliserol, glisin, HCl, hekzan, Hg_2Cl_2 , KCl, metanol, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, NaOH, n-bütanol, NH_4Cl , $NiCl_2$, sitrik asit, sodyum dodesil sülfat (SDS), I_2 , sülfürik asit (H_2SO_4), TEMED, trikloroasetik asit, Tris baz, Triton X-100, kongo kırmızısı, üre, 2,3-bütandiöl, yeast ekstrakt (maya özütü), $ZnCl_2$, β -merkaptotanol, sodyum potasyum tartarat ($C_4H_4O_6KNa_4 \cdot H_2O$), skim milk, Tween 60 **Merck firmasından**; 1,4- dithiothreitol (DTT), 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), fenil metil sülfonil florür (PMSF), iodoasetamid (İAA), metil-p-toluen-sulfonat (CMC), N-bromo suksinamid (NBS), o-fosforik asit, sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid, amilopektin, amiloz, glikojen, pirinç nisastası, rafinoz, buğday nisastası, dekstrin, orsinol, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz **Fluka firmasından**; 1,4-dioksan, dimetil sülfoksit (DMSO), etilen glikol, Tween 20 sodyum asetat **Panreac firmasından**; LiCl **Avokado firmasından**; KH_2PO_4 , NaCl ve sodyum sitrat **Carlo Erba firmasından**; asetik asit, KI ve propanol **Riedel-de Haën firmasından**; malt ekstrakt agar, czapek dox agar, patates dekstroz agar **Lab M firmasından**; Taq polimeraz, dTNP ve PCR tamponu **Fermentas firmasından** sağlandı.

3.1.2. Mikroorganizma

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarı fungus stoklarında bulunan ve çeşitli kaynaklardan izole edilen 91 adet fungus stoku kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Fungusların Sıcaklık Sınırının Belirlenmesi

Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Laboratuvarında saklanan ve çeşitli kaynaklardan izole edilen 91 fungusun termotolerant veya termofilik olup olmadıklarını belirlemek amacıyla sıcaklık taraması yapıldı. Stok fungus suşları patates dekstroz agar ortamında farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50 ve 60 °C'da) 5 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda koloni çapları elektronik kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, İngiltere) ile ölçüldü ve sonuçlar mm cinsinden kaydedildi. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.2. Kalitatif Lipolitik, Amilolitik, Proteolitik, Selülitik ve Üreolitik Aktivite Tayini

Sıcaklık taraması yapılan, termofilik ve termotolerant olarak belirlenen fungusların amilolitik, selülitik, proteolitik, lipolitik ve üreolitik aktivite gösterip göstermedikleri aşağıda ayrıntıları verilmiş olan metotlar ile belirlendi.

3.2.2.1. Lipolitik aktivite tayini

İzolatların lipolitik aktiviteleri Tween 80 agar yöntemine göre (Haba vd., 2000) belirlendi. Bunun için %0.01' lik $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ içeren malt ekstrakt agar ortamı ve Tween 80 ayrı olarak 115 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilize edilen bu ortam 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, Tween 80 konsantrasyonu %1 olacak şekilde agar ortamına eklendi. Stok fungus kültürleri, Tween 80 agarlı petrilere inoküle edildi ve 27-30 °C'deki etüvde 72 saat inkübe edildi. Lipolitik aktivite gösteren funguslar, Tween 80'i substrat olarak kullandığında açığa çıkan oleik asit ortamdaki Ca^{2+} ile birleşip çökerek kolonilerin etrafında opak bir zon oluşturur. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında oluşan opak zon çapı ölçüldü ve zon çapının koloni çapına oranlanması

ile lipolitik aktivitenin derecesi belirlendi. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Amilolitik aktivite tayini

İzolatların amilolitik aktiviteleri amilaz besiyeri (%2 agar, %0.5 safra tuzu, %1 çözünebilir nişasta, %0.67 yeast nitrojen baz) kullanılarak belirlendi. Bunun için %2 agar, %0.5 safra tuzu, %1 çözünebilir nişasta içeren ortam 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Ortam 40-50 °C'ye soğuduktan sonra yeast nitrojen baz, son konsantrasyonu %0.67 olacak şekilde ve filtre sterilizasyonu yapılarak, bu ortama eklendi. Stok fungus kültürleri, amilaz besiyeri içeren petrilere inoküle edilerek, 27-30 °C'deki etüvde 72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilere %0.3 I-%0.6 KI ile hazırlanan iyodür çözeltisi püskürtüldü. Amilolitik aktiviteye sahip organizmalar ortamdaki nişastayı parçaladıkları için, kolonilerin etrafında nişastanın iyotla verdiği karakteristik koyu mavi renk oluşmayarak açık zonlar görülür. Amilolitik aktivitenin derecesi ise oluşan bu açık zon çapının koloni çapına oranlanması ile belirlendi (Møller vd., 2004). Tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.2.3. Proteolitik aktivite tayini

İzolatların proteolitik aktiviteleri %10 skim milk içeren malt ekstrakt agar ortamı kullanılarak belirlendi (Pereira vd., 2001). Bunun için, malt ekstrakt agar ve skim milk ayrı olarak 115 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilize edilen bu ortam 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, skim milk çözeltisi son konsantrasyonu %10 olacak şekilde agar ortamına eklenerek karıştırıldı ve steril koşullarda petrilere döküldü. Stok fungus kültürleri, skim milk agarlı petrilere inoküle edildi ve 27-30°C'deki etüvde 72 saat inkübe edildi. Proteolitik aktivite gösteren izolatlar skim milk'teki kazeini parçalayarak besi ortamında şeffaf bir zon oluşturur. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında oluşan bu şeffaf zon pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Zon çapının koloni çapına oranlanması ile proteolitik aktivitenin derecesi belirlendi. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.2.4. Selülitik aktivite tayini

İzolatların selülitik aktiviteleri %1 selüloz içeren Czapek dox agar ortamı kullanılarak belirlendi (Teather ve Wood, 1982; Doran, 2000). Bunun için, selüloz ve Czapek dox agar 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilize edilen bu ortam 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril koşullarda petrilere döküldü. Stok fungus kültürleri, selülozlu Czapek dox agarlı petrilere inoküle edilerek 27-30°C'deki etüvde 72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilere %0.1'lik Kongo kırmızısı damlatılıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 1 M NaCl çözeltisi damlatıldı ve 5-10 dakika bekletildi. Selülitik aktivitenin derecesi süre sonunda oluşan zon çapının koloni çapına oranlanması ile belirlendi. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.2.5. Üreolitik aktivite tayini

İzolatların üreolitik aktiviteleri üre agar yöntemine (%0.13 üre, %2 glukoz, %0.05 MgSO₄. 7H₂O, %0.03 CaCl₂, %0.012 fenol kırmızısı, %1.5 agar) göre belirlendi. Bunun için glukoz, MgSO₄. 7H₂O, CaCl₂, fenol kırmızısı ve agarın 100 °C de çözünmesi sağlandı. Besiyeri soğuduktan sonra 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH 6.8'e ayarlandı. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilize edilen ortam 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, filtre sterilizasyonu yapılan üre steril koşullarda besi ortamına eklendi. Stok fungus kültürleri, üre agarlı petrilere inoküle edildi ve 27-30 °C'deki etüvde 72 saat inkübe edildi. Üreolitik aktiviteye sahip funguslar, üreyi substrat olarak kullandığında açığa çıkan amonyak ortam pH'sını yükseltir. pH değişiminden dolayı fenol kırmızısının rengi sarıdan kırmızıya döner ve kolonilerin etrafında bir zon oluşturur. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında oluşan zon çapı ölçüldü ve zon çapının koloni çapına oranlanması ile üreolitik aktivitenin derecesi belirlendi (Ghasemi vd., 2004). Tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.3. Aflatoksin Testi

Amilolitik aktivite gösterdikleri belirlenen 15 termotolerant ve termofilik fungusun aflatoksin üretme yetenekleri floresans yöntemi kullanılarak belirlendi (Hara vd., 1974). Bunun için sukroz, 30 g; K₂HPO₄, 10 g; MgSO₄.7H₂O, 0.5 g; KCl, 0.5 g; (NH₄) H₂PO₄, 10 g; FeSO₄.7H₂O, 0.01 g; NaNO₃, 3 g; HgCl₂, 5x10⁻⁴ M; corn steep liquor, 0.5 g; agar, 20 g, distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Agar

eklenmeden önce pH 1 N NaOH ile 5.50'e ayarlandı ve ortam 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Ortam 40-50 °C'ye kadar soğuduktan sonra, steril koşullarda petrilere döküldü. Fungus kültürleri, besiyerine inoküle edilerek, 27-30 °C'deki etüvde 7 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda petri plakları UV ışığına (365 nm) tutuldu. UV ışığı altında floresan ışımaya yapan koloniler aflatoksin üretme yeteneği açısından pozitif olarak kabul edildi.

3.2.4. Seçilen Fungusların Toksin Üretme Yeteneklerinin Görüntülenmesi

Amilolitik aktivite yönünden en yüksek olan ve aflatoksin üretmeyen termofilik iki fungus ve aflatoksin yönünden pozitif olan iki farklı fungus (kontrol) patates dekstroza agarda 5 gün 30 °C de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fungusların serum fizyolojik su ile OD₆₂₀ 0,1 olacak şekilde spektrofotometre de ayarlama yapıldı. Uygun seyreltmeleri yapılan fungus örneklerinden Bronchial epitelium cell basal medium ortamına steril koşullarda ekim yapıldı ve 37 °C de 2, 4 ve 8 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler 500 µL serum fizyolojik ile 2 kez yıkandıktan sonra ½ oranında seyreltilmiş tripan blue/serum fizyolojik ile 5 dakika boyunca boyandı. Boyama sonunda kuyucuklardaki boya mikro pipetle uzaklaştırıldı. Olympus CK40 invertör tip mikroskop kullanılarak 10'luk objektifte beş farklı alanda ölü ve canlı hücreler sayıldı. Yüz hücredeki ölü ve canlı hücre sayıları hesaplanarak, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki ölü ve canlı hücre sayısı karşılaştırıldı. Herhangi bir çözelti içermeyen hücreler ise kontrol grubu olarak kullanıldı.

3.2.5. Mikroorganizmanın Seçimi

Toksin üretimi yapmayan funguslar *Aspergillus fumigatus* HBF125 ve *Aspergillus fumigatus* HBF126 suşları sıvı kültür ortamında geliştirilerek spektrofotometrik yöntemle kantitatif olarak amilolitik aktivite tayini yapıldı. Bu işlem için yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

3.2.5.1. Sporulasyon ve kültür ortamı

Bu işlem için önce *Aspergillus fumigatus* HBF125 ve *Aspergillus fumigatus* HBF126 suşlarının sporulasyon ortamında spor oluşumu sağlandı. Sporulasyon ortamı olarak %1'lik çözünür nişasta içeren, patates dekstroza agar kullanıldı. Amilaz kültür ortamı içeren 500 mL'lik erlene, sporulasyondan sonra 10⁻⁴'lük seyreltmeden 10⁸ spor/mL olacak şekilde inoküle edildi Enzim üretimi için

kullanılan sıvı kültür ortamının içeriği Çizelge 3.1’de ve standart deney ortamı ise Çizelge 3.2’de verildi. İnkübatörde 40 °C’da 100 rpm de 6 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresince hergün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı ölçüldü. İnkübasyon sonunda kültür ortamı Buhner hunisinde filtre kağıdı kullanılarak vakum altında süzüldü ve süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Çizelge 3.1. Amilaz kültür ortamı

Kimyasal Maddeler	Miktarı (g/L)
NaNO ₃	3
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
KH ₂ PO ₄	1
Pepton	10
Çözünür patates nişastası	20
CaCl ₂ .H ₂ O	5
pH 5.0	

Çizelge 3.2. Ham enzim aktivitesi için standart deney ortamı içeriği

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patates nişastası (%1)	100 µL	100 µL
Enzim	100 µL	-
50 °C, 30 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorpsiyon okunur		

3.2.5.2. İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi için ince tabaka kromatografisi kullanıldı (Fontana vd., 1988). Bu işlem için 1 mL enzim çözeltisi ile 1 mL %1’lik çözünür patates nişastası karıştırılarak 40 °C’da 24 saat inkübe edildi. Yirmidört saat sonunda enzim-nişasta karışımından 200 µL alınarak kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Örnekler kullanılıncaya kadar 4 °C’da

saklandı. Standart olarak glukoz, maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltopentoz kullanıldı. Standart karışımı 50 mM McIlvaine tamponunda %0.1'lik olacak şekilde hazırlandı. İnce tabaka plaklarının (Alugram® Sil G/UV₂₅₄ 0.2 mm, 5 x 10 cm, Almanya) alt kısmından 0.5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizildi. Sonra standart, nişasta ve örneklerden mikropipetle 10 µL alınarak birer santim aralıklarla plaklara uygulandı ve havada kurutuldu. Hareketli faz için n-butanol; etanol; su (5:3:2) karışımı hazırlandı. İnce tabaka kromatografi tankına (Sigma, Almanya) bu karışımından 15 mL eklendikten sonra kurutulan plaklar tanka yerleştirildi, örneklerin yürütülmesi sağlandı. Yürütme işleminden sonra çözücünün aldığı yol ölçüldü ve plaklar havada kurutuldu. Boyama işlemi için sülfürik asit; metanol (1:9) karışımında hazırlanmış, %0.2'lik orsinol kullanıldı. Plaklar boya çözeltisine batırılıp çıkarıldı ve havada kuruması sağlandı. Kuruyan plaklar 100 °C'lık etüvde 10 dakika tutularak renk gelişimi sağlandı. Oluşan lekelerin aldığı yol cetvelle ölçüldü. Örneğin ve standartların aldığı yol, çözücünün aldığı yola oranlanarak Rf değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Örneklerin Rf değerleri, standartların Rf değerleri ile karşılaştırılarak enzim hidrolizi sonucunda oluşan ürünün ve enzimin tipi belirlendi.

$$Rf = \frac{\text{Örneğin aldığı yol (cm)}}{\text{Çözücünün aldığı yol (cm)}}$$

3.2.5.3. Ham enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini saptamak için farklı sıcaklıklarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C) standart deney koşullarında enzim aktivitesi ölçüldü. Her sıcaklıkta ortam pH'sını sabit tutmak için McIlvaine tamponu pH 5.0'e ayarlandı ve %10'luk stok çözünür nişastadan son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde tamponla seyreltilerek deney ortamına eklendi. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü.

3.2.5.4. Ham enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek için, standart deney ortamının pH'ı 0.5 birimlik aralıklarla pH 3.0–8.0 aralığında ayarlandı. Tampon çözeltileri olarak pH 3.0-6.5 için 50 mM McIlvaine tamponu, pH 7.0-8.0 için 50 mM Sørensen fosfat tamponu kullanıldı. Yüzde iki buçukluk çözünür stok nişastadan tamponlarla uygun seyreltmeler yapılarak standart deney ortamına son

konsantrasyonu %0.5'lik olacak şekilde konuldu. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü.

3.3.5.5. Enzimlerin elektroforetik olarak görüntülenmesi

Fungusların kültür ortamındaki enzim üretiminin belirlenmesi için PAGE zimografisi yapıldı (Martinez vd., 2000). Bu işlem için enzim aktivitesinin en yüksek olduğu gün sonunda kültür ortamı Buhner hunisinde filtre kağıdı kullanılarak vakum altında süzüldü ve süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı. Zimografi için kullanılan çözeltiler ve jellerin hazırlanışı elektroforez ve zimografi kısmında anlatıldığı gibi yapıldı.

3.2.6. Fungusdan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için taze kültürler kullanıldı. Agar yüzeyindeki misellerden steril bistüri yardımı ile yaklaşık 1 cm²'lik alan kesildi. Miseller steril mikrosantrifüj tüpü içine alınarak, -20 °C'de bir saat bekletildi. Daha sonra miseller 55 °C'lik su banyosunda 15-20 dk bekletilerek çözüldü. Dondurma-çözdürme işlemi en az 2 kez tekrarlandı. En son -20 °C'de dondurulan miseller steril pestil yardımı ile ezildi. Misellerin üzerine 600 µL STE, 25 µL proteinaz K (25 mg/ml) ve 75 µL SDS (%10) eklenerek 2 saat 55 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonra tüplere 1:1 fenol-kloroform izoamil alkol eklenerek 5 dk alt üst edildi ve daha sonra 13.200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Örneklerin üst fazı steril mikrosantrifüj tüpü içine alınarak üzerlerine 1 mL %96'lık etanol eklendi ve 2-3 kez alt üst edildi. Daha sonra 20 dk, -20 °C'de bekletilen örnekler 13.200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra 37 °C'lik etüvde bekletilip etanol uzaklaştırıldı. Son olarak mikrosantrifüj tüplerine 100 µL steril distile su eklenerek bir gece 37 °C'lik etüvde bekletildi (Tran-Dinh vd., 1999).

3.2.6.1. İzole edilen fungusların moleküler tanılanması

Tanılama işlemi için internal transcribed spacer (ITS), PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.3.'de verildi. Primer olarak ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') kullanılmıştır. PCR koşulları; 94 °C'de 3 dk ön denaturasyon sonrasında, 35 döngülük 94 °C'de 1 dk denaturasyon, 60 °C'de 1 dk primer bağlanma, 72 °C'de 1 dk uzamayı içermektedir. Son adım 72 °C'de 5 dakikalık son uzamayı içermektedir (Tran-Dinh vd., 1999).

Çizelge 3.3. ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı

Reaktifler (konsantrasyon)	Hacim
PCR buffer 10X	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
Primer R (10 p/Mol)	2 µL
Primer F (10 p/Mol)	2 µL
Taq Polimeraz (5U/µL)	0.4 µL
DNA (100 ng/µL)	1 µL
Distile su	34.6 µL
Toplam hacim	50 µL

PCR ürünlerinden 3 µL, yükleme tamponundan da 3 µL alınarak %5 safe view boya içeren %1.5'lük agaroz jele yüklendi. DNA büyüklük standardı; 1 kb'lık (Fermentas Gene Ruler TM) kullanıldı. Jel elektroforezi 75 V, 45 dk yapıldı. PCR ürünleri dizileme için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi. Dizileme her örnek için iki yönlü olarak yapıldı. Öncelikle Clustal W programı kullanılarak hizalandı, ardından BLAST programı kullanılarak tanısı yapıldı.

3.2.7. Amilaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini

Amilaz aktivitesi, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Bernfeld, 1955). Substrat olarak 0.45 µm' lik filtreden geçirilen %1'lik çözünür patates nişastası kullanıldı. Standart deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.4'de, DNS çözeltisinin bileşenleri Çizelge 3.5'da verildi. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 530 nm'de köre karşı absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japonya) ölçüldü. Oluşan indirgeyici şeker miktarı standart maltoz eğrisinden hesaplandı. Bir enzim ünitesi (IU), standart koşullarda 1 dk da çözünür patates nişastasından 1 µmol maltozun serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edildi. Enzim aktivitesi ve spesifik aktivite aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı.

$$\text{Volüm aktivite} = \frac{\text{Maltoz } (\mu\text{M}) \times \text{Total hacim (mL)}}{\text{İnkübasyon süresi (d)} \times \text{Enzim miktarı (mL)}} = \left(\frac{U}{\text{mL}} \right)$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Volüm aktivite (U/mL)}}{\text{mg protein/mL}} = \left(\frac{U}{\text{mg protein}} \right)$$

Çizelge 3.4. Amilaz enzim aktivitesi için standart deney bileşimi

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
% 1'lik Çözünür patates nişastası	100 µL	100 µL
Enzim	100 µL	-
60 veya 70 °C 30 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm de absorbans okunur		

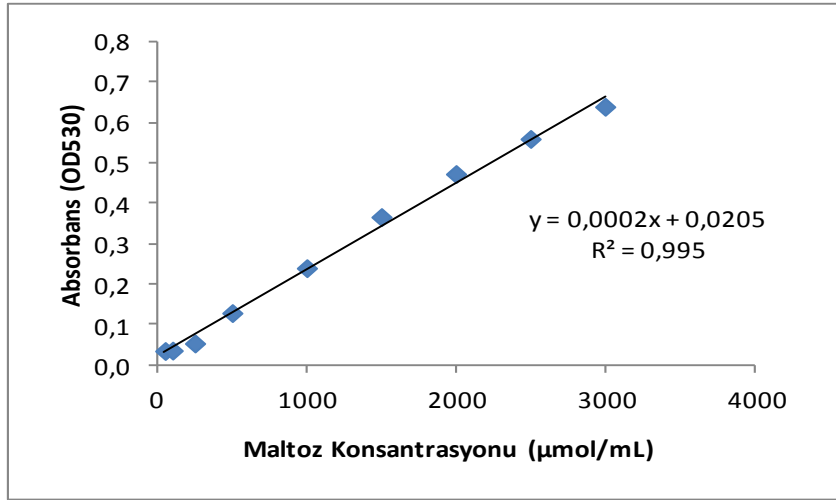
Çizelge 3.5. DNS çözeltisinin bileşenleri

Kimyasal madde	Miktar (g/L)
DNS	10
NaOH	16
C ₄ H ₄ O ₆ KNa.4H ₂ O	300

3.2.8. Maltoz Standart Grafiği ve Hazırlanışı

α -Amilazın nişastayı hidrolizleyerek oluşturduğu redüktör şeker miktarını saptamak için 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanıldı (Bernfeld, 1955). DNS yöntemi, redüktör şekerlerin serbest karbonil gruplarının varlığını test etmek için kullanılır. Bu yöntemin prensibi, fonksiyonel aldehit (glukoz) ve keton (fruktoz) gruplarının oksidasyonuna dayanır. Serbest aldehit veya keton grubuna sahip şekerler alkali koşullar altında 3,5-dinitrosalisilik asiti, 3-amino-5-nitrosalisilik aside indirgeyerek renk (kırmızı-kahverengi) oluşumuna neden olur.

Redüktör şeker miktarını saptamak için maltozun farklı konsantrasyonlardaki (50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 μM) çözeltileri hazırlandı. Redüktör şeker miktarı, DNS metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra, konsantrasyona karşı absorbands grafiği çizildi (Şekil 3.1). Konsantrasyonu bilinmeyen örneğin redüktör şeker miktarı elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak hesaplandı. Doğrunun denklemi $y = 0.0002x + 0.0205$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.995$ 'dir. Deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.6'da verildi.



Şekil 3.1. Standart maltoz grafiği

Çizelge 3.6. Redüktör şeker miktarının ölçümü

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
Maltoz	200 μL	-
DNS	50 μL	50 μL
Distile su	-	200 μL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	
Distile su	500 μL	500 μL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

3.2.9. Kültür Ortamının Redüktör Şeker Tayini

Kültür ortamının günlük süzütüsündeki redüktör şeker miktarının değişimi DNS metoduna göre ölçüldü. Deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.7'de verildi.

Çizelge 3.7. Kültür ortamının redüktör şeker miktarının tayini

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
Distile su	100 µL	200 µL
Kültür ortamı süzöntüsü	100 µL	-
DNS	50 µL	50 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

3.2.10. Protein Tayini

Çalışma boyunca protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı (Bradford, 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir ve 465 nm’de maksimum absorbands verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 595 nm’de maksimum absorbands verir. Bu yöntemde renk oluşumu 2 dakika sonra gerçekleşir ve 1 saat stabil kalır. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan çözeltiler ve standartlar aşağıda verildiği gibi hazırlandı.

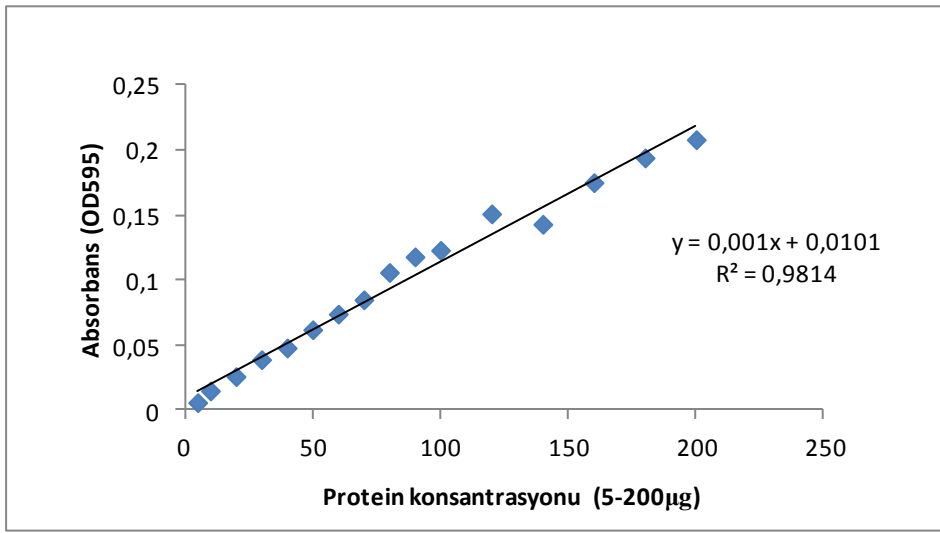
3.2.10.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilisinin hazırlanışı

Coomassie Brilliant Blue G-250’nin 100 mg’ı, 50 mL %95’lik etil alkolde çözüldü. Çözelti 100 mL %85’lik fosforik asitle karıştırıldı ve hacmi ultra saf su ile 1 L’ye tamamlandı. Hazırlanan boya çözeltilisi çözünmeyen boya kalıntılarını uzaklaştırmak için filtre kâğıdından süzöldü.

3.2.10.2 Protein standart grafiğinin hazırlanışı

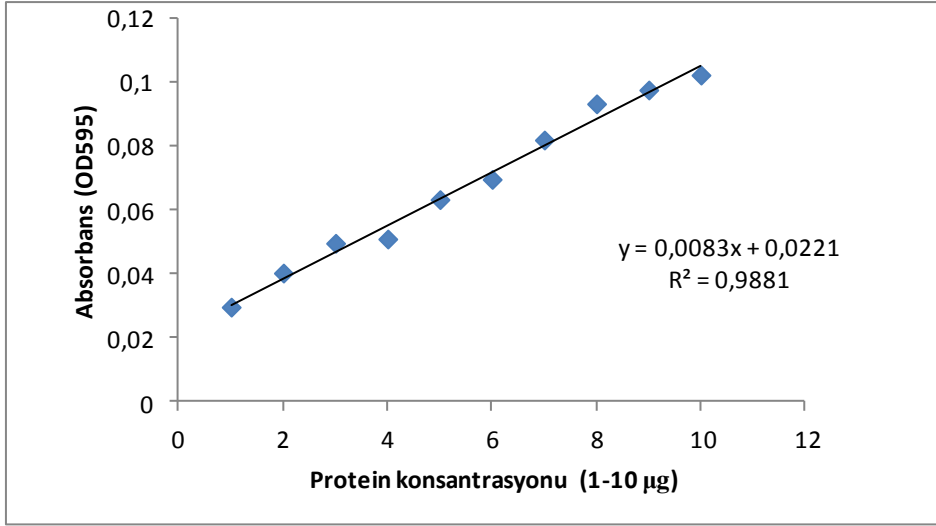
Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA’nın 1 mg/mL’lik standart çözeltilisi kullanıldı. Standart çözeltiler bu stoktan 5-200 µg/mL ve 1-10 µg/mL olacak şekilde, %0.9 NaCl çözeltilisi ile seyreltilerek hazırlandı.

Hazırlanan standart çözeltilerden makro protein standartı için (5-200 µg/mL) tüplere 50'er µL aktarılıp, köre ise 50 µL ultra saf su eklendi. Bütün tüplere 2.5'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklendi ve karıştırıldı. Beş dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve makro protein standart grafiği konsantrasyona karşı absorbans grafiği, linear regresyon analiziyle çizildi. Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu, bu standart grafiğin çiziminden (Şekil 3.2) elde edilen denklemin formülünden hesaplandı. Grafiğin formülü $y = 0.001x + 0.0101$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.9814$ 'dür.



Şekil 3.2. Makro protein standart grafiği (5-200 µg)

Hazırlanan standart çözeltilerden mikro protein standartı için (1-10 µg/mL) tüplere 100'er µL aktarılıp, köre ise 100 µL ultra saf su eklendi. Bütün tüplere 1'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklendi ve karıştırıldı. Beş dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve mikro protein standart grafiği konsantrasyona karşı absorbans grafiği, linear regresyon analiziyle çizildi. Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu, bu standart grafiğin çiziminden (Şekil 3.3) elde edilen denklemin formülünden hesaplandı. Grafiğin formülü $y = 0.0083x + 0.0221$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.9881$ 'dir.



Şekil 3.3. Mikro protein standart grafiği (1-10 µg)

3.3. *Aspergillus fumigatus* HBF125'in Amilaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

3.3.1. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için HBF125 suşu pH 5.0'e ayarlanan amilaz kültür ortamında 100 rpm/dk'da, farklı sıcaklıklarda (20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) 4-10 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda son pH ölçüldü ve kültür ortamı Buhner hunisinde filtre kağıdı kullanılarak vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'daki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Diğer denemelerde ortam sıcaklığı optimum enzim üretim sıcaklığına ayarlandı.

3.3.2. Amilaz Üretimi Üzerine Ortam pH'sının Etkisi

Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisini incelemek için amilaz kültür ortamı optimum sıcaklıkta farklı pH'lara (pH 2.0-10.0) ayarlanarak, HBF125 suşu bu koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 5-6 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein

miktarı belirlendi. Altıncı gün sonunda son pH ölçüldü. İnkübasyon sonunda kültür ortamları darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'daki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Diğer denemelerde ortam pH'sı optimum enzim üretim pH'sına ayarlandı.

3.3.3. Amilaz Üretimi Üzerine İnokulum Yaşının Etkisi

Enzim üretimi üzerine inokulum yaşının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum koşullardaki amilaz kültür ortamına farklı yaşlarda (5, 7, 10 gün) HBF125 şuşu inokule edildi ve optimum koşullarda 35 °C de, pH 5.0 da, 100 rpm/dk'da 4 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. Beşinci gün sonunda son pH ölçüldü. İnkübasyon sonunda kültür ortamları darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Diğer denemelerde inokulum yaşı, optimum inokulum yaşı olarak ayarlandı.

3.3.4. Amilaz Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

Amilaz üretimi üzerine inokulum miktarının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum koşullardaki amilaz kültür ortamına farklı oranlarda (%0.5, 1, 5, 10, 15, 20) HBF125 şuşu inokule edilerek, optimum koşullarda 35 °C de, pH 5.0 da, 100 rpm/dk'da 4-6 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. Altıncı gün sonunda son pH ölçüldü. Altıncı gün sonunda kültür ortamları darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Diğer denemelerde inokulum hacmi, optimum inokulum miktarı olarak ayarlandı.

3.3.5. Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum koşullardaki amilaz kültür ortamına ticari olarak satın alınan karbon kaynakları %2 oranında ilave edildi. Ruşeym, mısır nişastası (Katsan), buğday nişastası (Katsan), pirinç unu (Dr.Oetker), kepek, galeta unu (Bağdat), ırmik (Gonca), melas, zeytin atık suyu ticari olarak satın alındı ve kontrol grubu olarak da çözümlü patates nişastası kullanıldı. HBF125 suşu optimum koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 2-4 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda kültür ortamları darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü ve son pH ölçüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Bu aşamada saptanan en iyi karbon kaynağı diğer deneylerde optimum karbon kaynağı olarak belirlendi.

3.3.5.1. Amilaz üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı oranının belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı oranının belirlenmesi için daha önce saptanan optimum şartlardaki amilaz kültür ortamına %1,1.5, 2, 2.5, 3 oranında kepek ilave edildi ve HBF125 suşu optimum koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 2-4 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. Beşinci gün sonunda son pH ölçüldü. İnkübasyon sonunda kültür ortamları darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Bu aşamada saptanan en iyi karbon kaynağı oranı diğer deneylerde optimum karbon kaynağı olarak kullanıldı.

3.3.6. Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum koşullardaki amilaz kültür ortamına ticari olarak satın alınan ve analitik saflıktaki azot kaynakları %1 oranında ilave edildi. Pepton, sodyum nitrat analitik saflıkta, peynir altı suyu, süt tozu (VİP marka) ticari olarak satın alındı ve

kontrol grubu olarak da azot içermeyen kültür ortamı kullanıldı. HBF125 suşu optimum koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 2-4 gün boyunca inkübe edildi. Kültürden her gün 1.0 mL örnek alınarak enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda kültür ortamları darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü ve son pH ölçüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Bu aşamada saptanan en iyi azot kaynağı diğer deneylerde optimum azot kaynağı olarak belirlendi.

3.3.7. A. fumigatus HBF125'in Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

Optimum ortam koşullarında *A. fumigatus* HBF125'in büyüme eğrisini saptamak için 100 mL kültür ortamı içeren 18 adet 500 mL'lik erlen kullanıldı. Altı gün boyunca erlenlerden 3'er tanesi, 24 saatlik periyotlar da darası ölçülmüş filtre kâğıdı kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 100 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütlesi (g/100 mL) hesaplandı. Ayrıca kültür süzüntüsünün günlük pH, redüktör şeker, proteaz ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Süzülen enzim uygun kaplara alınarak, kullanılıncaya kadar -20 °C de saklandı.

3.3.7.1. Kültür ortamına salınan enzim üretiminin elektroforetik olarak izlenmesi

A. fumigatus HBF125 tarafından üretilen ve kültür ortamında kepeğin hidrolizinden sorumlu amilazı görüntülemek için, Laemmli yöntemine (Laemmli, 1970) göre hazırlanan %7.5'lük PAGE (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, ABD) kullanılarak zimografi (Martinez vd., 2000) yapıldı. Bu işlem için, 500 mL'lik altı erlene 100 mL amilaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra, 10⁸ spor/mL ortama inoküle edildi. Kültür ortamı çalkalamalı su banyosunda 35 °C'da, 100 rpm, 6 gün inkübasyona bırakıldı. Günlük olarak kültür ortamı süzüldükten sonra %7.5'lük PAGE jele uygulanarak zimografi yapıldı. Zimografi için kullanılan çözeltiler ve jellerin hazırlanışı elektroforez ve zimografi kısmında anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3.7.2. Proteaz aktivitesinin ölçümü

Kültür ortamında proteaz üretimini takip etmek için Brock vd. (1982) yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Substrat olarak %0.5'lik azokazein kullanıldı. Standart deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.8'de verildi. Enzim ünitesi; standart deney şartları altında 450 nm de dakikada 0.01 nm'lik değişime neden olan enzim miktarıdır.

Çizelge 3.8. Proteaz standart deney ortamı bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
%0.5 lik Azokazein	500 µL	500 µL
Enzim	500 µL	-
Distile su	-	500 µL
İnkübasyon (70 °C)	15 dk	
%1.5 TCA (Trikloroasetik asit)	500 µL	500 µL
İnkübasyon (buzlu ortam)	15 dk	
13.000 rpm 10 dk santrifüj		
450 nm dalga boyunda absorbans okunur		

3.3.7.3. Amilazın proteolitik hidrolizinin saptanması

A. fumigatus HBF125 amilazın kültürün hangi gününden itibaren üretilmeye başladığını, enzimin tek bir gen ürünü mü yoksa ortamdaki proteolitik enzimler tarafından alt birimlere ayrılıp ayrılmadığını saptamak için birinci ve üçüncü günlük kültür ortamları süzöldükten sonra %85'lik amonyum sülfat ile bir gece 4 °C'de yavaşça karıştırılarak bekletildi. Süre sonunda kültür ortamları 4 °C 10.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Proteaz aktivitesi yüksek olan üç günlük kültür ortamı, nişasta afinite kolon kromatografi metodu ile kısmi olarak saflaştırıldı. Bu metot ile amilaz ve proteazın birbirinden ayrılması sağlandı. Birinci gün elde edilen kültür ortamı ile kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimi, 35 °C' de 1:1 oranında karıştırılarak 1, 2, 4 ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler %7.5'luk PAGE jele uygulanarak zimografi yapıldı. Zimografi için kullanılan çözeltiler ve jellerin hazırlanışı elektroforez ve zimografi kısmında anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3.8. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

Amilazın nişastaya adsorpsiyon oranını belirlemek için çözüner olmayan mısır nişastası, pirinç nişastası ve buğday nişastası kullanıldı. Bu işlem için 2 g nişasta

50 mM pH 7.0 Sørensen fosfat tamponunda çözünür nişastayı uzaklaştırmak için yıkandı. Nişasta-tampon karışımı 3000 x g de 10 dk santrifüjlendi. Üst sıvı dökülerek nişasta kullanılıncaya kadar 4 °C da saklandı. Nişasta ve 10 mL ham enzim buzlu ortamda ayrı ayrı 20 dk bekletildi. Daha sonra enzim ve nişasta örnekleri karıştırılarak 2 saat boyunca 4 °C da manyetik karıştırıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim nişasta karışımı 2500 x g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantda enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü. Adsorpsiyon oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Morita ve Fujio, 2000).

$$AO(\%) = \frac{(O-R)}{O} \times 100$$

AO= Adsorpsiyon oranı

O= Başlangıç enzim aktivitesi

R= Geride kalan enzim aktivitesi

3.3.9. Amilazın Saflaştırılması

A. fumigatus HBF125'in kültür koşullarının optimizasyonu yapıldıktan sonra saflaştırma işlemlerine geçildi. Optimum koşullarda enzim üretimi yapılarak belirlenen optimum günde (2. gün) kültür ortamı süzüldü. Süzüntü "ham ekstrakt" olarak adlandırıldı ve enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Saflaştırmada ilk adım olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı, daha sonra ultrafiltrasyon ve nişasta afinite kolon kromatografisi uygulandı. Aksi belirtilmedikçe tüm saflaştırma adımları 4 °C'de yapıldı.

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri belirlenen standart koşullarda yapıldı. Ham ekstrakt olan ekstraselüler sıvının saflaştırma katsayısı 1 kabul edilerek ve diğer fraksiyonların özgül aktiviteleri ham ekstrakt spesifik aktivitesine oranlanarak saflaştırma katsayıları hesaplandı. Fraksiyonların yüzde verimlerini belirlemek için ham ekstrakt verimi 100 olarak kabul edilerek ve fraksiyonların total aktivitesi ham ekstrakt total aktivitesine oranlanarak yüzde verimleri hesaplandı. Elde edilen veriler saflaştırma çizelgesi oluşturularak özetlendi.

3.3.9.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik teknikler kullanılır. Enzim saflaştırmada en çok kullanılan tekniklerden biri, yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürmedir. Proteinlerin su içerisindeki çözünürlükleri çok azdır. Ortama bir miktar nötral tuz (NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gibi) ilave edildiğinde (düşük iyonik kuvvet) proteinlerin yüzeyinde veya iç kısımlarında bulunan hidrofilik grupların su ile etkileşim derecesi artar. Bu durumda proteinlerin çözünürlükleri de artar. Bu olaya “salting in” denir. Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır. Bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çökerler. Bu olaya ise “salting out” denir. Protein çözeltisinde hidrofobik alanları büyük ve daha fazla olan proteinler, hidrofobik alanları küçük ve daha az olanlarınkine göre daha çabuk birbirleri ile etkileşerek çökerler. Böylece proteinlerin fraksiyonlanması sağlanmış olur (Metin vd., 2007).

Kültür ortamı süzildükten sonra elde edilen ham ekstrakt amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanıldı. Ham ekstrakt için ayrı ayrı %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıkların da 4 °C da doymuş amonyum sülfat eklenerek çöktürme işlemleri yapıldı. İlk önce ham ekstrakta %20 konsantrasyonlarda amonyum sülfat eklenerek 4 °C da 2 saat manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırılarak inkübe edildi. Süre sonunda çözelti 10000 x g de 30 dk santrifüjlendi. Süpernatant ve pellet birbirinden ayrıldı. Pellet 20 mM, pH 7.0, 4 °C Tris-HCl tamponunda çözüldü ve diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Süpernatanta sırasıyla diğer konsantrasyonlarda amonyum sülfat eklenerek işleme devam edildi. Bütün fraksiyonlar için aşağıda anlatıldığı gibi diyaliz yapıldı. Diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Bütün fraksiyonlar için spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve yüzde verim hesaplandı.

3.3.9.2. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca biyolojik

moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Metin, 2007).

Sırasıyla %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pellet uygun hacimde 20 mM, pH 7.0, 4 °C Tris-HCl tamponunda çözüldü. Daha sonra yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) uygun uzunlukta kesildi. Tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal artıklarını gidermek için ön işleminden geçirildi (Çizelge 3.9). Diyaliz torbasına örnek aktarıldı ve her iki ucu klipsler yardımıyla kapatıldı. Daha sonra pelletlerin çözüldüğü ve içinde 10 mM CaCl bulunan aynı tampona karşı 24 saat süreyle 2 defa değiştirilerek (toplam 1200 mL) diyaliz edildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4 °C' de gerçekleştirildi.

Çizelge 3.9. Diyaliz torbasının ön işleminden geçirilmesi

1	%0.3' lük sodyum sülfid çözeltisinde 80 °C' de 1 dakika bekletilir.
2	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.
3	%0.2' lik sülfürik asitte 1 dakika bekletilir.
4	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.

3.3.9.3. Ultrafiltrasyon

Kültür ortamı süzütüsünden (420 mL) enzimi hem kısmi olarak saflaştırmak hem de konsantre etmek için ultrafiltrasyon yapıldı. Süzüntü 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı içeren Vivacell 250 ultrafiltrasyon kabına (Sartorius, Almanya) aktarıldı. Azot gazı ile 4 bar basınç uygulayarak inkübatörde 10 °C da, 100 rpm'lik hızda çalkalanarak konsantre edildi.

3.3.9.4. Nişasta affinite kolon kromatografisi

Saflaştırma için Mendu vd. (2005) nişasta affinite kromatografi metodunda kısmi değişiklikler yapılarak kullanıldı. Bu işlem sırasında 8 g mısır nişastası 50 mL 20 mM pH 7.0, 4 °C Tris-HCl tamponunda oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılarak şişmesi sağlandı. Daha sonra manyetik karıştırıcı kapatılarak nişastanın çökmesi beklendi ve üst sıvı döküldü. Nişasta üzerine tampon eklenerek manyetik karıştırıcıda, vakum altında havası alındı. Daha sonra nişasta tampon karışımı homojen bir şekilde kolona (Bio-Rad, 1.5 cm x 10 cm) yüklendi. Kolon, peristaltik pompa (ATTO AC-2110, Japonya) yardımıyla belli bir akış hızında 4

°C de 20 mM pH 7.0 Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Böylece kolonunun hem tampon ile dengeye gelmesi sağlandı, hem de çözünür nişastanın kolondan uzaklaştırılması sağlandı. Ultrafiltrasyon ile konsantre edilen ham enzim kolona yüklendi. Kolon, 60 mL/saat akış hızında, 20 mM Tris-HCl tamponu ile yıkanarak istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması için yıkandı. Protein çıkışı 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek izlendi. Kolonda protein çıkışı gözlenmediğinde kolon oda sıcaklığına alındı. Nişastaya bağlı amilazı uzaklaştırmak için, 20 mM pH 7.0 Tris-HCl tamponunda taze olarak hazırlanan dekstrin ile %0-1'lik linear gradient yapıldı. Kolonda çıkan her fraksiyonda protein, proteaz ve enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirilerek dekstrinin uzaklaştırılması için diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Son olarak fraksiyonlar enzimin saflığının kontrolü, ayırımın gerçekleşip gerçekleşmediğini ve molekül ağırlığının tayin için poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile zimografi yapılarak görüntülendi. Her saflaştırma işleminden önce kolon taze olarak hazırlandı.

3.3.10. Elektroforez ve Zimografi

3.3.10.1. Amilazın molekül ağırlığının belirlenmesi

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonların saflığını ve enzimin moleküler ağırlığı Laemmli yöntemine (1970) göre PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile tayin edildi. Standart olarak domuz miyozini (200.000 Da), *E. coli*'den β -galaktozidaz (116.000 Da), tavşan kasından fosforilaz B (97.400 Da), sığır albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da) ve sığır eritrositinden karbonik anhidraz (29.000 Da) kullanıldı. Enzimin görüntülenmesi için PAGE ve SDS-PAGE kullanılarak zimografi (Martinez vd., 2000) yapıldı. SDS-PAGE ve PAGE zimografi elektroforezi, aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.3.10.2. PAGE ve SDS-PAGE için gerekli Çözeltiler

Yüzde 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid stok çözeltisi: 30 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilenbisakrilamid 100 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve 4 °C' de saklandı.

Ayırma tamponu (separating tamponu): 1.5 M Tris-HCl hazırlandıktan sonra, HCl kullanılarak pH'ı 8.8'e ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yoğunlaştırma tamponu (Stacking tamponu): 0.5 M Tris-HCl hazırlandıktan sonra pH'ı 6.8'e HCl ile ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Amonyum persülfat: %10'luk amonyum persülfat ultra saf su içerisinde taze olarak hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS): %10'luk SDS ultra saf su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak hazırlandı.

Örnek tamponu: 0.6 M Tris-baz (pH 6.8) 5 mL, SDS 0.5 g, sukroz 5.0 g, β -merkaptotanol'den 0.25 mL ve %0.5'lik stok brom fenol mavisi çözeltisinden 5 mL alınarak karıştırıldı ve hacmi ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. PAGE için hazırlanan yükleme tamponunda SDS ve β -merkaptotanol kullanılmadı. Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı. β -merkaptotanol'ün etkisi zamanla kaybolduğundan gerektiği zaman hazırlanan tampona aynı oranda ilave edildi.

Elektroforez tamponu (Yürütme tamponu): 3 g Tris-baz ve 14.4 g glisin ve 1 g SDS karıştırılarak hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanarak pH'ı 8.3'e ayarlandı. PAGE için hazırlanan elektrot tamponunda SDS kullanıldı. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilendi.

Coomassie Blue G-250 Çözeltisi: Commasie blue boyadan 100 mg, önce 200 mL metanol (%50) içinde çözüldü, daha sonra 35 mL asetik asit (%10) ilave edilerek, ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

%2'lik çözümlü nişasta çözeltisi: Çözümlü patates nişastasından 2 g tartıldı ve deiyonize distile su içerisinde mikrodalga fırında tamamen çözümlünceye kadar ısıtıldı. Soğuduktan sonra 0.45 μ m'lik enjektör filresinden geçirildi.

Yıkama Çözeltisi: %10 metanol ve %7 asetik asit çözeltisinden oluşmaktadır.

Jelin Hazırlanışı: Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapıldı. Elektroforez camları %70'lik etanolle

iyice temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için standına yerleştirildi. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde gazı alınmış %7.5'lik ayırma jeli, TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırıldı. Hazırlanan jel mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, ABD) cam levhalar arasına döküldü. Ayırma jelinin içeriği Çizelge 3.10' da verildi.

Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri %70'lik etanolle kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat bekletildi. Süre sonunda ayırma jelinin üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jelle temas etmeden yavaş yavaş alındı ve üzerine %4'lük yoğunlaştırma jeli döküldü. Tarak, jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jelle yerleştirildi ve polimerleşmesi için 1-2 saat beklendi. Yoğunlaştırma jelinin içeriği Çizelge 3.11'de verildi.

Çizelge 3.10. Ayırma jelinin (%7.5) içeriği

Jelin İçeriği	Miktar (mL)
Distile su	2.046
Ayırma tamponu (pH 8.8)	1.00
%30'luk akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid	1.249
%2'lik çözünür nişasta	0.625
%10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0.050
%10'luk amonyum persülfat	0.025
TEMED	0.00175

Çizelge 3.11. Yoğunlaştırma jelinin (%4) içeriği

Jelin İçeriği	Miktar (mL)
Distile su	1.875
Yoğunlaştırma tamponu (pH 8.8)	0.25
%30'luk akrilamid/ N,N'-metilenbisakrilamid	0.3375
%10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0.025
%10'luk amonyum persülfat	0.0125
TEMED	0.0035

3.3.10.3. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı

Jele uygulanacak örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. (PAGE için örnekler kaynatılmadı). Tarak jele zarar vermeden çekildi ve jel elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar elektroforez tamponu ile dolduruldu ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 15 µL yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektroforez tamponu eklendi. Güç kaynağı (UVP, Almanya) ile 200 V 45 dakika 20 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapıldı.

3.3.10.4. Jelin boyanması

Cam levhalar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrıldı. Boyanın aldığı yol elektronik kumpasla ölçüldükten sonra, protein boyaması yapıldı. Coomassie Blue G-250 çözeltisi ile 1 saat 100 rpm'de çalkalanarak boyandı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 100 rpm' de yıkanarak uzaklaştırıldı ve bantlar görünür hale geldi.

3.3.10.5. Zimografi

Zimografi için cam plaklar arasından çıkarılarak ayrılan jel, 50 mM pH 5.5 McIlvaine tamponunda hazırlanmış %1'lik çözünür patates nişastası içinde 4 °C'da 1 saat inkübe edildi. Jel aynı çözelti içerisinde 50 °C'da 1 saat etüvde inkübe edildi. Jel nişastadan çıkarılıp distile su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra iyot çözeltisinde (%0.3 I₂-%0.6 KI) bantlar belirginleşene kadar bekletildi. Gerekli ölçümler yapıldıktan sonra aynı çözelti içerisinde saklandı.

3.3.10.6. Amilazın molekül ağırlığının hesaplanması

Elektroforez sonucunda PAGE ve SDS-PAGE sonuçları karşılaştırılarak amilaz bantları belirlendi. SDS-PAGE jeline boyanın, standartların ve enzimin kat ettikleri mesafeler elektronik kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, İngiltere) yardımı ile ölçüldü. Standartların ve enzimin R_f değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$Rf = \frac{Py}{Jb} \times \frac{Ob}{Iy}$$

Py = Boyamadan sonra taşınan proteinin aldığı yol

Jb = Boyamadan sonraki jelin boyu

Ob = Boyamadan önceki jelin boyu

Iy = Boyamadan önceki işaretleyicinin (boyanın) aldığı yol

Standartların molekül ağırlıklarının logaritması alındı ve Rf değerlerine karşı grafik çizildi. Elde edilen standart grafiğin denkleminde yararlanılarak enzimin molekül ağırlığı saptandı.

3.4. *Aspergillus fumigatus* HBF125 Amilazının Karakterizasyonu

3.4.1. Amilaz Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için farklı zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 ve 75 dk) optimum pH (pH 7.0) ve sıcaklıkta (70 °C), sabit substrat konsantrasyonunda (son konsantrasyon %0.5) ham enzim substrat ile inkübe edildi. Oluşan indirgeyici şeker miktarı DNS metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için saflaştırılmış enzimin farklı sıcaklıklarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 °C) standart deney koşullarında aktivitesi ölçüldü. Nişasta çözeltisi (%10) 0.05 M McIlvaine tamponunda (pH 5.0) hazırlanarak, standart deney ortamına son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde konuldu. Enzim aktivitesi sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek, standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi saflaştırılmış enzimde yapıldı. Standart deney ortamının pH'sı 0.5 birimlik aralıklarla pH 3.0-9.0

aralığında ayarlandı. Tampon çözeltiler olarak pH 3.0-6.5 için 0.05 M McIlvaine tamponu, pH 7.0-8.0 için 0.05 M Tris-HCl tamponu ve pH 8.5-9.0 için 0.05 M Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Yüzde ikilik stok nişasta çözeltisi 0.05 M McIlvaine (60 °C, pH 7.0) tamponunda hazırlandı final konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde standart deney ortamına konuldu. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü.

3.4.4. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, saflaştırılmış enzim stabilitesinin belirleneceği sıcaklıklar olan 25 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C' de hazırlanan 50 mM McIlvaine tamponu (pH 5.5) ile 2 kat seyreltildi. Enzim bu sıcaklıklardaki su banyosunda (Poly science 911, ABD) 24 saat boyunca inkübe edildi ve belirli aralıklarda örnekler alınarak standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerinin yüzdesi olarak hesaplandı.

3.4.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'ın etkisini belirlemek için, pH 4.0, 5.0, 5.5 ve 6.0 değerlerinde 50 mM McIlvaine tamponu, pH 7.0 ve 8.0 için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Enzim çözeltisi bu tamponlarla 2 kat seyreltildi ve 25 °C'deki su banyosunda (Poly science 911, ABD) 24 saat inkübe edildi. Enzim çözeltisinden inkübasyon boyunca belirli aralıklarla örnekler alındı ve standart deney koşulları altında aktivite ölçümü yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerinin yüzdesi olarak hesaplandı.

3.4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH'da (60 °C ve pH 5.5), sabit inkübasyon süresinde (20 dk) ve farklı konsantrasyonlarda (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mg/ml çözünür nişasta) substrat kullanılarak enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı.

3.4.7. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz, amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası ve çözünür patates nişastasının pH 5.5 McIlvaine tamponunda hazırlanan %1'lik çözeltileri substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesi standart deney koşulları altında ölçüldü. Çözünür patates nişastası için ölçülen değer kontrol olarak (100) kabul edildi ve aktivite değişimleri yüzde değer olarak hesaplandı. Deneyde kullanılan stok çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Mısır nişastası, pirinç nişastası ve buğday nişastası manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözünmesi beklendi. Ancak, çözünme tam olarak gerçekleşmedi ve süspansiyon halinde kaldı. Bu süspansiyonlar substrat kaynağı olarak kullanıldı.

Amilopektin ve çözünür patates nişastası mikrodalga fırında, tampon içerisinde ısıtılarak çözüldü. Dekstrin, maltoz ve rafinoz ısıtılmadan tampon içerisinde çözüldü.

Amiloz farklı bir işlemle hazırlandı. Bu işlem için 0.1 g amiloz tartıldı ve 2 mL 0.5 N NaOH çözeltisinde çözüldü. Çözeltiyi nötrleştirmek için 2 mL 0.5 N HCl ilave edildi. Daha sonra 1 M pH 5.5 McIlvaine tamponundan final konsantrasyonu 0.05 M olacak şekilde ilave edildi. Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için $AlCl_3$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, KCl , $LiCl$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $NaCl$, NH_4Cl , $NiCl_2$, $HgCl_2$, $ZnCl_2$ ve EDTA kullanıldı. Metal iyonları 100 mM stok çözeltisinden son konsantrasyonu 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde deney ortamlarına eklendi (Çizelge 3.12, 3.13 ve 3.14). Hiçbir metali içermeyen deney ortamı, kontrol olarak kabul edildi. Standart koşullarda aktivite tayini yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri yüzde değer olarak belirlendi.

Çizelge 3.12. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 MES tamponu	73 µL	73 µL
Metal iyonu	2 µL	2 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk ön inkübasyon		
%4'lük çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 MES tamponu)	-	25 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%4'lük çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 MES tamponu)	25 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur.		

Çizelge 3.13. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 MES tamponu	65 µL	65 µL
Metal iyonu	10 µL	10 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk ön inkübasyon		
%4'lük çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 MES tamponu)	-	25 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%4'lük çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 MES tamponu)	25 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur.		

Çizelge 3.14. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 MES tamponu	55 µL	55 µL
Metal iyonu	20 µL	20 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk ön inkübasyon		
%4'lük çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 MES tamponu)	-	25 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%4'lük çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 MES tamponu)	25 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur.		

3.4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan fenil metil sülfonil florür (PMSF); SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β merkaptoetanol; SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4- dithiothreitol (DTT); sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB); triptofan inhibitörü olan N-bromo suksinamid (NBS); karboksil grubu inhibitörü olan sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC); sistein ve histidin alkilleyici iodoasetamid (İAA); arjinin inhibitörü olan 2,3 bütandiol; kuvvetli bir inhibitör olan florür; katotropik ajan olan borik asit, okzalit ve sitrat; protein denatürantı olan üre ve SDS; indirgeyici madde olarak glutatyon kullanıldı.

PMSF, n-propanolda, DTNB ise 0.1 M NaOH de çözüldü. İnhibitörler 100 mM'lık stok çözeltilerinden, deney ortamına son konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde eklendi ve standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi (Çizelge 3.15 ve 3.16). Hiçbir inhibitör veya denatürant içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri yüzde değer olarak belirlendi.

Çizelge 3.15. 1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu	48 µL	48 µL
Denaturant ve inhibitör	2 µL	2 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk ön inkübasyon		
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	-	50 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	50 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbens okunur.		

Çizelge 3.16. 5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu	40 µL	40 µL
Denaturant ve inhibitör	10 µL	10 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk ön inkübasyon		
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	-	50 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	50 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbens okunur.		

3.4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini belirlemek için aseton, gliserol, 1,4-dioksan, etanol, metanol, dimetilsülfoksit (DMSO), 1-propanol kullanıldı. Organik çözücüler son konsantrasyonları %10 ve %20 olacak şekilde saflaştırılmış enzimle karıştırıldı ve 25 °C'deki inkübatörde 100 rpm hızda çalkalamalı olarak 30 dakika inkübe edildi (Çizelge 3.17 ve 3.18). İnkübasyon

sonunda enzim aktiviteleri standart deney koşullarında tayin edildi. Hiçbir organik çözücü içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edildi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri yüzde değer olarak belirlendi.

Çizelge 3.17. %10 organik çözücü içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu	30 µL	30 µL
Organik çözücü	20 µL	20 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk 100 rpm ön inkübasyon		
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	-	50 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	50 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalgaboyunda absorbands okunur.		

Çizelge 3.18. %20 organik çözücü içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu	10 µL	10 µL
Organik çözücü	40 µL	40 µL
Enzim çözeltisi	100 µL	100 µL
25°C'de 30 dk 100 rpm ön inkübasyon		
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	-	50 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
DNS	50 µL	50 µL
%2'lik çözünür nişasta (50 mM pH 5.5 Mcllvaine tamponu)	50 µL	-
Soğuk su banyosunda 2 dk inkübasyon		
Kaynar su banyosunda 5 dk inkübasyon		
Soğuk su banyosunda 3 dk inkübasyon		
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalgaboyunda absorbands okunur.		

3.4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 ve Triton X-100 kullanıldı. Deterjanlar son konsantrasyonları %0.5 ve %1 olacak şekilde saflaştırılmış enzimle karıştırıldı ve 25 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart deney koşullarında tayin edildi. Hiçbir deterjan içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edildi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri yüzde değer olarak belirlendi.

3.4.12. Enzim Aktivitesi Üzerine CaCl₂ Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine kalsiyum klorürün etkisini belirlemek için, hazırlanan stok CaCl₂ (100 mM) çözeltisinden, son konsantrasyonu 1.0, 2.2, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 mM olacak şekilde deney ortamına ilave edilerek, standart deney koşullarında aktivite ölçümleri yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri yüzde değer olarak belirlendi.

3.4.13. Enzimin Tuz Toleransı

α -Amilazın tuz toleransını belirlemek için, enzim son konsantrasyonu 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 M NaCl ile 4 °C'da, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra standart deney koşullarında enzim aktivitesi ölçüldü. Başlangıç aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre yüzde değer olarak belirlendi.

3.4.14. Verilerin Değerlendirilmesi

Protein derişimi, V_{max} ve K_m değerleri lineer regresyon analizi ile saptandı. Her deney üç tekrar üzerinden yapıldı. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Tukey ve Duncan Testi) yapıldı. Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulandı. Bu istatistiksel analizler STATISTICA 7.0 programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fungusların Sıcaklık Sınırının Belirlenmesi

Bölümümüz Mikrobiyoloji laboratuvarında kayıtlı bulunan ve çeşitli kaynaklardan izole edilen 91 fungusun termofilik veya termotolerant olan suşlarını belirlemek amacıyla sıcaklık taraması yapıldı. Sıcaklık taraması yapılan 91 adet fungusdan 3 tanesi termofilik fungus, 18 tanesi termotolerant fungus, 70 tanesi ise mezofilik fungus olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Fungusların sıcaklık tarama sonuçları

Stok No	Fungus	Koloni çapları (mm)				
		20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
HBF134	<i>Absidia</i> sp.	12.03	17.24	14.59	5.54	-
HBF57	<i>Acremonium kiliense</i>	27.31	23.36	3.44	-	-
HBF95	<i>Acremonium kiliense</i>	15.78	14.82	-	-	-
HBF136	<i>Acremonium</i> sp.	16.91	21.23	25.45	16.38	4.65
HBF137	<i>Acremonium</i> sp.	19.52	20.05	-	-	-
HBF138	<i>Acremonium</i> sp.	8.80	9.14	-	-	-
HBF8	<i>Acremonium</i> sp.	24.55	19.32	-	-	-
HBF59	<i>Arthrotrichy oligospora</i>	21.35	18.71	-	-	-
HBF41	<i>Aspergillus alliaceus</i>	34.84	34.10	65.00	-	-
HBF46	<i>Aspergillus crystallinus</i>	25.59	16.60	-	-	-
HBF130	<i>Aspergillus flavipes</i>	16.80	34.62	25.37	14.63	-
HBF53	<i>Aspergillus flavipes</i>	15.48	15.02	-	-	-
HBF128	<i>Aspergillus flavus</i>	25.79	36.95	45.79	15.45	-
HBF33	<i>Aspergillus flavus</i>	31.61	23.40	-	-	-
HBF34	<i>Aspergillus flavus</i>	34.21	46.73	36.26	-	-
HBF54	<i>Aspergillus foetidus</i>	38.25	65.00	65.00	-	-
HBF55	<i>Aspergillus foetidus</i>	33.95	65.00	65.00	-	-
HBF125	<i>Aspergillus fumigatus</i>	9.97	50.01	51.33	33.66	6.08
HBF126	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.44	47.81	58.31	31.39	2.67
HBF127	<i>Aspergillus fumigatus</i>	17.23	21.00	19.73	3.64	-
HBF42	<i>Aspergillus fumigatus</i>	65.00	65.00	65.00	38.83	-
HBF96	<i>Aspergillus fumigatus</i>	45.83	65.00	65.00	65.00	-
HBF47	<i>Aspergillus glaber</i>	29.82	24.50	-	-	-
HBF50	<i>Aspergillus japonicus</i>	29.03	65.00	65.00	65.00	-
HBF97	<i>Aspergillus japonicus</i>	41.80	65.00	43.78	-	-
HBF131	<i>Aspergillus niger</i>	13.38	44.50	52.72	36.39	-
HBF39	<i>Aspergillus niger</i>	40.20	65.00	49.72	-	-
HBF40	<i>Aspergillus niger</i>	49.57	65.00	13.55	-	-
HBF98	<i>Aspergillus niger</i>	46.12	65.00	65.00	65.00	-
ATCC9642	<i>Aspergillus niger</i>	36.41	65.00	27.70	-	-
HBF99	<i>Aspergillus niveus</i>	12.55	26.67	19.07	-	-

Çizelge 4.1. Fungusların sıcaklık tarama sonuçları (devamı)

Stok No	Fungus	Koloni çapları (mm)				
		20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
HBF129	<i>Aspergillus ochraceus</i>	20.38	31.22	21.67	9.61	-
HBF 56	<i>Aspergillus parasiticus</i>	42.94	47.93	49.29	-	-
NRRL2999	<i>Aspergillus parasiticus</i>	41.42	49.10	65.00	-	-
HBF44	<i>Aspergillus sclerotionum</i>	21.11	26.67	-	-	-
HBF45	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	36.73	30.33	-	-	-
HBF100	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	26.90	29.34	8.38	-	-
HBF132	<i>Aspergillus sp.</i>	30.11	30.37	43.02	14.89	-
HBF133	<i>Aspergillus sp.</i>	10.64	14.59	1.10	-	-
HBF123	<i>Aspergillus terreus</i>	15.55	27.61	31.13	6.33	-
HBF124	<i>Aspergillus terreus</i>	14.86	22.02	14.13	5.06	-
HBF38	<i>Aspergillus terreus</i>	22.01	39.39	42.11	12.56	-
HBF101	<i>Aspergillus terreus</i>	20.20	48.95	65.00	6.91	-
HBF52	<i>Aspergillus versicolor</i>	22.63	18.79	-	-	-
HBF102	<i>Aspergillus versicolor</i>	7.35	12.75	45.87	51.37	-
HBF103	<i>Aspergillus wentii</i>	44.06	50.37	-	-	-
HBF63	<i>Cladosporium sp.</i>	27.39	19.73	-	-	-
HBF64	<i>Colletotrichum sp.</i>	18.43	18.56	-	-	-
HBF105	<i>Epicoccum sp.</i>	22.29	21.21	65.00	-	-
HBF69	<i>Fusarium melanochlorum</i>	20.51	19.75	-	-	-
HBF122	<i>Mortieralla sp.</i>	22.79	20.42	-	-	-
HBF73	<i>Mucor racemosus</i>	24.20	9.41	-	-	-
HBF140	<i>Mucor sp.</i>	17.03	31.23	65.00	32.36	-
HBF141	<i>Mucor sp.</i>	44.71	52.46	-	-	-
HBF79	<i>Paecilomyces sp.</i>	24.38	22.72	-	-	-
HBF21	<i>Penicillium chrysogenum</i>	24.06	21.24	-	-	-
HBF22	<i>Penicillium chrysogenum</i>	22.00	21.33	-	-	-
HBF23	<i>Penicillium chrysogenum</i>	24.22	17.48	-	-	-
HBF24	<i>Penicillium chrysogenum</i>	28.73	10.60	-	-	-
HBF106	<i>Penicillium chrysogenum</i>	15.8	11.92	8.27	-	-
HBF9	<i>Penicillium citrinum</i>	28.90	18.30	-	-	-
HBF62	<i>Penicillium citrinum</i>	30.64	65.00	-	-	-
HBF18	<i>Penicillium coralligenum</i>	26.21	22.65	-	-	-
HBF1	<i>Penicillium cyclopium</i>	30.52	17.33	-	-	-
HBF5	<i>Penicillium donkii</i>	28.96	21.98	-	-	-
HBF6	<i>Penicillium funiculosum</i>	26.02	16.72	-	-	-
HBF15	<i>Penicillium funiculosum</i>	22.67	23.42	-	-	-
HBF10	<i>Penicillium gladioli</i>	21.45	20.83	-	-	-
HBF30	<i>Penicillium janthinellum</i>	20.60	22.02	-	-	-
HBF31	<i>Penicillium janthinellum</i>	18.77	15.26	-	-	-
HBF4	<i>Penicillium miczynskii</i>	27.34	19.52	-	-	-
NRRL2995	<i>Penicillium parasiticus</i>	24.08	21.04	-	-	-
HBF11	<i>Penicillium pedemontanum</i>	22.35	31.94	-	-	-
HBF12	<i>Penicillium phoeniceum</i>	32.29	22.20	-	-	-
HBF16	<i>Penicillium pulvillorum</i>	29.06	16.63	-	-	-
HBF13	<i>Penicillium raistrickii</i>	24.73	12.62	-	-	-
HBF107	<i>Penicillium restrictus</i>	23.28	18.86	-	-	-

Çizelge 4.1. Fungusların sıcaklık tarama sonuçları (devamı)

Stok No	Fungus	Koloni çapları (mm)				
		20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
HBF26	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	24.48	18.49	-	-	-
HBF17	<i>Penicillium soppü</i>	20.06	23.86	-	-	-
HBF135	<i>Penicillium</i> sp.	11.46	16.74	8.03	1.94	-
HBF27	<i>Penicillium</i> sp.	32.06	32.35	-	-	-
HBF2	<i>Penicillium variable</i>	23.55	18.28	-	-	-
HBF82	<i>Pluteoaurantium</i> sp.	24.22	11.08	-	-	-
HBF87	<i>Rhizoctonia solani</i>	19.26	17.31	6.12	-	-
HBF86	<i>Rhizoctonia</i> sp.	8.69	-	-	-	-
HBF83	<i>Rhizopus</i> sp.	65.00	65.00	65.00	-	-
HBF84	<i>Rhizopus stolonifer</i>	65.00	65.00	65.00	-	-
HBF85	<i>Rhizopus stolonifer</i>	65.00	65.00	65.00	-	-
HBF108	<i>Rhizopus stolonifer</i>	65.00	65.00	65.00	-	-
HBF92	<i>Torula herbarum</i>	20.69	29.78	-	-	-
HBF139	<i>Trichoderma</i> sp.	18.69	31.89	17.79	-	-

Ökaryotik organizmalar arasında sadece birkaç fungus türü 45 ile 55 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilme yeteneğine sahiptir. Minimum ve maksimum büyüme sıcaklıkları temel alınarak bu tür mantarlar termofilik ve termotolerant türler olarak ayırt edilirler. Termofilik funguslar, en düşük 20° C, en yüksek 60° C, en iyi ise 40-55° C arasında üreyebilirken, termotolerant funguslar ise en iyi 25- 40° C arasında ve 50° C de ise yavaş üreyebilmektedir (Halil ve Kalkancı, 2008).

Termotolerant olarak belirlenen fungusların *Absidia* sp, *Acremonium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. ve 14 tanesinin ise *Aspergillus* cinsine ait olduğu saptanmıştır. Termofilik olarak belirlenen üç fungusun ise *Acremonium* ve *Aspergillus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

4.2. Kalitatif Lipolitik, Amilolitik, Proteolitik, Selülitik ve Üreolitik Aktivite Tayini

Sıcaklık taraması sonucunda termofilik ve termotolerant olarak belirlenen 21 adet fungusun enzim üretme yetenekleri kalitatif olarak ölçülmüştür. Termofilik olarak belirlenen *Aspergillus fumigatus* suşlarından HBF125 numaralı suş amilolitik, selülitik ve üreolitik, HBF126 numaralı suş ise amilolitik ve üreolitik, *Acremonium* sp. HBF136 suşu ise üreolitik aktivite yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Pozitif ve negatif örnek resimleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir. Termotolerant suşların 13 tanesinin amilolitik aktivite, 2 tanesinin lipolitik aktivite, 5 tanesinin selülitik aktivite ve 5 tanesinin de üreolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Termofilik suşların 2 tanesinin amilolitik aktivite, 2

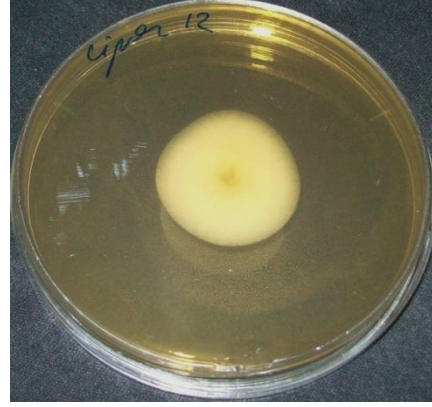
taneninin üreolitik aktivite ve 1 tanesinin de selüloolitik aktivite gösterdiği saptandı. Kullanılan 21 adet fungusun agar ortamında proteolitik aktivite göstermediği saptanmıştır. Bundan sonraki aşamalarda amilaz enzim üretim çalışması yapılacağından amilolitik aktivite yönünden pozitif olarak belirlenen termotolerant ve termofilik funguslar ile çalışmaya devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2' de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Kalitatif enzim tarama sonuçları

Stok No	Fungus	Zon çapı/Koloni çapı				
		Amilaz	Proteaz	Lipaz	Selülaz	Üreaz
HBF134	<i>Absidia</i> sp.	-	-	-	-	-
HBF136	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-	2.53
HBF130	<i>Aspergillus flavipes</i>	1.89	-	-	0.69	-
HBF128	<i>Aspergillus flavus</i>	1.73	-	-	-	-
HBF125	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.58	-	-	1.01	2.16
HBF126	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.17	-	-	-	1.66
HBF127	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.65	-	-	-	-
HBF42	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.50	-	-	-	3.49
HBF50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.90	-	-	1.02	6.62
HBF96	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.60	-	-	-	6.66
HBF131	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	1.39	1.02	-
HBF98	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	1.23	1.61	-
HBF129	<i>Aspergillus ochraceus</i>	1.40	-	-	-	-
HBF132	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-	2.29
HBF123	<i>Aspergillus terreus</i>	1.58	-	-	-	-
HBF124	<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	-	-
HBF38	<i>Aspergillus terreus</i>	1.10	-	-	-	-
HBF101	<i>Aspergillus terreus</i>	1.60	-	-	-	-
HBF102	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.10	-	-	-	9.08
HBF140	<i>Mucor</i> sp.	0.88	-	-	-	-
HBF135	<i>Penicillium</i> sp.	1.18	-	-	1.07	-



(a)



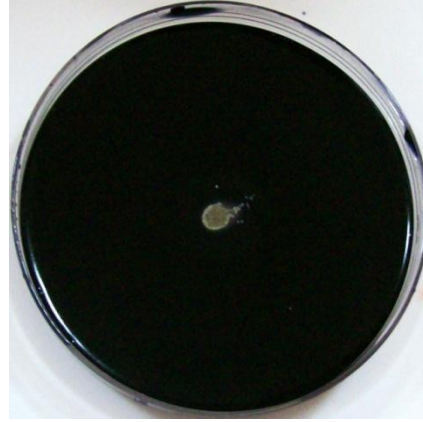
(b)

Şekil 4.1. Lipolitik aktivite. (a) Pozitif

(b) Negatif



(a)



(b)

Şekil 4.2. Amilolitik aktivite. (a) Pozitif

(b) Negatif



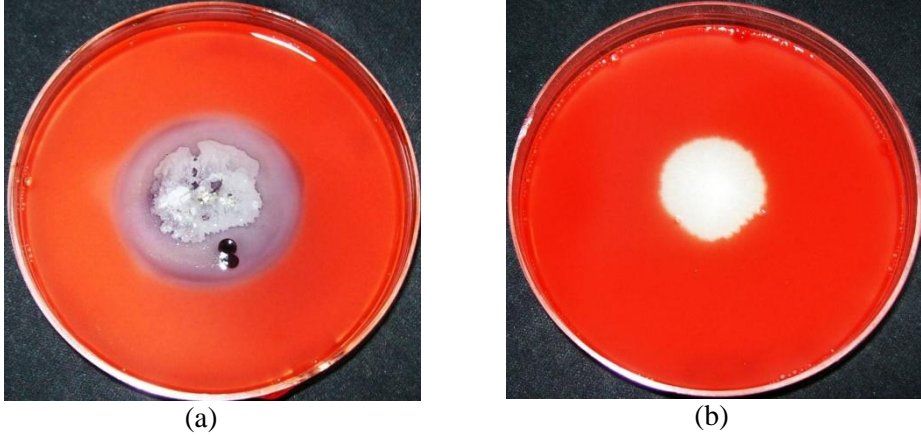
(a)



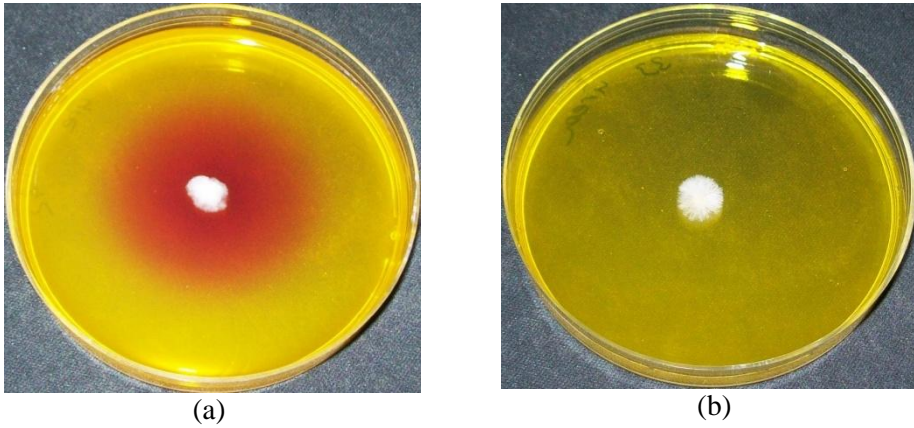
(b)

Şekil 4.3. Proteolitik aktivite. (a) Pozitif

(b) Negatif



Şekil 4.4. Selülitik aktivite. (a) Pozitif (b) Negatif



Şekil 4.5. Üreolitik aktivite. (a) Pozitif (b) Negatif

4.3. Aflatoksin

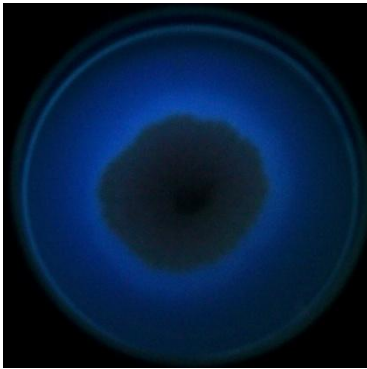
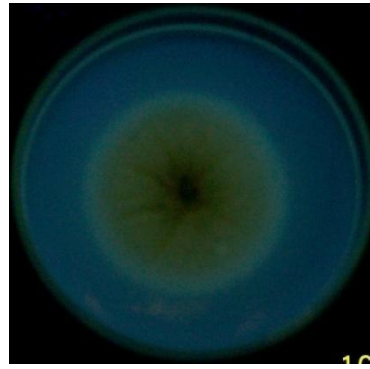
Termotolerant ve termofilik olarak belirlenen ve amilolitik aktivite yönünden pozitif olan 15 adet fungusun aflatoksin üretip üretmediği Hg Czapek Dox Agar kullanılarak saptandı. Hazırlanan ortama malt ekstrakt agarda spor oluşumu sağlanan stokdan tek nokta ekimi yapıldı ve 30 °C'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kültürler UV ışığı (365 nm) altında incelenerek ışımaya yapıp yapmadığına bakıldı.

Aflatoksin testi sonucunda 15 adet termotolerant ve termofilik fungusdan *Aspergillus fumigatus* HBF42 ile *Aspergillus ochraceus* HBF129 suşlarının aflatoksin ürettikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te, pozitif ve negatif sonuçlar için örnekler Şekil 4.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Aflatoksin test sonuçları.

Stok no	Fungus	Aflatoksin testi
HBF130	<i>Aspergillus flavipes</i>	-
HBF128	<i>Aspergillus flavus</i>	-
HBF125	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
HBF126	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
HBF127	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
HBF42	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+
HBF50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
HBF96	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
HBF129	<i>Aspergillus ochraceus</i>	+
HBF123	<i>Aspergillus terreus</i>	-
HBF38	<i>Aspergillus terreus</i>	-
HBF101	<i>Aspergillus terreus</i>	-
HBF 102	<i>Aspergillus versicolor</i>	-
HBF140	<i>Mucor sp.</i>	-
HBF135	<i>Penicillium sp.</i>	-

Aflatoksinler (AF) kimyasal olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin türevleridir. Önemli aflatoksinler olarak, AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂, AFG₁ ve AFG₂ görülmektedir. Bu toksinlerden; AFB₂ toksini AFB₁' in, AFG₂ toksini AFG₁' in dihidro formlarıdır. AFM₁ ve AFM₂ ise AFB₁ ve AFB₂' nin OH içeren formlarıdır. Aflatoksinlere verilen bu harfler toksinlerin UV ışını altında verdikleri floresan renkleri belirtir. B₁ ve B₂ mavi, G₁ ve G₂ yeşil-mavi, M₁ mavi-viyole ve M₂ viyole renkli floresan yayar (Tunail, 2000).

(a) *Aspergillus ochraceus* HBF129(b) *Aspergillus fumigatus* HBF126

Şekil 4.6. Aflatoksin test (a) Pozitif

(b) Negatif

Aspergillus ochraceus HBF129 ve *Aspergillus fumigatus* HBF42'nin UV ışığı altında mavi ışımaya yapması aflatoksin B₁ veya B₂ ürettiğini göstermektedir.

Termotolereant ve termofilik olarak belirlenen 13 fungusun ise agar ortamında ışımaya vermemesi aflatoksin üretmediklerinin göstergesidir.

4.4. Seçilen Fungusların Toksin Üretme Yeteneklerinin Görüntülenmesi

UV altında ışımaya yapmayan türlerden en iyi amilaz aktivitesi gösteren *Aspergillus fumigatus* HBF125 ve *Aspergillus fumigatus* HBF126 suşları akciğer epitel hücreleri kullanılarak toksin üretme yeteneklerinin görüntülenmesi için seçildi. Amilolitik aktivite yönünden en yüksek olan ve aflatoksin üretmeyen termofilik iki fungus ve aflatoksin yönünden pozitif olan iki farklı fungus patates dekstroza agarda 5 gün 30 °C de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fungusların serum fizyolojik ile uygun seyreltmeleri yapıldı ve fungus örneklerinden Bronchial epitelium cell basal medium ortamına steril koşullarda ekim yapıldı ve 37 °C de 2, 4 ve 8 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon saatleri sonunda tripan blue/serum fizyolojik ile 5 dakika boyunca boyandı. Boyama sonunda kuyucuklardaki boya mikro pipetle uzaklaştırıldı. Olympus CK40 invertör tip mikroskop kullanılarak 10'luk objektifte beş farklı alanda ölü ve canlı hücreler sayıldı. 100 hücredeki ölü ve canlı hücre sayıları hesaplanarak, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki ölü ve canlı hücre sayısı karşılaştırıldı. Herhangi bir çözelti içermeyen hücreler ise kontrol grubu olarak kullanıldı.

Deney sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.4'de verilmiştir. *Aspergillus fumigatus* HBF125 ve *Aspergillus fumigatus* HBF126'nın 8. saat sonunda canlı hücre sayısının %73.2 ile 75.51 oranında olduğu belirlendi. Aflatoksin üreten funguslarda ise canlı hücre sayısının %50'nin altında olduğu belirlendi.

Çizelge 4.4. Toksin üretme yeteneklerinin belirlenmesi

Deney grubu	Canlı hücre sayısı (%)		
	2 saat	4 saat	8 saat
Kontrol	95	95	95
<i>Aspergillus fumigatus</i> HBF125	88.7	79.82	73.2
<i>Aspergillus fumigatus</i> HBF126	81.84	83.4	75.51
<i>Aspergillus fumigatus</i> HBF42	82.44	68.43	15.32
<i>Aspergillus parasiticus</i> HBF56	83.16	49.64	44.52

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır; doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalidir; doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir ve biyodegradasyonda rol alırlar. Bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar; uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler (Chazelet vd., 1998; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003; Çeter ve Pınar, 2009).

Aspergillus'lara bağlı alerjik hastalıklar (astım, alerjik sinüzit, alveolit gibi) ve mikotoksikoz (bu mantarların etkisiyle bazı besinlerde oluşan zehirlerin yenmesiyle ortaya çıkan hastalık) dışında, *Aspergillus* türlerinin sebep oldukları hastalıklar aspergilloz (tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi, pnömonilerin ardından akciğerlerdeki boşluklarda aspergilloma denilen mantar topu oluşturması) olarak tanımlanmaktadır. İnvaziv aspergilloz'a en sıklıkla sebep olduğu bildirilen türler *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*'dır. Daha nadir olarak hastalığa sebep olanlar *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulosis*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Neosartoria fischeri* olarak sayılmaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Akciğer epitel hücrelerinde toksik etki göstermedikleri için, çalışmamızda kullanılacak fungustan üretilen enzimin endüstriyel işlemlerde kullanılabileceği belirlendi. Amilolitik enzimlerin günümüzde birçok endüstriyel alanda özellikle gıda endüstrisinde kullanılmasından dolayı üretilecek enzimin endüstriyel çalışmalarda güvenli bir şekilde kullanılabileceğini gösterdi.

4.5. Mikroorganizmanın Seçimi

4.5.1. Amilaz Kültür Ortamında Enzim Üretimi

Toksin üretimi yapmayan funguslar *Aspergillus fumigatus* HBF125 ve *Aspergillus fumigatus* HBF126 suşları sıvı kültür ortamında geliştirilerek spektrofotometrik olarak amilolitik aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler Çizelge 4.5'te verildi. Kültür ortamında enzim aktivitesi, hücrelerin parçalandığı 5. günde maksimum olarak ölçüldü. Üçüncü günde ortamdaki redüktör şeker miktarının fazla olmasından dolayı enzim aktivitesi ölçülmedi. Beşinci gündeki enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında HBF125 suşunun enzim aktivitesi HBF126 suşuna göre yüksek bulundu.

Çizelge 4.5. Fungusların amilaz kültür ortamında enzim üretme yeteneklerinin karşılaştırılması

İnkübasyon Süresi (Gün)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)				Redüktör Şeker (µmol/mL)		Protein Konsantrasyonu (mg/mL)		Final pH		Biyokütle (g/100 mL)	
	HBF125	x	HBF126	x	HBF125	HBF126	HBF125	HBF126	HBF125	HBF126	HBF125	HBF126
3	-		-		0.868	0.865	0.033	0.040	8.35	8.39	0.93	0.95
4	560.28 ± 58.64	a	716.38 ± 225.44	a	0.421	0.384	0.063	0.075				
5	929.17 ± 18.43	b	797.22 ± 31.91	a	0.231	0.264	0.062	0.114				
6	720.28 ± 15.64	b	580.83±79.00	a	0.214	0.248	0.095	0.134				

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

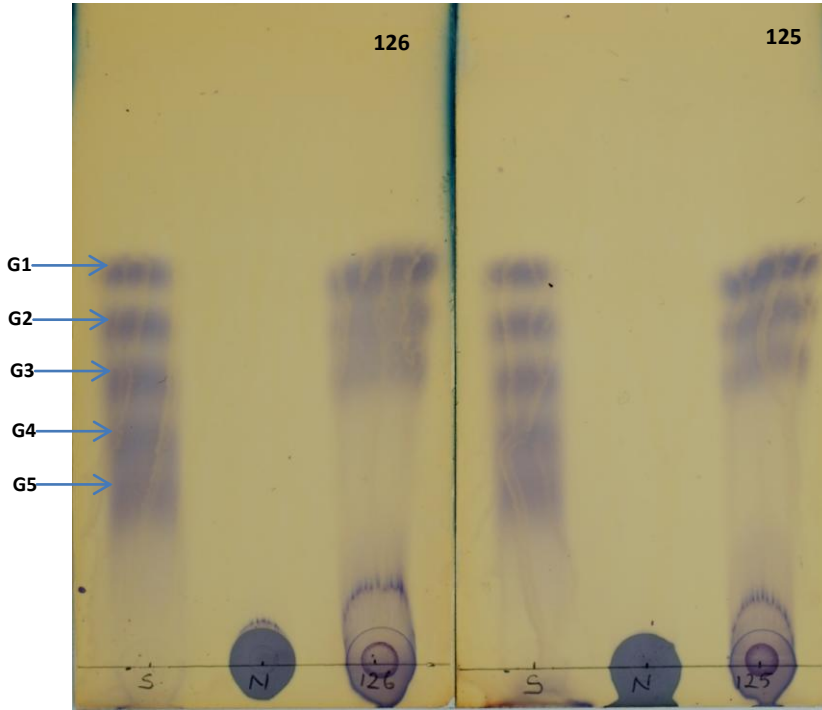
S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

4.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Mikroorganizma seçimi için *A. fumigatus* HBF125 ve HBF126 suşlarının, nişastanın enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan ürünlerin analizi ve enzim tipinin belirlenmesi için ince tabaka kromatografisi yapıldı.

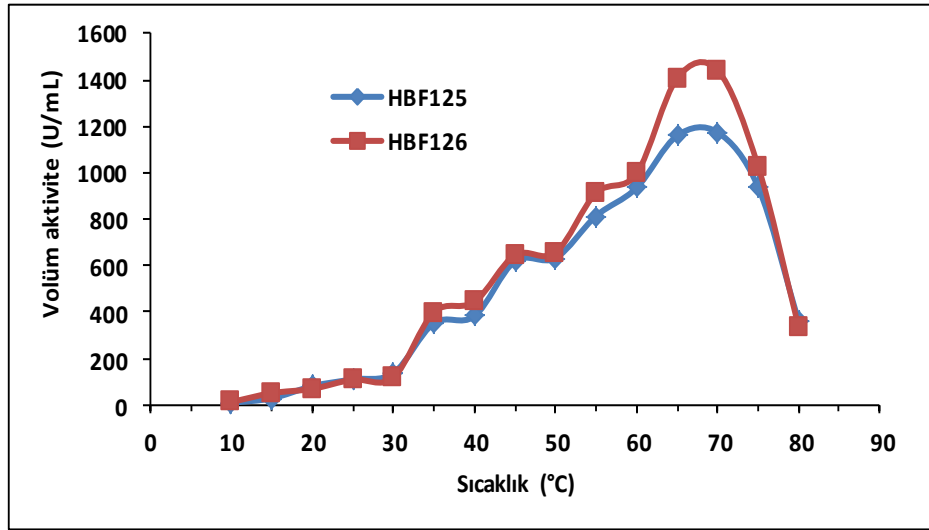
İnce tabaka kromatografi analizi sonucunda, nişastanın 24 saat sonunda enzimatik hidrolizi ile oluşan son ürünün hem *Aspergillus fumigatus* HBF125'te hemde HBF126'da glukoz, maltoz ve maltotrioz olduğu bulundu (Şekil 4.7). Nişastanın hidrolizi sonucunda oluşan son ürünlerin glukoz, maltoz ve maltotrioz olması, her iki fungusun kültür ortamında ürettiği enzimin α -amilaz olduğunu göstermektedir.



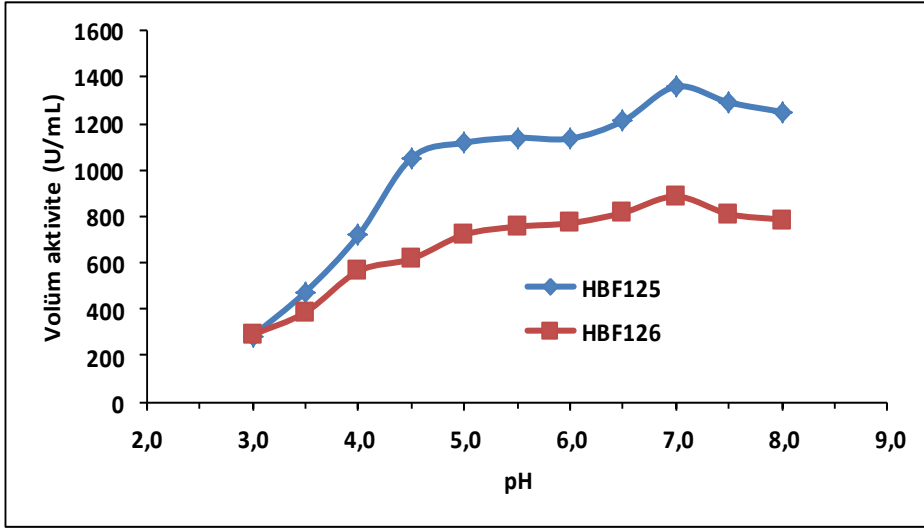
Şekil 4.7. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi görüntüsü G1: Glukoz, G2: Maltoz, G3: Maltotrioz, G4: Maltotetroz, G5: Maltopentoz, S: Standart, N: Nişasta

4.5.3. Ham Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi

Mikroorganizma seçimi için ham enzimin optimum sıcaklık, optimum pH ölçümleri yapıldı ve elde edilen değerler Şekil 4.8 ve 4.9 da gösterildi. HBF125 ve HBF126 funguslarının ham enzimlerinin optimum sıcaklığı 70 °C ve optimum pH'ları da 7.0 olarak bulundu.



Şekil 4.8. *A. fumigatus* HBF125 ve HBF126 ham amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

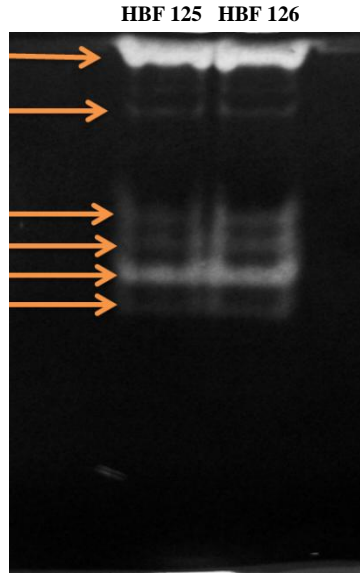


Şekil 4.9. *A. fumigatus* HBF125 ve HBF126 ham amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.5.4. Enzimlerin Elektroforetik Olarak Görüntülenmesi

Fungusların kültür ortamındaki enzim üretiminin belirlenmesi için PAGE zimografisi yapıldı. Bu işlem için enzim aktivitesinin en yüksek olduğu gün (5. gün) sonunda kültür ortamı kullanıldı. *A. fumigatus* HBF125 ve HBF126 suşlarının α -amilazının PAGE zimografisi ile görüntülenmesi yapıldığında her iki suşun kültür ortamında nişastanın hidrolizinden sorumlu 6 enzim ürettiği saptandı (Şekil 4.10).

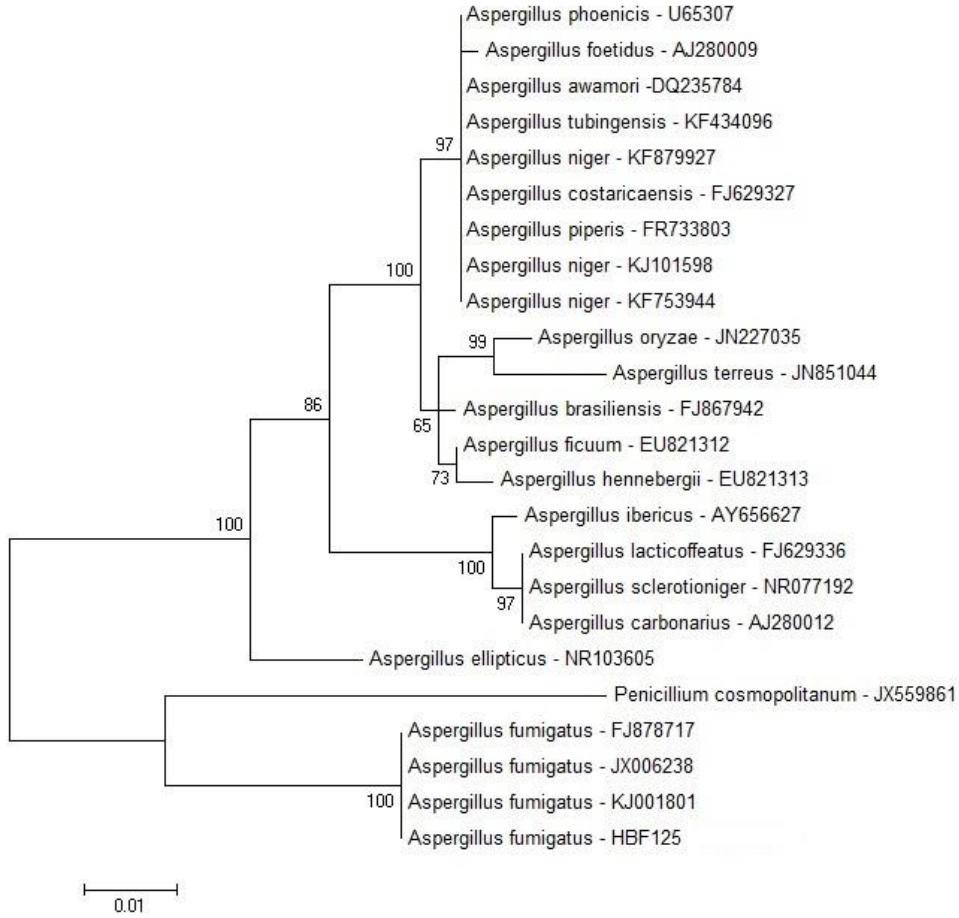
Aspergillus fumigatus HBF125 ve HBF126 suşlarının optimum pH ve sıcaklığı, enzim tipi ve ürettikleri enzim sayısı aynı olduğu için, bundan sonraki çalışmalarda kullanılacak fungusun seçiminde petri de oluşturduğu zon çapı ve sıvı kültür ortamındaki enzim aktivitesi temel alındı. Daha sonra yapılacak çalışmalarda *Aspergillus fumigatus* HBF125'in kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.10. Ham enzim PAGE zimogram görüntüsü

4.6. Fungusun Moleküler Tanısı

Morfolojik olarak *A. fumigatus* HBF125 olarak teşhis edilen izolatu, ITS gen bölgesinin dizileri, Clustal W programı kullanılarak hizalandı. Hizalanan dizilerin (www.pubmed.com) GENBANK'taki Blast programı aracılığıyla veri tabanında yer alan ITS dizileri ile karşılaştırıldı. Veritabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan funguslar arasında en yüksek benzerlik oranı (%100) *Aspergillus fumigatus* olarak saptandı. Nükleotid Blast programında elde edilen diziler ile Neighbor Joining Ağacı elde edildi (MEGA 6) (Şekil 4.11). Buna göre HBF125 izolatımız *A. fumigatus*'un da içinde bulunduğu grupta yer alıp, daha önce yapılan morfolojik tanıyı destekledi. *Aspergillus fumigatus* HBF125 izolatının dizisi için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html> adresinde bulunan Sequin programı kullanılarak Genbank'tan **KJ530990** kayıt numarası alındı.



Şekil 4.11. *A. fumigatus* HBF125 ITS gen bölgesinin dizileri ile en yüksek homoloji gösteren GENBANK'daki dizilerle elde edilmiş neighbor joining ağacı.

4.7. *Aspergillus fumigatus* HBF125'in Amilaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde enzim üretme kapasitelerinin taranması, besiyeri bileşimi ve kültür koşullarının değerlendirilmesi önemli bir basamaktır (Singh ve Satyanarayana, 2008). Ayrıca kültür ortamının bileşenlerinin enzim üretimini artırmada önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Mukesh kumar vd., 2012).

4.7.1. Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Aspergillus fumigatus HBF125'in amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etki sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.12'de sunuldu. Denenen sıcaklıklardan 30, 35, 40, 45 ve 50 °C'de enzim üretimi görülmüş olup 30, 35 ve 40 °C arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). En iyi enzim üretim sıcaklığı inkübasyonun 4. Gününde, 35 °C de görülmüştür. Yirmi santigrad derece sıcaklıkta fungus gelişimi meydana gelmesine rağmen, enzim üretimi 10 günlük inkübasyon boyunca görülmemiş ve kültür ortamındaki sıvının azalmasından dolayı ortam stabilitesi bozulduğundan 10. gün sonunda inkübasyona son verilmiştir. 55 ve 60 °C de 10 günlük inkübasyon süresi boyunca fungus gelişimi olmamıştır. 30 ve 35 °C de ortamda sporlanma meydana geldiği için, kültür ortamı yeşil renk almıştır (Şekil 4.13). Oluşan sporlanma enzim aktivitesini etkilemediği için *A. fumigatus* HBF125 fungusunun amilaz üretimi için en uygun sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda optimum ortam sıcaklığı olarak kullanılmıştır.

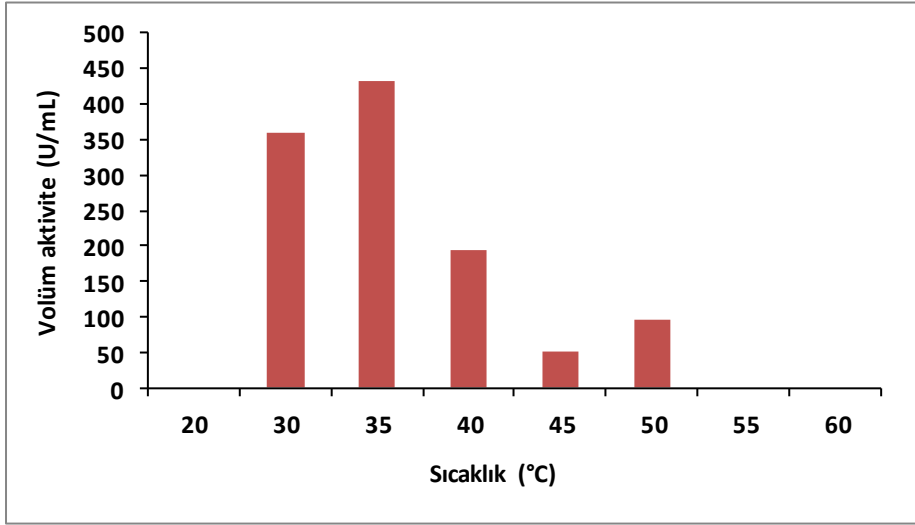
Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi organizmanın büyümesi ile ilgilidir. Bu nedenle optimum enzim üretim sıcaklığı mikroorganizmanın mezofilik ve termofilik oluşuna bağlıdır (Gautam vd., 2013). İnkübasyon sıcaklığı sadece mikroorganizmanın büyümesini değil aynı zamanda biyolojik aktivitelerini de etkiler (Puri vd., 2013). Fermentasyon boyunca ortamın sıvı oranının kontrolü de enzim üretimi ve mikrobiyal büyüme için önemlidir (Anto vd., 2006).

Aspergillus fumigatus NTCC 1222 amilaz üretimi ile yapılan çalışmada optimum üretim sıcaklığının 35 °C olarak bulunduğu bildirilmiştir (Singh vd., 2013). Bu sonuç çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

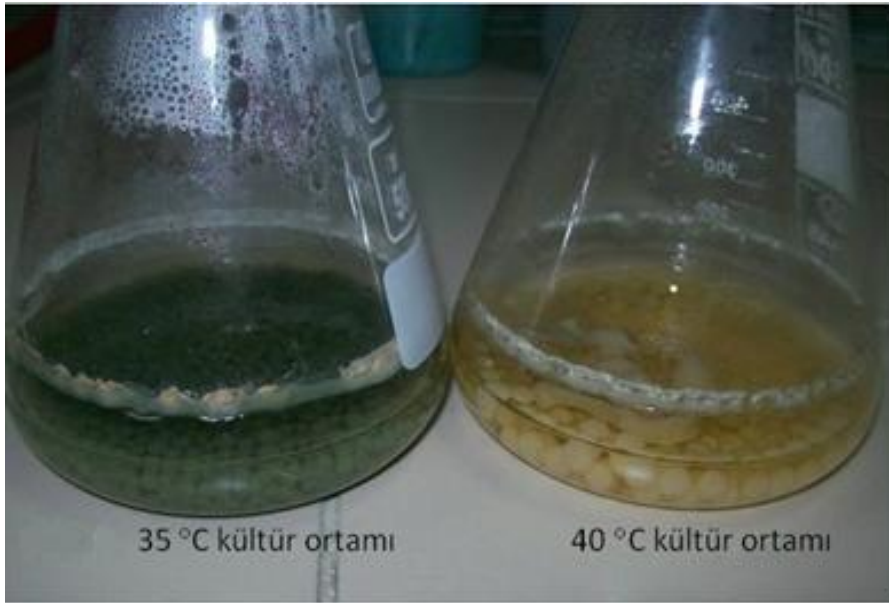
Aspergillus niger-ML-17 ve *Rhizopus oligosporus*-ML-10 amilaz üretimi ilgili yapılan çalışmada optimum enzim üretim sıcaklığı 30 ve 35 °C olarak bulunmuştur (Irfan vd., 2012).

Mucor sp., *Aspergillus* sp. A3, *Penicillium fellutanum*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* amilaz ve glukoamilazları ile yapılan çalışmalarda optimum enzim üretim sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuştur (Mohapatra vd., 1998; Ellaiah

vd., 2002; Kathiresan ve Manivannan, 2006; Gupta vd., 2008; Fadahunsi ve Garuba, 2012).



Şekil 4.12. Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 4.13. Kültür ortamında meydana gelen sporlanma

Çizelge 4.6. Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
20	-	-	1.00	0.857	0.073	4.65	10
30	359.91 ± 35.73	a	0.90	0.093	0.079	7.74	7
35	433.09 ± 23.65	b	1.01	0.283	0.115	7.80	4
40	194.17 ± 4.25	c	1.02	0.305	0.099	7.83	5
45	51.44 ± 1.17	d	0.99	0.179	0.101	7.60	6
50	94.78 ± 4.06	d	1.14	0.303	0.054	7.03	7
55	-	-	-	-	-	5.0	10
60	-	-	-	-	-	5.0	10

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.7.2. Enzim Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisini incelemek için kültür ortamı optimum enzim üretim sıcaklığında farklı pH'lara (pH 2.0-10.0) ayarlandı ve HBF125 suşu saptanan optimum sıcaklıkta (35 °C) 100 rpm/dk'da 6 gün boyunca inkübe edildi. Altı günlük inkübasyon süresince günlük enzim aktivitesi, redüktör şeker ve protein miktarı ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütle ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.14. ve Çizelge 4.7'de verildi.

Aspergillus fumigatus HBF125 fungusu geniş pH aralığında üreme ve enzim üretme yeteneği göstermiştir. pH 3.0-10.0 arasında gelişme göstermesine rağmen, pH 2.0 de ürememiştir. En iyi enzim üretimi pH 5.0 de elde edildi. pH 5.0'te ölçülen enzim aktivitesinin pH 4.0, 6.0 ve 7.0 ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$). pH 8.0, 9.0 ve 10.0 da fungus üremesi olmasına karşın enzim aktivitesinde düşüş saptandı.

Büyüme ortamının pH'sı, enzim salgılanması ve organizmanın morfolojik değişmesine neden olan önemli fizyolojik parametreler arasındadır. Organizmanın büyümesi boyunca değişiklik gösteren pH, ortamdaki ürün stabilitesini etkiler (Gupta vd., 2003). Pek çok fungusun amilaz üretimi ve büyümesi için optimum pH aralığının pH 5.0 ile 6.0 olduğu bildirilmiştir (Khoo vd., 1994).

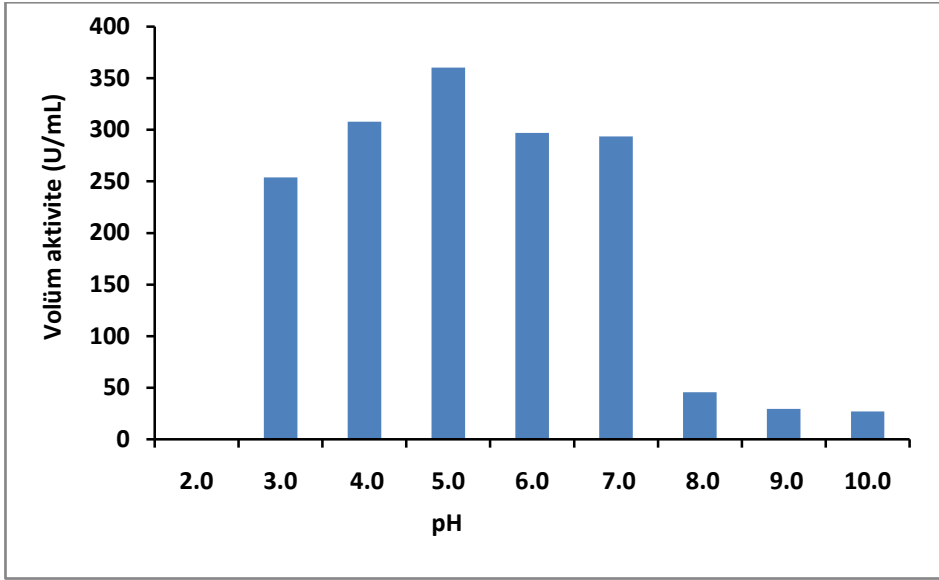
Bacillus sp. tarafından üretilen termostabil amilazın optimum üretim pH'sının hücresel büyümenin artış gösterdiği pH 7.0'de olduğu bulunmuştur. Kültür ortamının pH'sı 4.0, 5.0, 6.0 ve 10.0'a ayarlandığında mikroorganizmanın üremediği bildirilmiştir (Teodoro ve Martins, 2000).

Batık (SmF) fermentasyon kullanılarak üretilen *Aspergillus oryzae*'nin maksimum enzim üretiminin, kültür ortamının pH'sının 7.0'ye ayarlandığında olduğu bildirilmiştir (Shah vd., 2014).

Bacillus licheniformis amilaz üretimi üzerine pH'nın etkisine bakmak için kültür ortamının farklı pH değerlerine ayarlandığı ve maksimum enzim üretiminin pH 7.0 de, minimum enzim üretiminin ise pH 3.0 de olduğu bildirilmiştir (Sankaralingam vd., 2012).

Aspergillus sp. A3, *Fusarium soloni*, *Aspergillus niger* ve *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) α -amilaz ve glukoamilazları ile yapılan çalışmalarda

enzim üretimi için optimum ortam pH'sı 5.0 olarak bulunmuştur (Ellaiah vd., 2002; Bhatti vd., 2007, Gupta vd., 2008; Sindhu vd., 2009). Bu bildirimler ile çalışmamız benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.14. Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisi.

Çizelge 4.7. Enzim üretimi üzerine pH'nın etkisi

pH	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
2.0	-	-	-	-	-	2.0	6
3.0	253.78 ± 6.06	a	1.19	256.67	0.100	7.13	5
4.0	307.83 ± 40.05	ac	1.00	531.19	0.106	7.18	5
5.0	360.17 ± 4.69	c	1.08	583.61	0.096	7.29	5
6.0	297.06 ± 18.63	ac	1.06	619.17	0.097	7.07	5
7.0	293.61 ± 47.64	ac	1.03	348.06	0.104	7.09	5
8.0	45.50 ± 1.58	b	1.05	599.72	0.115	7.57	5
9.0	29.35 ± 4.35	b	1.03	465.28	0.137	7.58	5
10.0	26.94 ± 0.00	b	1.02	587.50	0.137	7.59	5

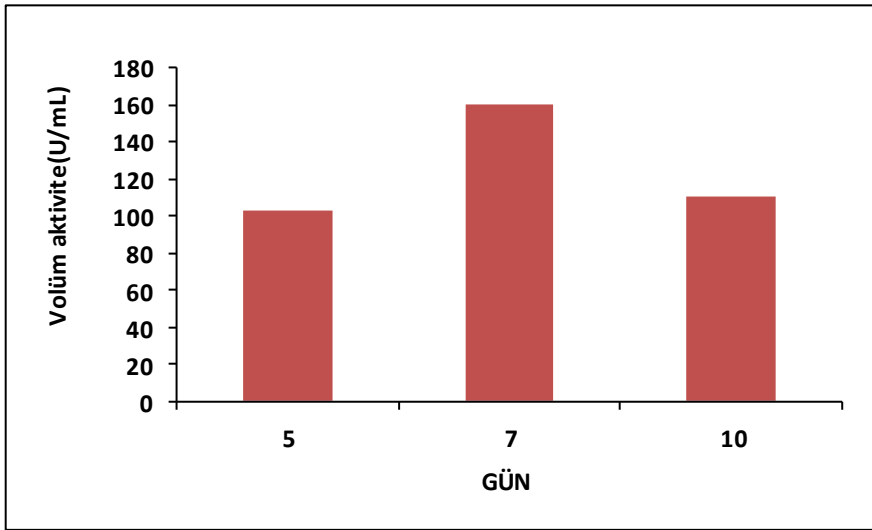
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.7.3. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Yaşının Etkisi

Enzim üretimi üzerine inokulum yaşının etkisini incelemek için amilaz kültür ortamına farklı yaşlarda 5, 7, 10 günlük sporulasyon ortamından %1'lik HBF125 suşu inokule edildi. HBF125 suşu bu koşullarda 35 °C de, pH 5.0 de, 100 rpm/dk'da 5 gün boyunca inkübe edildi. Beş günlük inkübasyon süresince günlük enzim aktivitesi, redüktör şeker ve protein miktarı ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütlesi ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.15 ve Çizelge 4.8'de verildi. Elde edilen sonuçlara göre en iyi enzim üretimi 7 günlük inokulum yaşında elde edilmesine karşın 5 ve 10 günlük inokulum yaşı ile aralarındaki fark istatistikî olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$). Yedi günlük inokulum yaşında elde edilen enzim aktivitesi yüksek olduğu için daha sonraki optimizasyon denemelerinde 7 günlük inokulum yaşı kullanıldı.



Şekil 4.15. Enzim üretimi üzerine inokulum yaşının etkisi

Aspergillus oryzae L-glutaminaz üretimi için inokulum yaşı olarak 4 günlük sporulasyon ortamı kullanıldığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmada inokulum yaşı arttıkça, mikrobiyal gelişimin ölüm fazına girip enzim üretiminin azalmasıyla sonuçlandığı belirtilmiştir (Prasanna ve Raju, 2012).

Çizelge 4.8. Enzim üretimi üzerine inokulum yaşının etkisi

İnokulum yaşı (Gün)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
5	103.09 ± 14.27	a	1.01	583.33	0.151	7.48	4
7	159.72 ± 46.51	a	1.03	474.17	0.132	7.42	4
10	110.43 ± 4.62	a	1.04	535.83	0.141	7.46	4

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

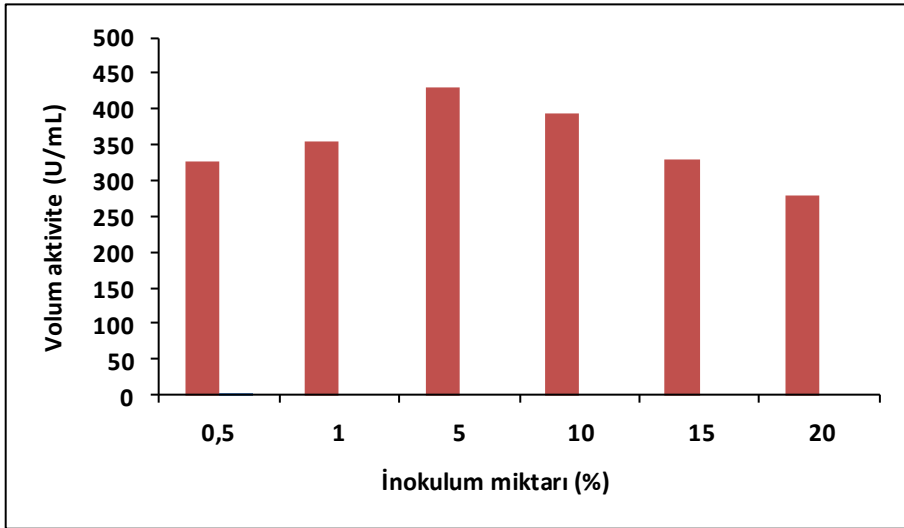
S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.7.4. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum şartlardaki amilaz kültür ortamına farklı oranlarda (%0.5, 1, 5, 10, 15, 20) HBF125 şuşu inokule edilerek, optimum koşullarda (7 günlük sporulasyon ortamı, 35 °C de, pH 5.0 da, 100 rpm/dk'da) 5-6 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca kültürün enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütlesi ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.16 ve Çizelge 4.9'da verildi.

Elde edilen sonuçlara göre en düşük ve en yüksek inokulum miktarında enzim aktivitesi en düşük değer olarak bulundu. İnokulum miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$). İnokulum miktarı arttıkça kültür ortamında enzim üretim gününün azaldığı ve kültür ortamındaki fungusların ölüm fazına daha çabuk girdikleri görüldü. Bunun sebebi olarak ortamdaki fungus miktarının fazla olması ve bu sebeple ortamdaki besinin daha çabuk tüketilmesi gösterilebilir. En iyi enzim üretimi %5'lik inokulum miktarında görüldü. Bundan sonraki optimizasyon denemelerinde %5'lik inokulum miktarı kullanıldı.



Şekil 4.16. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi.

İnokulum miktarı amilaz üretimi için önemli bir faktördür. Yüksek inokulum miktarları doğal bir inhibitördür. *Aspergillus* sp. A3 amilazı ile yapılan çalışmada inokulum miktarı olarak %10, *Fusarium solani* glukoamilazı ile yapılan çalışmada ise inokulum miktarı %15 olarak bulunmuştur (Ellaiah vd., 2002; Bhatti vd., 2007).

Bacillus subtilis amilazı ile yapılan çalışmada inokulum miktarı arttıkça enzim üretiminin azaldığı bildirilmiştir (Jogezai vd., 2011). *Paenibacillus amylolyticus* α -amilazı ile yapılan çalışmada yüksek inokulum miktarlarında enzim üretiminin azalmasına; çok fazla miktarda olan hücreler için ortamda besinin azalmasına veya toksik metabolitlerin hızla birikmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (Ikram-Ul-Haq vd., 2012). Bu bildirimler ile çalışmamız paralellik göstermektedir.

Çizelge 4.9. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi

İnokulum miktarı (%)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
0.5	327.50 ± 69.00	a	1.02	561.67	0.155	6.97	6
1	355.06 ± 31.44	a	1.26	1162.50	0.079	6.99	5
5	429.00 ± 36.28	a	1.08	775.00	0.090	7.25	5
10	394.11 ± 14.39	a	1.16	561.67	0.122	7.26	4
15	328.67 ± 56.83	a	1.23	541.67	1.133	7.21	4
20	278.44 ± 111.94	a	1.00	1015.83	0.061	6.90	4

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.7.5. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum şartlardaki amilaz kültür ortamına ticari olarak satın alınan ruşeym, mısır nişastası (Katsan), buğday nişastası (Katsan), pirinç unu (Dr.Oetker), kepek, galeta unu (Bağdat), irmik (Gonca), melas, zeytin atık suyu ve kontrol olarak da çözünür patates nişastası %2 oranında eklendi. HBF125 suşu optimum koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 4-6 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca kültürün enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütlesi ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.17 ve Çizelge 4.10'da verildi. Patates nişastası kontrol olarak kabul edildi ve denenen bütün karbon kaynakları bu değerle karşılaştırıldı.

Denenen karbon kaynaklarından pirinç nişastası, irmik, ruşeym, galeta ununun kontrol grubuna göre aktiviteleri düşük olmasına rağmen, aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol grubunda maksimum enzim aktivitesi üretimin 2. gününde olurken, pirinç nişastası, irmik, ruşeym, galeta ununda ise maksimum enzim aktivitesi sırasıyla üretimin 3., 4., 4. ve 2. gününde ölçüldü.

Karbon kaynağı olarak kullanılan kepeğin kontrol grubuna göre enzim aktivitesi artış göstermiş ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Maksimum enzim aktivitesi inkübasyonun 2. gününde ölçülmüştür.

Mısır nişastası ve buğday nişastasında enzim aktivitesi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Zeytin atık suyu ve melasda fungus gelişimi olmasına rağmen enzim üretimi olmamıştır. Melas ön işlemden geçirildikten sonra içeriğinde %22 oranında şeker içeriği bulunmaktadır. Ortamda bulunan şeker mikroorganizmanın büyümesi için yeterli gelmiş fakat enzim üretimini arttırmadığı görülmüştür.

Denenen karbon kaynaklarından buğday kepeğinin en iyi karbon kaynağı olarak bulunması tarımsal yan ürünlerin enzim üretiminde kullanılmaya uygun olduğunu göstermektedir. Hem ucuz hem de çok fazla miktarlarda bulunması enzim üretiminde maliyeti azaltacağını göstermektedir.

Bacillus cereus MTCC 1305 α -amilazı üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının (Buğday kepeği, mısır unu, çavdar samanı, buğday samanı ve pirinç kepeği) etkisi incelenmiş ve amilaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak buğday kepeği bulunmuştur (Singh vd., 2010).

Aspergillus fumigatus NTCC 1222 α -amilaz üretimi ile ilgili yapılan çalışmada maksimum enzim üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak buğday kepeği bulunmuştur (Singh vd., 2013). Bu sonuçlar çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Aspergillus niger α -amilaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının (%2 oranında glukoz, maltoz, laktoz, sukroz ve nişasta) etkisi denenmiş ve en iyi karbon kaynağı olarak sukroz bulunmuştur. Glukozun *Aspergillus niger*'in enzim üretimini katabolit olarak baskıladığı bulunmuştur (Suganthi vd., 2011).

Aspergillus oryzae LS1 amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi incelenmiş ve üretim ortamına buğday kepeğini tamamlayıcı karbon kaynağı olarak %1 oranında glukoz, laktoz, maltoz, sukroz, çözünen nişasta, pirinç nişastası ve buğday unu kullanılmıştır. Denenen bütün karbon kaynaklarının enzim üretimini kontrol değerine göre arttırdığı bulunmuş ve en iyi karbon kaynağı olarak sukroz kullanıldığı belirtilmiştir (Farid ve Shata, 2011).

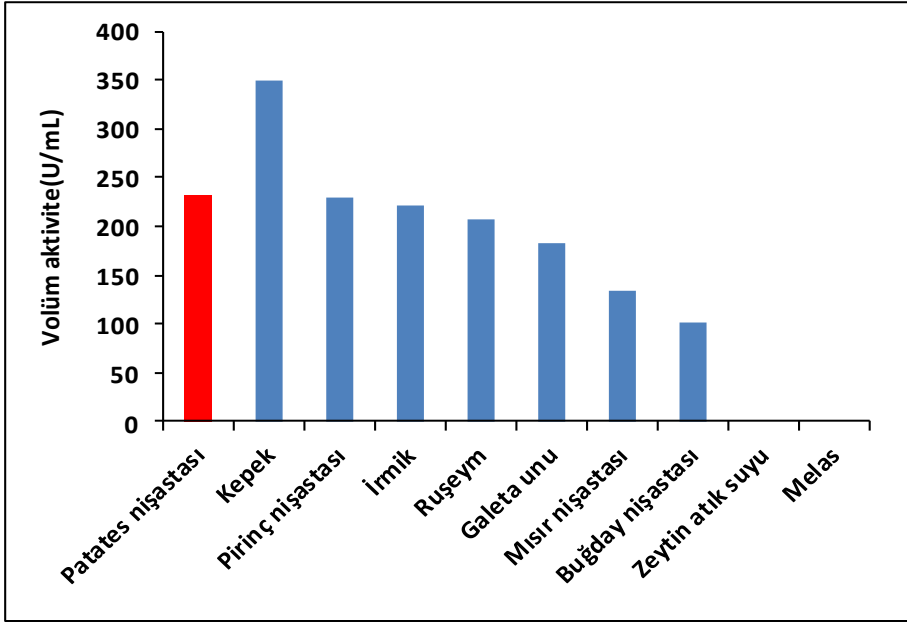
Çizelge 4.10. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynağı (%2)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
Patates nişastası (KONTROL)	232.56 ± 41.39	a	1.14	1778.33	0.142	7.81	2
Kepek	350.50 ± 8.92	b	1.12	620.83	0.238	8.30	2
Pirinç nişastası	229.61 ± 13.21	a	0.96	1137.50	0.371	7.46	3
İrmik	222.06 ± 63.00	a	1.07	460.00	0.083	8.27	4
Ruşeym	208.12 ± 6.69	a	1.26	866.67	0.304	8.30	4
Galetu unu	182.56 ± 20.28	a	1.18	2052.50	0.94	8.27	2
Mısır nişastası	135.06 ± 0.56	b	1.07	1158.75	0.183	7.43	2
Buğday nişastası	101.00 ± 2.06	b	0.97	770.00	0.375	7.72	3
Zeytin atık suyu	-		0.53	23.75	0.029	7.91	4
Melas	-		1.00	3371.25	0.044	8.37	4

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.17. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi.

4.7.5.1. Amilaz üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı oranının belirlenmesi

Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı oranının belirlenmesi için daha önce saptanan optimum şartlardaki amilaz kültür ortamına %1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 oranında kepek ilave edildi ve HBF125 suşu optimum koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 5 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca kültürün enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütlesi ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.18 ve Çizelge 4.11'de verildi.

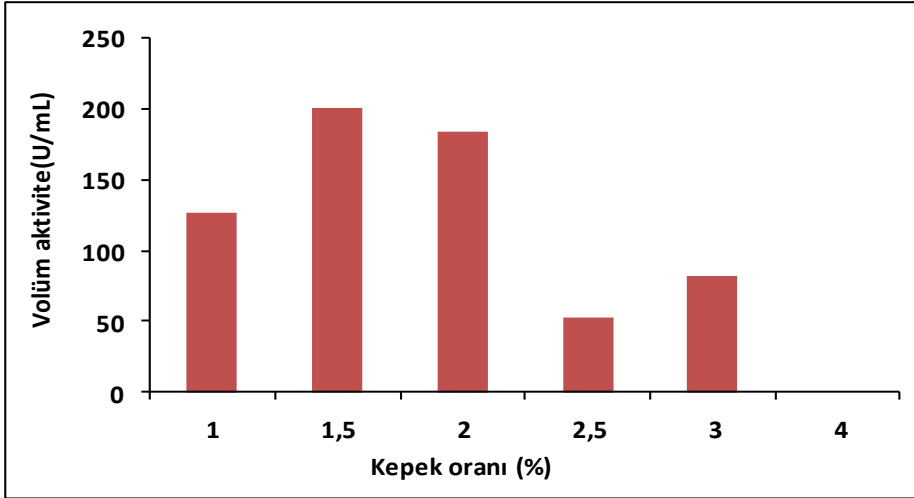
Çizelge 4.11. Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı (kepek) oranının etkisi

Kepek Oranı (%)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (μmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
1.0	126.80 ± 2.28	a	0.92	537.50	0.031	8.18	2
1.5	200.83 ± 8.26	b	1.18	1867.50	0.113	8.26	2
2.0	184.54 ± 15.99	b	1.43	1700.00	0.234	8.29	2
2.5	51.94 ± 5.25	c	1.62	560.00	0.183	8.34	3
3.0	81.54 ± 2.59	c	1.89	251.67	0.231	8.28	4

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

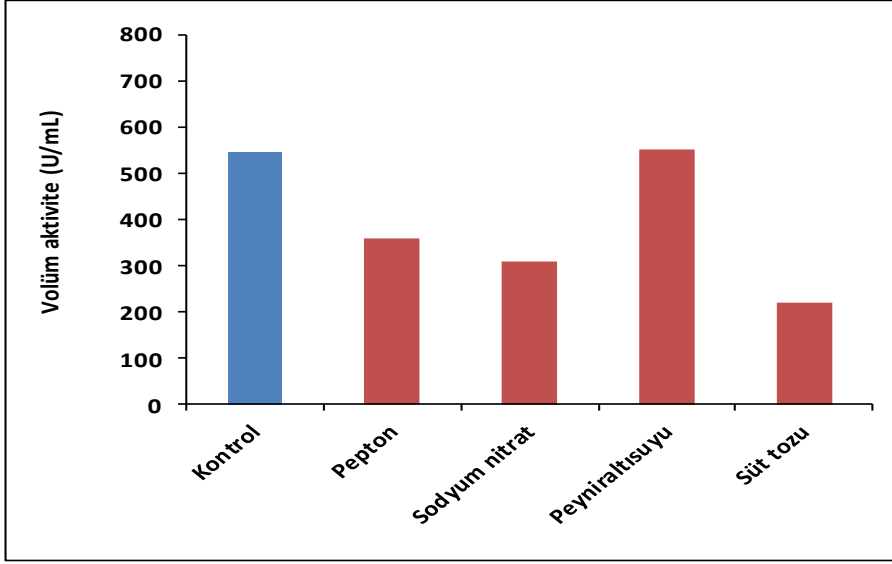


Şekil 4.18. Enzim üretimi üzerine en iyi karbon kaynağı (kepek) oranının etkisi.

Elde edilen sonuçlara göre en iyi enzim üretimi %1.5'lük kepek miktarında görüldü. %1.5 ve %2'lik karbon kaynağı oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmasına rağmen, enzim aktivitesi %1.5'lük kepek oranında daha yüksek ölçüldü. %2.5 ve 3 arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$). %1'lik kepek oranında ise denenen diğer oranlar ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Bundan sonraki optimizasyon denemelerinde %1.5'lük kepek miktarı kullanıldı.

4.7.6. Enzim Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisini incelemek için daha önce saptanan optimum koşullardaki amilaz kültür ortamına ticari olarak satın alınan ve analitik saflıktaki azot kaynakları %1 oranında ilave edildi. Pepton, sodyum nitrat analitik saflıkta, peynir altı suyu, süt tozu (VİP) ticari olarak satın alındı ve kontrol grubu olarak da azot içermeyen kültür ortamı kullanıldı. HBF125 suşu optimum koşullarda 35 °C de, 100 rpm/dk'da 4 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca kültürün enzim aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütlesi ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.19 ve Çizelge 4.12'de verildi.



Şekil 4.19. Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi.

Süt tozu, pepton ve sodyum nitrat kontrol değerine göre enzim üretimini arttırmadığı ve bulunan değerlerin kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemli olduğu ($p < 0.05$) bulundu. Peynir altı suyunun ise enzim üretimini etkilemediği ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistikî olarak önemsiz ($p > 0.05$) olduğu saptandı.

Organik veya inorganik azot kaynağı içermeyen kontrol grubunda enzim aktivitesi en yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni olarak üretim ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan buğday kepeği gösterilebilir. Buğdayın kabuk kısmından kepek (bran) elde edilir. Tahıl danesinin yaklaşık %14.5'ini kepek oluşturur, tam buğday ununun kepeğinde; %86 niasin, %50 pantotenik asit, %42 riboflavin, %33 tiamin, %19 protein bulunur. Bir de yoğun olarak selüloz bulunur (<http://www.usf.org.tr/>). Azot içermeyen ortamda enzim aktivitesinin yüksek olmasının nedeni karbon kaynağı olarak kullanılan kepeğin büyük oranda protein içermesi olduğu düşünülmektedir. Bu sebepten dolayı kontrol olarak kullanılan kepekli ortam denenen azot kaynaklarından daha iyi şekilde fungusun enzim üretimini desteklemiştir. Azot kaynağı olarak denenen kaynaklardan seçim yapılmamıştır. Bundan sonraki aşamalarda karbon ve azot kaynağı olarak kepek kullanılmasına karar verilmiştir.

Bacillus cereus MTCC 1305 α -amilazı üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının (kazein, amonyum klorür, yeast ekstrakt, sodyum nitrat) etkisine bakılmış ve azot

kaynağı içermeyen kontrol grubunda (karbon kaynağı olarak kepek kullanılmış) enzim üretiminin daha iyi olduğu bulunmuş ve üretim ortamına azot kaynağı ilave edilmediği belirtilmiştir (Singh vd., 2010). Bu sonuç çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Yüksek veya düşük azot kaynağının enzim üretiminin inhiye olmasına neden olduğu gibi mikrobiyal büyüme için zararlı olduğu da belirtilmiştir (Mishra vd., 2014).

Çizelge 4.12. Enzim üretimi üzerine azot kaynağı oranının etkisi

Azot Kaynağı (%1)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
Kontrol (Azotsuz)	544.35 ± 11.04	a	0.91	1032.50	0.090	6.43	3
Pepton	359.09 ± 9.58	b	0.99	1234.17	0.114	7.97	2
Sodyum nitrat	308.40 ± 30.40	b	0.66	1117.50	0.115	7.52	2
Peynir altı suyu	550.57 ± 4.48	a	0.58	974.17	0.114	6.33	3
Süt tozu	219.28 ± 16.20	b	0.83	2700.83	0.109	5.72	4

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.7.7. A. fumigatus HBF125'in Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

A. fumigatus HBF125'in büyüme eğrisini saptamak için optimum koşulları (35 °C, pH 5.0, 7 günlük inokulum yaşı, %5 inokulum miktarı, %1.5 kepek) belirlenen amilaz üretim ortamında maksimum enzim üretim günü belirlendi ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere enzim üretimi yapıldı. İnkübasyon boyunca kültürün enzim aktivitesi, proteaz aktivitesi, redüktör şeker miktarı ve protein miktarı belirlendi. İnkübasyon sonunda son pH ve biyokütlesi ölçüldü. Elde edilen değerler Şekil 4.20 ve Çizelge 4.13'de verildi. Süzülen enzim uygun kaplara alınarak, kullanılıncaya kadar -20 °C de saklandı.

Maksimum enzim üretimi temel kültür ortamında 5. gün olarak saptanırken, optimum koşullarda ise maksimum enzim üretimi 2. gün olarak saptanmıştır. Maksimum enzim üretimi durağan fazın ortalarında hücre lizisi başlamadan önce tespit edilmiş, 3, 4, 5 ve 6. günde enzim üretimi azalmıştır.

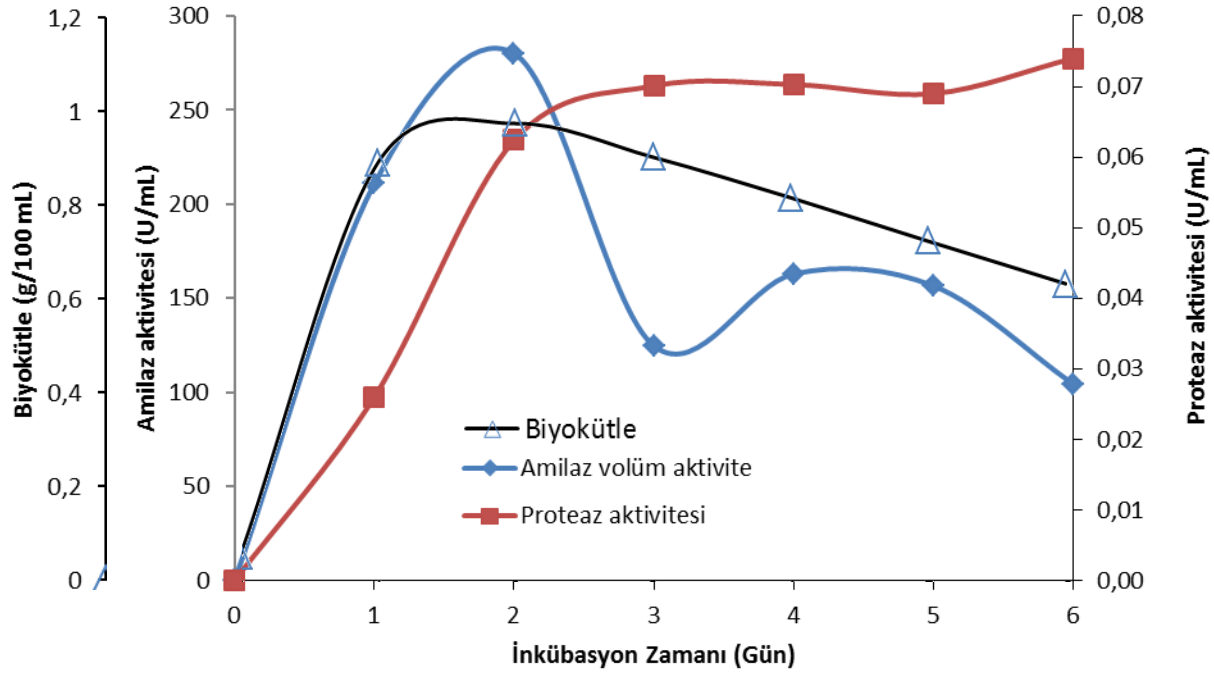
Kültür ortamının günlük proteaz aktivitesi ölçülmüş 1. gün aktivite düşük iken, 2. gün artmış ve inkübasyonun 3, 4, 5 ve 6. gününde sabitlenmiştir. Kültür ortamında proteaz üretimini engellemek için kültür ortamına proteaz inhibitörü olan PMSF (fenil metil sülfonil florür) 10 mM oranında ilave edildi. Fakat kültür ortamında fungus gelişimi tamamen durdu. Fungusun büyüme ve metabolit üretimi için ortamdaki azot kaynağını kullanması gerekmektedir. Ortamda inhibitör kullanılınca enzim üretimi durmuş, dolayısıyla büyüme ve gelişme de olmamıştır.

İnkübasyon periyodu enzim üretimlerinde çeşitlilik gösterir. Kısa inkübasyon periyotları ekonomik olarak daha ucuz enzim üretimleri için potansiyel oluşturur. Optimum koşullarda enzim üretiminin 2 günlük kısa bir periyotta olması enzim üretimimiz için önem teşkil etmektedir. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında enzim üretiminin daha kısa bir sürede yapılması önemli bir özelliktir.

Penicillium fellutanum α -amilazının inkübasyon zamanı 4.gün olarak bulunmuştur (Kathiresan ve Manivannan, 2006). *Penicillium rugulosum* amilazı ile yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin 3. günde olduğu bulunmuştur (Tiwari vd., 2007).

Fungal izolat 6 ve 8 amilazları ile yapılan çalışmada ise maksimum amilaz üretimi inkübasyon periyodunun 10. ve 4. gününde bulunmuştur (Tripathy vd., 2011).

Aspergillus fumigatus NTCC 1222 amilazının en yüksek üretiminin kültür koşulları optimize edildikten sonra (35 °C, pH 6.0, karbon kaynağı olarak buğday kepeği ve azot kaynağı olarak beef ekstrakt) inkübasyonun 6. gününde olduğu bulunmuştur (Singh vd., 2013).



Şekil 4. 20. *A. fumigatus* HBF125'in zaman bağılı büyüme eğrisi ve enzim üretimi.

Çizelge 4.13. *Aspergillus fumigatus* HBF125'in büyüme eğrisi

İnkübasyon Süresi (Gün)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Proteaz Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	x	Redüktör Şeker (µmol/mL)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Final pH
1	210.89 ± 24.39	a	0.10 ± 0.01	a	0.90 ± 0.03	ab	2126.67	0.03	4.81
2	271.28 ± 9.51	b	0.93 ± 0.01	b	0.99 ± 0.03	b	746.67	0.04	4.91
3	124.67 ± 3.83	c	1.19 ± 0.03	c	0.91 ± 0.04	abc	687.50	0.07	5.88
4	162.89 ± 4.50	c	1.18 ± 0.01	c	0.81 ± 0.03	acd	333.06	0.03	5.99
5	156.56 ± 0.61	c	1.28 ± 0.01	c	0.72 ± 0.01	de	450.00	0.07	6.07
6	159.94 ± 2.22	c	1.19 ± 0.07	c	0.62 ± 0.02	e	455.83	0.06	6.06

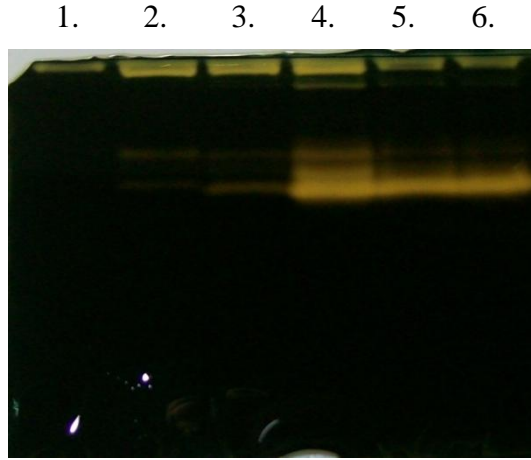
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.7.7.1. Kùltür ortamına salınan enzim üretiminin elektroforetik olarak izlenmesi

A. fumigatus HBF125 tarafından üretilen ve kùltür ortamında kepeğin hidrolizinden sorumlu amilazı görüntülemek için PAGE kullanılarak zimografi yapıldı. Günlük süzölen kùltürler %85'lik amonyum sülfat ile çöktürölmüş, diyaliz işlemleri yapılmış ve PAGE jeline uygulanmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.21'de verildi.



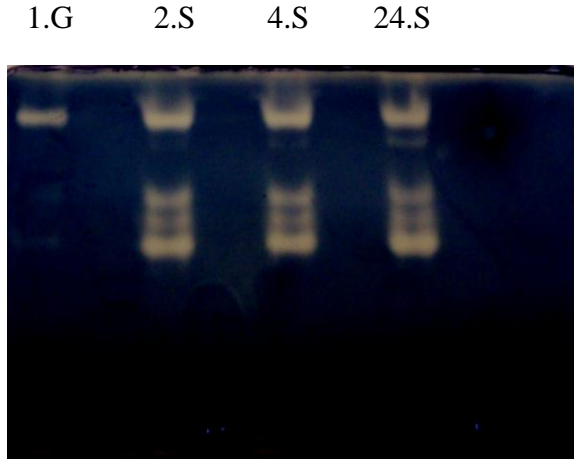
Şekil 4.21. Kùltür ortamında günlük enzim üretiminin görüntölenmesi.

Kùltür ortamında üretilen enzimin günlük zimografi görüntölenmesi yapıldığında 1.gün tek bir enzim olduğu, 2. ve 3. gün üç enzim, 4, 5 ve 6. günde ise 5 enzim ürettiği gözlemlendi.

4.7.7.2. Amilazın proteolitik hidrolizinin saptanması

A. fumigatus HBF125 amilazın fermentasyonun hangi gününden itibaren üretilmeye başlandığını, enzimin tek bir gen ürünü mü yoksa ortamdaki proteolitik enzimler tarafından alt birimlere ayrılıp ayrılmadığını saptamak için birinci ve üçüncü gün kùltür ortamları süzöldükten sonra %85'lik amonyum sülfat ile çöktürme işlemleri yapıldı. Uygun hacimde çözüldükten sonra diyaliz işlemleri yapıldı. Proteaz aktivitesi yüksek olan üç günlük kùltür ortamı nişasta afinite kolon kromatografisi metodu ile kısmi olarak saflaştırıldı. Birinci gün kùltür ortamı ile kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimi, 35 °C'de 1:1 oranında karıştırılarak 2, 4

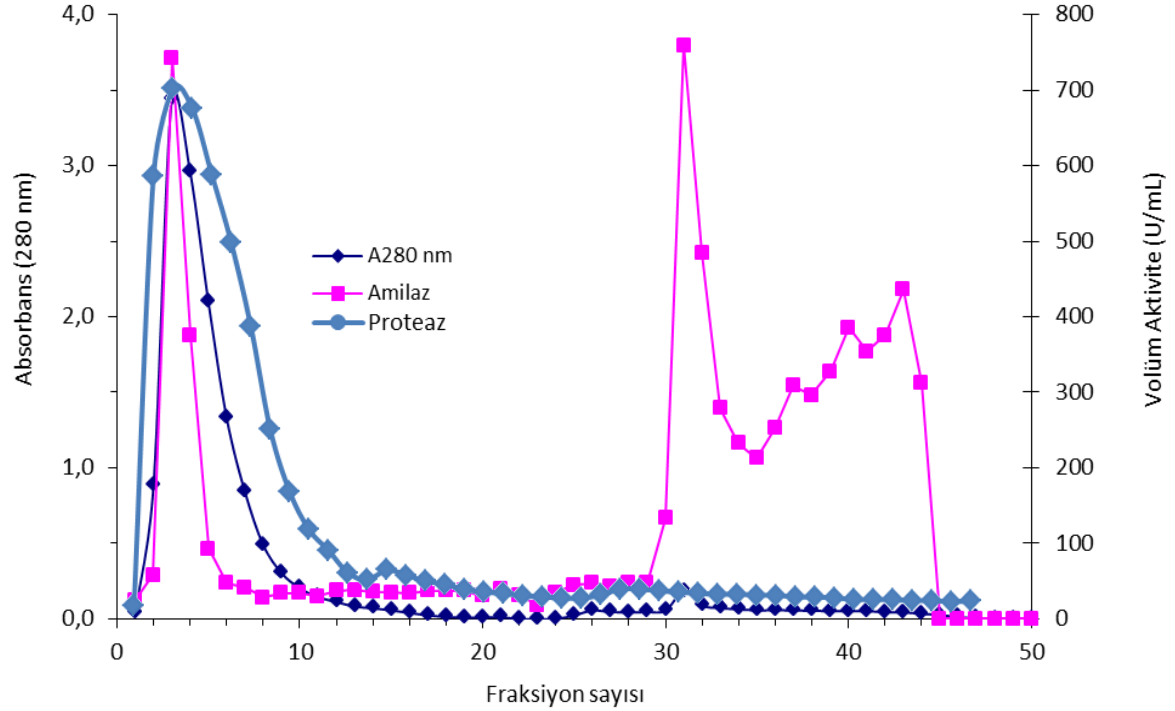
ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler PAGE jele uygulanarak zimografi yapıldı (Şekil 4.22). Saflaştırma grafiği Şekil 4.23'de verildi.



Şekil 4.22. Amilazın proteolitik hidrolizi (G: gün, S:saat).

Kültür ortamında 1. gün tek enzim üretildiği, inkübasyonun 4, 5 ve 6. gününde ise 5 enzim üretildiği belirlenmişti. Kültür ortamında proteaz üretimi yapıldığı kantitatif olarak belirlenmişti. Enzimin proteaz tarafından parçalanıp parçalanmadığını görmek için 1. gün enzimi kısmi olarak saflaştırılan üçüncü gün proteazı ile muamele edildi. İnkübasyondan 2 saat sonra alınan örnek jele uygulandığında 4 enzim bandı, 4 ve 24 saatlik örneklerde ise 5 enzim bandı saptandı. Bu sonuç bize kültür ortamında üretilen enzimin proteaz tarafından parçalandığını ve alt ünitelere ayrıldığını göstermektedir.

Aspergillus oryzae S2'nin kültür ortamında AmyA ve AmyB olmak üzere iki α -amilaz ürettiği, ortama proteaz inhibitörü konduğunda sadece AmyA'nın üretildiği, proteaz inhibitörü konmadığında proteolizis sonucunda AmyB'nin AmyA'dan oluştuğu bildirilmiştir (Sahnoun vd., 2012). Bu çalışma bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonucu desteklemektedir.



Şekil 4. 23. *A. fumigatus* HBF125 proteazının nişasta affinite kolon kromatografisi ile saflaştırılması.

4.8. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

Amilazın farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı Çizelge 4.14’de gösterilmiştir. α -Amilazın en iyi adsorbe olduğu nişasta kaynağı, mısır nişastası olarak bulunmuştur. α -Amilazın başlangıç aktivitesi ile farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyonu sonrasında kalan aktivite arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Mısır nişastası, pirinç nişastası ve buğday nişastasında adsorpsiyon oranı sırasıyla %83, 79 ve 76 olarak hesaplanmıştır.

Amilazların saflaştırılmasında nişasta kaynaklarının kullanıldığı yeni kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Amilazlar nişasta, nişasta selit, nişasta sefaroza kolonuna bağlanır ve bu kolonlardan dekstrin, maltoz kullanılarak kolondan ayrılır (Naidu ve Saranraj, 2013). Najafi ve Kembhavi (2005) mısır nişastasını kullanarak nişasta affinite metodu ile *Vibrio* sp. amilazını tek basamakta saflaştırmışlardır.

Koç ve Metin (2010) adsorban olarak mısır nişastasını kullanmış ve nişasta affinite metodu ile *Aspergillus flavus* HBF34 glukoamilazını tek basamakta saflaştırmışlardır.

Çizelge 4.14. *A. fumigatus* HBF125 α -amilazının farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı

Nişasta	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	x	Adsorpsiyon %
Kontrol	12006.55 \pm 271.26	a	100
Mısır nişastası	2067.00 \pm 143.92	b	83
Buğday nişastası	2489.93 \pm 128.43	b	79
Pirinç nişastası	2871.32 \pm 25.09	b	76

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

4.9. Amilazın Saflaştırılması

4.9.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Kültür ortamı süzöldükten sonra elde edilen ham ekstrakt amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanıldı. Ham ekstrakt için ayrı ayrı %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıklarında amonyum sülfat eklenerek çöktürme işlemleri yapıldı. Bütün fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı ve saflaştırma katsayıları ile yüzde verimleri hesaplandı (Çizelge 4.15.).

Elde edilen sonuçlara göre amonyum sülfat çöktürme basamaklarında enzim veriminde büyük oranda kayıp olduğu için bundan sonra yapılacak olan saflaştırma işlemlerinde amonyum sülfat çöktürme aşamasının uygulanmamasına karar verildi. Saflaştırma aşamasından önce enzimin kısmi olarak saflaştırılması ve konsantrasyonu için ultrafiltrasyon işlemi yapılmasına karar verildi.

Çizelge 4.15. Amonyum sülfat çöktürme basamakları

Saflaştırma basamakları	Fraksiyon hacmi (mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Aktivite (U)	Protein (mg/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaş. Kat.	Verim (%)
Ham enzim	330	202.58 ± 14.30	66852.5 ± 4719.4	0.01 ± 0.001	3.69 ± 0.28	18132.60 ± 516.63	1	100
%0-20	3	114.25 ± 0.58	342.8 ± 1.7	0.06 ± 0.004	0.18 ± 0.01	1941.77 ± 108.83	0.107	0.51
%20-40	5	159.08 ± 1.17	795.4 ± 5.8	0.10 ± 0.002	0.49 ± 0.01	1636.77 ± 19.06	0.090	1.19
%40-60	7	450.58 ± 3.09	3154.1 ± 2.6	0.26 ± 0.001	1.84 ± 0.004	1713.90 ± 11.09	0.095	4.72
%60-80	9	193.08 ± 2.46	1737.8 ± 22.1	0.25 ± 0.002	2.28 ± 0.02	763.42 ± 5.14	0.042	2.60
%80-100	10	83.58 ± 3.09	835.8 ± 30.9	0.11 ± 0.003	1.08 ± 0.03	775.24 ± 29.07	0.043	1.25

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

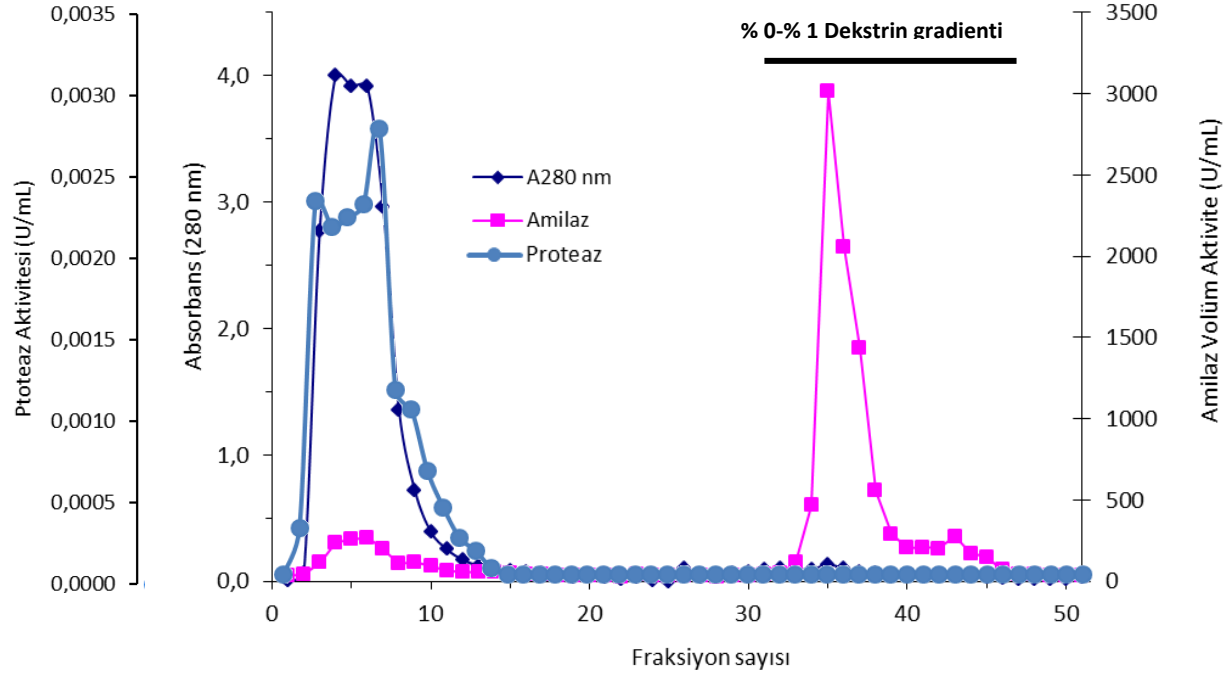
S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.9.2. Nişasta Affinite Kolon Kromatografisi

Amonyum sülfat çöktürme işleminde enzim veriminde büyük bir kayıp olmasından dolayı, kültür ortamını konsantre edebilmek için ultrafiltrasyon yapıldı. Ultrafiltrasyonda enzimin yaklaşık olarak %23.5'lik kısmı geri kazanıldı. Bu nedenle bundan sonraki saflaştırma işlemlerinin ilk basamağında ultrafiltrasyon işlemi yapılmasına karar verildi. Daha önce yapılan nişasta adsorbsiyonunun deneyinde enzimin en iyi adsorbe olduğu nişasta mısır nişastası olduğu için nişasta affinite kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak mısır nişastası kullanılmıştır. Ultrafiltrat mısır nişasta affinite kolonuna uygulandığında, kolondan büyük miktarda protein çıkışı oldu, ancak bu çıkan fraksiyonlarda enzim aktivitesi saptanmadı. İstenmeyen proteinler kolondan uzaklaştıktan sonra, enzimin kolondan ayrılabilmesi için oda sıcaklığında %1'lik dekstrinle linear gradient yapıldığında, kolondan tekrar protein çıkışı gözlemlendi (Şekil 4.24). Çıkan bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi ölçüldüğünde belirli fraksiyonlarda (34-38. fraksiyonlar) enzim aktivitesinin oldukça yüksek olduğu görüldü. Bu fraksiyonlar birleştirilerek dekstrinin uzaklaştırılması için diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Elde edilen veriler saflaştırma tablosuna konulduğunda enzim %4'lük verimle 54.4 katlık bir saflaştırma ile elde edildi (Çizelge 4.16). Kromatografi boyunca çıkan bütün fraksiyonlarda proteaz aktivitesi bakıldı. Enzim kolona uygulandığında çıkan ilk fraksiyonlarda proteaz aktivitesinin yüksek olduğu, dekstrin gradiyentinin uygulandığı kısımda ise aktivitenin azaldığı görüldü.

Nişasta afinite metodunu ilk kez uygulayan Najafi ve Kembhavi *Vibrio* sp. amilazını 163.5 kat, %78 verim ile saflaştırmışlardır (Najafi ve Kembhavi, 2005). *Bacillus licheniformis* α -amilazının saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, nişasta afinite metodu kullanılmış ve saflaştırma sonunda %51 verimle 230 kat saflaştırmışlardır (Mendu vd., 2005). *Bacillus subtilis* tarafından üretilen α -amilazının amonyum sülfat fraksiyonlaması yapılmış ve %90 tuz konsantrasyonunda 0.144 U/mg spesifik aktivite ile 33 kat kısmi olarak saflaştırılmıştır (Sani vd., 2014). *Thermus* sp. α -amilazı ile yapılan bir çalışmada enzim; amonyum sülfat çöktürmesi, FPLC-hidrofobik etkileşim kromatografisi ve mısır nişastası afinite adsorbsiyonundan oluşan saflaştırma adımlarıyla 399 kat, %2.6'lük verimle saflaştırılmıştır (Shaw vd., 1995).



Şekil 4. 24. *A. fumigatus* HBF125 α -amilazın nişasta affinite kolon kromatografisi ile saflaştırılması.

Çizelge 4.16. *A. fumigatus* HBF125 α -amilazının saflaştırma adımları

Saflaştırma basamakları	Fraksiyon hacmi (mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	Total Aktivite (U)	Protein (mg/mL) (ORT. \pm S.H.)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham enzim	700	255.6 \pm 1.7	178908 \pm 1167	0.045 \pm 0.003	31.66 \pm 1.91	5689.3 \pm 322.94	1	100
Ultrafiltrat	28	1502.9 \pm 77.8	42082 \pm 2179	0.436 \pm 0.008	12.20 \pm 0.23	3444.8 \pm 118.61	0.6	23.5
Nişasta affinite	3.7	1920.8 \pm 115.7	7107 \pm 428	0.006 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	307185.3 \pm 18502.82	54.4	4.0

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.9.3. Elektroferez ve Zimografi

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlar toplanarak enzimin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının saptanması için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile zimografi yapıldı. PAGE ve SDS-PAGE ile elde edilen jel ikiye bölünmüş ve bir yarısı protein boyaması diğer yarısı da zimogram için kullanılmıştır (Şekil 4.25 ve 4.26). Zimogramda görülen bantların karşılığı olan protein bantları belirlenmiş ve Rf değerleri hesaplanmıştır. Protein standartlarının Rf değerleri ile molekül ağırlıklarının logaritması alınarak standart grafiği çizilmiştir (Şekil 4.27). Bu grafiğin denklemi $y = -0.9058x + 5.3517$, tamamlayıcılık katsayısı $R^2 = 0.97$ bulunmuştur. Bu denklemden yararlanarak proteolizis sonucunda iki alt ünitesi olduğu saptanan amilazın yaklaşık molekül ağırlığının 160 kDa, iki alt ünitesinin (A1 ve A2) molekül ağırlıklarının ise yaklaşık olarak 86.2 ve 73.8 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE protein boyamasında A2 alt ünitesinin protein oranı az olduğu için görüntüleme yapılamamıştır.

α -Amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasındadır. En düşük değer *Bacillus caldolyticus* için 10 kDa, en yüksek değer *Chloroflexus aurantiacus* için 210 kDa olarak bildirilmiştir (Gupta vd., 2003; Ratanakhanokchai vd., 1992).

Glikolizasyon; bir proteinin sekresyonu, stabilitesi ve üç boyutlu yapısı gibi fonksiyonlarını etkileyen önemli bir post-translasyon modifikasyondur (Barros vd., 2009). Oligosakkaritler genellikle (N- glikozilasyonu ile bağlı) asparajin yan zincirlerine veya serin ve threonin hidroksil yan zincirlerine (O- glikolizasyonu ile bağlı) bağlanır (Shental-Bechor ve Levy, 2009). Glikoproteinler, *A. oryzae* (Eriksen vd., 1998), *B. stearothermophilus* (Egekzeer vd., 1995) ve *B. subtilis* (Yamane vd., 1973) soylarında tespit edilmiştir. Genellikle α -amilazlarda bu oran %10 civarındadır (Vihinen ve Matsala, 1989). Bu karbohidrat kalıntılarının bazı α -amilazların yüksek molekül ağırlıklarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (El-Fallal vd., 2012). *S. castelii* α -amilazında bu oranın %56 olduğu bildirilmiştir (Sills vd., 1984). *T. vulgaris* 140 kDa ağırlığındaki amilazın molekül ağırlığının karbohidrat kalıntısına bağlı olduğu bildirilmiştir (Omar vd., 2011).

SDS- PAGE kullanılarak glikoproteinler Alsiyan mavisi gibi katyonik boyalar ile boyanarak veya periyodik asit ile karbohidratların oksidasyonu sağlanarak belirlenebilir (Wardi ve Michos, 1972). *Aspergillus fumigatus* HBF125 tarafından üretilen α -amilazın yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu hesaplanmış fakat karbohidrat kalıntısı içerip içermediğinin tespiti yapılmamıştır. Daha sonra yapılacak çalışma ile karbohidrat kalıntısı içerip içermediğinin tespit edilmesi düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda amilazların molekül ağırlıklarının yüksek olduğu bulunmuştur. *Alicyclobacillus acidocaldarius* 140 kDa (Matzke vd., 1997), *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T 135 kDa (Aquilari vd., 2005), *Bacillus brevis* MTCC 7521 205 kDa (Ray vd., 2008), *Chloroflexus aurantiacus* 210 kDa (Ratanakhanokchai vd., 1992) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

A. niger'in mutant soyunun ürettiği α -amilazın molekül ağırlığı 125 kDa olarak hesaplanmış ve enzimin yaklaşık olarak %25'inin karbohidrat kalıntısı olduğu tespit edilmiştir (Dubey vd., 2000).

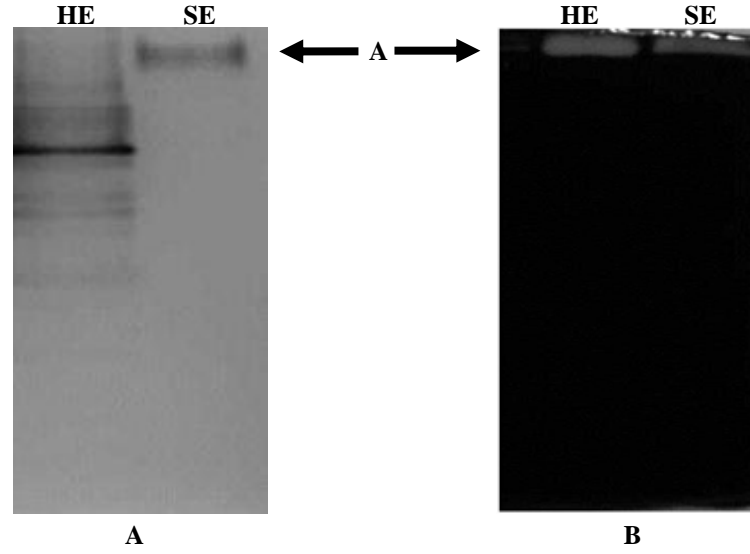
Proteolizis molekül ağırlığını azaltabilir. *T. vulgaris* 9A-2A (Amy TV1)'in tek bir protein olduğu ve molekül ağırlığının 53 kDa olduğu belirtilmiştir. Amy TV1'in proteolizis sonucunda iki küçük peptide ayrıldığı ve molekül ağırlıklarının 33 ve 18 kDa olduğu belirlenmiştir (Hofemeister vd., 1994). Bu çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir.

Nişasta afinite kromatografisi kullanılarak *Penicillium citrinum* HBF62 amilazı saflaştırılmış ve saflaştırılan amilazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığının yaklaşık olarak 65 kDa olduğu bulunmuştur (Metin vd., 2010).

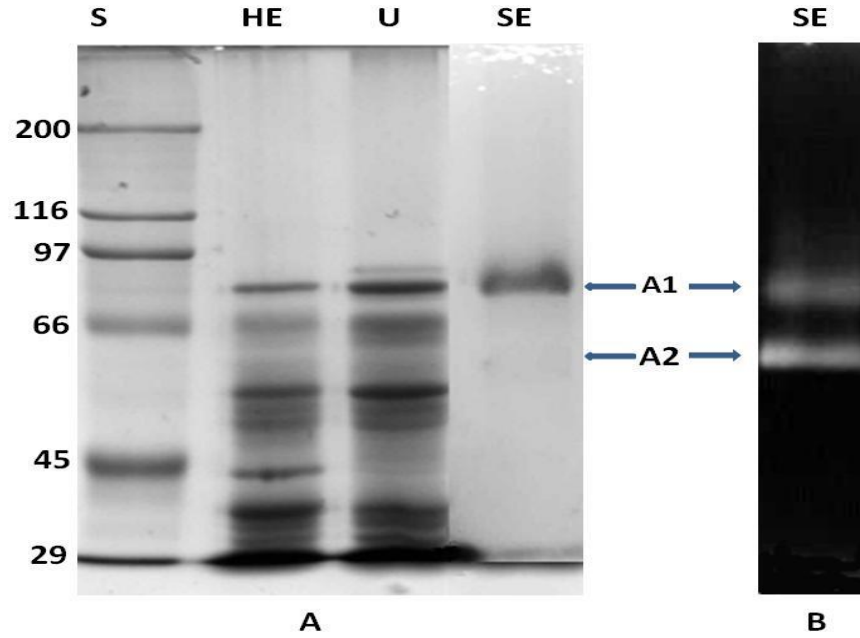
Bacillus licheniformis α -amilazının saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, nişasta afinite metodu kullanılmış ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 58 kDa olarak bulunmuştur (Mendu vd., 2005).

Abou-Zeid (1997) *Aspergillus flavus*'tan molekül ağırlığı 75 kDa α -amilazı saflaştırmıştır. *Streptomyces* sp. No.4 fungusundan iki amilaz enzimi saflaştırılmış ve molekül ağırlıkları sırasıyla 56 ve 77 kDa olarak bulunmuştur (Primarini ve Ohta, 2000).

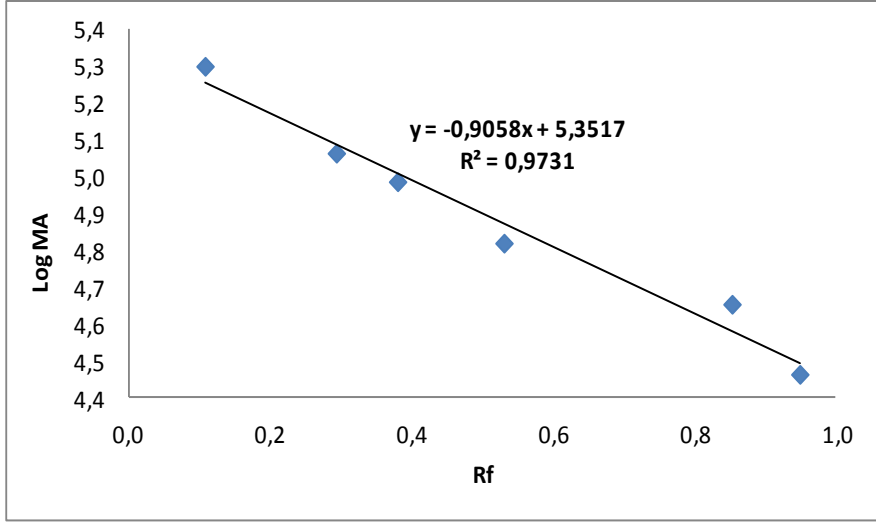
Termofilik bakteri *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazı ile yapılan çalışmada, amonyum sülfat çöktürmesi, Sefadexs jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile 8.138 kat, %58 verimle saflaştırılmış ve moleköl ağırlığı 94.5 kDa olarak hesaplanmıştır (Satheesh Kumar vd., 2010).



Şekil 4.25. Saflaştırma adımlarının PAGE (A) ve zimogram (B) görüntüleri (**HE**: Ham enzim, **SE**: Saf enzim, **A**: α -Amilaz)



Şekil 4.26. Safılaştırma adımlarının SDS- PAGE (A) ve zimogram (B) görüntüleri. (S: Standart, 200 kDa miyozin, 116 kDa β -galaktozidaz, 97 kDa fosforilaz B, 66 kDa sığır albumini, 45 kDa yumurta albumini, 29 kDa karbonik anhidraz, HE: Ham enzim, U: Ultrafiltrat, SE: Saf enzim, A1: α -Amilaz 1, A2: α -Amilaz2).



Şekil 4.27. SDS-PAGE protein standart eğrisi

4.10. *Aspergillus fumigatus* HBF125 Amilazının Karakterizasyonu

4.10.1. Amilaz Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivite ölçümlerinde, reaksiyon karışımında enzim ve substratın uygun konsantrasyonlarda bulunmasının yanı sıra diğer önemli faktör de inkübasyon zamanıdır. Reaksiyon karışımı *in vitro* ortamda gerçekleşmesinden dolayı başlangıçta reaksiyon için uygun olan ortam şartlarının zamana bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Ayrıca aktivite ölçümü enzimin birinci dereceden kinetik gösterdiği zamanda ölçülmelidir. Bu nedenlerden dolayı, ideal inkübasyon süresinin saptanması düşünülmüştür. Enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübe edildiklerinde redüktör şeker miktarı zamana bağlı olarak artmakta ise de ilk 20 dakikalık artış doğrusaldır (Şekil 4.28 ve Çizelge 4.17). 20, 25 ve 30 dk arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamasına rağmen 20 dakikaya kadar artış doğrusal olduğu için inkübasyon süresi olarak kullanılmasına karar verildi. Kültür koşullarının etkisine bakılırken herhangi bir deney planı belirtilmeden inkübasyon süresi 30 dk olarak kullanılmıştı. Fakat karakterizasyon işlemlerine geçmeden önce inkübasyon süresinin etkisi ham enzim kullanılarak belirlenmiştir. Bu nedenle bundan sonraki standart enzim aktivite deneyleri 20 dakikalık inkübasyonlar ile yapılmıştır.

Bir çok çalışmada da deney planı belirtilmeden inkübasyon süresi olarak 30 dk kullanılmıştır (Bignell vd., 2000; Marlida vd., 2000; Primarini ve Ohta, 2000; Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001; Frolova vd., 2002).

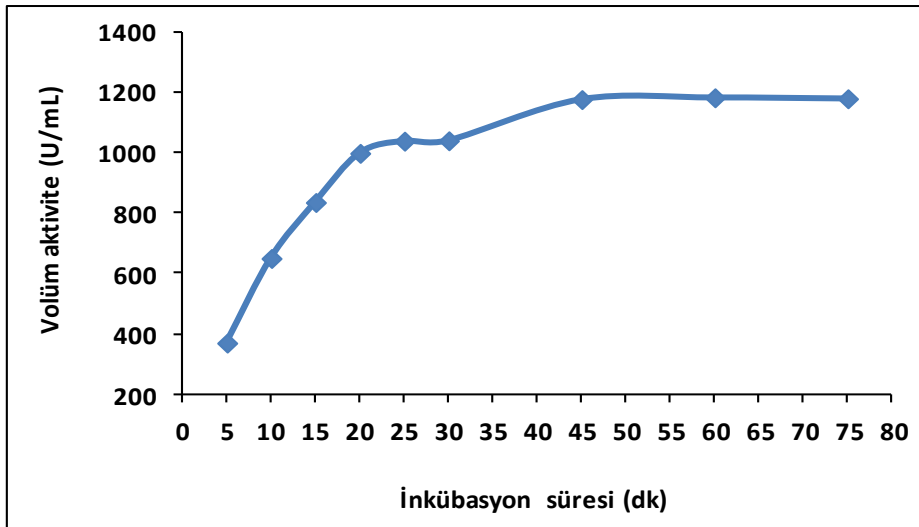
Çizelge 4.17. *A. fumigatus* HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon zamanı (dk)	Redüktör Şeker ($\mu\text{mol/mL}$) (ORT. \pm S.H.)	x	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x
5	5547.5 \pm 36.1	a	369.83 \pm 2.40	a
10	9757.5 \pm 60.0	b	650.50 \pm 4.00	b
15	12542.5 \pm 117.6	c	836.17 \pm 7.84	c
20	14987.5 \pm 355.1	d	999.17 \pm 23.67	d
25	15592.5 \pm 181.5	d	1039.50 \pm 12.10	d
30	15612.5 \pm 725.0	d	1040.83 \pm 48.33	d
45	17662.5 \pm 295.1	e	1177.50 \pm 19.67	e
60	17752.5 \pm 294.8	e	1183.50 \pm 19.66	e
75	17702.5 \pm 706.3	e	1180.17 \pm 47.09	e

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

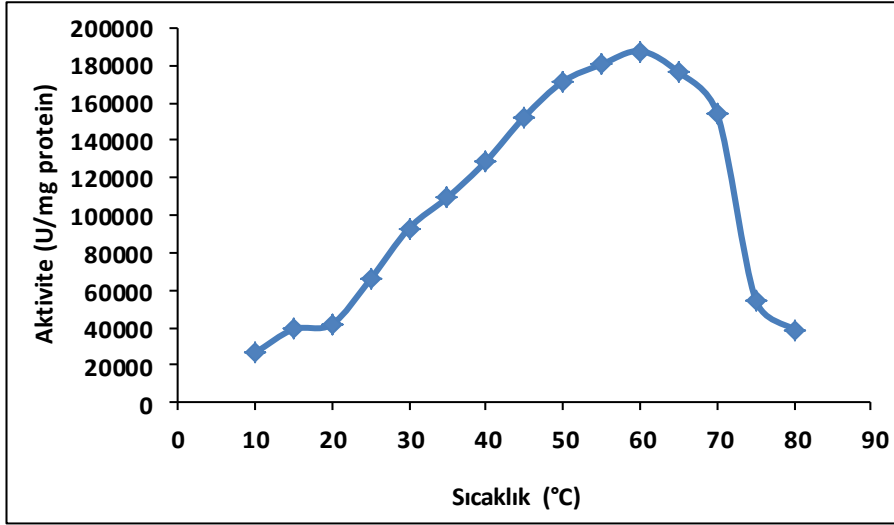


Şekil 4.28. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi.

4.10.2. Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

α -Amilaz aktivitesi (U/mg protein) üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 10 ile 80 °C arasında 5 °C'lik aralıklarla aktivite ölçümleri yapılmış olup, sonuçlar Şekil 4.29 ve Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi 10 °C'de en düşük değerde olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivite doğrusal bir şekilde artarak 60 °C'de maksimum seviyeye (187701 ± 5650 U/mg protein) ulaşmıştır. 65 °C'den sonra ise hızla düşmektedir. 60 °C ile 55 °C arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz, diğer sıcaklıklar ile önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer sıcaklıklardaki aktivite değişimi maksimum aktiviteye göre yüzde olarak hesaplandı. Her ne kadar maksimum aktivite 60 °C'de saptanmış ise de, 45, 50, 55, 65 ve 70 °C'lerde maksimum aktivitenin sırasıyla %81, 91, 96, 94 ve 82'si olduğu görülmüştür. Bu sonuç elde edilen enzimin geniş bir sıcaklık aralığında kullanılabileceğini göstermekte olup, biyoteknolojik uygulamalar için önemli bir sonuçtur.

Aspergillus niger AM07'den elde edilen α -amilazı maksimum aktivitesini 60 °C'de göstermiştir (Omemu vd., 2005). Bu sonuç çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. *Aspergillus flavus*'dan (Khoon vd., 1994) elde edilen α -amilaz maksimum aktivitesini 55 °C'de, *Aspergillus tamarii*'den (Moreira vd., 2004) elde edilen α -amilazların maksimum aktivitesini 50-55 °C, Maya *Cryptococcus flavus*'dan (Wanderley vd., 2004) elde edilen α -amilazın maksimum aktivitesini 50 °C'de gösterdiği bildirilmiştir.



Şekil 4.29. *A. fumigatus* HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

Çizelge 4.18. *A. fumigatus* HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (° C)	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	x	% Aktivite
10	26411.3 \pm 1757.6	a	14
15	39045.7 \pm 881.4	b	21
20	41733.9 \pm 1066.8	b	22
25	65793.0 \pm 2910.8	c	35
30	92943.5 \pm 465.6	d	50
35	109475.8 \pm 1905.6	e	58
40	128830.6 \pm 3614.1	h	69
45	152621.0 \pm 2292.8	ı	81
50	171438.2 \pm 5515.7	i	91
55	180578.0 \pm 4014.3	ij	96
60	187701.6 \pm 5650.0	j	100
65	176411.3 \pm 7216.9	i	94
70	154368.3 \pm 3792.1	ı	82
75	54771.5 \pm 3038.3	k	29
80	38911.3 \pm 2832.2	b	21

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.10.3. Amilaz Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Amilaz stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.19, 4.20 ve Şekil 4.30, 4.31’de gösterildi. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla enzim, farklı sıcaklıklarda (25, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) inkübe edildi. Enzim çözeltisinden belli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edildi ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi yüzde olarak belirlendi.

Amilaz enzimi 25 °C’da yirmi dört saatte aktivitesinin %97’sini koruduğu ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Enzimin 40 °C’da bir saatte aktivitesini büyük ölçüde koruduğu (%97) ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Altıncı saatten itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 24 saatte dahi aktivitenin %76’sının korunduğu saptanmıştır.

Enzimin 50 °C’de ilk bir saatte aktivitesini büyük oranda koruduğu (%96) ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Enzim aktivitesinin daha sonraki saatlerde düştüğü ve bu düşüşün kontrol değerine göre istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Enzimin 60, 70 ve 80 °C’lerde on beş dakikada sırasıyla aktivitesinin %90, 95 ve 21’ni koruduğu, bir saat sonunda ise 60 ve 70 °C’de aktivitenin sırasıyla %57 ve 52’sinin korunduğu 80 °C de ise aktivitenin korunmadığı bulundu. 60 °C’de yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda ise aktivitesinin %34’ünü koruduğu ve kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p<0.05$).

Enzimin üç boyutlu yapısını oluşturan zayıf bağlar (hidrojen, iyonik ve moleküler bağlar) ve özellikle disülfit bağlarının azlığı veya çokluğu enzimin pH ve sıcaklık stabilizasyonu için önemli rol oynadığı bilinmektedir (Shenoy vd., 1985).

Ayrıca enzim stabilizasyonu, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için oldukça önemli bir özelliktir. Bu amaçla enzimin sıcaklık stabilitesi araştırıldığında, enzimin 25 °C’de yirmi dört saat sonunda aktivitesini koruduğu, 40 ve 50 °C’de ise %76 ve 59 oranında koruduğu saptanmıştır.

Aspergillus fumigatus HBF125 amilazının 25, 40 ve 50 °C'larda stabilitesini büyük oranda korumuş olması, 60 ve 70 °C'de ise bir saat sonunda aktivitesini % 50 oranında koruması bu sıcaklıklarda işlem yapan endüstriyel uygulamalar için uygun olabileceğini göstermektedir. Ancak 80 °C'nin üzerinde işlem yapan endüstriyel işlemler için çok uygun değildir.

α -Amilazlarla yapılan çalışmalarda ise, *A. flavus* α -amilazının 50 °C'da 1 saat stabil olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994). *A. carbonarius* amilazının 20 dk inkübasyondan sonra 30 °C ile 80 °C arasında aktivitesinin %85'ini, 90 °C'da ise %65'ini gösterdiği bulunmuştur (Okolo vd., 2000). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* α -amilazının 50 °C'da 1 saat stabil olduğu, enzimin yarı ömrünün 55 °C'da 25 dk ve 60 °C'da 12 dk olduğu, %1'lik nişasta varlığında 60 °C'da 1 saat tamamen stabil olduğu bulunmuştur (Aquino vd., 2003). *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis* amilolitik aktivitesinin sıcaklık stabilitesinin oldukça yüksek olduğu, 60 °C'da 120 dk sonra enzim aktivitesinin %50'sinin geri kazanıldığı, 65 °C'da stabil olmadığı fakat ortama %1'lik nişasta eklendiği zaman termal inaktivasyondan korunduğu bulunmuştur (Peixoto vd., 2003). *A. tamarii* α -amilazının 65 °C'da birkaç saat tamamen aktif olduğu, enzimin yarı ömrünün 70 °C'da 30 dakika olduğu ve 75 °C'da ise stabil olmadığı bulunmuştur. %1'lik nişasta ile inkübe edildiğinde enzimin yarı ömrünün 70 °C'da 70 dakika ve 75 °C'da 40 dakika olduğu bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Çizelge 4.19. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (25, 40 ve 50 °C) stabilitesi

İnkübasyon Zamanı (Saat)	25 °C			40 °C			50 °C		
	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
0	673.17 \pm 31.02	a	100	370.83 \pm 7.84	a	100	384.83 \pm 6.06	a	100
1	632.17 \pm 40.59	a	94	352.50 \pm 0.00	a	95	368.83 \pm 34.84	a	96
6	621.83 \pm 31.67	a	92	287.50 \pm 0.00	b	78	231.83 \pm 10.67	b	60
12	634.50 \pm 2.89	a	94	273.50 \pm 0.00	b	74	238.83 \pm 4.91	b	62
24	650.17 \pm 2.96	a	97	280.00 \pm 15.30	b	76	226.50 \pm 0.00	b	59

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

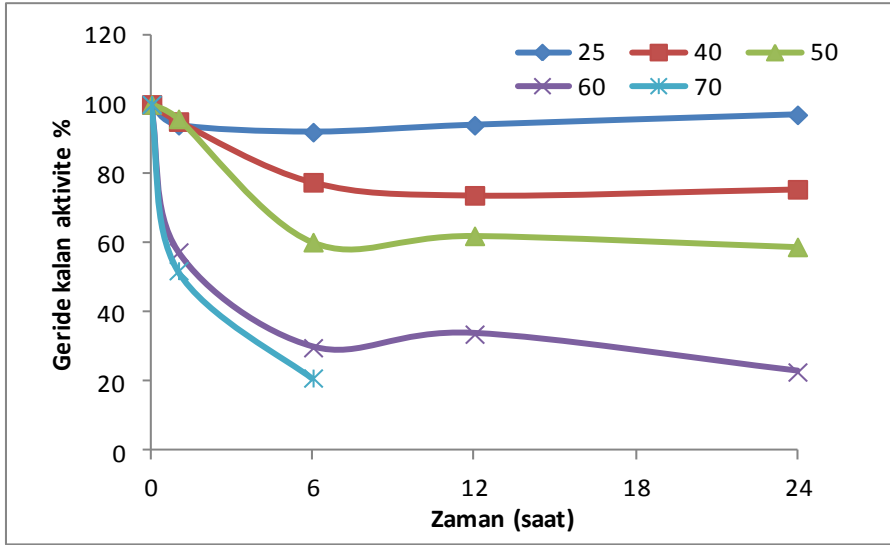
Çizelge 4.20. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (60, 70 ve 80 °C) stabilitesi

İnkübasyon Zamanı	60 °C			70 °C			80 °C		
	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
0	512.50 \pm 37.54	a	100	448.83 \pm 8.41	a	100	488.83 \pm 33.12	a	100
15 dk	460.83 \pm 19.46	a	90	427.50 \pm 20.21	a	95	101.83 \pm 8.88	b	21
30 dk	404.17 \pm 23.96	b	79	397.17 \pm 37.38	a	88	30.17 \pm 4.26	b	6
45 dk	294.83 \pm 14.24	b	58	244.17 \pm 21.99	b	54	28.83 \pm 0.67	b	6
60 dk	294.17 \pm 29.85	b	57	233.50 \pm 22.14	b	52	-		
90 dk	306.50 \pm 24.43	b	56	179.50 \pm 8.74	b	40	-		
2 saat	287.50 \pm 13.23	b	56	139.17 \pm 19.89	b	31	-		
3 saat	308.83 \pm 19.80	b	60	126.83 \pm 9.40	b	28	-		
4 saat	276.83 \pm 16.48	b	54	105.83 \pm 12.25	b	24	-		
5 saat	283.83 \pm 10.84	b	55	95.50 \pm 6.56	b	21	-		
6 saat	152.50 \pm 5.51	b	30	95.50 \pm 6.56	b	21	-		
12 saat	172.50 \pm 10.44	b	34	-			-		
24 saat	116.50 \pm 3.00	b	23	-			-		

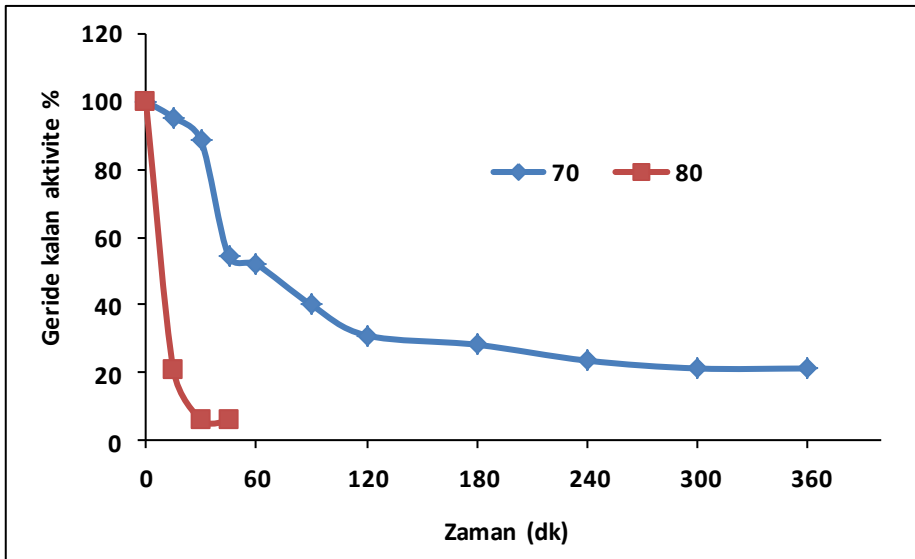
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.30. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (25, 40, 50, 60 ve 70 °C) stabilitesi.

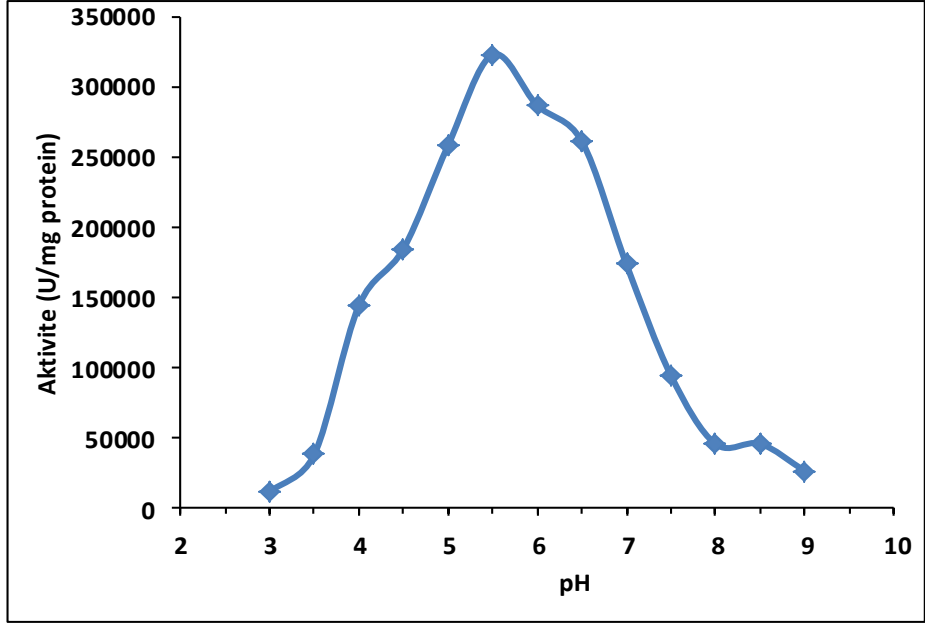


Şekil 4.31. α -Amilazın farklı sıcaklıklardaki (70 ve 80 °C) stabilitesi.

4.10.4. Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Amilaz aktivitesi (U/mg protein) üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.21 ve Şekil 4.32'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla, enzimin pH 3.0-9.0 arasında aktiviteleri ölçülmüştür. Enzim aktivitesi pH 3.0'de en düşük seviyede olup (11088.71 ± 898.03 U/mg protein), pH'daki 0.5'şer birimlik artışlarla beraber enzim aktivitesi de istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. Maksimum enzim aktivitesi pH 5.5'da (322620.97 ± 5685.91 U/mg protein) görülmüştür. Her ne kadar maksimum enzim aktivitesi pH 5.5 'te görülmüş ise de, pH 5.0, 6.0 ve 6.5'da aktivitenin sırasıyla %80, 89 ve 81'i görülmüş ve istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). pH 7.0'dan itibaren enzim aktivitesi önemli bir düşüş göstermiştir.

Sonuçlar enzimin, pH 4.0 ile 7.0 arası gibi geniş bir pH aralığında çalıştığını göstermektedir. Bununla birlikte enzimin asidik pH'larda daha aktif olduğu görülmektedir. α -Amilazlar geniş pH aralığında aktivite gösterirler ve optimum pH'ları 2.0 ile 12.0 arasında değişir (Wanderley vd., 2004). Nişastadan glukoz eldesi endüstride önemli bir yer tutmaktadır. Nişastanın sıvılaştırılmasında (liquefaction) α -amilaz, şekerleştirilmesinde (sakkarifikasyon) ise gluoamilaz kullanılmaktadır. Bu işlemler pH 4.2 ile 6.2 arasında yapılmaktadır (Crabb ve Shetty, 1999; Moreira vd., 1999). Enzimin geniş pH aralığında çalışması, bu gibi koşullarda çalışan endüstriyel işlemlerde kolaylıkla kullanılabileceğini de göstermektedir. Yapılan çalışmalarda da *A. tamarii*, (Moreira vd., 1999; Moreira vd., 2004), *A. flavus* (Khoo vd., 1994), *Mucor* sp. (Mohapatra vd., 1998), *Streptomyces* sp. No.4 (Primarini ve Ohta, 2000) fungal amilazların optimum pH'larının genellikle asidik pH'larda (pH 4.5-6.5) olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalar sonuçlarımızı desteklemektedir.



Şekil 4.32. *A. fumigatus* HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Çizelge 4.21. *A. fumigatus* HBF125 α -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	X	% Aktivite
3.0	11088.71 \pm 898.03	a	3
3.5	37701.61 \pm 1689.70	b ₁	12
4.0	143750.00 \pm 6318.69	c	45
4.5	184233.87 \pm 4964.10	d	57
5.0	257862.90 \pm 2174.43	e	80
5.5	322620.97 \pm 5685.91	f	100
6.0	286572.58 \pm 9231.67	g	89
6.5	261088.71 \pm 6985.94	e	81
7.0	173427.42 \pm 930.05	d	54
7.5	94072.58 \pm 2773.77	h	29
8.0	45282.26 \pm 898.03	i	14
8.5	45362.90 \pm 838.09	i	14
9.0	26088.71 \pm 1860.09	b	8

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.10.5. Amilaz Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

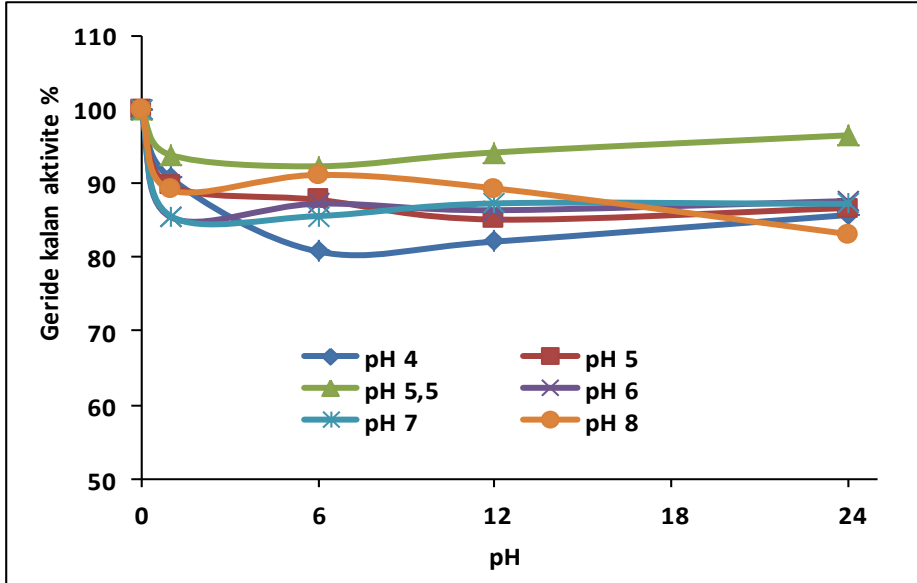
Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.22, 4.23'de ve Şekil 4.33'de gösterilmiştir. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla enzim, farklı pH'larda (4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0) inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edilmiştir ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi yüzde olarak belirlenmiştir.

Enzimin pH 5.5 'da 24 saatlik inkübasyon sonunda stabil olduğu (%97) ve kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Enzimin pH 4.0 ve 5.0 de bir saatlik inkübasyon sonunda stabil kaldığı (%91 ve 90), fakat kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli bulunduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Yirmi dört saat sonunda ise sırasıyla %86 ve 87'sini koruduğu saptanmıştır.

pH 6.0, 7.0 ve 8.0 de ise yirmi dört saat sonunda aktivitenin büyük bir kısmının (%88, 87 ve 83) korunduğu görülmesine rağmen, kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışma sonucunda enzimin geniş pH aralığında stabil olduğu, 24 saat sonunda denenen bütün pH'larda aktivitesini %83-97 oranında koruduğu saptanmıştır. Bakteri ve fungus amilazlarının optimum pH'ları asidik ve alkali aralıkta değişmektedir. α -Amilazlar genellikle pH 4.0 ile 11.0 arasında stabildir. Bununla birlikte stabilitesinin sınırlı olduğu alanlarda bulunmaktadır (Gupta vd., 2003; Sharma ve Satyanarayana, 2013). Çalışmamızda bu bulguları destekler niteliktedir.

A. flavus α -amilazının pH 5.0 ile 8.5 aralığında stabil olduğu (Khoo vd., 1994), ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake* α -amilazının geniş pH aralığında (4.0 ile 10.0) stabil olduğu (Kusuda vd., 2003), maya *Candida antarctica* CBS 6678 glukoamilazının asidik pH'larda stabil olduğu, α -amilazının alkali pH'larda hızlı bir şekilde aktivitesinde kayıplar olduğu bulunmuştur (De Mot ve Verachtert, 1987).



Şekil 4.33. α -Amilazın farklı pH'lardaki stabilitesi.

Çizelge 4.22. α -Amilazın farklı pH'lardaki stabilitesi

İnküb. Zamanı (Saat)	pH 4.0		pH 5.0		pH 5.5		pH 6.0		pH 7.0		pH 8.0	
	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x
0	718.83 \pm 15.71	a	785.17 \pm 30.51	a	673.17 \pm 31.02	a	826.50 \pm 11.06	a	989.50 \pm 33.47	a	928.17 \pm 3.18	a
1	652.50 \pm 0.00	b	704.83 \pm 48.51	a	632.17 \pm 40.59	a	706.50 \pm 21.13	b	847.17 \pm 20.17	b	827.50 \pm 25.70	b
6	580.83 \pm 2.60	b	689.50 \pm 29.70	a	621.83 \pm 31.67	a	721.50 \pm 0.00	b	847.17 \pm 67.65	b	846.50 \pm 8.89	b
12	590.50 \pm 37.29	b	668.50 \pm 10.97	b	634.50 \pm 2.89	a	714.17 \pm 15.33	b	864.17 \pm 4.63	b	829.50 \pm 22.37	b
24	616.50 \pm 42.06	b	680.83 \pm 6.06	b	650.17 \pm 2.96	a	724.50 \pm 5.29	b	863.50 \pm 14.98	b	771.83 \pm 14.72	b

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.23. *Aspergillus fumigatus* α -Amilazının farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite %

İnkübasyon zamanı	Geride kalan aktivite %					
	pH 4.0	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
Kontrol	100	100	100	100	100	100
1 saat	91	90	94	85	86	89
6 saat	81	88	92	87	86	91
12 saat	82	85	94	86	87	89
24 saat	86	87	97	88	87	83

4.10.6. Amilaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

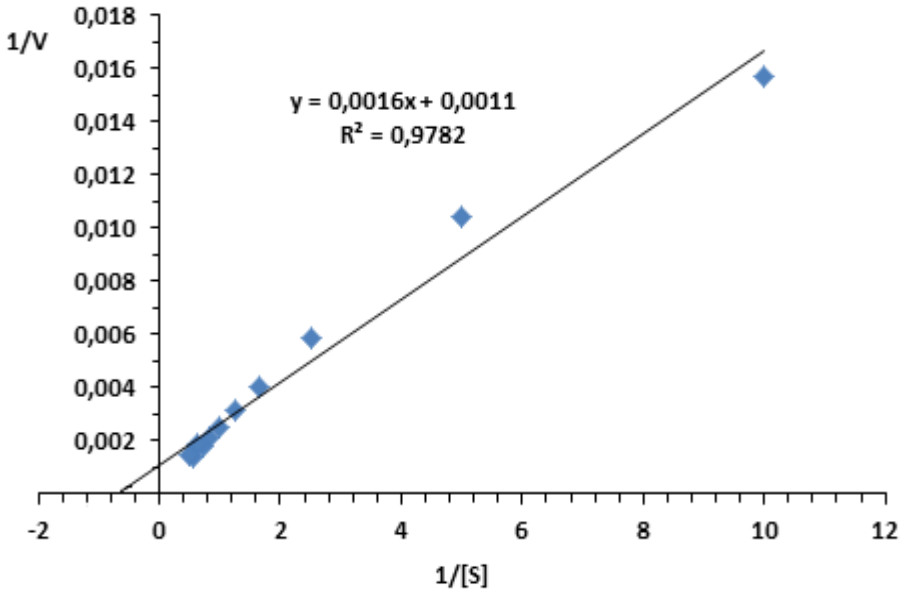
Amilaz aktivitesi üzerine substrat (çözünür patates nişastası) konsantrasyonunun etkisi Çizelge 4.24'de gösterilmiştir. Amilaz aktivitesi üzerine çözünür patates nişastasının etkisini saptamak amacıyla, 0.1-2.0 mg/mL arasında konsantrasyonları kullanılmıştır.

Amilazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, Lineweaver-Burk $y = a + bx$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V'$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizilmiştir (Şekil 4.32). Bu grafiğin doğru denklemi ise, $y = 0.0011 + 0.0016x$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0.98 bulunmuştur. Denklemden doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0.0011$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 909 U/mL olarak hesaplanmıştır. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -0.6875$ değerinde olup, K_m değeri 1.45 mg/mL olarak bulunmuştur.

Aspergillus flavus α -amilazının jelatinize tapioka nişastası için K_m ve V_{max} değerinin 0.5 g/L ve 108.67 μ mol redüktör şeker/min/mg protein olduğu bulunmuştur (Khoo vd, 1994). *Streptomyces* sp. tarafından üretilen üç farklı α -amilazın (Amilaz 1, 2 ve 3) amiloz için yüksek afiniteye sahip olup K_m değerleri sırasıyla 0.2, 0.3 ve 0.2 mM olarak, maltotriosa karşı zayıf afiniteye sahip olup K_m değerleri sırasıyla 8.2, 8 ve 8.2 mM olarak bulunmuştur (McMahon vd., 1999). Maya *Cryptococcus flavus* α -amilazının nişasta için K_m değeri 0.056 mg/mL olarak bulunmuştur (Wanderley vd., 2004).

Bacillus subtilis KIBGE HAS mikroorganizmasından saflaştırılmış α -amilazın optimum koşullar altında çözünür nişasta substratı ile K_m değeri 2.68 mg/mL ve V_{max} 1773 U/mL olarak hesaplanmıştır (Bano vd., 2011). *Bacillus licheniformis* AI20 α -amilazının K_m değeri 0.709 mg/mL ve V_{max} 454 mU/mg olarak hesaplanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013)

Literatür sonuçları ile K_m değerleri karşılaştırıldığında, α -amilazlara göre düşük bir K_m değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç enzimimizin çok düşük substrat konsantrasyonlarında dahi substratına olan ilgisinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.34. α -Amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).

4.10.7. Amilazın Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Amilazın substrat spesifitesi Çizelge 4.24'de verilmiştir. Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz, amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, çözünür patates nişastası kullanılmıştır.

Substratların enzimatik hidrolizi sonucunda, kontrol grubuna göre en iyi enzim aktivitesi maltoz (492948 ± 18215 U/mg protein), dekstrin (444230 ± 11340 U/mg protein) ve glikojen (389615 ± 20487 U/mg protein) için bulunmuş, maltoz ve dekstrinin kontrol ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Glikojenin kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Çözünür patates nişastası için ölçülen enzim aktivite değeri kontrol (100) olarak kabul edildi ve kullanılan substratlar için aktivite değişimi yüzde değer olarak hesaplandı. Maltotrioz, amilopektin ve pirinç nişastası ve maltotriozun aktivite değerleri sırasıyla %98, 97 ve 92 olarak bulunmuş ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$). Mısır nişastası, buğday nişastası ve rafinoz için % aktivite değerleri sırasıyla %50, 83 ve 5 olarak hesaplanmış, kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Sonuçlar irdelendiğinde amilazın oldukça geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu ifade edilebilir. Amilazın rafinoza karşı az aktivite gösterdiği de saptanmıştır.

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F₁ α -amilazı ve glukoamilazının amilozu hızlı bir şekilde hidrolizlediği, pullulanı ise çok az hidrolizlediği bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001). *A. tamarii* α -amilazının nişasta, amilopektin ve amilozu hidrolizleme oranının yüksek olduğu, glikojen ve pullulanı çok yavaş hidrolizlediği, siklodekstrinleri (α ve β) hidrolizleyemediği bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake* α -amilazının substrat spesifitesi için farklı polisakaritler kullanılmış, en iyi hidrolizlenen substratın çözünür nişasta olduğu daha sonra sırası ile amiloz A, amiloz, amiloz B ve glikojen olduğu bulunmuştur. *Tricholoma matsutake* α -amilazı α -1,6 bağlarını ve siklik polisakaritleri (α - ve β -siklodekstrin), α -1,4, α -1,6 ve α -1,3 bağlarını da içeren pullulanı hidrolizleyemediğini göstermiştir (Kusuda vd., 2003). Maya *Cryptococcus flavus* α -amilazının nişastaya karşı maksimum aktivitesinin %100 olduğu, glikojen, amilopektin ve amiloza karşı ise sırasıyla %18.9, 16.7 ve 7.1 olduğu bulunmuştur (Wanderley vd., 2004).

Çizelge 4.24. *A. fumigatus* HBF125 α -amilazının substrat spesifitesi

Substrat	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	x	% Aktivite
Çözünür patates nişastası	379359 \pm 6317	a	100
Maltoz	492948 \pm 18215	b	130
Dekstrin	444230 \pm 11340	b	117
Glikojen	389615 \pm 20487	a	103
Maltotrioz	371153 \pm 22702	a	98
Amilopektin I	369615 \pm 20654	a	97
Pirinç nişastası	349359 \pm 8941	a	92
Buğday nişastası	315000 \pm 5875	b	83
Amiloz	260897 \pm 2677	b	69
Mısır nişastası	190897 \pm 20021	b	50
Rafinoz	19102 \pm 1025	b	5

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

4.10.8. Amilaz Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için, enzim 1 mM, 5 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarda AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NH_4Cl , NiCl_2 , HgCl_2 , ZnCl_2 metal iyonları ve EDTA içeren deney ortamlarında 25 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve aktivite tayini yapıldı.

Metal iyonları ve EDTA içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilip, aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri yüzde değer olarak belirlendi ve sonuçlar Çizelge 4.25 ile Şekil 4.35'te verildi.

Mn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının 1, 5 ve 10 M'lık konsantrasyonları amilaz aktivitesini kuvvetli bir şekilde aktive etmiştir. İnkübasyon sonunda denenen konsantrasyonlarda geriye kalan enzim aktivitesi Mn^{2+} için sırasıyla %192, 192 ve 191, Ca^{2+} için ise, %119, 156, 167, Co^{2+} için sırasıyla %142, 140 ve 123, Ba^{2+} % 105, 131 ve 142 olarak ölçülmüştür. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

1 mM'lık metal iyonu konsantrasyonunda, Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonları aktivite de %11 ve 27'lik bir artış sağlamış ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Na^+ , Zn^{2+} ve Mg^{2+} iyonunun aktivitede meydana getirdiği değişim istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Denenen diğer metal iyonları (NH_4^+ , Al^{3+} , Ni^{2+} , Li^+ , K^+ , Hg^{2+}) enzim aktivitesinde sırasıyla %5, 8, 10, 5, 9 ve 22'lik bir azalmaya sebep olmuş ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

5 mM'lık metal iyonu konsantrasyonunda Li^+ ve Na^+ iyonları aktivitede %6 oranında bir artışa neden olmuş ve bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} iyonları sırasıyla aktivitede %5, 7, 7, 8, 22 ve 25'lik bir azalmaya neden olmuş ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Hg^{2+} iyonu 5 ve 10 mM konsantrasyonda enzimi tamamen inhibe etmiştir. 10 mM'lık metal iyonu konsantrasyonunda Li^+ ve Na^+ iyonları aktivitede önemli oranda bir değişime neden olmamıştır. Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} ve NH_4^+

iyonları aktivitede %18, 22, 44, 5, 59, 85 ve 8 oranında bir azalma meydana getirmiş ve bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

EDTA 1, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında aktivitede sırasıyla %18, 38 ve 49 oranında bir azalma meydana getirmiş ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile aralarındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Birçok enzimin maksimum aktivitesi için metal iyonu gereklidir. Eğer enzim metal iyonuna çok sıkı bağlıysa ve doğal durumunu korumak için metal iyonuna gerek duyuyorsa böyle enzimler metalloenzimdir. Metal iyonlarına daha zayıf bağlanan ve sadece katalitik fonksiyon için metal iyonlarına gerek duyan enzimler metal aktif enzimler olarak adlandırılır. Metal aktif ve metalloenzimler için metal iyonlarının bir rolü de, reaksiyon sırasında gelişebilen negatif yük veya elektron yoğunluğunu dengeleyen elektrofilik katalizde rol oynamaktır. Birçok α -amilaz metalloenzimdir ve aktivite, yapısal kararlılık ve stabilite için kalsiyum iyonuna gerek duyarlar (Sudha, 2012).

Çalışmamızda EDTA'nın enzim aktivitesinde 10 mM konsantrasyonda yaklaşık olarak %50 oranında bir inhibisyona neden olduğu görülmektedir. Fakat enzim saflaştırma aşamalarında diyaliz işleminden sonra enzim aktivitesinin azaldığı görülmüş, ortama kalsiyum ilave edildiğinde aktivitede artış meydana geldiği görülmüştür. Diyaliz işlemi ile ortamdan uzaklaştırılan kalsiyumun ortama ilavesi ile aktivite artışın meydana gelmesi enzimimizin metalloenzim olduğunu göstermektedir. Saflaştırılan enzimin içerisinde kalsiyum olmasına rağmen 10 mM'lık konsantrasyonda aktivitede yarı yarıya bir inhibisyon meydana getirmiştir. Ortamda kalsiyum olmasına rağmen Ca^{2+} iyonları tekrar ilave edildiğinde aktivitede artış meydana gelmiştir. Bu sonuç da literatür çalışmalarını destekler niteliktedir.

Ayrıca Mn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} iyonlarının enzim aktivitesini artırdıkları iyonların enzimin stabilizasyonunda veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini sağladığını düşünmekteyiz.

Çeşitli mikroorganizmaların nişasta hidrolizleyen amilazlarının aktivite için Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} gibi divalent katyonlara gereksinim duyduğu bildirilmiştir. *Penicillium citrinum* HBF62 α -amilazının Mn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ve Ca^{2+} tarafından aktive edildiği, NH_4^+ ve Al^{3+} tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. HBF62 amilazının denenen diğer metal iyonları tarafından zayıf bir şekilde

etkilendiği, Hg^{2+} tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Metin vd., 2010). *A. carbonarius* amilazı 2 mM Fe^{2+} ve Co^{2+} tarafından aktive edilmiş, Ca^{2+} gibi divalent veya Na^+ gibi monovalent katyonlara aktivite için gereksinim göstermemiştir. Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} ve EDTA enzim aktivitesini inhibe etmiştir (Okolo vd., 2000). *Scytalidium thermophilum* α -amilaz aktivitesinde 1 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Na^+ iyonları %4-8 oranında bir artışa sebep olurken, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} ve NH_4^+ sırasıyla %47, 17, 12 ve 12 oranında, özellikle Hg^{2+} ile Cu^{2+} ise %85 ile 75 oranında inhibisyona sebep olmuştur. 10 mM konsantrasyonda ise aktivitede Na^+ iyonu %10'luk bir artış göstermiş, Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^+ iyonları yaklaşık olarak %18'lik inhibisyona ve özellikle Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları ise %93, 96 ve 100'lük inhibisyona neden olmuştur (Aquino vd., 2003). *Cryptococcus flavus*'un α -amilaz aktivitesinde 4 mM Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonları sırasıyla %4, 5, 15, 30, 71, 80 ve 100 azalmaya sebep olmuştur (Wanderley vd., 2004). *A. tamarrii* α -amilazı 10 mM Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} tarafından %90-98 oranında inhibe edilmiş, Ba^{2+} tarafından %23 oranında aktive edilmiş ve denenen diğer metal iyonları tarafından önemli bir şekilde etkilenmediği bulunmuştur (Moreira vd., 2004). *Streptomyces* sp. No.4 amilazları (Amilaz 1 ve 2) üzerine 1 mM metal iyonlarının etkisi incelenmiş, Amilaz 1'in Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} tarafından çok az da olsa aktive edildiği, Ni^{2+} ve Mn^{2+} tarafından etkilenmediği, Sn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} (%100) ve EDTA tarafından inhibe edildiği bulunmuştur. Amilaz 2'nin ise, denenen tüm metal iyonları ile inhibe olduğu, EDTA'nın ise aktivitede %13'lük bir artışa neden olduğu bulunmuştur (Primarini ve Ohta, 2000).

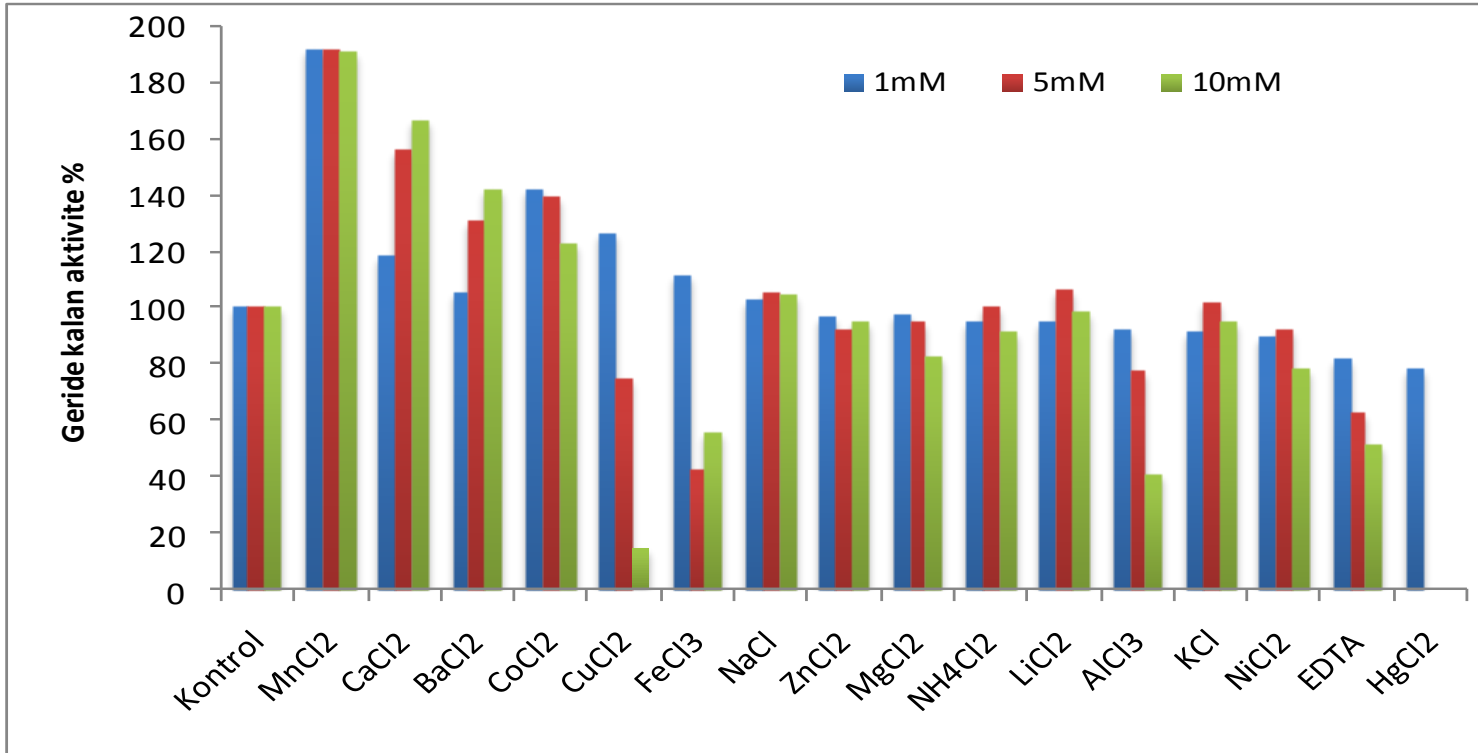
Termofilik fungus *T. lanuginosus* ATCC 34626 α -amilazının 10 mM'lık Zn^{2+} ve Co^{2+} tarafından inhibe edildiği, Mn^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının aktiviteyi etkilemediği, Ca^{2+} , Ba^{2+} ve EDTA tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Nguyen vd., 2002). Termofilik fungus *T. lanuginosus* α -amilazının 5 mM Cu^{2+} ve Fe^{3+} iyonları tarafından %90 oranında inhibe edildiği, bunun da muhtemelen enzimin aktif bölgesindeki karboksil gruplarıyla kompleks oluşturduğu, Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} ve Cd^{2+} 'un ise enzimi aktive ettiği bulunmuştur (Petrova vd., 2000). *Mucor* sp. amilazı Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ve Hg^{2+} 'nın yüksek konsantrasyonlarında (25 mM) inhibe olurken, Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} tarafından daha az inhibe edildiği, 25 mM Mg^{2+} enzimi etkilemediği, 5 mM EDTA'nın enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Mohapatra vd., 1998).

Çizelge 4.25. *Aspergillus fumigatus* HBF125 α -amilazının farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi

Metal iyonu	1 mM			5 mM			10 mM		
	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	642647 \pm 15883	a	100	642647 \pm 15883	a	100	642647 \pm 15883	a	100
MnCl ₂	1234244 \pm 3282	b	192	1235084 \pm 6274	b	192	1189706 \pm 11697	b	191
CaCl ₂	763655 \pm 12944	b	119	1000630 \pm 13046	b	156	1038445 \pm 13776	b	167
BaCl ₂	677941 \pm 19868	b	105	838866 \pm 13596	b	131	883403 \pm 5510	b	142
CoCl ₂	915336 \pm 13929	b	142	898529 \pm 4008	b	140	765336 \pm 10504	b	123
CuCl ₂	813235 \pm 14956	b	127	481303 \pm 15648	b	75	90966 \pm 3282	b	15
FeCl ₃	714916 \pm 3030	b	111	275000 \pm 5265	b	43	348529 \pm 6670	b	56
NaCl	658613 \pm 2521	a	102	677521 \pm 16060	b	105	649370 \pm 21861	a	104
ZnCl ₂	621218 \pm 5837	a	97	593908 \pm 8435	b	92	590546 \pm 7598	b	95
MgCl ₂	625840 \pm 9517	a	97	610714 \pm 5042	b	95	512395 \pm 12024	b	82
NH ₄ Cl ₂	608193 \pm 728	b	95	643908 \pm 7290	a	100	571218 \pm 14724	b	92
LiCl ₂	611975 \pm 7598	b	95	680882 \pm 15167	b	106	615336 \pm 20895	a	99
AlCl ₃	593067 \pm 6670	b	92	500210 \pm 8528	b	78	253151 \pm 23017	b	41
KCl	585924 \pm 8016	b	91	656933 \pm 11606	a	102	590966 \pm 6917	b	95
NiCl ₂	577521 \pm 6358	b	90	595588 \pm 16738	b	93	488025 \pm 17772	b	78
EDTA	524160 \pm 6563	b	82	401050 \pm 4954	b	62	319538 \pm 8201	b	51
HgCl ₂	503151 \pm 3439	b	78	0		0	0		0

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata. **x:** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4. 35. α -Amilaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi.

4.10.9. Amilaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör ve Denaturantların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inhibitör ve denaturantların etkisi Çizelge 4.26 ve Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

Triptofan inhibitörü olan N-bromo suksinamid (NBS) 1mM konsantrasyonda enzim aktivitesinde %88 oranında bir inhibisyona neden olmuş, 5 mM konsantrasyonda ise enzimi tamamen inhibe etmiştir.

SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β merkaptoetanol, SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4- dithiothreitol (DTT), arjinin inhibitörü olan 2,3 bütandiol 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesini sırasıyla %14, 3, 7 ve %8, 20, 27 oranında arttırmıştır. 2,3 bütandiol ve DTT'nin 1 mM'lık konsantrasyonundaki artış istatistiksel olarak önemsiz, diğer artışlar önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 1mM konsantrasyonda enzim aktivitesini etkilemezken, 5 mM da ise %10 oranında bir inhibisyon meydana getirmiştir.

Serin spesifik inhibitörü olan fenil metil sülfonil florür (PMSF), karboksil grubu inhibitörü olan sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC), sistein ve histidin alkilleyici iodoasetamid (İAA), kuvvetli bir inhibitör olan florür, katotropik ajan olan okzalit, indirgeyici madde glutatyon 1 mM konsantrasyonda sırasıyla %5, 6,10,7,12 ve oranında bir inhibisyona neden olmuş kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). 5 mM konsantrasyonda ise enzim aktivitesinde sırasıyla %27, 8, 25, 4,37 ve 41 oranında bir inhibisyona neden olmuş ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Katotropik ajan olan borik asit ve sitrat 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuş ve aktivitedeki bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Protein denaturantı olan üre ve SDS 1 ve 5 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinde sırasıyla %13, 26 ve %19 ve 10 oranında bir inhibisyona neden

olmuştur. Aktivitedeki bu azalma kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Triptofan inhibitörü olan NBS, amilaz aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Bu da amilazın aktif merkezinde katalizden sorumlu amino asidin triptofan olduğunu göstermektedir. Yine Hg^{2+} iyonunun enzim inhibisyonunun, aktif merkezde rol oynayan indol grubu içeren triptofan amino asidinin bir belirteci olabileceği belirtilmiştir (Wanderley vd., 2004).

Enzimin β -merkaptoetanol ve 1,4- dithiothreitol (DTT) tarafından aktive edildiği ve bu nedenle enzimin aktivitesinde molekül içi disülfit köprülerinin etkisinin olmadığı düşünülmektedir.

Protein denaturantı olan ürenin, yüksek konsantrasyonlarda bile enzimin aktivitesini çok fazla etkilememesi enzimin üre'ye karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Natronococcus sp. α -amilazının %1'lik SDS ve 1 M üre varlığında aktivitesinin %80 ve 74 oranında inhibe olduğu, 1 mM PMSF'nin inhibitör etkisi göstermediği, N-bromosüksinamidin ise %73 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre enzimin aktif merkezinde triptofan olduğu bulunmuştur (Kobayashi vd., 1992). *Penicillium citrinum* HBF62 α -amilazının PMSF, NBS ve CMC varlığında inhibe olduğunu bu sonuçlara göre de enzimin aktif merkezinde serin, triptofan kalıntısı ve karboksil gruplarının katalitik fonksiyonda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Metin vd., 2010).

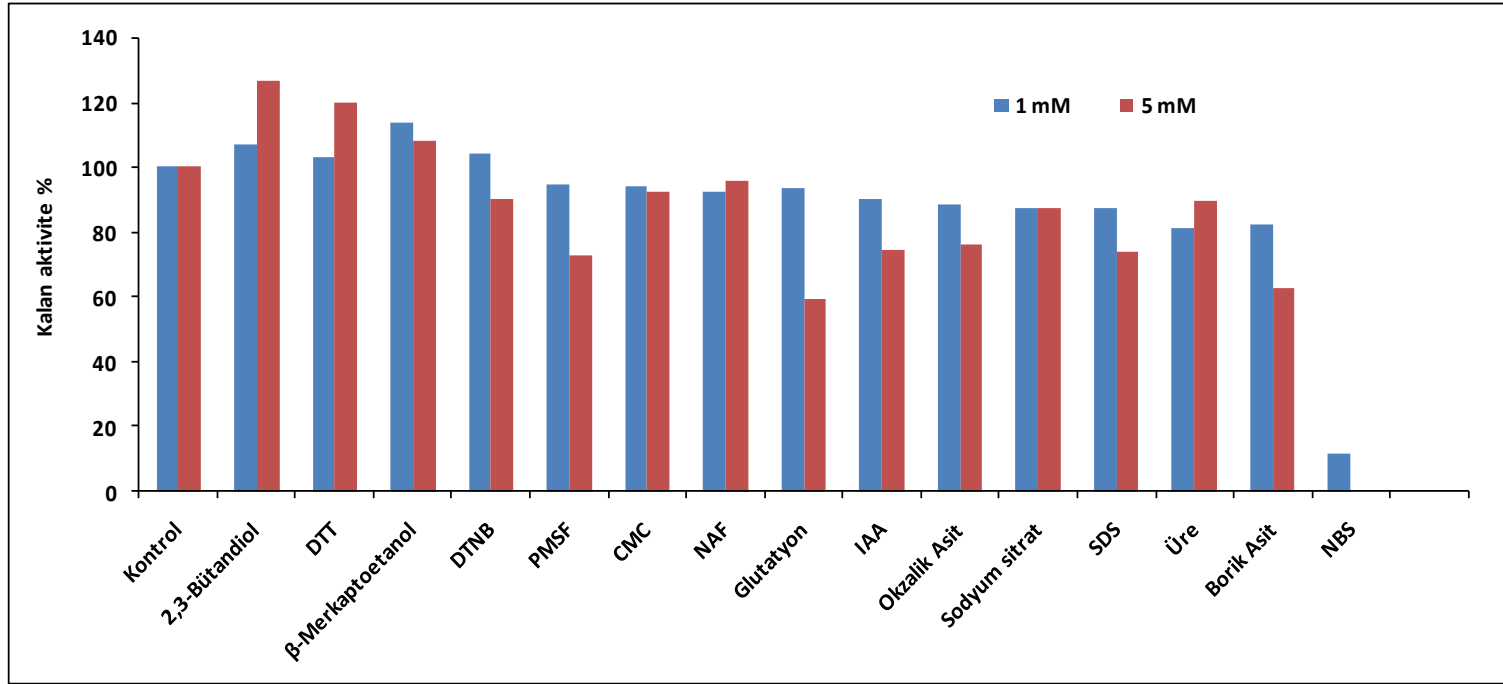
Çizelge 4.26. α -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatüranların etkisi

İnhibitör ve Denatürant	1 mM			5 mM		
	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	1303.00 \pm 53.03	a	100	1303.00 \pm 53.03	a	100
β -Merkaptoetanol	1483.67 \pm 41.91	b	114	1407.00 \pm 38.57	b	108
2.3-Bütandiol	1397.00 \pm 64.28	a	107	1649.00 \pm 26.91	b	127
DTT	1343.67 \pm 59.07	a	103	1561.00 \pm 29.46	b	120
DTNB	1355.67 \pm 43.91	a	104	1178.33 \pm 42.81	b	90
PMSF	1236.33 \pm 61.10	a	95	951.67 \pm 39.57	b	73
CMC	1227.00 \pm 37.47	a	94	1200.33 \pm 5.93	b	92
Glutasyon	1220.33 \pm 67.43	a	94	773.67 \pm 20.99	b	59
NAF	1207.00 \pm 42.72	a	93	1250.33 \pm 10.09	a	96
IAA	1174.33 \pm 64.85	a	90	971.67 \pm 26.64	b	75
Okzalik Asit	1151.00 \pm 21.07	a	88	990.33 \pm 7.69	b	76
Sodyum sitrat	1140.33 \pm 49.02	b	88	1135.00 \pm 16.17	b	87
SDS	1139.00 \pm 31.90	b	87	960.33 \pm 49.27	b	74
Borik Asit	1073.67 \pm 12.72	b	82	817.00 \pm 11.37	b	63
Üre	1059.00 \pm 44.23	b	81	1169.00 \pm 22.12	b	90
NBS	156.33 \pm 7.69	b	12	0		0

ORT: Her veri üç tekrarin ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.36. α -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denaturantların etkisi

4.10.10. Amilaz Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini belirlemek için aseton, gliserol, 1,4-dioksan, etanol, metanol, dimetilsülfoksit (DMSO), 1-propanol kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.27 ve Şekil 4.37’de sunulmuştur.

Organik çözücülerin %10 konsantrasyonda aseton, etanol, metanol, DMSO enzim aktivitesini etkilemediği, %20 konsantrasyonda ise aktivitede sırasıyla %39, 77, 54, 29 oranında inhibisyona neden oldukları saptandı.

Gliserol ve 1-propanol %10 konsantrasyonda sırasıyla %24 ve 74 oranında aktiviteyi inhibe ettiği, %20 konsantrasyonda ise %46 ve 85 oranında aktiviteyi inhibe ettiği bulunmuştur.

Genel olarak kullanılan çözücülerin dielektirik sabiteleri arttıkça (sırasıyla DMSO, gliserol, metanol, etanol, aseton, n-propanol 1,4- dioksan) enzim aktivitesinde %20 konsantrasyonda azalmaya neden olduğu görülmektedir. Bu çözeltilerin hidrofilik özelliği nedeniyle (dielektirik sabitelerinin yüksek) enzimle etkileşime girerek, enzim yapısında değişimlere neden olduğunu söyleyebiliriz.

Organik çözücü ilavesi yüksek sıcaklıklarda olursa protein konformasyonu hızlı bir şekilde değişir, bu da organik çözücü moleküllerinin proteinin iç kısmına erişmesine olanak sağlar ve burada bu moleküller hidrofobik etkileşimleri bozarak denatürasyona sebep olabilirler (<http://biyokure.org/protein-saflastirmada-cokturme-yontemleri/1782/>).

Yapılan çalışmada halophilic *Nesterenkonia* sp. amilolitik enzim aktivitesinin %20 oranında aseton, etanol, sikloheksanol gibi suyla karışmayan organik çözücülerin %9 oranında artış sağladığı, %50 konsantrasyonda ise enzim aktivitesini önemli oranda etkilemediği bulunmuştur. Yüzde elli toluen, benzen, kloroform ise enzim aktivitesini sırasıyla %57, 37 ve 22 oranında arttırdığı, 1-bütanolün ise enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur (Shafiei vd., 2012).

Bacillus licheniformis AI20 tarafından üretilen α -amilazı %10 oranında etanol, metanol, isopropanol, aseton gibi çözücüler ile gliserol gibi kimyasallara karşı büyük bir kararlılık göstermiş, %20 konsantrasyonda ise bazı çözücüler (etanol,

metanol, isopropanol) enzim aktivitesinde hafif bir düşüşe neden olmuştur. Aseton ve gliserolün ise enzim aktivitesini etkilemediği saptanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013).

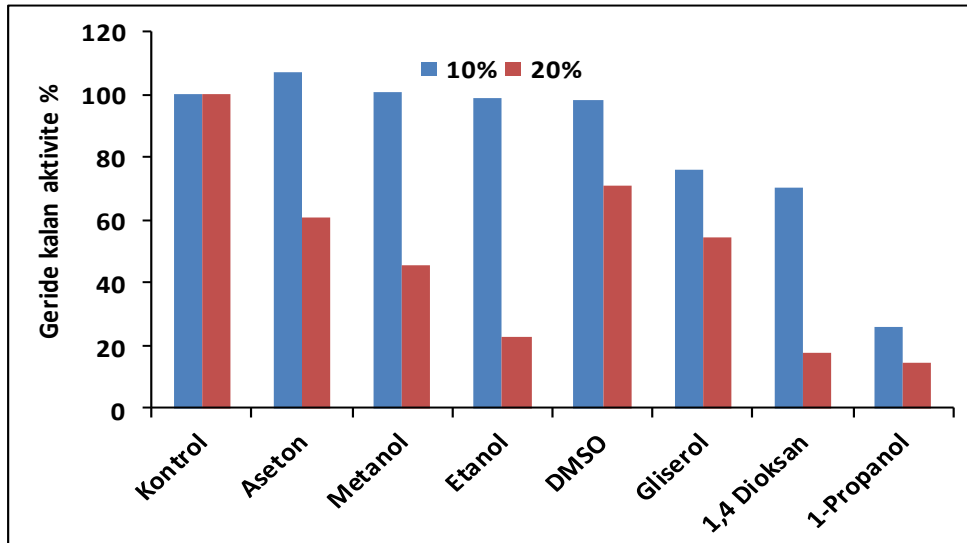
Çizelge 4.27. α -Amilaz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

İnhibitör ve Denaturant	%10			%20		
	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	1591.25 \pm 27.54	a	100	1591.25 \pm 27.54	a	100
Aseton	1707.92 \pm 28.66	a	107	964.58 \pm 15.43	b	61
Metanol	1609.58 \pm 18.05	b	101	724.58 \pm 13.41	b	46
Etanol	1572.92 \pm 90.72	a	99	365.42 \pm 20.22	b	23
DMSO	1562.08 \pm 49.80	a	98	1136.25 \pm 10.41	b	71
Gliserol	1211.25 \pm 20.97	b	76	866.25 \pm 25.17	b	54
1,4 Dioksan	1122.08 \pm 55.53	b	71	285.42 \pm 17.93	b	18
1-Propanol	412.08 \pm 15.16	b	26	230.42 \pm 23.33	b	15

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.37. α -Amilaz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

4.10.11. Amilaz Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 ve Triton X-100 kullanıldı ve elde edilen değerler Çizelge 4.28 ve Şekil 4.38’da verildi.

Tween 60 ve Tween 80’nin %0.5 konsantrasyonda enzim aktivitesini sırasıyla %16 ve 19 oranında artırdıkları ve aktivitedeki bu farkın kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). %1 konsantrasyonda ise aktivitede değişime neden olmadıkları görüldü.

Tween 20 ve Tween 40 %0.5’lik konsantrasyonda enzim aktivitesinde %12 lik bir aktivasyona neden olmasına rağmen, istatistiksel olarak bu fark önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). %1’lik konsantrasyonda ise enzim aktivitesi etkilenmemiştir.

Triton X-100 ise %0.5 ve 1’lik konsantrasyonlarda aktivitede %4-5’lik bir azalma meydana getirmesine rağmen kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

İyi bir deterjan enziminin yıkama sırasında etkili olması için deterjan bileşiminde yaygın olarak kullanılan sürfaktan ve oksitleyici maddelere karşı uyumlu ve kararlı olması gereklidir (Maalej vd., 2013). *Aspergillus fumigatus* HBF125 amilazının non-iyonik deterjan varlığın da oldukça stabil olduğu ve deterjan sektöründe kullanıma uygun olduğunu düşünmekteyiz.

Bacillus licheniformis AI20 tarafından üretilen α -amilazın aktivitesi üzerine Triton X-100, Tween-20 ve Tween 85 gibi deterjanlar ve SDS gibi sürfaktanların etkisi çalışılmıştır. Deterjanların %0.25 oranında denenen konsantrasyonunda enzim aktivitesinin stabil olduğu, Triton X-100, Tween-20 ve Tween 85 % 0.5 ve 1’lik konsantrasyonda ise aktivitede sırasıyla %16, 27, 41 ve %25, 28, 42 oranında bir kayba neden olduğu bulunmuştur. Anyonik sürfaktan SDS’nin %1 konsantrasyonda enzim aktivitesinde %35’lik bir azalma gösterdiği saptanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013).

Bacillus licheniformis NH1 α -amilazının 1 saat 40 °C de %1 oranında Tween-20 ve Triton X-100 ile muamele edildiği ve bu süre sonunda aktivitede herhangi bir kayıp olmadığı bildirilmiştir. %10’luk SDS varlığında ise aktivitede %20 oranında

bir azalma olduğu, %1'lik sodyum perborat (okside edici ajan) varlığında ise 1 saat sonunda %43 oranında kayıp olduğu bildirilmiştir (Hmidet vd., 2008).

Termofilik bakteri *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazının SDS, Triton X-100, Tween-20 ve Tween-80 tarafından etkilenmediği ve stabil olduğu, üre tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. Amilaz aktivitesi üzerine sürfaktanların etkisinin çok düşük oranda olduğu ve enzimin deterjan sektöründe kullanıma uygun olduğu bildirilmiştir. Üre denaturasyonunun ise enzimin bileşimindeki hidrofobik amino asit kalıntılarının varlığından dolayı olduğu bildirilmiştir (Satheesh Kumar vd., 2010).

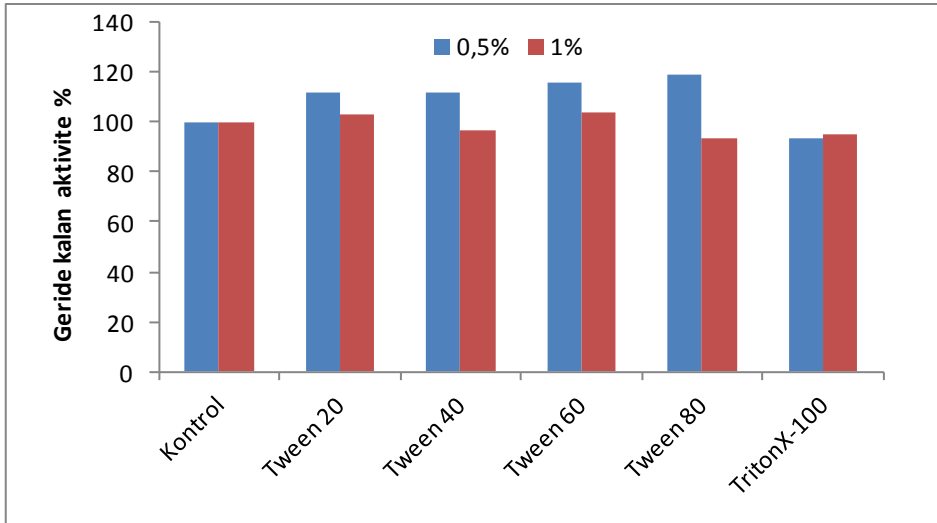
Çizelge 4.28. α -Amilaz aktivitesi üzerine deterjanların etkisi

Deterjanlar	%0.5			%1		
	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	1261.25 \pm 26.73	a	100	1261.25 \pm 26.73	a	100
Tween 20	1413.75 \pm 13.77	a	112	1298.75 \pm 104.05	a	103
Tween 40	1407.92 \pm 55.83	a	112	1222.92 \pm 78.45	a	97
Tween 60	1462.92 \pm 60.25	b	116	1312.08 \pm 94.14	a	104
Tween 80	1500.42 \pm 117.92	b	119	1182.08 \pm 75.06	a	94
Triton X-100	1182.92 \pm 22.05	a	94	1196.25 \pm 19.42	a	95

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.38. α -Amilaz aktivitesi üzerine deterjanların etkisi.

4.10.12. Amilaz Aktivitesi Üzerine CaCl_2 Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine kalsiyum klorürün etkisini belirlemek için, hazırlanan stok CaCl_2 (100 mM) çözeltisinden, final konsantrasyonu 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 mM olacak şekilde deney ortamına ilave edildi, standart deney koşullarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler Çizelge 4.29 ve Şekil 4.39'da verildi.

Denenen tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesi artmış ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Birçok metal katyonları, genellikle ağır metal iyonları, sülfidril grup ajanları, N-bromosüksinimid, p-hidroksilmerkuribenzoik asit, iyodoasetat, EDTA ve EGTA α -amilazı inhibe ederler. α -Amilaz, metalloenzimdir, çünkü yapısında en az bir Ca^{2+} iyonu bulunur. α -Amilazın kalsiyuma ilgisi diğer iyonlardan daha kuvvetlidir. Ca^{2+} , elektrodiyaliz ve EDTA ilave edilerek amilazlardan uzaklaştırılır. Kalsiyumsuz enzimler, Ca^{2+} iyonları ortama eklendiği zaman yeniden aktive olurlar (Gupta vd., 2003).

Diyaliz işleminden sonra aktivitede büyük oranda kayıp meydana gelmiştir. Enzim tipimiz α -amilaz olduğu ve birçok amilazın metalloenzim olduğu literatür bilgisinde yer aldığı için saflaştırma adımından sonra kalsiyumun etkisine

bakılmıştır. Başlangıç aktivitesine göre kademeli olarak kalsiyum miktarı arttıkça enzim aktivitesinin tekrar geri kazanıldığı görülmüştür. Bu işlemten sonra bütün diyaliz basamaklarında diyaliz tamponunun içine 10 mM kalsiyum koyulmasına karar verilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç enzimimizin metalloenzim olduğunu göstermektedir.

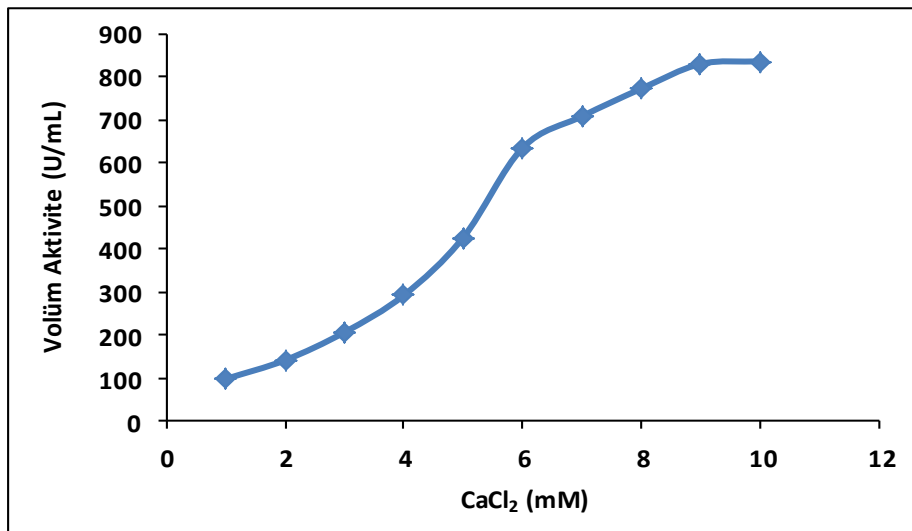
Çizelge 4.29. α -Amilaz aktivitesi üzerine CaCl_2 etkisi

CaCl_2 (mM)	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Aktiviteki Artış %
Kontrol	79.92 \pm 0.33	a	100
1	97.42 \pm 5.73	a	122
2	141.08 \pm 6.39	b	177
3	206.08 \pm 9.61	b	258
4	292.25 \pm 9.80	b	366
5	426.42 \pm 39.55	b	534
6	635.25 \pm 15.00	b	795
7	708.75 \pm 2.31	b	887
8	773.08 \pm 26.66	b	967
9	830.75 \pm 1.04	b	1039
10	836.92 \pm 1.86	b	1047

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

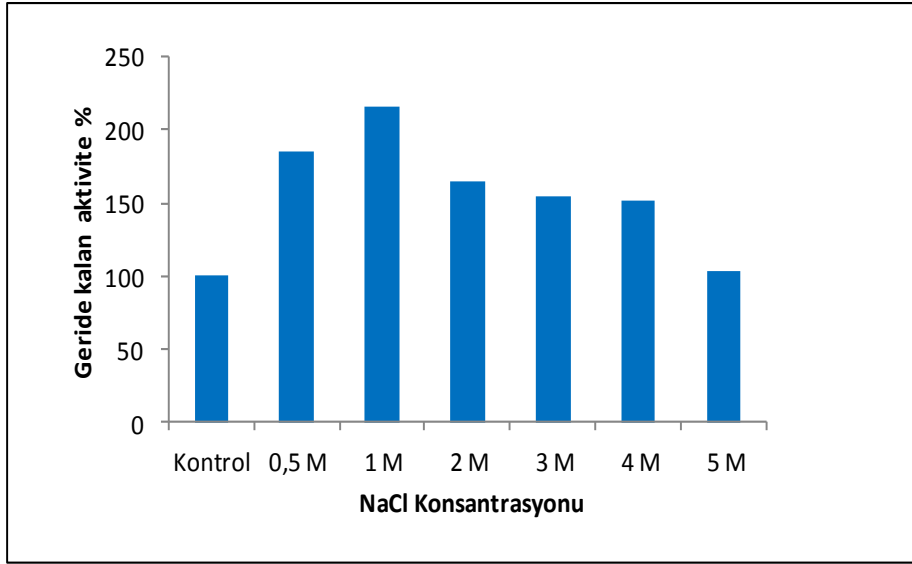


Şekil 4.39. α -Amilaz aktivitesi üzerine CaCl_2 etkisi

4.10.13. Amilazın Tuz Toleransı

Amilazın tuz toleransı Çizelge 4.30 ve Şekil 4.40'de gösterilmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyondan sonra 0.5-1 M NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde kademeli bir artış olmuş ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Ancak konsantrasyon arttırıldığında aktivitede yavaş yavaş azalma görülmesine rağmen aktivitedeki artış kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. NaCl'nin 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 M konsantrasyonları için kalan aktivite sırasıyla %185, 216, 164, 155, 151 ve 103 olarak bulunmuştur.

Sıcaklık, tuzluluk ve pH gibi endüstriyel işlemlerde kullanılmak üzere ekstrem koşullara toleranslı ve yeni fizyolojik özelliklere sahip amilazlar üreten mikroorganizmaların keşfi oldukça önemlidir. Enzimin tuz toleransının oldukça yüksek olması, enzimin yüksek tuz konsantrasyonu gerektiren endüstriyel işlemlerde de kullanıma uygun olabileceğini göstermiştir. Nişastanın şekerleştirme işlemlerinde ve endüstrideki farklı uygulamalarda kullanılan amilazlar için, yüksek tuz toleransına sahip olmanın yararlı bir özellik olduğu bildirilmiştir (Mohapatra vd., 1998). Tuz tolerans testinin, kirlilik kontrol mekanizmalarında, selüloz, nişasta ve yüksek oranda tuz içeren atık suların işlenmesinde önemli olduğu belirtilmiştir (Banerjee vd., 2001; Cordeiro vd., 2002).

Şekil 4.40. α -Amilazın tuz toleransı.Çizelge 4.30. α -Amilaz aktivitesi üzerine NaCl etkisi

NaCl (M)	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	293.75 \pm 37.50	a	100
0.5	542.08 \pm 51.34	b	185
1	635.42 \pm 58.85	b	216
2	482.92 \pm 31.10	b	164
3	455.42 \pm 42.83	b	155
4	443.75 \pm 24.62	b	151
5	303.75 \pm 13.23	a	103

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarında temin edilen ve çeşitli kaynaklardan izole edilen 91 fungusun sıcaklık taraması yapıldığında, 3 tane termofilik, 18 tane de termotolerant olmak üzere 21 adet fungus belirlenmiştir. Termotolerant olarak belirlenen fungusların *Absidia* sp., *Acremonium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. ve 14 tanesinin ise *Aspergillus* cinsine ait olduğu saptanmıştır. Termofilik olarak belirlenen üç fungusun ise *Acremonium* ve *Aspergillus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Termofilik ve termotolerant olarak belirlenen 21 adet fungusda kalitatif enzim taramaları yapılmış ve 15 fungusun amilolitik, 8 fungusun üreolitik, 6 fungusun selüloolitik ve 2 fungusun lipolitik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Fungusların proteolitik aktivite göstermedikleri bulunmuştur.

Amilolitik aktivite bakımından pozitif olan funguslar aflatoksin üretme yetenekleri bakımından kalitatif olarak incelenmiş ve iki fungusun UV ışığı altında ışımaya yaptıkları belirlenmiştir. Amilolitik aktivite zon çapı en iyi olan *Aspergillus fumigatus* HBF125 ve HBF126 suşları ve aflatoksin üretme yeteneği olan iki farklı fungus seçilmiş ve akciğer epitelyum hücreleri kullanılarak toksin üretme yetenekleri ölçülmüştür. HBF125 ve HBF126 türlerinin toksin üretmediği saptanmıştır.

HBF125 ve HBF126 türleri sıvı kültür ortamında üretilerek 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu kullanılarak kantitatif olarak ölçüm yapılmıştır. Optimum sıcaklıkları (70 °C), pH'ları (pH 7.0), enzim tipi (α -amilaz) belirlendi. *Aspergillus fumigatus* HBF125 türü enzim üretimi için seçilmiştir. Morfolojik olarak *A. fumigatus* HBF125 olarak teşhis edilen suşun ITS gen bölgesinin dizi analizi yapılarak www.pubmed.com adresinde yer alan veri tabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan funguslar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan diziler arasında en yüksek benzerliğin (%100) *Aspergillus fumigatus* ile olduğu saptanmıştır. *A. fumigatus* HBF125 izolatının Genbank kayıt numarası **KJ530990**'dir.

A. fumigatus HBF125 fungusunun amilaz üretimi için, kültür koşulları optimize edildiğinde en yüksek amilaz üretiminin 7 günlük sporulasyon ortamı, %5

inokulum oranı, başlangıç pH 5.0, sıcaklık 35 °C ve karbon kaynağı %1.5 kepek olarak bulunmuştur.

Optimum koşullarında üretilen *A. fumigatus* HBF125 kültür ortamı süzöldükten sonra elde edilen ham ekstrakt sırasıyla ultrafiltrasyon ve nişasta affinite kromatografisi işlemlerinden geçirilerek %4.7'lik geri kazanımla 54.4 kat saflaştırılmıştır.

Saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlar, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile zimografi yapılarak görüntülenmiş, enzimin iki alt ünitesinin olduğu görölmüştür. Standart proteinler kullanılarak enzimin moleköl ağırlığı yaklaşık olarak 160 kDa, alt üniteleri ise yaklaşık olarak 86.2 ve 73.8 kDa olarak hesaplanmıştır.

Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldığında, maksimum enzim aktivitesinin pH 5.5 ve 60 °C'de olduğu saptanmıştır. Enzimin geniş bir pH aralığında (pH 4.0-8.0) oldukça stabil olduğu görölmüştür. Enzimin 25-60 °C arasında aktivitesinin büyük bir kısmını koruması enzimin sıcaklık stabilitesinin iyi olduğunu göstermiştir. Amilaz enziminin nişasta için, K_m değerinin 1.45 mg/mL, V_{max} değerinin ise 909 U/mL olduğu bulunmuştur. *A. fumigatus* HBF125 amilazının geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptanmıştır. En yüksek enzim aktivitesi substrat olarak maltoz kullanıldığında elde edilmiştir. Amilazın, denenen organik çözücülerin büyük bir kısmının düşük konsantrasyonlarına karşı (%10) aktivitesini büyük bir oranda (%70) koruduğu, yüksek konsantrasyonlarına karşı (%20) aktivitesini koruyamadığı görölmüştür. Amilazın, denenen deterjanların düşük konsantrasyonlarına karşı (%0.5) aktivitesini koruduğu, yüksek konsantrasyonlarına karşı (%1) aktivitesini büyük bir oranda (%95) koruduğu görölmüştür. Enzimin NBS ile büyük oranda inhibe olması aktif merkezde katalizden sorumlu triptofan amino asidinin olabileceğini düşündürmüştür.

Enzim Mn^{2+} , Co^{2+} - Ca^{2+} ve Ba^{2+} un denenen tüm konsantrasyonları tarafından aktive edilirken, Hg^{2+} tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe olduğu belirlenmiştir. Bunlar dışındaki metal iyonlarının enzim aktivitesinde düşük konsantrasyonda (1 Mm) çok fazla inhibisyona neden olmadığı saptanmıştır. *A. fumigatus* HBF125 amilazının EDTA'nın denenen yüksek konsantrasyonlarında %50 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir. Enzimin saflaştırma aşamalarında diyaliz işleminden sonra

enzim aktivitesinin azaldığı görülmüş ve ortama kalsiyum ilave edildikten sonra aktivitede artış meydana geldiği belirlenmiştir. Ortamda kalsiyum iyonu bulunmasına rağmen EDTA'nın %50 oranında inhibisyon meydana getirmesi enzimin bir metalloenzim olduğu düşüncesini akla getirmektedir. Enzimin tuz toleransının çok iyi olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sonucunda *A.fumigatus* HBF125 amilaz enziminin sahip olduğu karakteristik özellikleri ile endüstriyel alanda kullanılması ve ekonomik açıdan değerlendirilmesi önerilebilir. Elde edilen enzimin özellikle deterjan endüstrisinde kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir. Ayrıca enzimin tuz toleransının yüksek olması, yüksek tuz konsantrasyonları gerektiren endüstriyel işlemlerde kullanıma uygun olabileceği düşünülmektedir. Enzim saf olduğu için ilaç sanayisindeki potansiyeli araştırılabilir. Enzimin karbonhidrat kalıntısı içerip içermediği tespit edilecektir. Enzimin ait olduğu alt sınıfın tam olarak belirlenebilmesi için enzimin elektroforezde saptanan bandı kesilerek, elde edilecek saf amilazın amino asit sekanslarının çıkarılması ve üç boyutlu yapısının aydınlatılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah Y. R., Soliman N. A., El-Toukhy N. M., El-Gendi H, Ahmed R. S. 2013. Production, Purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. **Journal of Chemistry**. Volume 2013, Article ID 673-173, 11 pages.
- Abdullah R., Shaheen N., Iqtedar M., Naz, S., Iftikhar T. 2014. Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus niger* (btm-26) in solid state fermentation. **Pak. J. Bot.**, 46(3): 1071-1078.
- Abou Dohara M. I., El-Sayed A. K., El-Fallal A. A., Omar N. F. 2011. Production and partial characterization of high molecular weight extracellular α -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* isolated from Egyptian soil. **Polish Journal of Microbiology**, Vol. 60, No. 1, pp. 65- 71.
- Abou-Zeid A.M. 1997. Production, purification and characterization of an extracellular α -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. **Microbios** 89: 55-66.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C and Haser, R. 1998. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. **Structure**, 6: 1503 –1516.
- Aguilar G., Morlon-Guyot J., Trejo-Aguilar B., Guyot J. P., 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. **Enzyme and Microbial Technology** 27: 406–413.
- Akcan N., Uyar F., Güven A.. 2011. Alpha-Amylase Production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in Submerged Cultivation. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**17 (Suppl A): S17-S22.
- Anto H., Trivedi U., Patel K.. 2006. Alpha-Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation, **Food Technol. Biotechnol.** 44 (2) 241–245.
- Aquino A. C. M. M., Jorge J. A., Terenzi H. F. Polizeli M. L. T. M. 2003. Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Appl Microbiol Biotechnol** 61: 323-328.

- Bamforth C.W. 2003. Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review. **MBAA TQ** Vol. 40, No. 2, pp. 89-97.
- Banerjee D., Mondal K.C., Pati B.R. 2001. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **J. Basic Microbiol.** 41 (6):, 313-318.
- Bano S., Ul Qader S.A., Aman A., Syed M.N., Azhar A.2011. Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. **AAPS PharmSciTech**;12(1):255-61.
- Barros, M., Silva, R., Ramada, M., Galdino, A., Moraes, L., Torres, F., Ulhoa, C., 2009. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Carbohydrate Research**, Vol. 344, No. 13, pp.1682–1686.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases, alpha and beta. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O (eds.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press. v. 1. pp. 149-158.
- Bhatti, H. N., Rashid, M. H., Nawaz, R., Asgher, M., Perveen, R., Jabbar, A. 2007. Optimization of Media for Enhanced Glucoamylase Production in Solid-State Fermentation by *Fusarium solani*. Enhanced Glucoamylase Production, **Food Technol. Biotechnol.** 45 (1) 51–56.
- Bhutto M. A., Umar D., Umar M. 2010. Effect of Alternative carbon and nitrogen sources on production of alpha-amylase by *Bacillus megaterium*. **World Applied Sciences Journal** (Special Issue of Biotechnology & Genetic Engineering):8- 85-90.
- Bıçak Ö., Ekmekçi Z. 2005. Polisakkaritlerin Flotasyonda Bastırıcı Olarak Kullanımı ve Soğurum Mekanizmaları. **Madencilik**. Cilt 44, Sayı 1, Sayfa 19-31.
- Bignell G.R., Bruce I.J., Evans I.H. 2000. Amylolytic enzymes of *Lipomyces starkeyi*: purification and size-determination. **Biotechnology Letters** 22: 1713-1718.
- Biazus J. P. M., Souza R. R, Márquez J. E. 2009. Production and Characterization of Amylases from *Zea mays* Malt. **Brazilian archives of Biology and technology** Vol.52, n. 4: pp. 991-1000.

- Balkan, B., Ertan, F., 2007. Production and Properties of alpha amylase from *Penicillium chrysogenum* and its Application in Starch Hydrolysis. Preparative. *Biochemistry and Biotechnology*, 35: 169–178.
- Bozkurt Uludağ Y. 2000. İmmobilize Glukoamilaz İle Maltodekstrinden Glukoz Üretimi. Gebze Yüksek Teknoloji ve Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-54.
- Brock, F. M., Forsberg, C. W., Buchanan-Smith, J. G. 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. **Applied and Environmental Microbiology** 44, 56 1-56.
- Cereia M., Guimarães L. H. S., Peixoto-Nogueira S. C., Jorge J. A., Terenzi H. F., Greene L. J., Polizeli M. L. T. M. 2006. Glucoamylase isoform (GAI) purified from a thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* 15.8 with biotechnological potential. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 5 (12), pp. 1239-1245.
- Ceska, M., Hultman, E., Ingelman, B. G. A. 1969. A new method for determination of α -amylase. **Experientia**. 25:555-6.
- Chazalet V., Debeauvais J. P., Sarfati J., Lortholary J., Ribaud P., Shah P., Cornet M., Vu Thien H., Gluckman E., Brücker G., Latgé J. P. 1998. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. **J. Clin. Microbiol**; 36: 1494-1500.
- Cichoke, A. J. 1999. The Complete Book of Enzyme Therapy. **Penguin**:492-37
- Cordeiro C.A.M., Martins M.L.L., Luciano A.B. 2002. Production and properties of α -amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology** 33: 57-61.
- Crabb W.D., Shetty J.K. 1999. Commodity scale production of sugars from starches. **Ecology and Industrial Microbiology**, 2: 252-256.
- Çeter, T., Pınar, N. M. 2009. Türkiye’de yapılan atmosferik fungus spor çalışmaları ve kullanılan yöntemler. **Asthma Allergy Immunol**, 7:3-10.

- Das K., Doley R., Mukherjee A. K. 2004. Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 40: 291-298.
- De Moraes L. M. P, Astolfi-Filho S., Ulhao C. J. 1999. Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein *Saccharomyces cerevisiae*. **World J Microbiol Biotechnol**;15:561-4.
- De Mot R., Verachtert H. 1987. Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. **Eur. J. Biochem.** 164: 643-654.
- Deb P., Talukdar S. A., Mohsina K., Sarker P. K., Abu Sayem SM,. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **Springer Plus.** 2:154.
- Demirkan E. 2010. Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. **Turk J Biol** 35 (2011) 705-712.
- Dhawale, M. R., Wilson, J. J., Khachatourians, G. G., Ingledew, W. M. 1982. Improved method for detection of starch hydrolysis. **Appl Environ Microbiol.** 44:747-50.
- Doran, J. 2000. Final Report for Screening of *Aspergillus niger* Strains Pulp Fermentations to Produce Fuel Ethanol. **Central Michigan University Office of Research and Sponsored Programs** 251 Foust Mt. Pleasant, MI 48859. Federal identification Number 38-6004447.
- Dubey A. K., Suresh C., Kavitha R., Karanth N. G., Umesh-Kumar S. 2000 Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme **FEBS Letters.** 471:251-255.
- Egelseer E., Schocher I., Sára M., Sleytr U. B., 1995. The s-layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high-molecular-weight amylase. **Journal of Bacteriology**, Vol. 177: p. 1444–1451, No. 6

- El-Fallal A., Abou Dohara M., El-Sayed A., Omar N., 2012. Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. Carbohydrates—Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. **Licensee InTech**. Chapter 21.
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu, B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus species*. **Process Biochemistry** 38: 615-620.
- Eriksen, S., Jensen, B., Olsen, J. 1998. Effect of N-linked glycosylation on secretion, activity and stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae*. **Curr. Microbiol.**, Vol. 37, No. 2, pp. 117-122.
- Fadahunsi I. F., Garuba O. E. 2012. Amylase Production by *Aspergillus flavus* Associated with the Bio-deterioration of Starch-Based Fermented Foods. **New York Science Journal**; 5(1).
- Farid M. A. F., Shata H. M. A. H., 2011. Amylase production from aspergillus oryzae LS1 by Solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of Wheat flour. **Iranian Journal of Biotechnology**, Vol. 9, No. 4.
- Fincan S. A., Enez B., 2014. Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. **Starch/Stärke**, 66, 182–189.
- Fontana, J. D., Gebara, M., Blumel, M., Schineider, H., Mackenzie, C. R., Fohnson, K. G. 1988. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.** 160: 560-571.
- Frolova G.M., Sil'chenko A.S., Pivkin M.V., Mikhalov V.V. 2002. Amylases of the fungus *Aspergillus flavipes* Associated with *Fucus evanescens*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Vol. 38, No. 2, pp. 134-138.
- Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94(6): 518-525.
- Fuwa H. 1954. A new method for micro determination of amylase activity by the use of amylose as substrate. **J Biochem.** 41:583-603.

- Gautam B., Karki T. B., Panta O. P. 2013. Optimization of Cultural Conditions for Solid State Fermentation of Amylase Production by *Aspergillus* species **Nepal Journal of Science and Technology** Vol. 14, No. 1 67-74.
- Ghasemi, M. F., Bakhtiari, M. R., Fallahpour, M., Noohi, A., Moazami, N., Amidi, Z. 2004. Screening of urease production by *Aspergillus niger* Strains. **Iranian Biomedical Journal**. 8 (1): 47-50.
- Gupta A., Gupta V. K, Modi D. R., Yadava L. P. 2008. Production and characterization of alpha amylase from *Aspergillus niger*. **Biotechnol.** 7(3): 551-556.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., Chauhan B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** 38: 1599-1616.
- Gupta A., Gautam N., Modi D. R., 2010. Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**. Vol. 1(1). pp. 001-008.
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M., Manresa, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 40-44.
- Halil E., Kalkancı A. 2008. Termofilik Mantarlar. **Çevre İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)**. 22 (2): 117-122.
- Hamer, R. J. 1995. Enzymes in the baking industry. In: Tucker G. A, Woods L. F. J., editors. Enzymes in food processing. **Galsgow: Blackie Academic and Professional**. 190-222.
- Hara, S., Fennell, D. I., Hesseltine, C. W. 1974. Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium and under UV light. **Applied Microbiology**, 27:1118-1123.
- Hegde S.V., Ramesha, A., Srinvas, C. 2011. Optimization of amylase production from an endophytic fungi *Discosia* sp. isolated from *Calophyllum inophyllum*. **Journal of Agricultural Technology** 2011 Vol. 7(3): 805-813.
- Hendriksen, H. V., Pedersen, S., Bisgard-Frantzen, H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. **Patent Application WO 99/35325**.

- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**;280:309–16.
- Henrissat, B. 1993. **Gene** 125,199-204.
- Hillier P., Wase D. A. J., Emery A. N., Solomons G. L. 1997. Instability of amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss. **Process Biochem**; 32: 51- 9.
- Hmidet, N., Nedra E. H. A., Nahed Z. F., Anissa H., Moncef N., Alya S.K., 2010. Chicken feathers: a complex substrate for the co-production of α -amylase and proteases by *Bacillus licheniformis* NH1. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 37: 983–990.
- Hofemeister, B., Konig, S., Hoang, V., Engel, J., Mayer, G., Hansen, G., Hofemeister, J.1994. The gene amyE (TV1) codes for a nonglucogenic α -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* 94-2A in *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 60, No. 9, pp. 3381-3389.
- Hollo, J., Szeitli, J. 1968. The reaction of starch with iodine. In: Rodley JA, editor. Starch and its derivatives, 4th ed. **Chapman & Hall**. 203-46.
- Hussain, I., F. Siddique, M.S. Mahmood, S.I. Ahmed, 2013. A review of the microbiological aspect of α -amylase production. **Int. J. Agric. Biol.**, 15: 1029–1034.
- Iefuji P, Chino M, Kato M, Iimura Y. 1996. Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. **Biochem J**.;318:989-96.
- Ikram-Ul-Haq, U. H., Mahmood, Z., Javed, M. M. 2012. Solid state fermentation for the production of α -amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. **Pak. J. Bot.**, 44: 341-346, Special Issue.
- Irfan, M., M. Nadeem, Syed Q. 2012. Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. **Journal of Cell and Molecular Biology** 10(1): 55-64.
- Janeček, Š. 2009. Amyolytic enzymes-focus on the Alpha-amylases from archaea and plants, **Nova Biotechnologica** 9-1.

- Jogezai, N., Raza, A., Abbas, F., Bajwa, M., Mohammad, D., Kakar, W., Saeed, M., Awan, A. 2011. Optimization of cultural conditions for microbial alpha amylase production. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**. Vol. 3(9), pp. 221-227.
- Juge N., Le Gal-Coëffet M.F., Furniss C.S.M., Gunning A.P., Kramhoft B., Morris V.J., Williamson G., Svensson B. 2002. The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis. **Biologia**, Bratislava, 57/Suppl. 11: 239-245.
- Kandra L. 2003. α -Amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure (Theochem)** 666–667.
- Kantarcioğlu, A. S., Yücel, A. 2003. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: mikoloji, Patogenez, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, Cilt 34 (3); sayfa 140-157.
- Karademir A., Akgül M., Tutuş A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). **KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi** 5(1).
- Karaoğlu M. M. Yüksek fruktozlu mısır şurubu. 2014. **Gıda Mühendisliği Dergisi** Sayı 33. Erzurum.
- Kathiresan, K., Manivannan, S. 2006. α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 5 (10), pp. 829-832.
- Kaur P., Vyas A. 2012. Characterization and optimal production of alkaline α -amylase from *Bacillus* sp. DLB 9. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 6(11), pp. 2674-2681.
- Khoo S. L., Amirul A. A., Kamaruzaman M., Nazalan N., Azizan M. N. 1994. Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. **Folia Microbiologica**. Volume 39, Issue 5, Pages 392-398.

- Kıran Ö. E., Çömlekçioğlu U. 2003. Zeytinli Iıcası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretim Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. **KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi** 6 (2).
- Kıran Ö. E., Çömlekçioğlu Dostbil U. N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. **KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi**, 9(1).
- Kobayashi T., Kanai H., Hayashi T., Akiba T., Akaboshi R., Horikoshi K. 1992. Haloalkaliphilic maltotriose-forming α -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. **J. Bacteriol.** 174(11): 3439-3444.
- Koç, Ö., Metin K. 2010. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by *Aspergillus flavus* HBF34. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 9(23), pp. 3414-3424, 7
- Kumar D., Yadav K. K., Muthukumar M. Garg N. 2013. Production and characterization of α -amylase from mango kernel by *Fusarium solani* NAMCC-F-02956 using submerged fermentation. **Journal of Environmental Biology** Vol.34, 1053-1058.
- Kusuda M., Nagai M., Hur T. C., Ueda M., Terashita T. 2003. Purification and some properties of α -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. **Mycoscience** 44: 311-317.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- Lin L. L., Chyau C. C., Hsu W. H. 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 28: 61-68.
- Maalej H., Hmidet N., Ghorbel-Bellaaj O., Nasri M., 2013. Purification and Biochemical Characterization of a Detergent Stable α -amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 18: 878-887.
- Marlida Y., Saari N., Hassan Z., Radu S. 2000. Raw starch-degrading enzyme from newly isolated strains of endophytic fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 16: 573-578.

- Martínez T. F., Alarcón F. J., Díaz-López M., Moyano F. J. 2000. Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. **Electrophoresis**: 21(14):2940-3.
- Matzke J., Schwermann B., Baker E. P., 1997. Acidostable and acidophilic proteins: the example of the α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Comp Biochem Physiol**. 118A:475–9.
- McDowall J. 2006. Protein of the Month-alpha-Amylase. **Available from:** http://www.ebi.ac.uk/interpro//potm/2006_2/Page1.htm (accessed March 30).
- McMahon H. E. M., Kelly C. T. & Fogarty W. M. 1999. High maltose-producing amylolytic system of a *Streptomyces* sp. **Biotechnology Letters** 21: 23-26.
- Mendu, D. R., Ratnam, B. V. V., Purnima, A., Ayyanna, C. 2005. Affinity chromatography of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**. 37 (2005) 712–717.
- Metin, K. 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), **Nobel Yayıncılık**, Sayfa 555-598, Ankara.
- Metin, K., Koç, O., Atelier, Z. B. B. Bıyık, H. H. 2010. Purification and characterization of amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62. **Afr. J. Biotechnol.** 9(45), 7692-7701.
- Mishra T., Ahluwalia S., Joshi M. 2014. Isolation and medium optimization for amylase producing bacterial strain isolated from potato field of Bhatinda, Punjab, India. **European Journal of Experimental Biology**, 4(3):588-594.
- Mobini-Dehkordi, M., Javan F. A. 2012 Application of alpha-amylase in biotechnology. **Review Article Journal of Biology and today's world**, volume 1, issue 1, pages: 39-50.
- Mohamed S. A., Almulaiky Y. Q., Ahmed Y. M., Al-Bar O. A., Ibrahim I. H. 2014. Purification and characterization of α -Amylase from Miswak *Salvadora persica*. **BMC Complement Altern Med.**, 14:119.
- Mohapatra B. R., Banerjee U. C., Bapuji M. 1998. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp.. **Journal of Biotechnology** 60: 113-117.

- Mojsov, K. 2012. Microbial α -Amylases and their industrial applications: A Review. **IJMIE** Volume 2, Issue 10, ISSN: 2249-0558.
- Møller, K., Sharif, M. Z., Olsson, L. 2004. Production of fungal α -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. **Journal of Biotechnology**. 111: 311-318.
- Moreira F. G., Lenartovicz V., Peralta R. M. 2004. A thermostable maltose-tolerant α -amylase from *Aspergillus tamarii*. **J. Basic Microbiol.** 44(1): 29-35.
- Moreira F. G., Lima F. A., Pedrinho S. R. F., Lenartovicz V., Souza C. G. M., Peralta R. M. 1999. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Revista de Microbiologia** 30: 157-162.
- Morita, H., Fujio, Y. 2000. Effect of Organic Nitrogen Sources on Raw Starch-Digesting Glucoamylase Production of *Rhizopus* sp. **MKU 40. Starch/Stärke** 52 Nr. 1, S. 18-21.
- Mrudula, S., Reddy G., Seenayya, G. 2011. Effect of substrate and culture conditions on the production of amylase and pullulanase by thermophilic *Clostridium thermosulfuregenes* SVM17 in solid state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, Vol 7(1), pp. 19-25.
- Mukesh kumar D. J., Andal Priyadharshini D., Suresh K., Saranya G. M., Rajendran K., Kalaichelvan P. T. 2012. Production, purification and characterization of α -amylase and alkaline protease by *Bacillus* sp. HPE 10 in a concomitant production medium. **Asian Journal of Plant Science and Research**, 2 (3):376-382.
- Naidu M. A, Saranraj P. 2013. Bacterial Amylase: A Review. **Int J Pharmaceutical & Biological Arch.** 4(2):274 – 287.
- Najafi M. F., Deobagkar D., Deobagkar D., 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification** 41:349–354.
- Najafi M. F. , Kembhavi A. 2005. One step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp. **Enzyme and Microbial Technology**. 36: 535-539.

- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2004. Enzymes. **Lehninger Principles of Biochemistry** (Nelson, D. L., Cox, M. M) W. H. Freeman, p. 190-249.
- Nguyen Q. D., Rezessy-Szabó J. M., Claeysens M., Stals I., Hoschke Á. 2002. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**. 31: 345-352.
- Niazi, M., Tehreema I., Romana T., Muhammad J. S., Humaira S., Syed Q. A., H. Ikram. 2010. α -amylase Production by *Bacillus licheniformis* under Solid State Fermentation Conditions and its Cross Linking with Metalosalts to Confer Thermostability. **Int. J. Agric. Biol.**, 12: 793–795.
- Nielsen J. E., Borchert T. V. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases. **Biochimica et Biophysica Acta** 1543: 253-274.
- Nugent A. P. 2005. Health properties of resistant starch. **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, 30: 27-54.
- Nwagu T. N., Okolo B. N., 2011. Growth profile and amylolytic activity of a thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. **Asian Journal of Biotechnology** 3 (1): 46-57.
- Odibo, F. J. C., Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Thermostable α - amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. **Acta Biotechnology**, 21(2):141-153, Germany.
- Okolo B. N., Ire F. S., Ezeogu L. I., Anyanwu C. U., Odibo F. J. C. 2000. Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. **J Sci Food Agric** 81: 329-336.
- Olufunke F. T., Azeez I. I. 2013. Purification and Characterization of Beta-Amylase of *Bacillus subtilis* Isolated from Kolanut Weevil, **Journal of biology and life science**. ISSN 2157-6076, vol. 4, No. 1.
- Omar, N., Abou-Dobara, M., El-Sayed, A. 2011. Studies on amylase produced by some actinomycetes, Lambert, **Academic publishing** ISBN 9783847334361, Germany.
- Omemu A. M., Akpan I. Bankole M. O., Temiola O. D. 2005. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal of Biotechnology** Vol. 4(1), pp.19-25.

- Ominyi Matthias C. 2013. Optimization of α -amylase and glucoamylase production from three fungal strains isolated from Abakaliki, Ebonyi State. **European Journal of Experimental Biology**,3(4):26-34.
- Ozcan B. D., Baylan M., Ozcan N., Tekdal D.,2010. Characterization of Thermostable α -amylase from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate DM-15. **Research Journal of Biological Sciences**. Volume: 5(1): 118-124.
- Oziengbe, E. O., Onilude, A. A. 2012. Production of a thermostable α -amylase and its assay using *Baillus licheniformis* isolated from excavated land sites in Ibadan, Nigeria. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, 5(1): 132 –138.
- Parker, K., Salas, M., Nwosu, V. C. 2010. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. 5(5): 71 – 78.
- Pasin T. M., Benassi V. M., Moreira E. A, Jorge J. A., Polizeli M. L. T. M. 2014. Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions. **British Biotechnology Journal** 4(4): 482-498.
- Peixoto S. C., Jorge J. A., Terenzi H. F. Polizeli M. L. T. M. 2003. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int Microbiol**. 6: 269-273.
- Pereira, C. I., Crespo, M. T. B., Romao, M. V. S. 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. **International Journal of Food Microbiology**. 68: 211-216.
- Perten, H. 1984. A modified falling number method suitable for measuring both cereal and fungal α -amylase activity. **Cereal Chem**.61:108-11.
- Petrova S. D., Ilieva S. Z., Bakalova N. G., Atev A. P., Bhat M. K., Kolev d.n. 200). Production and characterization of extracellular α -amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). **Biotechnology letters** 22: 1619-1624.
- Prakasham R. S., Subba Rao C. H., Sreenivas Rao R., Sarma P. N., 2007. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology** 102:204–211.

- Prasanna, K. L., Raju, K. J. 2012. Production of l-glutaminase by *Aspergillus oryzae* NCIM 1212 under solid state fermentation using agro – residues. *J. Chem. Bio. PHy. Sci. Sec.* Vol.2, No.1, 261.
- Primarini D., Ohta Y. 2000. Some enzyme properties of raw starch digesting amylases from *Streptomyces* sp. No. 4. **Starch/Stärke** 52: Nr. 1, S. 28-32.
- Puri S., Arora M, Sarao L. 2013. Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**; 3(3): 83-88.
- Rajagopalan, G., Krishnan, C., 2008. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresour. Technol.**, 99, 3044–3050.
- Ratanakhanokchai K, Kaneko J, Kamio Y, Izaki K. 1992. Purification and properties of a maltotetraose- and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58: 2490–2494.
- Ratnasri P. V, Lakshmi B. K. M, Ambika Devi K., Hemalatha K. P. J. 2014. Isolation characterization of *Aspergillus fumigatus* and optimization of cultural conditions for amylase production. **IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology**.ISSN: 2319-1163.
- Ray R. C., Kar S., Nayak S., Swain M. R. 2008. Extracellular α -Amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521, **Food Biotechnology**, Vol. 22:234–246. No. 3.
- Reddy N. S., Nimmagadda A., Sambasiva Rao K. R. S. 2003. An overview of the microbial α -amylase family. **African Journal of Biotechnology** Vol. 2 (12), pp. 645-648.
- Reilly P. J. 1999. Protein Engineering of Glucoamylase to Improve Industrial Performance – A Review. **Starch/Stärke** 51 Nr. 8-9, S. 269-274.
- Renge V. C., Khedkar S. N. V., Nandurkar. R. 2012. Enzyme Synthesis By Fermentation Method: A Review. **Sci. Revs. Chem. Commun.**: 2(4), 2012, 585-590.

- Roheena Abdullah, I., Javid M. Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by wild and mutant strain of *Aspergillus oryzae* in stirred fermenter. **Pak. J. Bot.**, 43(1): 715-723, 2011.
- Saha K., Maity S., Roy S., Pahan K., Pathak R., Majumdar S., Gupta S. 2014. Optimization of Amylase Production from *B. amyloliquefaciens* (MTCC 1270) Using Solid State Fermentation. **International Journal of Microbiology** Volume 2014, Article ID 764046, 7 pages.
- Sahnoun M., Bejara S., Sayaria A., Triki M. A., Kriaaa M., Kammouna R. 2012. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from anewly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process Biochemistry** 47:18–25.
- Sajilata M. G., Singhal R. S., Kulkarni P. R. 2006. Resistant Starch—A Review **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety** Vol. 5.
- Salt, W. B., Schenker, S. 1976. Amylase-its clinical significance: a review of the literature. **Medicine**, 55, 269-289.
- Sandstedt R. M, Kneen E, Blish M. J.1939. A standardised Wohlgemuth procedure for a-amylase activity. **Cereal Chem.**16:712-23.
- Sani I., Abdulhamid A., Bello F., Yahaya M., Bagudo A. I. 2014. Isolation, partial purification and characterization of α -amylase from *Bacillus subtilis*. **J. Microbiol. Biotech. Res.**,4 (1):49-54.
- Sankaralingam S., Shankar T., Ramasubburayan R. 2012. Optimization of culture conditions for the production of amylase from *Bacillus licheniformis* on submerged fermentation. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences**. 11/2012; 12(11):1507-1513.
- Satheesh kumar G., Subhosh Chandra M., Mallaiah K. V., Sreenivasulu P., Choi Y. 2010. Purification and Characterization of Highly Thermostable α -amylase from Thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 15: 000-000.
- Sauer J., Sigurskjold B. W., Christensen U., Frandsen T. P., Mirgorodskaya E., Harrison M., Roepstorff P., Svensson B. 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta** 1543: 275-293.

- Ševčík J., Hostinová E., Solovicová A., Gašperik J., Dauter Z., Wilson K. S. 2006. Structure of the complex of a yeast glucoamylase with acarbose reveals the presence of a raw starch binding site on the catalytic domain. **FEBS Journal** 273: 2161-2171.
- Shafiei M., Ziaee A., Amoozegar M. A. 2012. Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. **Extremophiles**.16:627–635.
- Shah I. J., Gami P. N., Shukla R. M., Acharya D. K. 2014. Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. **Basic Research Journal of Microbiology** ISSN 2354-4082 Vol. 1(4) pp.
- Sharma A., Satyanarayana T. 2013. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. **Process Biochemistry**. 48: 201–211.
- Shaw J. F., Lin F. P., Chen S. C., Chen H. C. 1995. Purification and Properties of An Extracellular α -amylase from *Thermus* sp. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 36: 195-200.
- Shenoy B. C., Katwa L. C., Appu Rao A. G., Raghavendra Rao M. R. 1985. Fungal glucoamylases. **J. Biosci.**, Vol. 7, Numbers 3 & 4, pp. 399-419.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y. 2009. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. **Current Opinion in Structural Biology**, Vol. 19, No. 5, pp. 524–533.
- Shih N. J., Labbe R. G. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* Type A. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 61, No. 5 p. 1776-1779.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. R., Pandey A. 2006. α -Amylases from Microbial Sources-An Overview on Recent Developments. **Food Technol. Biotechnol.** 44(2): 173-184.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. R., Pandey A. 2007. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state. **Journal of Scientific & Industrial Research**. Vol. 66, pp. 621-626.

- Sindhu, M. K., Singh B. K., Prased, T. 1997. Changes in starch content of anhar seed due to fungal attack. **In. Phytopathol.** 34, 269-271.
- Sindhu R., Suprabha G. N., Shashidhar S. 2009. Optimization of process parameters for the production of α - amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 3(9) pp. 498-503.
- Singh B., Satyanarayana T. 2008. Phytase production by *Sporotrichum thermophile* in a cost-effective cane molasses medium in submerged and its application in bread. **Journal of Applied Microbiology** ISSN 1364-5072.
- Singh R. K., Mishra S. K., Kumar N. 2010. Optimization of α -amylase production on agriculture byproduct by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.**ISSN: 0975-8585.
- Singh S., Cheema S. K., Kaur B., Mann N. K. 2013. Sorbitol: An Enhancer of Growth and Alpha-amylase Production for *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 Using Wheat Bran as Substrate. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research.** ISSN 2231-1238, Volume 4, Number 6 (2013), pp. 555-560.
- Sills, A., Sauder, M., Stewart, G. 1984. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castelli* . **J Inst Brew.**, Vol. 90,pp. 311-314.
- Souza P. M., Magalhães P. D. O. 2010. Application of microbial α -amylase in industr -A review. **Braz. J. Microbiol.** 41:850-861.
- Spendler, T., Jorgensen, O. 1997. Use of a branching enzyme in baking. Patent Application WO97/41736. **Starch/Stärke**, 66, 182–189.
- Sudha. 2012. Effect of different concentrations of metal ions on alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Research in Biotechnology**, 3(4): 67-71.
- Suganthi R., Benazir J. F., Santhi R., Ramesh Kumar, V., Hari A., Meenakshi N., Nidhiya, K. A., Kavitha, G., Lakshmi, R. 2011. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST).** Vol. 3 No.:1756-1763.

- Sundar R., Liji.T, Rajila.C, Suganyadevi P. 2012. Amylase production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation using *Ipomoea batatas*. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology** page 175-182.
- Sundarram A., Pandurangappa T., Murthy K. 2014. α -Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, Vol. 2, No. 4, 166-175.
- Sunitha. V. H., Ramesha. A., Savitha. J., Srinivas. C. 2012. Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (haw.) Roscoe. **Brazilian Journal of Microbiology**: 1213-1221.
- Sutthirak P., Dharmsthiti S., Lertsiri S. 2005. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry** 40: 2821-2826.
- Syu, M., Chen., Y. H. 1997. A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Chemical Engineering journal**. 65, 237-247.
- Şimşek T. 2006. Türkiye'nin değişik bölgelerinden termostabil alfa amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin izolasyonu karakterizasyonu ve Alfa amilaz geninin klonlanması. Yüksek Lisans Tezi.
- Tatar S. 2007. Termofil moderately halofilik *Bacillus* sp. Suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması Adana, Yüksek Lisans Tezi.
- Teather, R. M. and Wood, P. J. 1982. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 777-780 Vol. 43, No. 4.
- Teodoro C. E. S., Martins M. L. L. 2000. Culture Conditions For The Production Of Thermostable Amylase By *Bacillus* Sp. **Braz. J. Microbiol.** vol.31 no.4
- Tiwari, K. L., Jadhav, S. K., Fatima, A. 2007. Culture condition for the production of Thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. **Global Journal of Biotechnology&Biochemistry** 2 (1). 21-24.

- Tran-Dinh, N., Pitt, J. I, Carter, D. A. 1999. Molecular Genotype Analysis of Natural Toxigenic and Nontoxigenic Isolates of *Aspergillus flavus* and *A. Parasiticus*. **Food Science Australia**, 11:1485–1490.
- Tripathy, S. S., Dash, S., Gupta, N. 2011. Screening&Selection Of Some Fungi For Production Of Extracellular Amylase. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**. Vol. 1 (4): pp.131-136.
- Tunail, N., 2000. Funguslar ve Mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. **Sim Matbaası**, Ankara 522 s., 03. Bölüm, 13. Kısım.
- Ueno S., Miyama M., Ohashi Y., Izumiya M., Kusaka I. 1987. Secretory enzyme production and conidiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. **Appl Microbiol Biotechnol**;26:273-6.
- Usha B. Hemalatha K. P. J. 2011. Purification of α -amylase from germinating little millets (*Panicum sumatrense*). **Journal of pharmacy research**, Volume 2011; 4(5): 1370–1371.
- Vahidi H., Shafagi B., Mirzabeigi Z. 2005. Culture medium optimization of α -amylase producing organism *Mucor* spp. Using the variable size-simplex algorithm. **Daru** Volume 13, No. 1.
- Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uidehaag, J. C. M., Leembius, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. 94, 137-155.
- Varalakshmi K. N. Kumudini B. S, Nandini B. N, Solomon J, Suhas R, Mahesh B, Kavitha A.P. 2009. Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. **Pol J Microbiol.**;58(1):29-36.
- Vasanth R., Hemashenpagam N. 2012. Production and medium optimization of amylase by *Bacillus* using fermentation methods. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research: volume 2 : issue 4**.
- Vengadaramana, A., Balakumar, S., Arasaratnam V. 2012. Production and Optimization of α -amylase by *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 in Lab Bench-Scale Fermenter. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, 2 (1):190-211.

- Vihinen, M., Mantsala, P. 1989. Microbial amyolytic enzymes. **Crit Rev Biochem Mol Biol.**, Vol. 24, No. 4, pp. 329-418.
- Wardi, A., Michos, G. 1972. Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis. **Anal. Biochem.**, Vol. 49, No. 2, pp. 607-609.
- Wanderley, K. J., Torres, F. A. G., Moraes, L. M. P., Ulhoa, C. J. 2004. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters** 231:165-169.
- Williamson M. P., Le Gal-Coëffet M. F., Sorimachi K., Furniss C. S. M., Archer D. B., Williamson G. 1997. Function of Conserved Tryptophans in the *Aspergillus niger* Glucoamylase 1 Starch Binding Domain. **Biochemistry** 36: 7535-7539.
- Wiseman, A. 1987. The Application of Enzymes in Industry. **Handbook of Enzym Biotechnology**. John Wiley Sons, p:274-373, New York.
- Yamane, K., Yamaguchi, K., Maruo, B. 1973. Purification and properties of a crossreacting material related to α -amylase and biochemical comparison with parental α - amylase. **Biochim Biophys Acta.**, Vol. 298, No. 2, pp. 295-323.
- <http://biyokure.org/protein-saflastirmada-cokturme-yontemleri/1782/>
- http://www.brabender.com/fileadmin/dateien/gb/download/nahrungsmittel/download/Veroeffentlichungen/T_Calculable_Dough_Qualities_2012_1.pdf
- http://www.novozymes.com/en/aboutus/brochures/Documents/Enzymes_at_work.pdf
- <http://www.usf.org.tr/TR/belge/1-305/una-dair-hersey.html>

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Öznur KOÇ
Doğum Yeri ve Tarihi : Pertek/22.01.1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

1. **Öznur Koç** and Kubilay Metin, Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by *Aspergillus flavus* HBF34, African Journal of Biotechnology Vol. 9(23), pp. 3414-3424, 7 June, 2010.
2. Kubilay Metin, **Öznur Koç**, Z. Burcu Bakir Ateşlier and H. Halil Bıyık, Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62, African Journal of Biotechnology Vol. 9(45), pp. 7692-7701, 8 November, 2010.

b) Ulusal Bildiriler

- M. Balkaya, H. Bıyık, E. Oryaşın, **Ö. Arat**, H. Ünsal (2005): Asetilkolin ve epinefrinin bakteriler ve protozoonlar üzerine etkileri: ilk bulgular, XXXI Ulusal Fizyoloji Kongresi Kitapçığı, 272
- Arat Ö.**, Öztürk T., Metin K. (2006): *Aspergillus flavus* HBF34"ün ekstrasellular glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi., 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kitapçığı, 204.
- Ateşlier Z.B.B., **Arat Ö.** ,Öztürk T., Bıyık H.H., Metin K. (2006): Farklı kaynaklardan izole edilen funguslarda lipolitik, amilolitik ve proteolitik enzimlerinin taranması, 18.Ulusal Biyoloji Kongresi Kitapçığı, 208.
- Ateşlier Z.B.B., Başbülbul G., Bozdoğan B., Metin K., Oryaşın E., **Arat Ö.**, Bıyık H. (2007): Lipolitik aktiviteye sahip termofilik bakterilerin 16S rRNA analizi ile tanılanması, Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, Malatya.

Metin K., Kiral F., Güçlü Ö., **Koç Ö.**, Türkozan O.(2007): MAUREMYS RIVULATA (VALENCIENNES, 1833)'NIN kan parametrelerindeki mevsimsel değişiklikler, Konya

E. Poyrazoğlu Çoban, **Ö. Koç**, H.H. Bıyık, K. Metin,(2007):*Aspergillus niger* HBF40 ve *Trichoderma* sp. HBF 110 Funguslarından Elde edilen selüloz enzimi ile Bakteriyal selülozun hidrolizi, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Kitapçığı, Antalya.

Ö. Koç, K. Metin,(2007): *Aspergillus flavus* HBF34 tarafından üretilen Glukoamilazın karakterizasyonu, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Kitapçığı, Antalya.

H.H. Bıyık, E. Kalmış, G. Başbülbul, T. Yonar, F. Kalyoncu, E. Oryaşın, **Ö. Koç**, (2008): Toprakta izole edilen bazı fungal organizmaların tekstil boyalarında renk giderimi potansiyellerinin araştırılması,19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon.

K. Metin, **Ö. Koç**, Ateşlier Z.B.B. H.H. Bıyık,(2008): *Penicillium citrinum* HBF 62 Ekstrasellüler α -amilazının karakterizasyonu, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon

Ateşlier Z.B.B., **Ö. Koç**, K. Metin, H.H. Bıyık,(2008): *Aspergillus foetidus* HBF55 ekstrasellüler lipazının karakterizasyonu,19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon.

Ö. Koç, E. Oryaşın, A. Şahiner, H.H. Bıyık,(2008): Aydın il merkezi sınırları içerisinde bulunan bazı ilköğretim okullarının bina içi ve bina dışı havasının fungus yoğunluğunun belirlenmesi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon.

A.Avcı, E.P. Paksuz, Ç. Ilgaz, N. Üzüm, **Ö. Arat**, K. Olgun (2008); Türkiye’de yayılış gösteren *Eirenis* ve *Rhynchocalamus* cinslerine ait bazı türlerin kan hücre morfolojisi ve eritrosit büyüklükleri, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon.

Katıldığı Projeler

Türkozan O., Metin K., Kiral F.K., Koca Y., Kiremit F., Avcı A., **Koç Ö.**, Türkiye’de yaşayan bazı kara ve su kaplumbağalarının plazma biyokimyasal parametreleri ve kan hücre morfolojisinin incelenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU FEF 04004, AYDIN, TÜRKİYE, 2004-2006.

- Metin K., **Koç Ö.**, Bıyık H.H., Ateşlier Z.B.B., Başbülbul G., *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 05010, AYDIN, TÜRKİYE, 2005-2006 .
- Metin K., **Koç Ö.**, Bıyık H.H., Ateşlier Z.B.B., Farklı kaynaklardan izole edilen fungusların lipolitik ve amilolitik enzimlerinin taranması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 06016, 2006-2008 .
- Metin K., Bıyık H.H., Başbülbul G., Ateşlier Z.B.B., **Koç Ö.** Termofilik bakterilerden bakteriyosin ve lipolitik enzim üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu, TÜBİTAK Projesi-106T581, ANKARA, TÜRKİYE, 2007-2009 .
- Önenç A., Metin K., Taşkın T. , Kayaardı S., Kırıl F.K., Akşit H., Ateşlier Z.B.B., **Koç Ö.** ,Türkiye'de yaygın olarak kesilen sığır ve koyun ırklarının karkas ve et kalitelerinin Avrupa Birliğinde uygulanan EUROP sınıflandırma sisteminde tanımlanması üzerine bir araştırma, TÜBİTAK Projesi-106O722, ANKARA, TÜRKİYE, 2007-2009 .
- Metin K., **Koç Ö.**, Ateşlier Z.B.B., *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretim koşullarının optimizasyonu, saflaştırılması ve aktivitesi üzerine çeşitli çözücülerin etkisinin incelenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 2008-2010.
- Bıyık H.H., **Koç Ö.**, Oryaşın E., Şahiner A., Aydın il merkezi sınırları içerisinde bulunan bazı ilköğretim okullarının ev içi ve ev dışı havasının fungus yoğunluğunun belirlenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF-07015, 2007-2009.
- Bıyık H.H., Kalmış E., Başbülbul G., Yonar T., Kalyoncu F., Oryaşın E., **Koç Ö.**, Toprakтан İzole Edilen Bazı Fungal Organizmaların Tekstil Boyalarında Renk Giderimi Potansiyellerinin Araştırılması, TÜBİTAK 104Y393, 2008.

İŞ DENEYİMİ

- Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :Adnan Menderes Üniversitesi /2004-2010
Milli Eğitim Bakanlığı –Ardahan/ 2010-2012
Milli Eğitim Bakanlığı-Aydın/ 2012-

İLETİŞİM

E-posta Adresi : oarat2001@yahoo.com.

Tarih :