

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
BİY-YL-2011-0002

*Aspergillus sp.* TARAFINDAN ÜRETİLEN AMİLAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Ahsen UÇAR

Tez Danışmanı:  
Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN

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

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ahsen UÇAR tarafından hazırlanan “*Aspergillus sp.* Tarafından Üretilen Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı tez, 01.02.2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye	: Doç. Dr. H. Halil BIYIK	ADÜ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (tezin türü) tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... Sayılı kararıyla (tarih) tarihinde onaylanmıştır.

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

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.

14/01/2011

İmza

Ahsen UÇAR

**ÖZET*****Aspergillus sp.* TARAFINDAN ÜRETİLEN AMİLAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Ahsen UÇAR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN  
2011, 111 sayfa

*Aspergillus fumigatus* HBF50 suşu tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz ultrafiltrasyon, DEAE sepharoz CL-6B, fenil sepharoz CL-4B, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografi teknikleri kullanılarak 3.0 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 55 kDa olarak bulundu.  $\alpha$ -Amilazın optimum pH'sı 5.0 ve optimum sıcaklığı 55°C olarak saptandı. Enzimin 25 ve 40°C'lerde ve pH 4.0 ile 8.0 aralığında stabil olduğu belirlendi.  $\alpha$ -Amilazın çözünür patates nişastası için  $V_{max}$  9091 U/mL,  $K_m$  ise 1.55 mg/mL olarak hesaplandı.  $\alpha$ -Amilazın geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu saptandı.  $Mn^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  iyonları  $\alpha$ -amilaz aktivitesini kuvvetli bir şekilde aktive ederken,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları enzimi inhibe etti. NBS, PMSF, İAA ve CMC enzimi inhibe ettiği, bu yüzden triptofan, serin ve histidin kalıntıları ve karboksil gruplarının enzimin katalitik sürecinde önemli rol oynadığı ileri sürülebilir. Amilaz aktivitesinin 5 M tuz konsantrasyonlarına kadar toleranslı olduğu saptandı. Enzimin ham mısır nişastasına adsorbsiyonu % 48 olarak bulundu. Enzimatik hidroliz ürünlerinin ince tabaka kromatografisi sonucunda glikoz, maltoz ve maltotrioz saptandı ve bu sonuçlar enzimin  $\alpha$ -amilaz olduğunu gösterdi.

**Anahtar Sözcükler:** *Aspergillus fumigatus*, amilaz, saflaştırma, karakterizasyon

**ABSTRACT****PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE ENZYME  
PRODUCED BY *Aspergillus sp.***

Ahsen UÇAR

MSc Thesis, Department of Biology Sciences

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Kubilay METIN

2011, 111 pages

The extracellular amylase produced by *Aspergillus fumigatus* HBF50 was purified 3.0 folds using ultrafiltration, DEAE sepharose CL-6B, phenyl sepharose CL-4B and gel filtration chromatography. The molecular weight of amylase was estimated to be about 55 kDa by SDS-PAGE. The temperature and pH for optimum activity of the enzyme were 55°C and 5.0, respectively. It was completely thermostable between 27°C and 40°C. It was found to be stable pH range between 4.0 and 8.0. Km and Vmax values for soluble starch of the enzyme were calculated to be 1.55 mg/ml and 9091 U/mL, respectively. The amylase exhibited broad substrate specificity. The enzyme was stimulated by Mn<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> and strongly inhibited by Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> ve Hg<sup>2+</sup>. The enzyme activity was inhibited in the presence of NBS, PMSF, IAA and CMC, suggesting that tryptophan, serine, histidine residues and carboxyl groups play an important role in the catalytic process. The activity of amylase was found to be tolerant up to 5M NaCl concentration. Raw corn starch adsorption of amylase was found to be 48%. Thin layer chromatography of the starch hydrolysis products showed glucose, maltose and maltotriose as the main end products, indicating that the purified enzyme was α-amylase.

**Key words:** *Aspergillus fumigatus*, amylase, purification, characterization.



## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında, sahip olduğu bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, araştırmalarım sırasında beni yönlendiren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda kullandığım mikroorganizmaların temininde bana yardımcı olan saygı değer hocam Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Öznur KOÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan arkadaşım Gurbet ASLAN'a teşekkür ederim. Tezimin tüm aşamalarında benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bu günlere gelmemin en önemli nedeni olan annem Hacer KARAYER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin tüm aşamalarında yanımda olan ve birlikte gülüp birlikte ağladığım değerli arkadaşım Güler Tuğba GÖKÇEK'e sevgi ve saygılarımı sunarım.





## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamadaki Önemi .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Amilazlar .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1. Endoamilazlar .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2. Ekzoamilazlar .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3. Dallanma Kırıcı Enzimler .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.4. Transferazlar .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Nişasta .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. <math>\alpha</math>-Amilazların Kullanım Alanları .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.1. Alkol ve Bira Üretiminde .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2. Nişasta Sıvılaştırılmasında .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.3. Ekmek Sanayiinde.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.4. Tekstil Sanayiinde .....</b>	<b>11</b>

1.4.5. Kâğıt Sanayiinde .....	11
1.4.6. Meyve Suyu Endüstrisinde .....	11
1.5. <i>Aspergillus</i> .....	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	14
3. MATERYAL ve METOD .....	19
3.1. Kimyasallar .....	19
3.2. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi.....	19
3.3. Aflatoksin Testi .....	20
3.4. Sporulasyon ve İnokulum Miktarının Belirlenmesi.....	21
3.4.1. Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı.....	21
3.5. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin Fermentasyonu .....	22
3.6. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi.....	23
3.7. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin Amilaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	24
3.7.1. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	24
3.7.2. Amilaz Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi .....	24
3.8. Enzimin Saflaştırılması .....	24
3.8.1. İyon Değişirme Kromatografisi .....	25
3.8.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi .....	26
3.8.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi .....	27
3.9. Elektroforez ve Zimografi.....	28
3.9.1. $\alpha$ -Amilazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi .....	28

<b>3.9.2. SDS-PAGE ve Zimografi İçin Gerekli Çözeltiler .....</b>	<b>28</b>
<b>3.9.3. Yöntem .....</b>	<b>30</b>
<b>3.9.3.1. Jelin hazırlanışı.....</b>	<b>30</b>
<b>3.9.3.2. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı .....</b>	<b>31</b>
<b>3.9.3.3. Jelin boyanması .....</b>	<b>32</b>
<b>3.9.4. Zimografi .....</b>	<b>32</b>
<b>3.10. Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....</b>	<b>32</b>
<b>3.11. Maltoz Standardı.....</b>	<b>34</b>
<b>3.12. Fermentasyon Ortamının Redüktör Şeker Tayini .....</b>	<b>35</b>
<b>3.13. Protein Tayini.....</b>	<b>35</b>
<b>3.13.1. Coomassie Brilliant Blue G250 Çözeltisinin Hazırlanışı .....</b>	<b>36</b>
<b>3.13.2. Standart Protein Çözeltisinin Hazırlanışı.....</b>	<b>36</b>
<b>3.13.3. Yöntem.....</b>	<b>36</b>
<b>3.14. İnkübasyon Süresinin Etkisi .....</b>	<b>36</b>
<b>3.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....</b>	<b>37</b>
<b>3.16. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....</b>	<b>37</b>
<b>3.17. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....</b>	<b>38</b>
<b>3.18. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....</b>	<b>38</b>
<b>3.19. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....</b>	<b>39</b>
<b>3.20. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi.....</b>	<b>39</b>
<b>3.21. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....</b>	<b>40</b>
<b>3.22. Enzimin Tuz Toleransı.....</b>	<b>42</b>

3.23. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi .....	42
3.24. Ham Nişasta Adsorpsiyonu.....	44
3.25. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) .....	44
3.26. Verilerin Değerlendirilmesi .....	45
4. BULGULAR .....	46
4.1. Fungusların Amilolitik Taranması, Aflatoksin Testi ve Seçimi.....	46
4.2. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi.....	48
4.3. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi .....	50
4.4. Enzimin Saflaştırılması .....	52
4.5. Elektroforez ve Zimografi.....	58
4.6. Maltoz Standardı .....	60
4.7. Protein Tayini.....	60
4.8. İnkübasyon Süresinin Etkisi .....	61
4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	62
4.10. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	64
4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	67
4.12. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	69
4.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	72
4.14. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi .....	74
4.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	76
4.16. Enzimin Tuz Toleransı.....	80
4.17. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi .....	81

4.18. Ham Nişasta Adsorpsiyonu .....	85
4.19. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) .....	85
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	87
5.1. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi .....	87
5.2. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi .....	88
5.3. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi .....	89
5.4. Enzimin Saflaştırılması .....	89
5.5. Elektroforez ve Zimografi .....	90
5.6. İnkübasyon Süresinin Etkisi .....	91
5.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	91
5.8. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	92
5.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	93
5.10. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	94
5.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	95
5.12. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi .....	96
5.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi .....	96
5.14. Enzimin Tuz Toleransı .....	98
5.15. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi .....	99
5.16. Ham Nişasta Adsorpsiyonu .....	100
5.17. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) .....	101
KAYNAKLAR .....	104
ÖZGEÇMİŞ .....	111



**KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ**

%	Yüzde
$\mu$	Mikron
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
$\mu$ m	Mikrometre
$\mu$ M	Mikromolar
M	Molar
mM	Milimolar
N	Normal
$\mu$ mol	Mikromol
g	Gram
mg	Miligram
cm	Santimetre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
mm <sup>3</sup>	Milimetre küp
kDa	Kilodalton
mbar	Milibar
psi	Basınç birimi (pound/inchkare)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
[S]	Substrat Konsantrasyonu
°C	Derece Santigrad
dk	Dakika
g	Yer çekimi ivmesi
Ort	Ortalama
S.H.	Standart hata
OD	Optik yoğunluk
R <sup>2</sup>	Tamamlayıcılık katsayısı

HBF	Halil Bıyık Fungus
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
pH	H <sup>+</sup> iyonu konsantrasyonu
SH grubu	Sülfidril grubu
DNS	Dinitro salisilik asit
TEMED	Tetrametil etilen diamin
EDTA	Etilen diamintetra asetik asit
TLC	İnce tabaka kromatografisi
IU	Uluslar arası enzim ünitesi
U	Enzim Ünitesi
V <sub>max</sub>	Maksimum enzim aktivitesi
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten sabiti
β	Beta
α	Alfa
GA	Glukoamilaz
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Amilolitik enzimlerin sınıflandırılması .....	4
Şekil 4.1. Amilolitik aktivitenin taranması.....	47
Şekil 4.2. Aflatoksin testi .....	48
Şekil 4.3. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin büyüme eğrisi ve kültür ortamının pH değişimi.....	49
Şekil 4.4 <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin kültür ortamındaki redüktör şeker ve enzim aktivite değişimi .....	50
Şekil 4.5. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	51
Şekil 4.6. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin amilaz üretimi üzerine pH'nın etkisi.....	51
Şekil 4.7. İyon değişim kromatografisi (DEAE sepharoz CL-6B) .....	55
Şekil 4.8. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (Fenil sepharoz CL-4B).....	56
Şekil 4.9. Jel filtrasyon kromatografisi (Sefadex G-100) .....	57
Şekil 4.10. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının zimografi ve elektroforez görüntüleri. ....	59
Şekil 4.11. SDS-PAGE protein standart eğrisi .....	59
Şekil 4.12. Maltoz standart eğrisi .....	60
Şekil 4.13. Protein standart eğrisi .....	61
Şekil 4.14. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	62
Şekil 4.15. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	63
Şekil 4.16. $\alpha$ -Amilazın farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite yüzdesi.....	66
Şekil 4.17. $\alpha$ -Amilazın 1 günlük geride kalan aktivite yüzdesi .....	67
Şekil 4.18. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi .....	68
Şekil 4.19. $\alpha$ -Amilazın farklı pH'lardaki (pH 4.0-8.0) stabilitesi .....	71
Şekil 4.20. $\alpha$ -Amilazın farklı pH'lardaki (pH 4.0-8.0) stabilitesi .....	71
Şekil 4.21. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafiği) .....	73
Şekil 4.22. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine çözümlü patates nişasta konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği).....	73
Şekil 4.23. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine Mn, Ba, Ca, Co ve Zn iyonlarının etkisi.....	78
Şekil 4.24. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine Ni, Mg, Li, K, NH <sub>4</sub> , Na ve Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> iyonlarının etkisi .....	78
Şekil 4.25. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine Fe, Hg, Al ve Cu iyonlarının etkisi .....	79
Şekil 4.26. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi .....	79
Şekil 4.27. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisi .....	80
Şekil 4.28. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatürantların etkisi .....	84

Şekil 4.29. $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatürantların etkisi .....	84
Şekil 4.30. Nişastanın enzimatik hidrolizi .....	86

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	1
Çizelge 3.1. <i>A. fumigatus</i> HBF50 fermentasyon ortamı.....	23
Çizelge 3.2. % 10'luk ayırma jelinin içeriği.....	31
Çizelge 3.3. % 5'lik ayırma jelinin içeriği .....	31
Çizelge 3.4. Standart deney ortamı .....	33
Çizelge 3.5. DNS çözeltilisinin bileşenleri.....	33
Çizelge 3.6. Redüktör şeker miktarının ölçümü .....	34
Çizelge 3.7. Fermentasyon ortamının redüktör şeker miktarının tayini.....	35
Çizelge 3.8. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi .....	37
Çizelge 3.9. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için kullanılan deney ortamı .....	38
Çizelge 3.10. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı .....	40
Çizelge 3.11. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı .....	41
Çizelge 3.12. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı .....	41
Çizelge 3.13. 1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.....	43
Çizelge 3.14. 5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.....	43
Çizelge 4.1. Fungusların kalitatif amilolitik tarama ve aflatoksin test sonuçları.....	47
Çizelge 4.2. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin fermentasyon ortamında zamana bağlı redüktör şeker, enzim aktivitesi, pH ve biomass değişimi .....	49
Çizelge 4.3. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının saflaştırılması.....	54
Çizelge 4.4. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi .....	61
Çizelge 4.5. <i>A. fumigatus</i> HBF50'nin $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	63
Çizelge 4.6. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi .....	65
Çizelge 4.7. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite yüzdesi .....	66
Çizelge 4.8. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	68
Çizelge 4.9. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının farklı pH'lardaki stabilitesi.....	70
Çizelge 4.10. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının farklı pH'larda geride kalan aktivite yüzdesi .....	70
Çizelge 4.11. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine substrat (çözünür nişasta) konsantrasyonunun etkisi .....	72
Çizelge 4.12. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının substrat spesifitesi .....	75
Çizelge 4.13. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi .....	77

Çizelge 4.14. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının tuz toleransı	80
Çizelge 4.15. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki inhibitörler ve denatürantların etkisi .....	83
Çizelge 4.16. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki inhibitörler ve denatürantların etkisi .....	83
Çizelge 4.17. <i>A. fumigatus</i> HBF50 $\alpha$ -amilazının farklı nişasta kaynaklarına adsorbsiyon oranı.....	85

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamadaki Önemi

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörlerdir. Enzimler, hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü kendisi değişikliğe uğramadan düzenleyebilir. Enzimler, molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar. Katalitik fonksiyonları bakımından enzimler 6 gruba ayrılırlar.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

GRUP ADI	KATALİTİK FONKSİYONLARI
1. Oksido redüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon
2. Transferazlar	Grup transferi
3. Hidrolazlar	Hidroliz
4. Liyazlar	Grup ayırma
5. İzomerazlar	İzomerleştirme
6. Ligazlar	Moleküllerin birleştirilmesi

Hücrelerde çok önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler, değişik amaçlarda kullanılmak için günlük hayata girmişlerdir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Kıran, Ö.E. vd., 2006). Mikroorganizmalar enzim üretme yeteneklerinin yanı sıra, toksik ve patojen olmamasına göre de seçilir. Mikroorganizmalar bizim için birçok nedenden önemlidir, fakat en önemlisi üretilme değeridir.

Bitki, hayvan veya kimyacılar tarafından sentez edilebilen maddelerin üretimi yerine, mikroorganizmaların kullanımının asıl nedenleri şunlardır:

Yüzey alanın hacimlerine göre daha geniş olması, metabolizma ve biyosentezin desteklenmesi için gerekli besinlerin hızlı girişini kolaylaştırmaktadır.

Mikroorganizmalar çok çeşitli reaksiyonları yapabilme yeteneğindedirler.

Farklı çevrelere adapte olma yetenekleri sayesinde, mikroorganizmaların doğadan laboratuvar erlenine veya fabrika fermentörüne nakledilmesi kolaydır.

Ucuz karbon ve azot kaynaklarında gelişebilme yetenekleri sayesinde oldukça değerli bileşiklerin üretimi yapılabilmektedir.

Tarama işlemlerinin çok basit olması binlerce mikroorganizmanın oldukça kısa zamanda incelenmesine izin vermektedir.

Geniş bir çeşitliliğe sahip olmaları nedeniyle, farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen oldukça farklı enzimleri üretmesi, reaktördeki işletim şartlarına göre bir esneklik sağlar.

Genetik manipulasyonların kolaylığı sayesinde hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak binlerce kata kadar üretimi artırmak, yapıları ve aktiviteleri değiştirmek ve tümüyle yeni ürünleri yapmak gibi kullanım nedenleri vardır (Barredo, 2005).

1970'lerin başlarına kadar enzimlerin en iyi kaynakları olarak bitki ve hayvan materyalleri dikkate alınmıştır. Fakat bugünlerde mikrobiyal enzimlerin teknik ve ekonomik avantajları bakımından önemi giderek artmaktadır (Cherry vd., 2004). Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış olup bunlar arasından yaklaşık 100 tanesi ticari kullanıma uygun bulunmasına rağmen günümüzde sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla kullanılmaktadır.

$\alpha$ -Amilaz enzimi endüstriyel boyutlarda ilk kez 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak Japonya'da üretilmiştir.

Endüstriyel uygulamalarda genellikle termostabiliteye sahip immobilize enzimler kullanılmaktadır. Termostabil mikroorganizmalardan elde edilen termofilik amilazlar da bu alanda oldukça önemli bir yere sahiptir (Kurakake vd., 1997; Tanrıseven vd., 2002). Termostabil amilazlar (genellikle  $\alpha$ -amilaz), ekstrem termofiller ve termofillerin enzimlerinin endüstriyel olarak çok yüksek potansiyelinin olması nedeniyle oldukça fazla araştırılmaktadır (Sunna vd., 1997). Mezofilik ve termofilik gruplar arasında olan ve daha yaygın olan fakültatif termofiller ise, daha az araştırılmıştır. Fakültatif termofiller genellikle mezofilik sıcaklık aralığında (optimum 45°C) büyüebilirler. Mezofilik ve termofilik sıcaklık aralığını da kapsayan, yüksek sıcaklıklarda da büyüme yetenekleri vardır. Bununla birlikte bu organizmaların enzim üretimi hakkında çok şey bilinmemektedir. İki grubun (mezofilik ve termofilik) yapısal özelliklerinin karşılaştırmalı analiziyle termostabil amilazların yüksek sıcaklığa tolerans yeteneklerinin moleküler düzeyi hakkında birçok bilgi elde edilmiştir (Nielsen ve Borchert, 2000).

## 1.2. Amilazlar

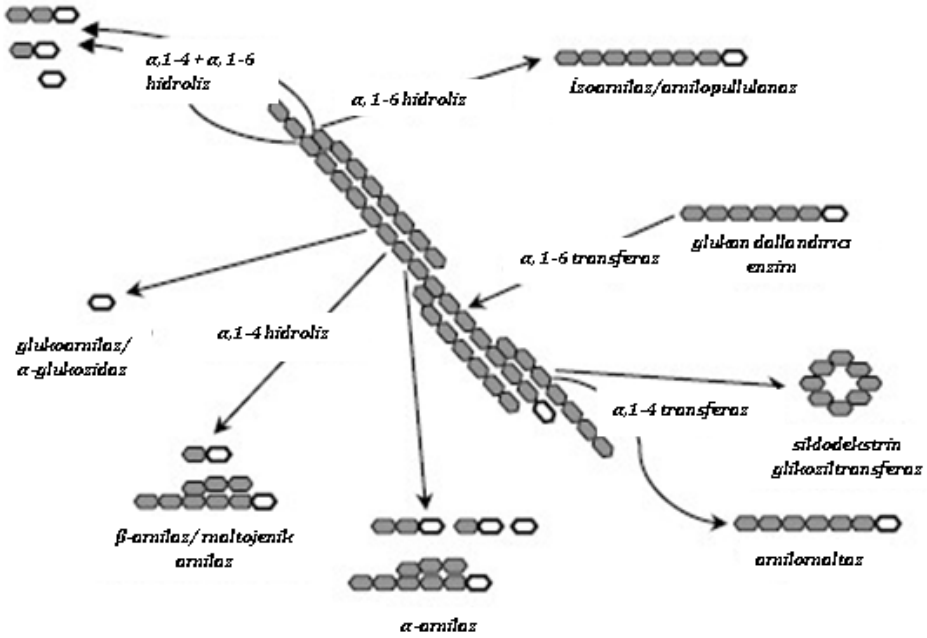
Amilazlar endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanma kırıcı enzimler ve transferazlar olarak olarak dört grupta incelenirler.

**1.2.1. Endoamilazlar:** Nişasta içindeki  $\alpha$ -1,4 bağlarını hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda  $\alpha$ -anomerik ürünler oluştururlar.  $\alpha$ -amilaz bir endoamilaz olarak bilinir (Pandey vd., 2000).

**1.2.2. Ekzoamilazlar:** Nişasta molekülündeki  $\alpha$ -1,4 veya  $\alpha$ -1,6 bağlarını redükleyici olmayan uçtan başlayarak hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda  $\alpha$ - veya  $\beta$ -anomerik ürünler oluştururlar.

**1.2.3. Dallanma Kırıcı Enzimler:** Nişasta dönüştüren enzimlerin 3. grubu, sadece  $\alpha$ -1,6 bağlarını hidrolize ederek uzun doğrusal ürünler oluşturan dallanma kırıcı enzimlerdir.

**1.2.4. Transferazlar:** Donör molekülün  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını ayırarak, alıcı molekülde yeni bir glikozidik bağ oluşturmak için transfer ederler (Van der Maarel vd., 2002).



Şekil 1.1. Amilolitik enzimlerin sınıflandırılması (Van der Maarel vd., 2002)

Amilazların iki büyük sınıfını oluşturan glukoamilaz ve  $\alpha$ -amilazlar birçok mikroorganizmada tanımlanmış ve elde edilmiştir. Genellikle bitkisel orijinli olan  $\beta$ -amilaz ise, birkaç mikrobiyal kaynaktan da elde edilmiştir.

### $\beta$ -Amilazlar

$\beta$ -Amilaz ( $\alpha$ -1,4-glukan maltohidrolaz, E.C.3.2.1.2) genellikle bitki orijinli olup, birkaç mikrobiyal strain tarafından da üretilir.



Amiloz, amilopektin ve glikojen moleküllerini redükte olmayan ucundan başlayarak hidrolizleyen ekzoamilazdır. Glikozidik bağların hidrolizi sonucunda maltoz ( $\beta$  anomerik formu) oluşur.  $\beta$ -Amilaz amilopektin içindeki  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağlarına tamamen etki edemez, hidroliz sonucunda % 50-60 maltoz ve  $\beta$ -limit dekstrin oluşur.  $\beta$ -Amilazı *Clostridium* sp. (anaerobik), *Pseudomonas* sp. (aerobik) ve *Bacillus* sp. gibi bakteriyal strainlerin, *Streptomyces* sp. gibi aktinomiset strainlerin ve *Rhizopus* sp. gibi fungal strainlerin sentez ettiği gösterilmiştir (Ha vd., 2001; Gupta vd., 2003).

### **$\alpha$ -Amilazlar**

$\alpha$ -Amilazlar (endo-1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolaz, E.C.3.2.1.1), ürünlerde  $\alpha$ -anomerik yapının korunması ile polisakkaritlerde  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen nişasta parçalayıcı enzimlerdir.  $\alpha$ -Amilazların çoğu, yapısal bütünlük, kararlılık ve aktiviteleri için gerekli kalsiyum iyonları olan metalloenzimlerdir.

$\alpha$ -Amilazlar, eczacılıkla ilgili endüstri için siklodekstrinlerin üretiminden şeker şuruplarında nişastanın değişimine kadar geniş bir uygulama çeşitliliğine sahip olan önemli endüstriyel enzimlerdir. Bu enzimler dünyanın enzim üretiminin yaklaşık % 30'unu kapsar.  $\alpha$ -amilaz ailesi, yaklaşık 30 farklı enzim spesifitesini kapsayan izomerazlar, transferazlar ve glikosid hidrolazların en geniş ailesidir (Sivaramakrishnan vd., 2006).  $\alpha$ -Amilazlar, uzun amiloz zinciri içindeki glikoz üniteleri arasındaki 1,4- $\alpha$ -D-glikozidik bağlarını hidrolizleyen ekstraselüler enzimlerdir (Aquino vd., 2003; Moreira vd., 2004).  $\alpha$ -Amilazlar genellikle hayvan, bitki ve mikrobiyal türlerde yayılış göstermektedir.

$\alpha$ -Amilazlar fungus, maya ve bakterilerden elde edilirler.  $\alpha$ -Amilazlar birçok aktinomiset bakteri, maya ve funguslardan elde edilmesine rağmen, fungal ve özellikle bakteriyel kaynaklardan elde edilen enzimlerin, endüstriyel sektörlerde kullanımı daha yaygındır.

Bakteriyel amilazlar, sağladığı birkaç karakteristik avantajdan dolayı tercih edilir. Başlıca *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* olmak üzere *Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp. türleri ticari uygulamalar için kullanılır (Gupta vd., 2003).

$\alpha$ -Amilazlar genellikle modifiye nişasta ve çözünür nişasta kullanılarak analiz edilirler.  $\alpha$ -Amilaz, nişasta içindeki  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalizleyerek glikoz, dekstrin ve limit dekstrinleri üretir.  $\alpha$ -amilaz aktivitesi çeşitli metotlarla tayin edilebilir. Bu metotlar; nişasta süspansiyonundaki viskozitenin azalması, substrat renk karışımının azalması, redükte şekerlerin artması, nişasta-iyot renk yoğunluğunun azalmasına dayanır (Bernfeld, 1955; Gupta vd., 2003).

Birçok mikroorganizmanın  $\alpha$ -amilazının enzimatik ve fizikokimyasal özellikleri kapsamlı olarak tanımlanmış ve araştırılmıştır.  $\alpha$ -amilazın substrat spesifitesi mikroorganizmadan mikroorganizmaya çeşitlilik gösterir. Genellikle  $\alpha$ -amilazların spesifitesi sırasıyla; maltotrioz, glikojen, siklodekstrin, amilopektin, amiloz ve nişastaya doğru artış göstermektedir.

$\alpha$ -Amilazların optimum pH'sı 2.0 ile 12.0 arasında değişebilir (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001; Kusuda vd., 2003; Moreira vd., 2004; Wanderley vd., 2004). Bakteri ve fungus amilazlarının optimum pH'ları asidik ve alkali aralıkta değişir.  $\alpha$ -Amilazlar genellikle pH 4.0 ile 11.0 arasında stabildir. Bununla birlikte stabilitesinin sınırlı olduğu alanlarda bulunmaktadır.

$\alpha$ -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık mikroorganizmaların büyümesine bağlıdır (De Mot ve Verachtert, 1987; Khoo vd., 1994; Aquino vd., 2003; Kusuda vd., 2003; Moreira vd., 2004).

Optimum sıcaklığı çok düşük olan *F. oxysporum* amilazı için 25-30°C gerekirken, optimum sıcaklığı çok yüksek olan *Pyrococcus wosei*, *Pyrococcus furiosus*, Archea  $\alpha$ -amilazı için genellikle 100-130°C gerekir.  $\alpha$ -Amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasındadır (Gupta vd., 2003).

## Glukoamilazlar

Glukoamilaz (amiloglukozidazlar, AG, GA, 1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolaz, glukojenik enzim, nişasta glukojenaz,  $\gamma$ -amilaz, maltaz, E.C.3.2.1.3 ) nişasta zincirinin ucundaki indirgen olmayan kısımdan, ardışık olarak glukoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Glukoamilazların ürün olarak sadece glukoz oluşturması bu enzimleri  $\alpha$  ve  $\beta$  amilazlardan ayırmaktadır. Glukoamilaz, sırasıyla hidrolize  $\alpha$ -1,4;  $\alpha$ -1,6 ve nadiren  $\alpha$ -1,3 bağları ile glikojen, amiloz ve amilopektin içeren glukozun en son redükte olmayan ucundan  $\beta$ -D-glukozun üretimini katalizleyen hücre dışı etkili bir enzimdir (Koç ve Metin, 2010).

Glukoamilaz önemli bir endüstriyel enzimdir. Glukoamilaz endüstriyel enzimler arasında dünya çapındaki satış ve pazarlamada proteazların ardından 2. sıradadır (Bhatti vd., 2007). Bu enzim, düşük kalorili biranın mayalanmasında, ekmek endüstrisinde, dekstroz üretiminde kullanılır (James ve Lee, 1997). Glukoamilazın ticari uygulamalarının ilki, nişastadan glukoz şuruplarının üretimidir (Bhatti vd., 2007). Bu uygulamalar termostabilite ve yüksek aktiviteye sahip enzimleri gerektirir. Termostabil enzimlerin kullanılmasının; yüksek sıcaklığın kullanılması durumunda kontaminasyon riskini azaltmak ve reaksiyon hızını arttırmak gibi birçok avantajları vardır (Koç ve Metin, 2010).

Çeşitli fungal kaynaklardan elde edilen glukoamilazın molekül kütlesi, *Aspergillus niger* tarafından üretilen 125 kDa glukoamilazın haricinde genellikle 48-90 kDa arasındadır (Suresh vd., 1999).

Fungal glukoamilazlar, birden fazla izoformda bulunur. GAI ile gösterilen en büyük form, 2 domain [katalitik (CD) ve nişasta bağlayıcı bölge(SBD)] ve bir bağlanma bölgesinden oluşur. *Aspergillus niger* gibi bazı funguslar GAII olarak belirtilen en küçük izoformu salgılar.

GAII'nin GAI'den farkı; GAII SBD'den yoksundur ve dolayısıyla ham nişastayı parçalama yeteneğinde değildir.

İki amaca ulaşmak için çeşitli protein modifikasyonları ve mutajenler ile glukoamilazın performansını geliştirici birkaç deneme vardır. Birinci amaç; daha fazla saf üretim ortaya koyan glukoamilazların keşfedilmesidir. İkinci amaç; en yüksek termostabilite ile glukoamilazları elde etmektir (Jensen vd., 2006).

Fungal glukoamilazlar, genellikle asidik pH değerlerinde etkilidirler. Fakat bazı formlar farklı optimum pH'ya sahiptir. Örneğin; bir nematofagus fungus tarafından üretilen 3 glukoamilazdan biri olan *Arthrobotrys amerospora* pH 6'da etkilidir ve diğer ikisi pH 5.6'da etkilidir (Norouzian vd., 2000).

Çoğu glukoamilazlar, genellikle 50-60°C'deki termofilik sıcaklıklarda etkilidir. *Aspergillus niger* NRRL 330 ve *Aspergillus auramori* var. *kawachi*'den elde edilen enzimler, sırasıyla 50 ve 60°C'de en iyi aktiviteye sahiptir. Halbuki *Arthrobotrys amerospora*'nın glukoamilazları 55°C'de en iyi aktiviteye sahiptir (Norouzian vd., 2000).

### 1.3. Nişasta

Doğada bol miktarda yayılış gösteren polisakkaritlerden biri bitkiler tarafından üretilen nişastadır. Güneş enerjisinin kimyasal enerjiye dönüşmesi esnasındaki süreçte bitkiler, fotosentezin bir sonucu olarak nişasta sentezlerler. Nişasta, gece boyunca solunum için bir depo maddesi olarak tohum ve köklerde bulunan amiloplastlarda sentezlenir. Bundan sonraki organellerde, nişastanın büyük bir çoğunluğu suda çözünmeyen granüller olarak birikir. Bu granüllerin çapı ve biçimi bitkinin orijinine göre değişir (Van der Maarel vd., 2002).

Nişasta yüksek molekül ağırlığına sahip iki polimer olan amiloz ve amilopektin'den oluşur (Koç ve Metin, 2010).

Amiloz,  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağ ile bağlı glikoz kalıntılarını içeren doğrusal bir polimerdir (James ve Lee, 1997; Norouzian vd., 2006). Glukoz kalıntılarının sayısı, orijini ile değişen polimerizasyonun derecesi ile gösterilir.

Patates ya da tapyoka nişastasından elde edilen amiloz, 1000 ile 6000 arasında bir polimerizasyon derecesine sahipken, mısır ya da buğday nişastasından elde edilen amiloz, 200 ile 1200 arasında değişen bir polimerizasyon derecesine sahiptir. Nişastalarda bulunan amiloz ortalaması % 0 ile 75 arasında değişebilir. Fakat tipik değer % 20 ile 25 arasındadır (Van der Maarel vd., 2002).

Amilopektin molekülünde glukoz birimleri lineer bir şekilde  $\alpha$ -1,4 bağları ile birbirlerine bağlıdır. Her 24-30 glukoz biriminde bir  $\alpha$ -1,6 bağı ile bir dal başlar. İç zincirler 20-24 glukoz altbiriminden oluşur. Amilopektin molekülünün tamamı, yaklaşık ortalama 2.000.000 glukoz ünitesi içerir. Dolayısıyla doğada en fazla bulunan moleküllerden birisidir. Çoğunlukla amilopektinin yapısının kabul edilen modeli, küme modelidir (Buleon vd.,1998).

Nişasta granülleri kristal ve kristal olmayan bölgelerin içerisine yerleşmiştir. Amiloz, kristal olmayan bölgelerde bulunurken, yumru ve kök nişastalarındaki kristal bölgeler sadece amilopektini içerir (Van der Maarel vd., 2002).

#### **1.4. $\alpha$ -Amilazların Kullanım Alanları**

$\alpha$ -Amilazların uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmekçilikte, tekstil, kâğıt, meyve suyu endüstrisinde, alkol fermentasyonunda kullanılmaktadır.

##### **1.4.1. Alkol ve Bira Üretiminde**

Bira teknolojisinde üretim sürecini kısaltmak, yatırım ve işçilik giderlerini en az düzeye indirmek; bu dalda enzim kullanımının esas amacını oluşturur. Bu amaçla en çok  $\alpha$ -amilaz ve proteazlardan yararlanılmaktadır.

Örneğin; nişastalı hammaddelerden ucuz etanol üretimi için işleme aşamalarında kullanılan bazı alet ve ekipmanlar enzim uygulaması ile azaltılarak daha ucuz ve

çabuk etanol üretilmektedir. Bu amaçla,  $\alpha$ -amilazlar en fazla kullanılan enzimlerdir (Dönmez, S., 1986).

#### **1.4.2. Nişasta Sıvılaştırılmasında**

$\alpha$ -Amilaz enzimi nişasta işleme endüstrisinde nişasta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmıştır. 1959 yılında ise  $\alpha$ -amilaz ve amiloglukozidaz kullanılarak nişastadan toz ve kristal dekstrozun endüstriyel üretimine başlanmıştır (Sarıkaya, 1988).

#### **1.4.3. Ekmek Sanayinde**

Enzimlerin ekmek sanayinde geniş bir uygulama alanı vardır.  $\alpha$ -Amilazlar ekmek kalitesini arttırdığı gibi bayatlamayı da geciktirmektedir. Ekmek yapımında gerek fermentasyon gerekse pişirme sırasında ekmeğin kabarmasını, hacim kazanmasını sağlayan CO<sub>2</sub> gazıdır. Maya fermentasyonunun gerçekleştirilmesi her şeyden önce ortamda yeterli miktarda fermente olabilir şekerin varlığına bağlıdır. Ancak unlarda maya faaliyeti için gerekli fermente olabilir şeker miktarı çok düşük (% 0.1-0.5), nişasta miktarı ise çok yüksektir. Amilaz enzimleri unda mevcut olan nişastayı (% 4-10) ve jelatinize olmuş nişastayı parçalayarak fermente olabilir şekerleri oluşturmaktadırlar. Ancak  $\alpha$ -amilaz sağlam buğdaydan çekilen unda çok az miktarda bulunmaktadır.

Yine unda bulunabilecek  $\alpha$ -amilaz miktarı un verimine bağlı olarak değişmektedir. Ülkemizde buğday özellikle Orta, Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde kurak şartlarda yetiştirilmektedir. Buğdayların olgunlaşma devresinin sıcak ve kurak geçmesi ve bu şartlarda hasat edilmesi, protein miktarı ve kalitesini arttırırken  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla hasat mevsiminde yağmur altında kalmamış siloloma şartlarında çimlenmeye yüz tutmamış buğday örnekleri, normal öğütme işlemiyle düşük ve yetersiz  $\alpha$ -amilaz aktivitesi göstermektedir. Bu durum ekmeklik unlarda önemli bir problem teşkil etmektedir (Elgün ve Ertugay, 1995).

#### **1.4.4. Tekstil Sanayiinde**

Dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işleme “haşılama” adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işlemede “haşıl alma” adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarakta yaygın olarak  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılmaktadır.

#### **1.4.5. Kağıt Sanayiinde**

Kâğıt endüstrisinde kâğıt kaplaması için gerekli olan düşük viskozite ve yüksek molekül kütleli nişastanın üretimi için  $\alpha$ -amilazlar kullanılır. Doğal nişastanın viskozitesi kâğıdı kaplamak için çok yüksektir. Bu sorun  $\alpha$ -amilazlar kullanılarak çözülür. Kâğıdın kaplanması, işlem boyunca meydana gelebilecek mekanik zararları önlemek amacıyla yapılır (Gupta vd., 2003).

#### **1.4.6. Meyve Suyu Endüstrisinde**

Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir. Bu sorun, ortama  $\alpha$ -amilaz ilave edilerek giderilmektedir (Ekşi, 1998, Sarıkaya, 1988).

### **1.5. *Aspergillus***

*Aspergillus*'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır. Toprakta çürüten bitki materyalleri doğal yaşam ortamını oluşturur. Bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar. Uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Üreme hızları yüksektir.

*Aspergillus* türleri zincirler halinde çok miktarda konidi üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidyumlar genelde 2-5 µm çapındadırlar ve hava ile taşınırlar. Konidyumlar bir hücreli, duvarları düz veya pürüzlü, dikenli; şeffaf veya pigmentli olabilirler.

Bazı *Aspergillus* türleri 37°C'de gelişme yeteneğinden yoksundur. Bu özellik patojen olan türleri olmayanlardan ayırt etmekte yararlıdır. Mantarın gelişme hızı hastalık geliştirme ve patojenite ile ilişkilidir. En hızlı gelişen tür *A. fumigatus* olup, 37°C'de çimlenme hızı besiyerine bağlı olarak 5-12 saattir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Çalışmamızda kullanılan *Aspergillus fumigatus*'un genel özellikleri şunlardır: Czapek agar besiyerinde koloniler hızlı gelişmekte ve yayılmakta, koloni yüzeyi kesin velvet ile derin keçemsi ve flukkoz arasında değişmekte, önce beyaz, konidi başlarının gelişmesi ile yeşil olmakta, bazen kunduz grisi rengi olmakta, bazı ırklarda koloni altı ve substratum renksiz, diğerlerinde ise sarı, yeşil hatta koyu kırmızı-kahverengi tonlarında, konidi başları kolumnar, kompakt, genellikle yoğun şekilde bir arada, ölçüleri değişmekte, 20 mm kadar olabilmekte ancak genelde çok daha kısa, bazen çok küçük, konidiyoforlar kısa, düz, 1.5-2.4 mm ölçülerinde, genellikle az veya çok yeşil renkli, özellikle üst kısım belirgin şekilde renkli, doğrudan batık hiflerden geliştiği gibi havai hiflerden de gelişmekte, uca doğru yavaş yavaş genişlemekte ve uçta şişe şeklinde bir vezikül haline gelmekte, vesiküller 20-30 µm çapında, genellikle konidiyoforla aynı renkte, sadece üst kısmında fertil, sterigma tek seri ve renkli, 12-18 µm ölçülerinde, eksenleri kabaca konidiyofor eksenine paralel, konidiler kitle halinde yeşil, ekinutal, globoz-subgloboz, genellikle 2.5-3.0 µm çapında, ancak 2.0-3.5 µm arasında ekstremler var, sklerosyum veya kleistotesyum yoktur (Hasenekoğlu, 1991).

Amilazlar endüstride önemli bir pazar payına sahiptirler. Özellikle nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonunda kullanılan fungus  $\alpha$ -amilazları ve glukoamilazları bu bakımdan oldukça dikkat çekmektedir.



Bu amaçla çalışmamızda, yeni endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir fungus amilazlarının araştırılması düşünülmüştür. Bunun için mevcut funguslarda amilolitik taramayla *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz ürettiği saptanmıştır. *A. fumigatus*  $\alpha$ -amilazları ile daha önce çok fazla çalışma yapılmaması da dikkate alınarak,  $\alpha$ -amilazın üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyon çalışmaları yapılarak endüstriyel uygulamalarda kullanıma uygun olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Bacillus sp.* YX-1 tarafından ham nişasta parçalayan  $\alpha$ -amilazın saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Maksimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesi 44 saatlik inkübasyondan sonra 45°C'de gözlenmiştir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografi saflaştırma basamakları kullanılarak saflaştırılmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE kullanılarak 56 kDa olarak gözlenmiştir. Enzim pH 5.0'te maksimum aktivite ve 40-50°C'de optimum aktivite göstermiştir (Liu, X.D. ve Yan Xu, 2008).

Gıda sanayinde kullanılan enzimlerin ülkemizdeki durumu incelenmiş ve enzimlerin süt ve mamülleri sanayi, meyve ve sebze işleme, alkol ve bira üretimi, ekmek sanayi, et ve balık sanayi gibi birçok alanda kullanıldığı saptanmıştır (Dönmez, S., 1986).

*Aspergillus ve Chaetomium*'un  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ve nişasta hidrolizi incelenmiştir. Maksimum nişasta hidrolizi *Aspergillus ve Chaetomium*'un her ikisi içinde 6-7. gün olarak belirlenmiştir. Fakat, maksimum enzim aktivitesi 9-11. günlerde bulunmuştur. *Aspergillus fumigatus*'un nişasta hidrolizi, proteaz ve  $\alpha$ -amilaz aktivitesi *C. globosum*'a göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, *A. fumigatus*'un optimum sıcaklıktaki (45°C) performansı, *C. globosum*'a oranla daha iyidir. *A. fumigatus*'un çok iyi bir termotolerant olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı *A. fumigatus* nişasta işleme sanayinde kullanılabilir (Sharma ve Shukla, 2008).

Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* tarafından üretilen termostabil bir  $\alpha$ -amilaz üzerine yapılan çalışmada  $\alpha$ -amilaz, DEAE-selüloz, CM-selüloz iyon değişim kromatografisi ve sepharoz 6B jel filtrasyon saflaştırma basamakları kullanılarak saflaştırılmıştır. PAGE'te tek protein bandı görülmüştür ve moleküler ağırlığı 36 kDa olarak hesaplanmıştır. Optimum pH'sı 6.0, sıcaklığı ise 60°C olarak bulunmuştur (Aquino vd., 2003).

Substrat olarak,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside kullanılarak *A. fumigatus* tarafından amilazın üretim çalışması yapılmıştır. Toprakta izole edilen *A. fumigatus* suşu ile karbon kaynağı olarak maltozun sentetik bir analogu olan  $\alpha$ -methyl-D-glucoside ( $\alpha$ MG) içeren ortamda yüksek amilaz aktivitesi ve biyomas üretimi gerçekleştirmiştir.  $\alpha$ MG'nin benzer konsantrasyonlarda maltoz ve nişastadan çok daha etkili bir indikatör olduğu belirlenmiştir (Goto vd., 1998).

Yeni bir amilaz, deniz süngeri *Spirastrella sp.* ile birlikte yaşayan *Mucor sp.*'den izole edilmiştir. Enzimin optimum pH'sı 5.0, sıcaklığı ise 60°C olarak bulunmuştur. Enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saflaşan enzimin aktivasyon ve deaktivasyon enerjileri sırasıyla 46.60 ve 157.05 kJ/mol olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi EDTA tarafından güçlü bir şekilde inhibe olmuştur (Mohopatra vd., 1998).

Fungusların büyük bir çoğunluğunun fermentasyon ortamında genellikle  $\alpha$ -amilaz ürettiği ve bir kısmının da hem  $\alpha$ -amilaz hem de glukozamilazı aynı anda ürettikleri bir çok araştırmacı tarafından saptanmıştır (Shenoy vd., 1985; De Mot ve Verachert, 1987; Morita ve Fujio, 2000; Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001; Norouzian vd., 2006).

Enzim stabilizasyonu, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için oldukça önemli bir özelliktir. Yapılan çalışmalarda, *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının 50°C'de 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'de ise % 65'ini gösterdiği bulunmuştur (Okolo vd., 2000). *A. tamarii*  $\alpha$ -amilazının 65°C'de birkaç saat tamamen aktif olduğu, enzimin yarı ömrünün 70°C'de 30 dakika olduğu ve 75°C'de ise stabil olmadığı bulunmuştur. % 1'lik nişasta ile inkübe edildiğinde enzimin yarı ömrünün 70°C'de 70 dakika ve 75°C'de 40 dakika olduğu bulunmuştur (Moreira vd., 2004). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum*  $\alpha$ -amilazının 50°C'de 1 saat stabil olduğu, enzimin yarı ömrünün 55°C'de 25 dk ve 60°C'de 12 dk olduğu, % 1'lik nişasta varlığında 60°C'de 1 saat tamamen stabil olduğu bulunmuştur (Aquino vd.,

2003). Endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda yapılan şekerleştirme yöntemlerinde genellikle yüksek termostabiliteye sahip mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (Gomes vd., 2005). Şekerleştirme yöntemleri, 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).

Enzimler protein yapısında olmasından dolayı ortam pH'sı enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Nişastadan glukoz eldesi endüstride önemli bir yer tutmaktadır. Nişastanın sıvılaştırılmasında  $\alpha$ -amilaz, şekerleştirilmesinde ise glukoamilaz kullanılmaktadır. Bu işlemler pH 4.2 ile 6.2 arasında yapılmaktadır (Moreira vd., 1999). *Aspergillus*  $\alpha$ -amilazlarıyla yapılan çalışmalarda *A. foetidus* ATCC 10254 pH 5.0, *A. fumigatus* pH 6.0, *A. flavus* LINK pH 6.0, *A. awamari*'nin optimum pH'sının 5.0 olduğu bulunmuştur (Gupta vd., 2003). *A. tamarii* optimum pH'sı 4.5-5.0 olduğu bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Ekstrem pH'larda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için, enzim stabilizasyonu oldukça önemli bir özelliktir. Yapılan çalışmalarda termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F<sub>1</sub> GA ve  $\alpha$ -amilazının pH 4.0'te 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). *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının pH 5.0 ile 8.5 aralığında stabil olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994). Ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake*  $\alpha$ -amilazının geniş pH aralığında (4.0 ile 10.0) stabil olduğu bulunmuştur (Kusuda vd., 2003).

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapılarının oluşumunda ve aktif merkezde substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar. Termofilik fungus *T. lanuginosus* F<sub>1</sub>'in  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin 2 mM Co<sup>2+</sup> (% 78), Mn<sup>2+</sup> (% 24), Zn<sup>2+</sup> (% 13), Ca<sup>2+</sup> (% 11) ve Fe<sup>2+</sup> (% 8) tarafından aktive edildiği, Ba<sup>2+</sup> (% 11), EDTA (% 46) ve Hg<sup>2+</sup> (% 90) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

*Scytalidium thermophilum*  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Na}^+$  iyonları % 4-8 oranında bir artışa sebep olurken,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  ve  $\text{NH}_4^+$  sırasıyla % 47, 17, 12 ve 12 oranında, özellikle  $\text{Hg}^{2+}$  ile  $\text{Cu}^{2+}$  ise % 85 ile 75 oranında inhibisyona sebep olmuştur. 10 mM konsantrasyonda ise aktivitede  $\text{Na}^+$  iyonu % 10'luk bir artış göstermiş,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  iyonları yaklaşık olarak % 18'lik inhibisyona ve özellikle  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  iyonları ise % 93, 96 ve 100'lük inhibisyona neden olmuştur (Aquino vd., 2003). Maya *Cryptococcus flavus*'un  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde 4 mM  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları sırasıyla % 4, 5, 15, 30, 71, 80 ve 100 azalmaya sebep olmuştur (Wanderley vd., 2004). *A. tamarii*  $\alpha$ -amilazı 10 mM  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  tarafından % 90-98 oranında inhibe edilmiş,  $\text{Ba}^{2+}$  tarafından % 23 oranında aktive edilmiş ve denenen diğer metal iyonları tarafından önemli bir şekilde etkilenmediği bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

$\alpha$ -Amilazın ham nişasta kaynaklarını sindirebilme yetenekleri ve immobilizasyonu endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. *Bacillus sp. YX-1*  $\alpha$ -amilazının % 1'lik konsantrasyondaki mısır, buğday ve patates nişasta granüllerinin parçalanma oranları, 8 saatte sırasıyla % 57.5, 53 ve 45.1 ve 12 saatte sırasıyla % 63.2, 56.4, 48.6'dır (Liu, X.D. ve Yan Xu, 2008). Çeşitli ham nişasta granüllerini parçalayabilen enzimler, ekonomik olarak caziptir. Onlar, direkt hidroliz için nişasta kaynaklarının alanını genişletebilirler.

Ham mısır nişastasını dünyadaki bol nişasta kaynaklarından birisi olarak, hidroliz süreçlerinin optimizasyonundaki araştırmalar için kullanılır (Liu, X.D. ve Yan Xu, 2008).

$\alpha$ -Amilaz enzimleri, nişasta molekülünün  $\alpha$ -1,4 bağlarını gelişigüzel hidrolizleyerek dekstrin, maltoz ve çok az miktarda glikoz meydana getirir.

İnce tabaka kromatografisi, kâğıt kromatografisi veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi tekniklerle enzimatik son ürünler tespit edilerek amilolitik enzimlerin tanısı yapılmaktadır.

Birçok mikroorganizma tarafından üretilen amilolitik enzimlerin tanısı için yapılan çalışmalarda nişastanın hidrolizi sonucu oluşan son ürün analizi, ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. *Tricholoma matsutake*, *Scytalidium thermophilum*, *Aspergillus tamarii* ve *Cryptococcus flavus*  $\alpha$ -amilazlarının tanısı ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır (Kusuda vd., 2003; Aquino vd., 2003; Moreira vd., 2004; Wanderley vd., 2004).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Kimyasallar

Agar-agar, çözünebilir nişasta,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pepton, maltoz, sitrik asit,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , etilen diamin tetra asetik asit ( $\text{EDTA-C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -merkaptotanol, brom fenol mavisi, glisin, TEMED, Coomassie brilliant blue G-250, akrilamid, amonyum persülfat, sodyum dodesil sülfat (SDS), gliserol,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ , Tris baz, rafinoz, üre, n-bütanol, etanol, metanol,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{I}_2$ ,  $\text{HCl}$ , sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Merck (Darmstadt, Germany) firmasından; amilopektin, amiloz, glikojen, pirinç nişastası, rafinoz, buğday nişastası, dekstrin, orsinol, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz ve fenil metil sülfonil florür (PMSF), Fluka (Buchs, Switzerland) firmasından, safra tuzu, alüminyum silika jel, mısır nişastası, N,N'- Metilen bis akrilamid, MES,  $\text{AlCl}_3$ , dithiothreitol, yeast nitrojen baz, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), standart karışımı [Miyosin (tavşankanı, 205 kDa),  $\beta$ -Galaktozidaz (E.coli, 116 kDa), Fosforilaz B (tavşankanı, 97.4 kDa), Albumin (Bovine 66 kDa), Albumin (yumurta 45 kDa), Karbonik anhidraz (bovin eritrosit, 29 kDa)] ve sığır serum albumini (Fraksiyon V), Sigma (Taufkirchen, Germany) firmasından;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ve  $\text{LiCl}$ , AVOKADO (Karlsruhe, Germany);  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sukroz, sodyum potasyum tartarat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ve sodyum sitrat, CARLO ERBA (Italy) firmasından; KI, glukoz ve propanol, Riedel-de Haën (Seelze, Germany) firmasından; malt ekstrakt agar, Lab M (Bury, England) firmasından sağlanmıştır.

#### 3.2. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı stok kültürlerinde kayıtlı havadan izole edildikten sonra tanısı yapılmış olan 11 *Aspergillus* cinsinde

kalitatif amilaz taraması yapıldı. Fungus örneklerinin amilolitik aktiviteleri, Møller ve arkadaşlarının kısmi olarak değiştirilmiş amilaz besiyeri kullanılarak belirlendi (Møller vd., 2004).

Amilaz besiyerini hazırlamak için % 2 agar-agar, % 0.5 safra tuzu ve % 1 çözünebilir nişasta içeren besi ortamı 121°C'de 15 dakika 1.5 psi atmosfer basınçta otoklavda (Hirayama HA-240 M IV, Japan) sterilize edildi.

Besiyeri 40-50°C'ye kadar soğuduktan sonra, enjektör filtresi (MFS, cellulose acetate, Japan) ile sterilizasyonu yapılan yeast nitrojen bazdan final konsantrasyonu % 0.67 olacak şekilde eklendi. Besiyeri steril petrilere dökülerek katılmasında beklendi ve daha sonra stok fungus kültürlerinden amilaz besiyeri içeren petrilere tek nokta ekimi yapıldı. Petri plakları 27°C'deki etüvde (Heraeus T6, Germany) 72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilere iyodür çözeltisi (% 0.3 I<sub>2</sub>, % 0.6 KI) püskürtüldü. Amilolitik aktivitenin derecesi, oluşan şeffaf zon çapının koloni çapına oranlanması ile belirlendi.

$$\text{Amilolitik aktivite derecesi} = \text{Şeffaf zon çapı} / \text{Koloni çapı}$$

En iyi amilaz aktivite gösteren funguslar içerisinde *Aspergillus fumigatus* HBF50 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi. Amilaz aktivitesi gösteren funguslar yatık malt ekstrakt agar içerisinde 4°C'de saklanarak üç aylık periyodlarla stoklar yenilendi. Ayrıca stoklar % 15'lik steril gliserol içerisinde alınarak -20°C'de uzun süre saklandı.

### 3.3. Aflatoksin Testi

Amilolitik tarama sonuçlarında amilaz aktivitesi gösteren izolatların aflatoksin üretip üretmediği Czapek Dox Agar, Hg Czapek Dox Agar, Glukoz Yeast Ekstrakt ve AFPA besiyerleri kullanılarak saptandı.



**Czapek Dox Agar;** 9.08 g Czapek-Dox 200 mL ultra saf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

**Hg Czapek Dox Agar;** 9.08 g Czapek-Dox agar, 0.0272 g HgCl<sub>2</sub>, 2 g (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.1 mL Corn step likor 200 mL ultra saf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

**Glukoz Yeast Ekstrakt;** 4 g glukoz, 1 g yeast ve 4 g agar 200 mL ultra saf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

**AFPA (*Aspergillus flavus-parasiticus* Agar) ;** 9.1 g AFPA 200 mL ultra saf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

Hazırlanan bu ortamlara izolatlar ekildi ve 30°C'de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV altında incelendi. UV ışığı altında ışımaya yapan türlerin aflatoksin ürettiği kabul edildi.

### **3.4. Sporulasyon ve İnokulum Miktarının Belirlenmesi**

Sporulasyon ortamı olarak % 1'lik çözünür nişasta içeren, malt ekstrakt agar kullanıldı. *A. fumigatus* HBF50'yi üretmek için önce sporulasyon ortamında spor oluşumu sağlandı. Sporulasyondan sonra inokulum miktarı belirlenerek fermentasyon ortamına ekim yapıldı.

#### **3.4.1. Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı**

500 mL'lik erlene 100 mL % 4.8'lik malt ekstrakt agar eklenerek mikrodalga fırında (Vestel, Turkey) 3 dakika ısıtıldıktan sonra 121°C'de 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan sonra erlen, 45° eğimli olacak şekilde katılaşmaya bırakıldı. *A. fumigatus* HBF50'nin stok kültüründen yatık malt ekstrakt agara üç nokta ekim yapıldı. Kültür 27°C'de etüvde 5 gün inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda sporulasyon ortamına % 0.5'lik steril sodyum dodesil sülfat (SDS) ve cam bilye ilave edilerek sporların çözeltiye geçmesi için yavaşça karıştırıldı.

Sıvı ortama geçen spor süspansiyonunun 1 mL'si, 9 mL steril fizyolojik suya (% 0.85 NaCl) ilave edildi. Uygun inokulum miktarını belirlemek için, ilk seyreltme ( $10^{-1}$ ) kullanılarak  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Her seyreltmede Thoma lamı ile mililitredeki spor sayımı yapıldı. Spor sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Mililitredeki spor sayısı} = A \times SF \times 10^4$$

$A$  = 0.1 mm<sup>3</sup> hacimde sayılan spor

$SF$  = Seyreltme faktörü

$10^4$  = mililitreye çevirme çarpanı

Spor sayısı belirlendikten sonra, aşağıda içeriği verilen 100 mL fermentasyon ortamı içeren 500 mL'lik erlenlere, her seyreltmeden 1 mL spor inoküle edildi. En iyi enzim üretimi gösteren seyreltme faktörü  $10^{-3}$  olarak bulundu.

### 3.5. *A. fumigatus* HBF50'nin Fermentasyonu

Denemede kullanılan amilaz fermentasyon ortamının içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir. İnokulum miktarı belirlendikten sonra, 100 mL amilaz fermentasyon ortamı içeren 500 mL'lik erlene,  $10^{-3}$ 'lük seyreltmeden  $10^8$  spor/mL olacak şekilde inoküle edildi.

İnkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24, New Jersey, USA) 30°C'de, 100 rpm'de, 12 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültür ortamı Buhner hunisinde filtre kâğıdı (Munktell, Germany) kullanılarak vakum altında süzüldü ve süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Çizelge 3.1. *A. fumigatus* HBF50 fermentasyon ortamı

Kimyasal Maddeler	Miktarı (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	3
KCl	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Pepton	10
Çözünür patates nişastası	20
pH 6.0	

### 3.6. *A. fumigatus* HBF50'nin Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

*A. fumigatus* HBF50 üretimi için, 500 mL'lik erlene (12 adet) 100 mL amilaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra ortama, 10<sup>8</sup> spor/mL inoküle edildi. Fermentasyon ortamı inkübatörde 30°C'de, 100 rpm'de, 12 gün inkübasyona bırakıldı. *A. fumigatus* HBF50'nin büyüme eğrisini saptamak için erlenlerden bir tanesi, 24 saatlik periyotlarda darası ölçülmüş filtre kâğıdı (Munktell, Germany) kullanılarak buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 80°C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide (Scaltec SBA 31, Germany) ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyoması (g/100 mL) hesaplandı. Ayrıca fermentasyon süzüntüsünün günlük pH (Senso Direct pH 200, Germany), redüktör şeker ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Kültür ortamı redüktör şeker miktarının fazla olmasından dolayı 2-7. günler arasındaki tampona (50 mM, pH 6.0 McIlvaine) karşı diyaliz edildi. İnkübasyondan sonra enzim aktiviteleri ölçüldü.

### **3.7. *A. fumigatus* HBF50'nin Amilaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi**

#### **3.7.1. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

*A. fumigatus* HBF50'nin en iyi amilaz ürettiği sıcaklığı belirlemek için, 500 mL'lik erlene 100 mL amilaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra ortama,  $10^8$  spor/mL inoküle edildi. Fermentasyon ortamı farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50°C), 100 rpm'de, 10 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda fermentasyon süzüntüsünde redüktör şeker ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

#### **3.7.2. Amilaz Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi**

*A. fumigatus* HBF50'nin en iyi amilaz ürettiği başlangıç pH'sını belirlemek için, 500 mL'lik erlene farklı pH'larda (pH 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 100 mL amilaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra ortama,  $10^8$  spor/mL inoküle edildi. Fermentasyon ortamı inkübatörde 30°C'de, 100 rpm'de, 10 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda fermentasyon süzüntüsünde redüktör şeker ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

### **3.8. Enzimin Saflaştırılması**

*A. fumigatus* HBF50 tarafından en yüksek enzim üretim sıcaklığı, pH ve zamanı belirlendikten sonra enzimin saflaştırılma işlemlerine geçildi. Belirlenen optimum koşullarda enzim üretimi yapıldıktan sonra, fermentasyon ortamı süzülerek enzim kaynağı olarak kullanıldı. Süzüntüdeki amilazın saflaştırılma işleminde ultrafiltrasyon, DEAE sepharoz CL-6B, fenil sepharoz CL-4B, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografi adımları kullanıldı. Aksi belirtilmedikçe tüm saflaştırma adımları 4°C'de yapıldı. Saflaştırma boyunca aktivite ve protein tayinleri aşağıda açıklanan standart deneyler ile yapıldı. Daha sonra saflaştırma tablosu oluşturuldu.

Ham ekstraktın saflaştırma katsayısı 1 kabul edildi ve diğer fraksiyonların spesifik aktiviteleri ham ekstraktın spesifik aktivitesine oranlanarak saflaştırma katsayıları hesaplandı.

Fraksiyonların % verimlerini belirlemek için ham ekstraktın verimi 100 olarak kabul edildi ve fraksiyonların total aktivitesi ham ekstraktın total aktivitesine oranlanarak % verimleri hesaplandı.

## **Ultrafiltrasyon**

Fermentasyon ortamının süzütüsünden (550 mL) enzimi hem kısmi olarak saflaştırmak hem de konsantre etmek için ultrafiltrasyon yapıldı. Süzütü 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı içeren Vivacell 250 ultrafiltrasyon kabına (Sartorius, Germany) aktarıldı. Daha sonra azot gazı ile 4 mbar basınç uygulayarak inkübatörde 10°C'de, 100 rpm'lik hızda çalkalanarak konsantre edildi.

### **3.8.1. İyon Değişirme Kromatografisi**

İyon değişirme kromatografisi proteinlerin elektrik yüküne bağlı olarak ayrılmasını sağlayan ve protein saflaştırma işlemlerinde çok sık kullanılan önemli bir tekniktir. Bu amaçla negatif yüklü proteinlerin saflaştırılmasında anyon değişirici olarak kullanılan pozitif yüke sahip DEAE sepharoz CL-6B kolon dolgu maddesi kullanıldı.

Ultrafiltrasyon ile konsantre edilen 12 mL örnek, daha önce 10 mM McIlvaine (pH 6.5, 4°C) tamponu ile dengeye getirilmiş 35 mL yatak hacmine sahip DEAE sepharoz CL-6B (2.5x10) kolonuna (Biorad, USA ) yüklendi. Daha sonra, kolon peristaltik pompa ile (ATTA AC-2110, Japan) sağlanan 69 mL/saat akış hızında aynı tamponu ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkması sağlandı. Bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra, 10 mM McIlvaine (pH 6.5, 4°C) tamponu ile hazırlanmış 0-1 M NaCl ile linear tuz gradienti yapılarak kolona bağlı proteinlerin çıkması sağlandı.

Kolondan çıkan örnekler fraksiyon kollektörü ile (Spectra/Chrom CF-1, USA) 5'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japan) 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi.

Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımında kullanıldı.

### **3.8.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Hidrofobik etkileşim kromatografisi protein moleküllerinin hidrofobik grupları ile durgun faz arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır. Durgun faz hidrofilik bir polimere (dekstran ya da agaroz) bağlı küçük non-polar grupları (butil, oktil veya fenil) içermektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ilgili proteinin bulunduğu fraksiyon yüksek tuz derişimi içeren tampon içerisinde (genellikle amonyum sülfat) kolona yüklenir. Bağlı proteinlerin kolondan uzaklaştırılması ise tampondaki tuz derişimi azaltılarak yapılır (Metin, 2007). Bu amaçla fenil sepharoz CL-4B kolon dolgu maddesi kullanıldı.

DEAE sepharoz CL-6B kolonundan çıkan aktivitesi yüksek fraksiyonlar (21 mL) birleştirilerek içerisinde 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eklendi. Yatak hacmi 20 mL olan fenil sepharoz CL-4B kolonu (1.5x15) (Biorad, USA) örnek yüklenmeden önce, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 10 mM McIlvaine (pH 6.5, 4°C) tamponu ile dengeye getirildi. Örnek kolona uygulandı ve kolon peristaltik pompa ile sağlanan 94 mL/saat akış hızında aynı tamponu ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkması sağlandı. Daha sonra, kolonda bağlı proteinlerin çıkması için 10 mM McIlvaine (pH 6.5, 4°C) tamponu ile hazırlanmış 1-0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile negatif tuz gradienti oluşturularak kolona bağlı proteinlerin çıkması sağlandı. Daha sonra kolon, kolona bağlı kalması muhtemel proteinlerin kolondan çıkması için tuz içermeyen aynı tamponla yıkamaya devam edildi.

Kolondan çıkan fraksiyonlar fraksiyon kollektörü ile 5'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı spektrofotometrede 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımında kullanıldı.

Fenil sepharoz CL-4B kolonundan çıkan aktif fraksiyonlar 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı içeren Vivacell 250 ultrafiltrasyon kabı ile 3.7 mL'lik hacime kadar konsantre edildi. Konsantre edilen örnekte aktivite ve protein tayini yapıldı ve bir sonraki saflaştırma adımı olan jel filtrasyon kolonuna uygulandı.

### **3.8.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Jel filtrasyon kromatografisi farklı molekül büyüklüğündeki proteinlerin ayrımını sağlayan bir kromatografi şeklidir. Bu amaçla, 70 mL yatak hacmine sahip Sephadex G-100 (medium) içeren kolon (1x100) kullanıldı. Kolon önce 0.15 M NaCl içeren 10 mM McIlvaine (pH 6.5, 4°C) tamponu ile dengeye getirildi. Daha sonra bir önceki adımda konsantre edilen örnek kolona yüklenerek peristaltik pompa yardımıyla 11 mL/saat akış hızında 0.15 M NaCl içeren 10 mM McIlvaine (pH 6.5, 4°C) tamponu ile yıkanarak, proteinlerin çıkışı spektrofotometrede 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolonda protein çıkışı olmayıncaya kadar kolonu yıkama işlemine devam edildi. Kolondan çıkan fraksiyonlar fraksiyon kollektörü ile 3'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen bu fraksiyonlar daha sonra karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

### 3.9. Elektroferez ve Zimografi

#### 3.9.1. $\alpha$ -Amilazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

$\alpha$ -Amilaz'ın saflığının ve moleküler ağırlığının saptanması Laemmli yöntemine (1970) göre SDS-PAGE kullanılarak yapıldı. Standart olarak miyozin (Tavşankanı, 205 kDa),  $\beta$ -galaktozidaz (E.coli, 116 kDa), fosforilaz B (Tavşankanı, 97.4 kDa), albumin (Sığır, 66 kDa), albumin (Yumurta, 45 kDa), karbonik anhidraz (Sığır eritrosit, 29 kDa) kullanıldı.  $\alpha$ -Amilaz'ın görüntülenmesi için SDS-PAGE kullanılarak zimografi (Wanderley vd., 2004) yapıldı. SDS-PAGE ve zimografi aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı. SDS-PAGE jelinde boyanın, standartların ve enzimin kat ettikleri mesafeler kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, U.K) yardımı ile ölçüldü. Standartların ve enzimin Rf değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$Rf = \frac{P_y}{J_b} \times \frac{O_b}{I_y}$$

$P_y$  = Boyamadan sonra taşınan proteinin aldığı yol

$J_b$  = Boyamadan sonraki jelin boyu

$O_b$  = Boyamadan önceki jelin boyu

$I_y$  = Boyamadan önceki işaretleyicinin (boyanın) aldığı yol

#### 3.9.2. SDS-PAGE ve Zimografi İçin Gerekli Çözeltiler

**% 30'luk akrilamid / N,N'- metilenbisakrilamid stok çözeltisi:** 29.2 g akrilamid ve 0.8 g N,N'- metilenbisakrilamid 100 mL distile suda çözüldü. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve oda sıcaklığında 1 ay saklandı.



**Ayırma tamponu:** 34.344 g Tris-baz az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8.8'e ayarlandı. 0.8 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra hazırlanan Tris-baz üzerine eklendi ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında kullanılmaya kadar saklandı.

**Yoğunlaştırma tamponu (Stacking tamponu):** 1.515 g Tris-baz az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra konsantre HCl kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlandı. 0.1 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra hazırlanan Tris-baz üzerine eklendi ve distile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında 1 ay süre ile saklandı.

**% 10'luk Amonyum persülfat:** 0.1 g Amonyum persülfat 1 mL distile su içerisinde çözüldü. Çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

**1 M Trizma baz:** 12.114 g Tris-baz az miktarda distile su içinde çözüldü. Konsantre HCl kullanılarak pH 6.8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**% 2'lik Brom fenol mavisi:** 0.1 g brom fenol mavisi 5 mL distile su içerisinde çözüldü.

**% 10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS):** 5 g SDS 50 mL distile su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak çözüldü.

**Örnek tamponu:** 1 M Tris-bazdan (pH 6.8) 12.5 mL, % 10'luk SDS'den 40 mL, gliserolden 20 mL, % 2'lik brom fenol mavisinden 2 mL ve % 5'lik  $\beta$ -merkaptoetanolden 5 mL alınarak karıştırıldı. Hazırlanan tampon koyu mavi renkte değilse, renk oluşana kadar NaOH ilave edildi. Distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı.  $\beta$ -merkaptoetanol'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 az miktarda distile su içerisinde çözüldü ve konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8.5'e ayarlandı. 1 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözülerek Tris-glisin çözeltisine ilave edildi. Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilendi.

**Commasie blue G-250 çözeltisi:** 0.125 g Commasie blue tartıldıktan sonra bir miktar distile su içerisinde çözüldü. Üzerine 200 mL metanol ve 35 mL asetik asit ilave edilerek distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Jel bu çözeltide bir gece bekletildi.

**1. Yıkama çözeltisi:** Metanol: asetik asit: distile su (400: 70: 530 mL) oranlarında karıştırıldı.

**2. Yıkama çözeltisi:** Metanol: asetik asit: distile su (50: 70: 880 mL) oranlarında karıştırıldı.

### 3.9.3. Yöntem

**3.9.3.1. 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 kenarları silikonlandı. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde degaze edilmiş % 10'luk ayırma jeli TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırıldı.

Hazırlanan jeller enjektör kullanılarak mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, USA) ve büyük elektroforez (20 x 20) (UVP, Germany) camları arasına döküldü. Ayırma jelinin içeriği Çizelge 3.2’de verildi. Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70’lik etanolla kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat beklendi. Süre sonunda jel üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaş yavaş alındı. Ayırma jelinin üzerine % 5’lik hazırlanan yoğunlaştırma jeli döküldü. Tarak jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için 1-2 saat beklendi. Yoğunlaştırma jelinin içeriği Çizelge 3.3’te verildi.

Çizelge 3.2. % 10’luk ayırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	İki jel için (mL)
Ayırma tamponu (pH 8.8)	2
Distile su	4.53
% 10’luk SDS	0.01
Vakum altında degaze işlemi	10 dk.
% 30’luk akrilamid/bis akrilamid	3.33
% 10’luk amonyum persülfat	0.05
TEMED	0.0035

Çizelge 3.3. % 5’lik yoğunlaştırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Tek jel için (mL)
Yoğunlaştırma tamponu (pH 6.8)	0.5
% 30’luk akrilamid/bis akrilamid	0.675
Distile su	3.75
% 10’luk SDS	0.05
Vakum altında degaze işlemi	10 dk.
% 10’luk amonyum persülfat	0.025
TEMED	0.007

**3.9.3.2. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı:** Jele uygulanacak örnekler ve standart örnek tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra, kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı (Zimografi için örnekler kaynatılmadı).

Tarak jele zarar vermeden çekildi. Jel distile su ile yıkanarak, polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra oluşan kuyucuklar elektrot tamponu ile dolduruldu ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 20 µL (protein bantlarının görüntülenmesi için 10 µg, zimogram için 100 µg protein) yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektrot tamponu eklendi. Güç kaynağı (UVP, Germany) ile üst jele 100 V, alt jele 200 V elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapıldı.

**3.9.3.3. Jelin boyanması:** Cam plaklar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrıldı. Boyanın aldığı yol kumpasla ölçüldükten sonra, ayırma jeli zimogram ve protein boyaması yapılmak üzere ikiye ayrıldı. Protein boyaması Coomassie Brilliant Blue G-250 ile 1 saat 100 rpm'de çalkalanarak boyandı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak uzaklaştırıldı ve bantlar görünür hale geldi.

#### **3.9.4. Zimografi**

Zimografi için cam plaklar arasından çıkarılarak ayrılan jel, oda sıcaklığında 20 dk distile su ile yıkandı. Jel 10 mM pH 5.0 McIlvaine tamponunda oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Aynı tamponda hazırlanmış % 1'lik çözünür patates nişastası içinde 4°C'de 1 saat inkübe edildi. Jel aynı çözelti içerisinde 55°C'de 1 saat etüvde inkübe edildi. Jel nişastadan çıkarılıp distile su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra iyot çözeltisinde (1 mM I<sub>2</sub>-0.5 M KI) bantlar belirginleşene kadar bekletildi. Gerekli ölçümler yapıldıktan sonra aynı çözelti içerisinde saklandı.

#### **3.10. Enzim Aktivitesinin Ölçümü**

*A. fumigatus* HBF50 suşundan saflaştırılan α-amilaz aktivitesi, Bernfeld'in kısmi olarak değiştirilmiş 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Bernfeld, 1955). Substrat olarak 10 mM pH 5.0 McIlvaine tamponunda hazırlanmış, % 1'lik çözünür patates nişastası

kullanıldı. Standart deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.4'te, DNS çözeltisinin bileşenleri Çizelge 3.5'te verildi. Enzim aktivitesi spektrofotometre kullanılarak 530 nm'de standart deney koşullarında ölçüldü. Oluşan redüktör şeker miktarı standart maltoz eğrisinden hesaplandı. Enzim aktivitesi ve spesifik aktivite aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı.

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

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

Bir enzim ünitesi (IU), 55°C'de pH 5.0'te 1 dakikada çözünür patates nişastasından 1 µmol maltozun serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edildi.

Çizelge 3.4. Standart deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
% 1'lik Çözünür patates nişastası	100 µL	100 µL
Enzim	100 µL	-
İnkübasyon (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

Çizelge 3.5. DNS çözeltisinin bileşenleri

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

### 3.11. Maltoz Standardı

$\alpha$ -Amilazın nişastayı hidrolizleyerek oluşturduğu redüktör şeker miktarını saptamak için, DNS metodu kullanıldı. DNS metodu, redüktör şekerlerin serbest karbonil gruplarının varlığını test etmek için kullanılır. Bu metodun prensibi, fonksiyonel aldehit (örneğin; 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 (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 ve 5000  $\mu$ M) çözeltileri hazırlandı. Redüktör şeker miktarı, DNS metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra, konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi. Deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.6'da verildi.

Çizelge 3.6. Redüktör şeker miktarının ölçümü

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
Maltoz	200 $\mu$ L	-
Distile su	-	200 $\mu$ L
DNS	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

### 3.12. Fermentasyon Ortamının Redüktör Şeker Tayini

Fermentasyon ortamının günlük süzütüsündeki redüktör şeker miktarının değişimi DNS metoduna göre ölçüldü. Redüktör şeker miktarı maltoz standart eğrisine göre hesaplandı. Deney ortamının bileşenleri Çizelge 3.7’de verildi.

Çizelge 3.7. Fermentasyon ortamının redüktör şeker miktarının tayini

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponu	100 µL	100 µL
Fermentasyon süzütüsü	100 µL	-
Distile su	-	100 µL
DNS	50 µL	50 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

### 3.13. Protein Tayini

Çalışma boyunca protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı (Bradford, M.M., 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir ve 470 nm’de maksimum absorbans verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm’de maksimum absorbans verir. Bu yöntemde renk oluşumu 2 dakika sonra gerçekleşir ve 1 saat stabil kalır. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan çözeltiler ve standartların hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

### **3.13.1. Coomassie Brilliant Blue G250 Çözeltisinin Hazırlanışı**

Coomassie Brilliant Blue G250'nin 100 mg'ı 50 mL % 95'lik etil alkolde çözüldü. Çözelti daha sonra 100 mL % 85'lik fosforik asitle karıştırılarak hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Boya çözeltisi daha sonra filtre kâğıdından süzöldü.

### **3.13.2 Standart Protein Çözeltisinin Hazırlanışı**

Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA'nın 1 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Standart çözeltiler bu stoktan 5-200 µg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek hazırlandı.

### **3.13.3. Yöntem**

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100'er µL aktarıldı, köre ise 100 µL ultra saf su eklendi. Bütün tüplere 5'er mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenerek karıştırıldı. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein standart grafiğı çizildi. Denemeler boyunca örneklerin protein tayini yukarıdaki yöntem kullanılarak belirlendi. Örneklerin protein miktarları, protein standart eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlendi.

## **3.14. İnkübasyon Süresinin Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için gerekli deney ortamı Çizelge 3.8'de verildi. Farklı zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk) enzim substrat ile inkübe edilerek, oluşan redüktör şeker miktarı DNS metodu ile ölçöldü (Bernfeld, 1955).



Çizelge 3.8. *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
% 1'lik Çözünür patates nişastası	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Enzim	100 $\mu$ L	-
55°C'de inkübasyon		
DNS	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Enzim	-	100 $\mu$ L
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

### 3.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

$\alpha$ -Amilaz 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 final konsantrasyonu % 0.5 olacak şekilde (standart deney konsantrasyonudur) tamponla seyreltilerek deney ortamına eklendi.

### 3.16. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

*A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilaz farklı zaman aralıklarında, 10 mM pH 5.0 McIlvaine tamponunda 25, 40, 55, 60, 70 ve 80°C'de inkübe edildi. İnkübasyondaki enzim çözeltisinden belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak standart deney koşulları altında aktivite ölçümü yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

### 3.17. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

*A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilaz üzerine pH'nın etkisini incelemek için, standart deney ortamının pH'sı 0.5 birimlik aralıklarla pH 3.0-8.5 aralığında ayarlandı. Tampon çözeltileri olarak pH 3.0-6.5 için 50 mM McIlvaine tamponu, pH 7.0-7.5 için 50 mM Sørensen fosfat tamponu ve pH 8.0-8.5 için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Yüzde 5'lik çözümler stok nişastadan tamponlarla uygun seyreltmeler yapılarak standart deney ortamına final konsantrasyonu % 0.5'lik olacak şekilde eklendi. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü. Deney ortamı Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için kullanılan deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözümler patates nişastası (% 5)	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Tampon	80 $\mu$ L	180 $\mu$ L
Enzim	100 $\mu$ L	-
İnkübasyon (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Enzim	-	100 $\mu$ L
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
530 nm dalga boyunda absorbanans okunur		

### 3.18. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

*A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazı farklı pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) 40°C'de inkübe edildi. Tampon çözeltileri olarak pH 3.0-6.0 için 50 mM McIlvaine tamponu, pH 7.0 için 50 mM Sørensen fosfat tamponu ve pH 8.0 için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı.

Bu işlem için, enzim belirtilen tampon çözeltileri ile aynı pH'da olması için uygun şekilde seyreltmeler yapılarak hazırlandı. Enzim çözeltisinden belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak standart deney koşulları altında aktivite ölçümü yapıldı.

Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol olarak kabul edildi (100) ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

### **3.19. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

$\alpha$ -Amilaz aktivitesi optimum sıcaklık (55°C), pH (5.0) ve sabit inkübasyon süresinde (20 dk) farklı konsantrasyonlarda substrat (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 ve 2.0, mg/mL çözümlü patates nişastası) kullanılarak ölçüldü. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı.

### **3.20. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi**

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz, amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası ve çözümlü patates nişastasının 50 mM pH 5.0 McIlvaine tamponunda hazırlanan % 1'lik çözeltileri substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesi standart deney koşulları altında ölçüldü. Çözümlü patates nişastası için ölçülen değer kontrol olarak (100) kabul edildi ve aktivite değişimleri % değer olarak hesaplandı. Deneyde kullanılan amiloz stok çözeltisi diğer substratlardan farklı olarak aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Bu işlem için 0.1 g amiloz tartıldı ve 2 mL 0.5 N NaOH çözüldü. Çözeltiyi nötrleştirmek için 2 mL 0.5 N HCl ilave edildi. Daha sonra 1 M pH 5.0 McIlvaine tamponundan final konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde ilave edildi. Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

### 3.21. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının (NaCl, KCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) ve EDTA'nın distile su içerisinde 100 mM stok çözeltileri hazırlandı.

Metal iyonları ve EDTA 1, 5 ve 10 mM final konsantrasyonlarda deney ortamına eklendi (Çizelge 3.10, 3.11 ve 3.12). Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü.

Bu deneyde kullanılacak % 2'lik çözümlü patates nişastası, 50 mM pH 5.0, 55°C MES tamponunda hazırlandı. Deney ortamına final konsantrasyonu % 0.5'lik olacak şekilde substrat ilave edildi. Metal iyonu içermeyen standart deney ortamı kontrol olarak (100) kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

Çizelge 3.10. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözümlü patates nişastası (% 2)	50 µL	50 µL
Metal iyonları	2 µL	2 µL
50 mM MES tamponu	48 µL	48 µL
Enzim	100 µL	-
İnkübasyon (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

Çizelge 3.11. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı

<b>Deney bileşenleri</b>	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
Çözünür patates nişastası (% 2)	50 µL	50 µL
Metal iyonları	10 µL	10 µL
50 mM MES tamponu	40 µL	40 µL
Enzim	100 µL	-
İnkübasyon (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

Çizelge 3.12. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı

<b>Deney bileşenleri</b>	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
Çözünür patates nişastası (% 2)	50 µL	50 µL
Metal iyonları	20 µL	20 µL
50 mM MES tamponu	30 µL	30 µL
Enzim	100 µL	-
İnkübasyon (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

### 3.22. Enzimin Tuz Toleransı

$\alpha$ -Amilazın tuz toleransını belirlemek için, enzim final konsantrasyonu 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 M NaCl ile 4°C'de, 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 % değer olarak belirlendi.

### 3.23. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan fenil metil sülfonil florür (PMSF); sülfidril redükleyici ajan  $\beta$ -merkaptoetanol ve 1,4-dithiothreitol (DTT); sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril grubu oksitleyici ajan 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB); sistein ve histidin alkilleyici iodoasetamid (İAA); triptofan spesifik inhibitörü N-bromo suksinamid (NBS); karboksil grubu spesifik inhibitörü, sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC) kullanıldı. Ayrıca, protein denatürantı olan üre ve SDS kullanıldı. PMSF,  $\beta$ -merkaptoetanol, DTT, CMC, DTNB, İAA, NBS, üre ve SDS'nin 100 mM'lık stok çözeltilerinden deney ortamına final konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde eklendi (Çizelge 3.13 ve 3.14). Enzim çözeltisi bu konsantrasyonlardaki inhibe edici ajanlarla 40°C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi. Aynı koşullar altında inhibitör içermeyen standart deney ortamı kontrol olarak (100) kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre aktivite değişimi % değer olarak belirlendi. Deneyde kullanılan stok çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

$\beta$ -merkaptoetanol, DTT, NBS, CMC, İAA, üre ve SDS distile suda, PMSF n-propanolde ve DTNB 0.1 M NaOH'ta çözüldü.

% 2'lik çözünür patates nişastası, 50 mM pH 5.0 Mcllvaine tamponunda hazırlandı ve deney ortamında final konsantrasyonu % 0.5'lik olacak şekilde ilave edildi.

Çizelge 3.13. 1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

<b>Deney bileşenleri</b>	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
50 mM Mcllvaine tamponu	48 µL	48 µL
İnhibe edici ajan	2 µL	2 µL
% 2'lik Çözünür nişasta	-	50 µL
Enzim	100 µL	-
İnkübasyon süresi (40°C)	30 dk	30 dk
% 2'lik Çözünür nişasta	50 µL	-
İnkübasyon süresi (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Çizelge 3.14. 5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

<b>Deney bileşenleri</b>	<b>Örnek</b>	<b>Kör</b>
50 mM Mcllvaine tamponu	40 µL	40 µL
İnhibe edici ajan	10 µL	10 µL
% 2'lik Çözünür nişasta	-	50 µL
Enzim	100 µL	-
İnkübasyon süresi (40°C)	30 dk	30 dk
% 2'lik Çözünür nişasta	50 µL	-
İnkübasyon süresi (55°C)	20 dk	20 dk
DNS	50 µL	50 µL
Enzim	-	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	500 µL	500 µL
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

### 3.24. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

$\alpha$ -Amilazın nişastaya adsorpsiyon oranını belirlemek için çözüdür olmayan mısır nişastası, pirinç nişastası ve buğday nişastası kullanıldı. 1 g nişasta örnekleri distile suda çözüdü. Daha sonra 2500 x g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Dökeltideki çözüdür nişasta kısımları uzaklaştırıldı ve çökelti 2 mL saflaştırılmış enzimle karıştırıldı. Enzim nişasta karışımı 4°C'de, 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim-nişasta karışımı, 2500 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlendikten sonra, süpernatantta 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

### 3.25. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi ve amilazın tipini belirlemek için ince tabaka kromatografisi (Alugram® Sil G/UV<sub>254</sub> 0.2 mm, 5 x 10 cm, Germany) kullanıldı (Fontana vd., 1988). Bu işlem için 2 mL enzim çözeltisi ile 2 mL % 1'lik çözüdür patates nişastası 55°C'de 24 saat inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında (15, 30, 45, 60 dk ve 24 saat) enzim-nişasta karışımından 500 µL alınarak kaynar su banyosunda 10 dakika kaynatıldı. Örnekler kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Standart olarak glukoz (G1), maltoz (G2), maltotrioz (G3), maltotetroz (G4) ve maltopentoz (G5) kullanıldı. Standart karışımı 50 mM McIlvaine tamponunda % 0.1'lik olacak şekilde hazırlandı.



İnce tabaka plaklarının alt kısmından 0.5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizildi. Sonra standart, nişasta ve farklı zamanlarda inkübe edilen 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, Germany) 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. Sonra plaklar boya çözeltisine batırılıp çıkarıldı ve havada kuruması sağlandı. Kuruyan plaklar 100°C'lik etüvde 10 dakika tutularak renk gelişimi sağlandı. Oluşan lekelerin aldığı yol 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.

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

### 3.26. Verilerin Değerlendirilmesi

Protein standardı, maltoz standardı,  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri lineer regresyon analizi ile saptandı (STATISTICA 8.0). Her deney üç tekrar üzerinden yapıldı. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Duncan Testi) yapıldı (STATISTICA 8.0). Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulandı (STATISTICA 8.0).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Fungusların Amilolitik Taranması, Aflatoksin Testi ve Seçimi

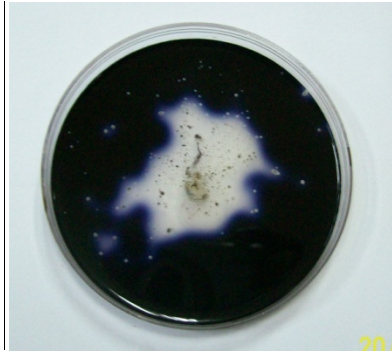
Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı stok kültürlerinde kayıtlı havadan izole edildikten sonra tamısı yapılan 11 fungusun kalitatif amilaz tarama sonuçları Çizelge 4.1’de verildi. Amilolitik tarama sonuçlarına bakıldığında 7 türde amilaz aktivitesi görüldü. Şekil 4.1’de amilolitik tarama için pozitif ve negatif sonuca birer örnek verildi. Daha sonra amilolitik aktivite gösteren bu türlerin aflatoksin üretilip üretilmediği kontrol edildi.

Amilolitik tarama sonuçlarında amilaz aktivitesi gösteren 7 türün (HBF38, HBF46, HBF47, HBF50, HBF56, HBF96, HBF100) aflatoksin üretilip üretilmediği kontrol edildi. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi HBF38, HBF56 ve HBF100 aflatoksin testinde pozitif sonuç verdi. Şekil 4.2’de aflatoksin testinde pozitif ve negatif sonuca birer örnek sunuldu.

UV altında ışımaya yapmayan türlerden en iyi amilaz aktivite gösteren *Aspergillus crystallinus* HBF46 olmasına rağmen sporulasyon süresinin uzun olması ve üretiminin zor olması nedeniyle, *Aspergillus fumigatus* HBF50 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi.

Çizelge 4.1. Fungusların kalitatif amilolitik tarama ve aflatoksin test sonuçları

Fungus	Zon Çapı (Aktivite çapı/ Koloni çapı)	Aflatoksin Testi
<i>Aspergillus fumigatus</i> HBF96	1.56	Negatif
<i>Aspergillus japonicus</i> HBF97	-	-
<i>Aspergillus niger</i> HBF98	-	-
<i>Aspergillus niveus</i> HBF99	-	-
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> HBF100	1.29	Pozitif
<i>Aspergillus versicolor</i> HBF102	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> HBF38	1.10	Pozitif
<i>Aspergillus crystallinus</i> HBF46	2.40	Negatif
<i>Aspergillus glaber</i> HBF47	1.90	Negatif
<i>Aspergillus parasiticus</i> HBF56	2.90	Pozitif
<i>Aspergillus fumigatus</i> HBF50	1.90	Negatif



Pozitif

(a)

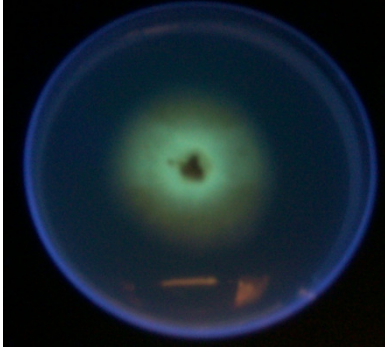


Negatif

(b)

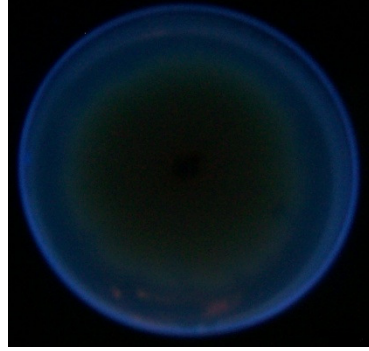
Şekil 4.1. Amilolitik aktivitenin taranması

(a) *A. fumigatus* HBF50(b) *A. versicolor* HBF102



Pozitif

(a)



Negatif

(b)

Şekil 4.2. Aflatoksin testi (a) *A. terreus* HBF38 (b) *A. fumigatus* HBF50

#### 4.2. *A. fumigatus* HBF50'nin Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

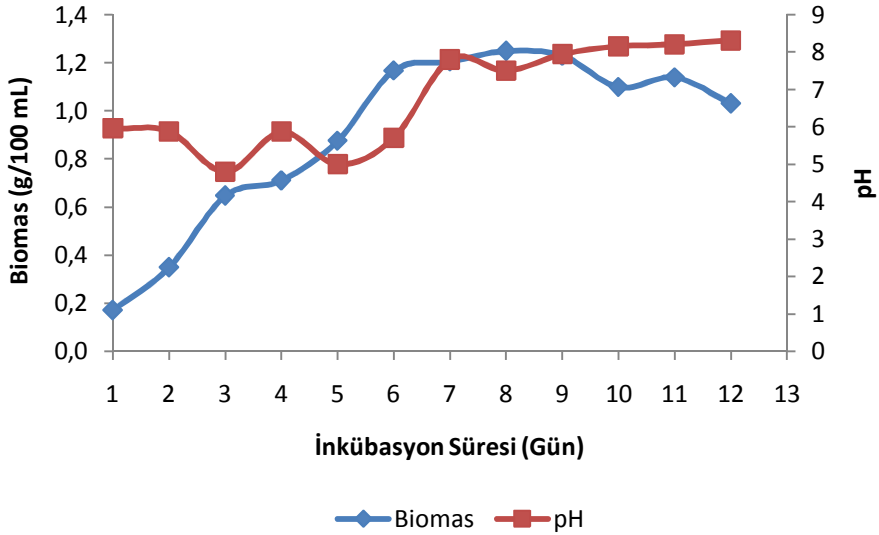
*A. fumigatus* HBF50'nin büyüme eğrisi ve en iyi enzim üretim zamanını saptamak için 12 günlük inkübasyon süresince günlük biyomas, pH, redüktör şeker ve enzim aktivite ölçümleri yapılarak, elde edilen değerler Çizelge 4.2'de verildi. İnkübasyon süresine bağlı olarak biyomas miktarı artarak, 8. günde maksimum bir değere ulaştı ve 8. günden sonra azaldı (Şekil 4.3). Başlangıçta 5.96 olan pH enzim aktivitesinin en yüksek olduğu gün 8.15 oldu (Şekil 4.3). İnkübasyon süresine bağlı olarak redüktör şeker miktarı ilk 3 gün artarak, 3. günden sonra azalmaya devam etti (Şekil 4.4). Enzim aktivitesi ilk 3 günde çok az bir artış gösterip, 3. günden sonra ise azaldı. 4. günden itibaren artarak 10. günde maksimum değere ulaştı ve 10. günden sonra azaldı (Şekil 4.4). Ölçülen bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ( $p < 0.05$ ) bulundu.

Çizelge 4.2. *A. fumigatus* HBF50'nin fermentasyon ortamında zamana bağlı redüktör şeker, enzim aktivitesi, pH ve biyomas değişimi

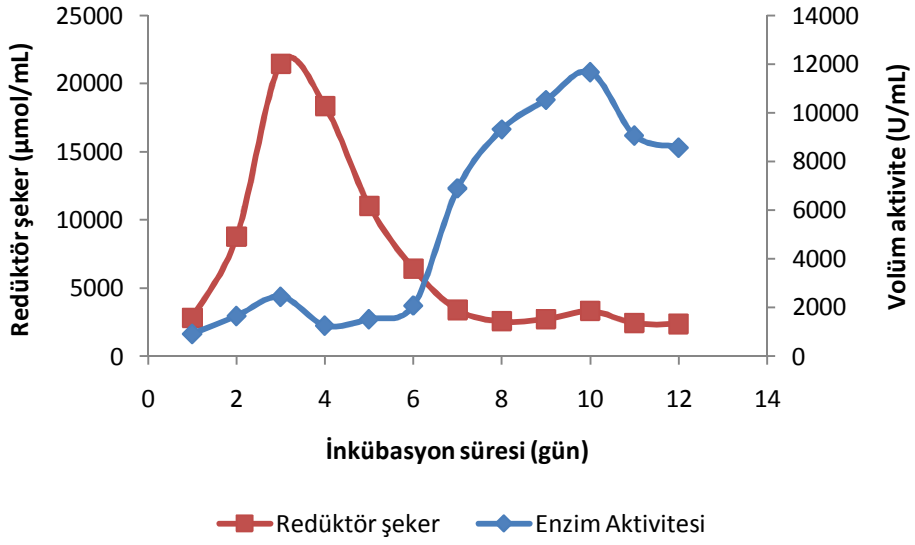
İnkübasyon süresi (gün)	Redüktör şeker ( $\mu\text{mol/mL}$ ) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	Enzim aktivitesi (U/mL) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	pH	Biyomas (g/100 mL)
1	2794 $\pm$ 18	a	923 $\pm$ 58	a	5.96	0.1717
2	8767 $\pm$ 265	b	1653 $\pm$ 83	bj	5.88	0.3493
3	21455 $\pm$ 175	c	2447 $\pm$ 153	c	4.80	0.6472
4	18339 $\pm$ 98	d	1262 $\pm$ 5	ab	5.87	0.7106
5	11032 $\pm$ 159	e	1524 $\pm$ 80	abd	5.00	0.8754
6	6429 $\pm$ 60	f	2082 $\pm$ 76	cdj	5.71	1.1670
7	3397 $\pm$ 51	g	6899 $\pm$ 398	e	7.80	1.2039
8	2582 $\pm$ 54	ah	9325 $\pm$ 214	f	7.50	1.2481
9	2730 $\pm$ 48	a	10532 $\pm$ 21	g	7.94	1.2282
10	3323 $\pm$ 59	g	11667 $\pm$ 429	h	8.15	1.0984
11	2444 $\pm$ 69	ah	9066 $\pm$ 239	fi	8.20	1.1389
12	2360 $\pm$ 58	h	8571 $\pm$ 299	i	8.31	1.0301

**ORT:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

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



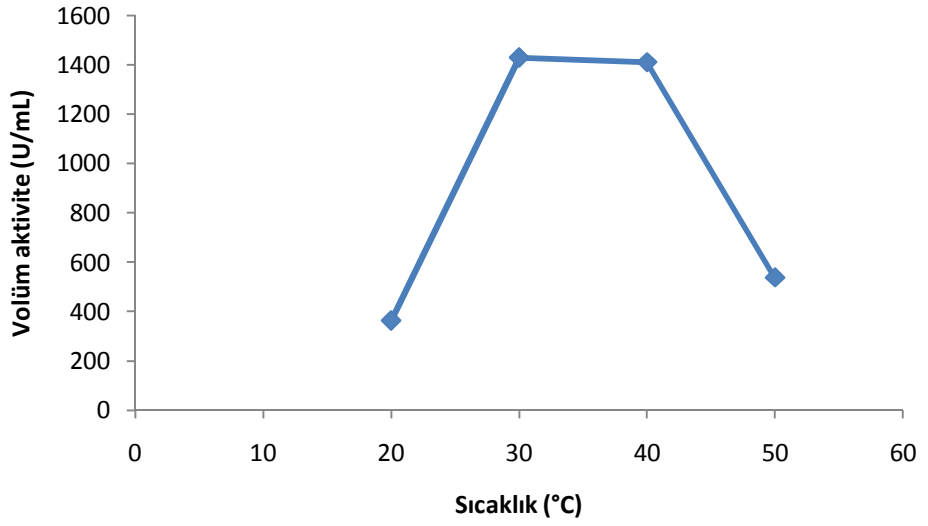
Şekil 4.3. *A. fumigatus* HBF50'nin büyüme eğrisi ve kültür ortamının pH değişimi



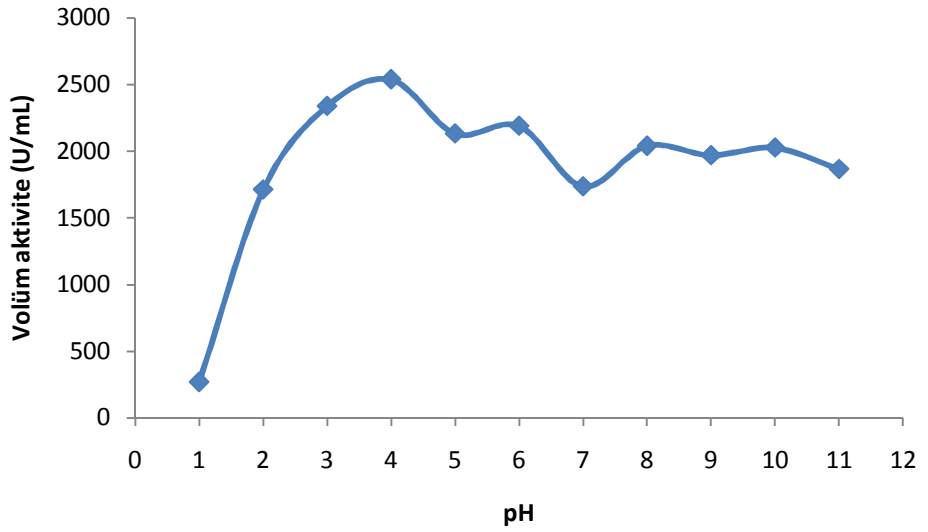
Şekil 4.4. *A. fumigatus* HBF50'nin kültür ortamındaki redüktör şeker ve enzim aktivite değişimi

### 4.3. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi

*A. fumigatus* HBF50'nin en iyi amilaz ürettiği sıcaklık 30°C ve pH ise 4.0 olarak bulundu. Sonuçlar Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterildi.



Şekil 4.5. *A. fumigatus* HBF50'nin amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.6. *A. fumigatus* HBF50'nin amilaz üretimi üzerine pH'nın etkisi

#### 4.4. Enzimin Saflaştırılması

Optimum koşullarda üretimi yapılan *A. fumigatus* HBF50'nin amilaz kültür ortamı süzülerek enzim kaynağı olarak kullanıldı. Süzüntüdeki amilazın saflaştırılmasında ultrafiltrasyon, DEAE sepharoz CL-6B, fenil sepharoz CL-4B, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografi adımları kullanılarak saflaştırıldı ve saflaştırma Çizelge 4.3'te sunuldu. Çizelgede görüldüğü gibi ultrafiltrasyon basamağında enzim hem konsantre edildi hem de % 59 verimle 1.08 kat saflaştırıldı.

Ultrafiltrat, DEAE sepharoz CL-6B kolonuna uygulandığında Şekil 4.7'de görüldüğü gibi bağlanmayan proteinlerin büyük bir kısmı kolonun tamponla yıkanması esnasında çıktı. Bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi çok düşük seviyede bulundu. Enzimin kolona bağlandığına karar verilerek, enzimin kolondan çıkarılması için iyon şiddeti artırılarak NaCl (0-1 M) ile linear gradient yapıldı. Tuz gradientinin 0.55-0.70 M derişimlerine karşılık gelen 46-49. fraksiyonlarda protein derişim ve enzim aktivitesi çok yüksek çıktı. Bu yüksek çıkan fraksiyonlar birleştirilerek enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin % 25 verimle, 1.48 kat saflaştırıldığı saptandı.

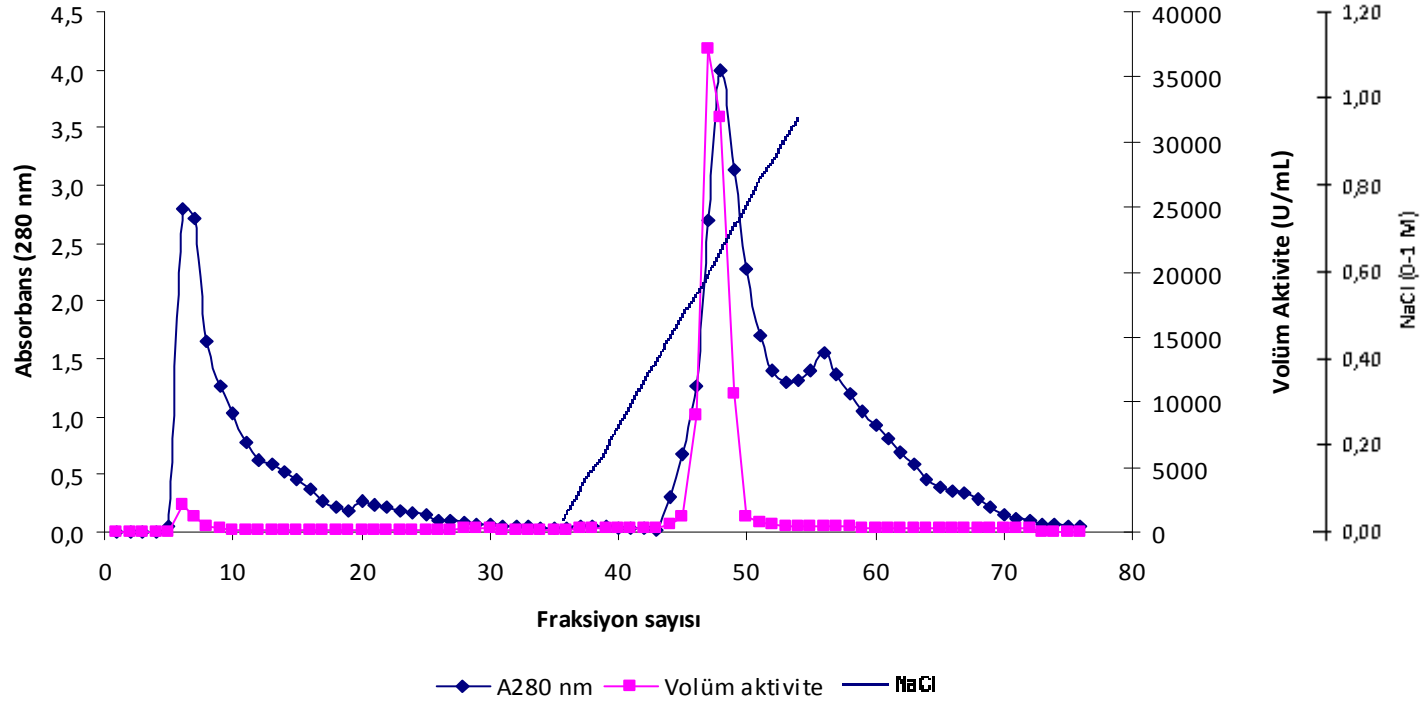
Aktif fraksiyonlar fenil sepharoz CL-4B kolonuna uygulandığında Şekil 4.8'de görüldüğü gibi bağlanmayan proteinlerin çok büyük bir kısmı kolonun amonyum sülfatlı tamponla yıkanması esnasında çıktı. Bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi saptanmadı. Bu durum enzimin tamamen kolona bağlandığını göstermektedir. Enzimin kolondan çıkarılması için amonyum sülfat derişimi azaltılarak (1-0 M) ile negatif tuz gradient yapıldı. Negatif tuz gradienti uygulaması ile çıkan fraksiyonlarda çok az bir protein çıkışı oldu. Ancak enzim aktivitesi saptanamadı. Bu yüzden kolon tuz içermeyen tamponla yıkanmaya devam edildi. Bu uygulamayla protein çıkışı artarak devam etti ve 53. fraksiyondan itibaren protein çıkışı durdu. Protein çıkan bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi ölçüldüğünde 47-49. fraksiyonlarda enzim aktivitesi diğer fraksiyonlara göre yüksek çıktı.



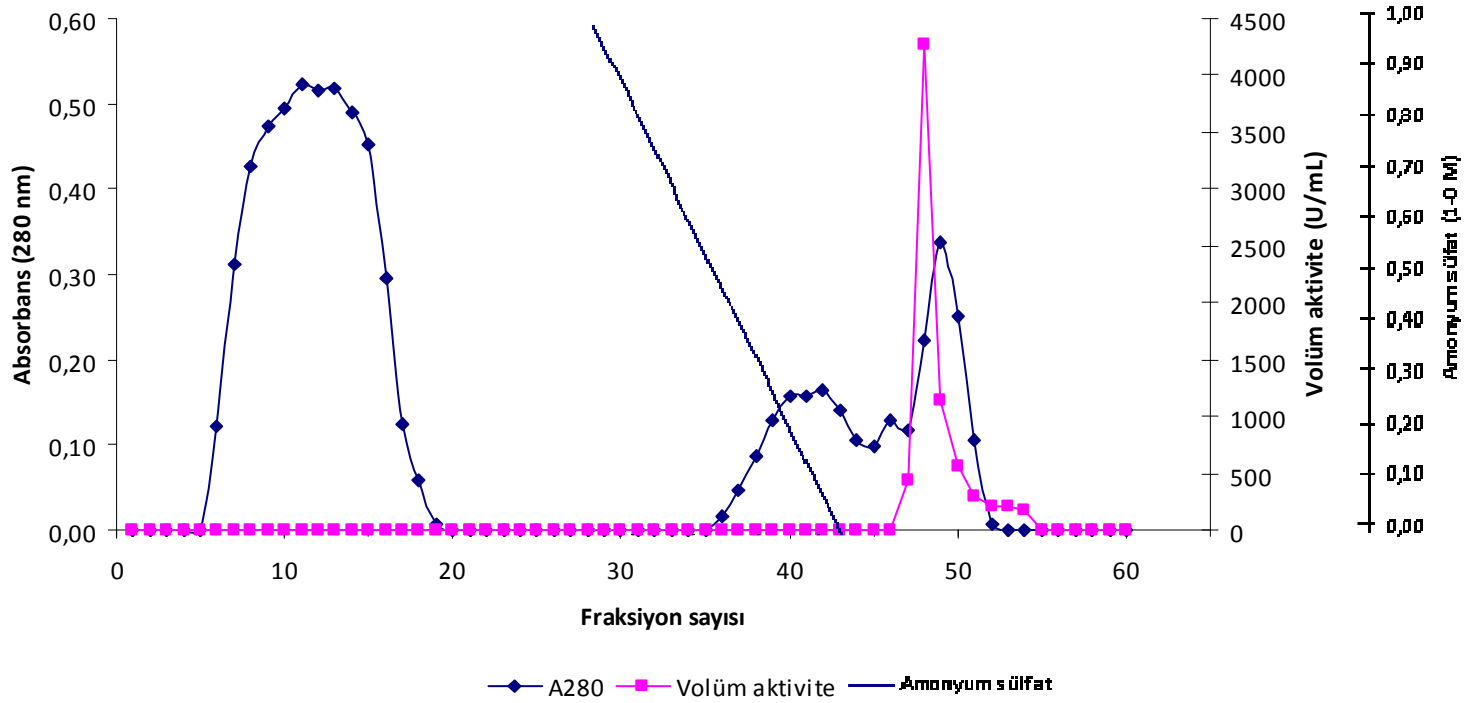
Bu yüksek çıkan fraksiyonlar birleştirilerek enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin % 6 verimle, 3.15 kat saflaştırıldığı saptandı. Hidrofobik etkileşim kromatografisinden çıkan bu fraksiyonlar ultrafiltrasyonla % 4.77 verimle, 2.49 kat saflaştırılarak konsantre edildi. Bu örnek daha sonra sefadeks G-100 kolonuna uygulandığında Şekil 4.9'da görüldüğü bir saflaştırma profili izledi. Kromatografinin başlangıcında çok az protein çıkışı görüldü. Fakat bu fraksiyonlarda düşük aktivite saptandı. Ancak, daha sonraki fraksiyonlarda protein çıkışı ile birlikte enzim aktivitesi de yükselmeye devam etti. Protein derişimini azaldığı 25-30. fraksiyonlarda enzim aktivitesi diğer fraksiyonlara göre çok yüksek çıktı. Bu yüksek çıkan fraksiyonlar birleştirilerek enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin % 1.92 verimle, 3 kat saflaştırıldığı saptandı. Elde edilen bu fraksiyonlar birleştirilerek karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı.

Çizelge 4.3. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının saflaştırılması

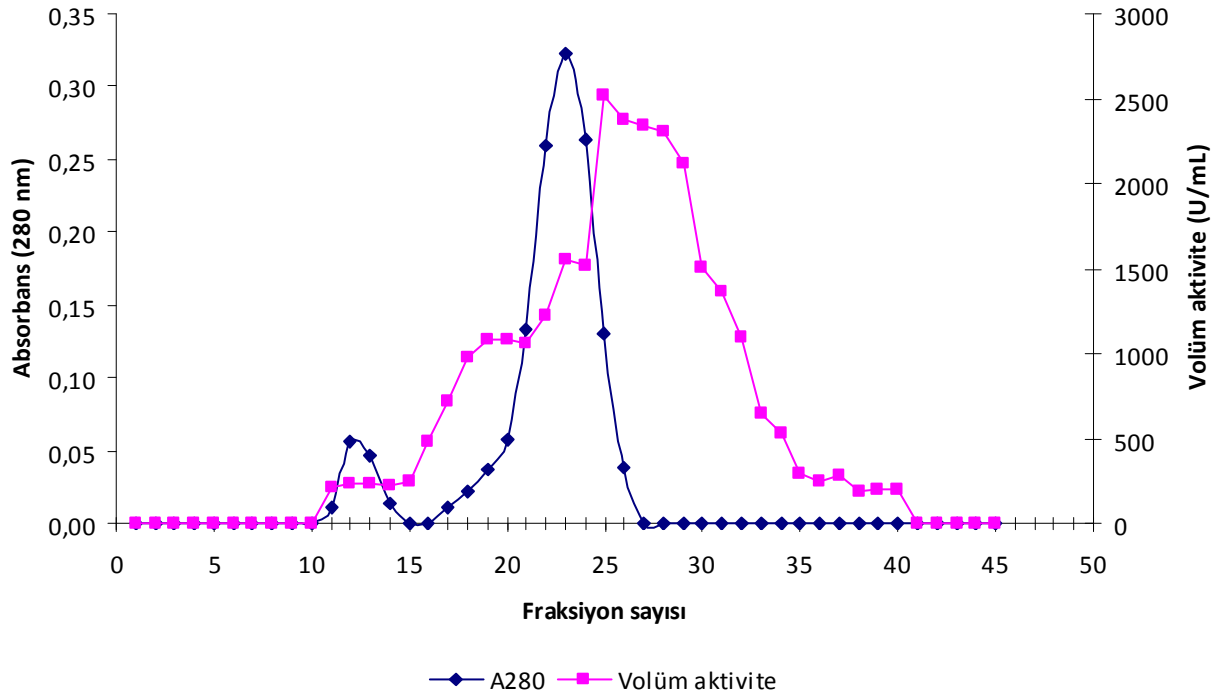
Saflaştırma Basamakları	Fraksiyon Hacmi (mL)	Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Total Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
<b>Ham Filtrat</b>	550	0.0783	43.07	57181	3149575	73129	100	1
<b>Ultrafiltrat (Üst sıvı)</b>	15	1.568	23.52	123560	1853400	78801	59	1.08
<b>DEAE-Sepharoz CL-4B</b>	21	0.342	7.19	743	780413	108617	25	1.48
<b>Phenyl-Sepharoz CL-6B</b>	33	0.025	0.83	5758	189997	230299	6.03	3.15
<b>Ultrafiltrat</b>	3.7	0.223	0.83	40640	150366	182262	4.77	2.49
<b>Sefadex G-100</b>	29	0.0095	0.28	2088	60559	219815	1.92	3.00



Şekil 4.7. İyon değişim kromatografisi (DEAE sepharoz CL-6B)



Şekil 4.8. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (Fenil sepharoz CL-4B)

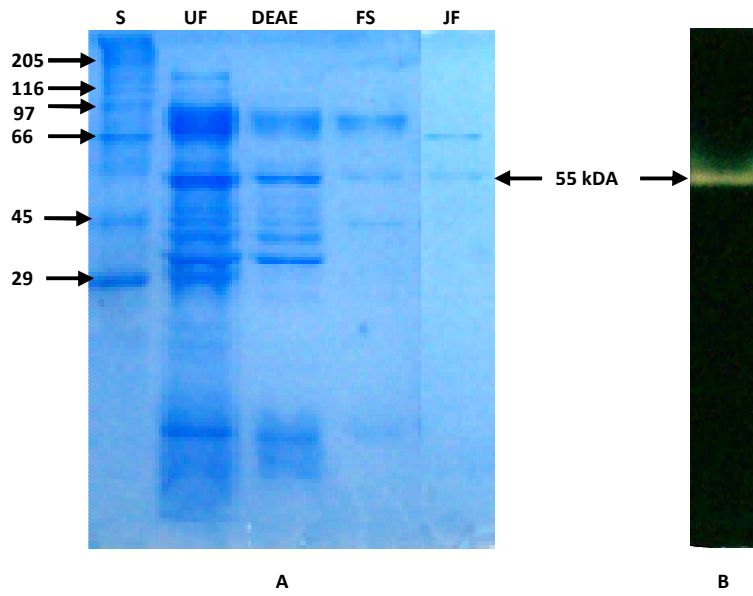


Şekil 4.9. Jel filtrasyon kromatografisi (Sefadeks G-100)

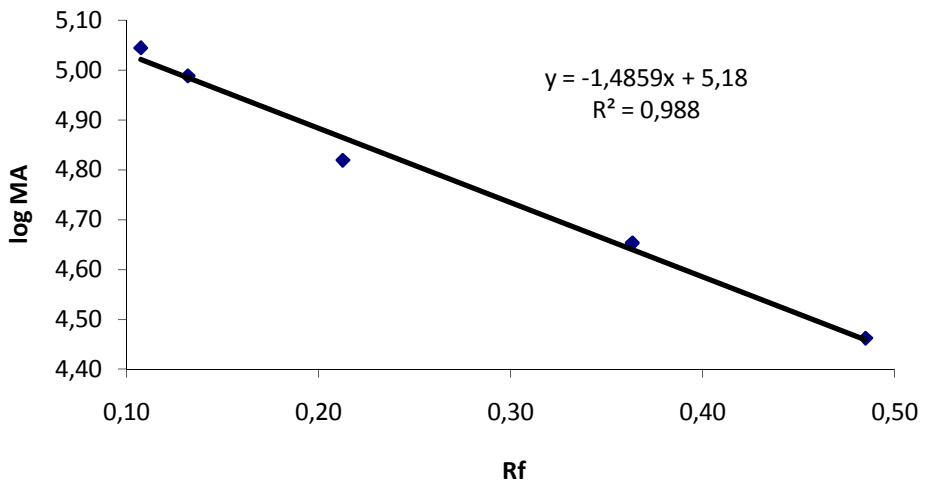
#### 4.5. Elektroferez ve Zimografi

Bu enzimin saflığını, moleköl ağırlığını ve kaç alt üniteye sahip olduğunu saptamak için SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi her saflaştırma adımında protein bantlarının sayısının gittikçe azaldığı görülmektedir. En son adımda ise iki protein bandı görülmektedir. Bu bantlardan hangisinin  $\alpha$ -amilaz olduğuna karar vermek için SDS-PAGE'te enzimin görüntülenmesi için zimografi yapıldı. Zimografi sonrası yapılan ölçümler sonucunda 2. bandın  $\alpha$ -amilaz olduğu ve nişastanın hidrolizinden sorumlu enzimin tek bir monomere sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, protein standartlarının Rf değerleri ile moleköl ağırlıklarının logaritması alınarak standart grafiğı çizildi (Şekil 4.11).

Bu grafiğın denklemleri  $y = -1.4859 + 5.18x$ , tamamlayıcılık katsayısı  $R^2 = 98.8$  bulundu. Bu denklemden yararlanarak enzimin moleköl ağırlıkları hesaplandı. Buna göre  $\alpha$ -amilazın moleköl ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak hesaplandı.



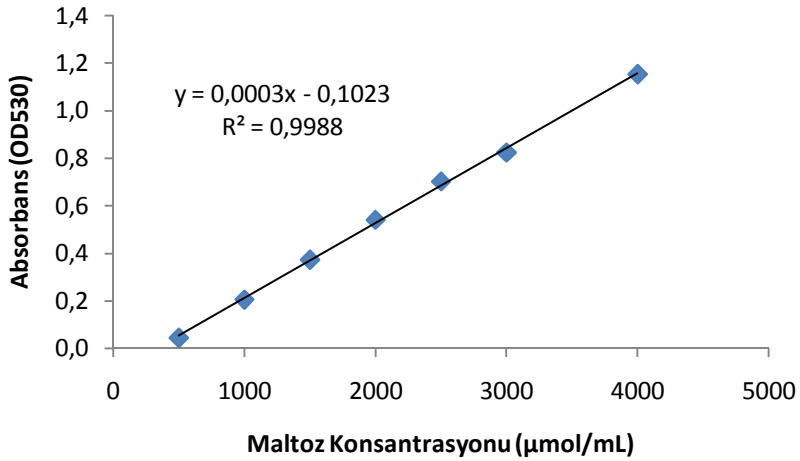
Şekil 4.10. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının zimografi ve elektroforez görüntüleri  
 A: SDS-PAGE, B: SDS-PAGE zimografi, (S: Standart, 205 kDa miyozin, 116 kDa  $\beta$ -galaktozidaz, 97 kDa fosforilaz B, 66 kDa albumin, 45 kDa albumin, 29 kDa karbonik anhidraz, UF: Ultrafiltrat, DEAE: DEAE sepharoz, FS: Fenil sefaroz, JF: Jel filtrasyonu)



Şekil 4.11. SDS-PAGE protein standart eğrisi

#### 4.6. Maltoz Standardı

$\alpha$ -Amilazın nişastayı hidrolizleyerek oluşturduğu redüktör şeker miktarını saptamak için, DNS metodu kullanıldı. Maltoz standart çözeltilerinin spektrofotometrik olarak absorbsanları ölçüldü. Konsantrasyona karşı absorbsan grafiği, linear regresyon analiziyle çizildi (Şekil 4.12). Konsantrasyonu bilinmeyen örneğin maltoz konsantrasyonu, grafik denklemden hesaplandı. Grafiğin denklemi  $y = 0.0003x - 0.1023$ , regrasyon katsayısı  $R^2 = 0.9988$  dir.

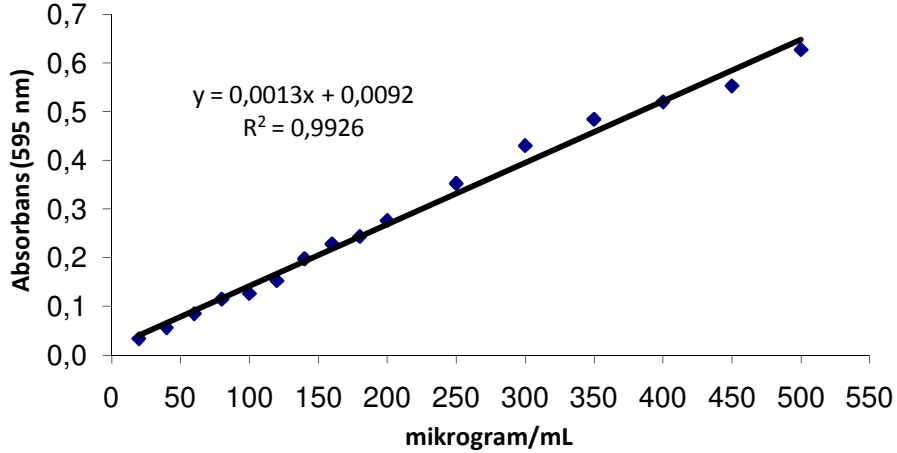


Şekil 4.12. Maltoz standart eğrisi

#### 4.7. Protein Tayini

Fermentasyon ortamının ve saflaştırmanın her basamağında protein tayini yapıldı. Örneklerin protein konsantrasyonlarını saptamak için, standart olarak sığır serum albumini kullanılarak konsantrasyona karşı absorbsan grafiği linear regresyon analiziyle çizildi (Şekil 4.13). Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu bu grafiğin denkleminde ( $y = 0.0013x + 0.0092$ ,  $R^2 = 0.9926$ ) hesaplandı.





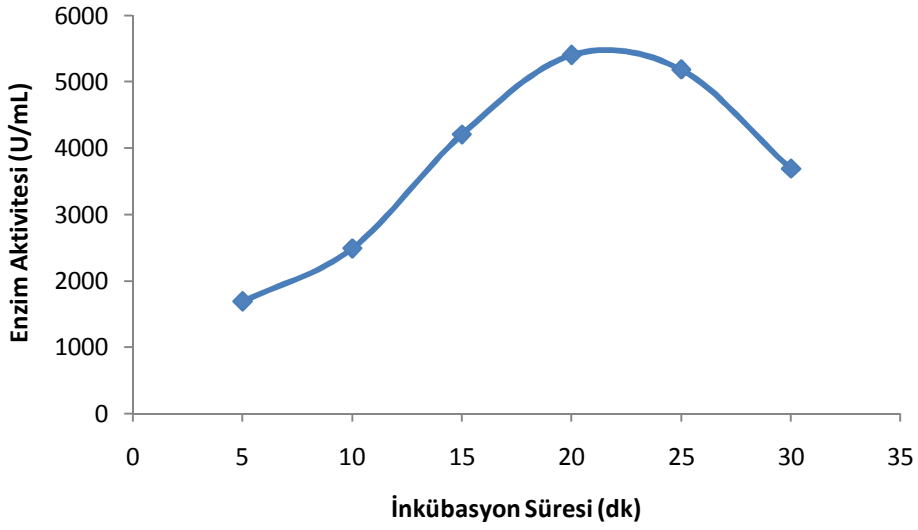
Şekil 4.13. Protein standart eğrisi

#### 4.8. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakıldıklarında ilk 20 dakikada enzim aktivitesi zamana bağlı olarak doğrusal olarak artmaktadır (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.4). Ancak zamanın artışı ile enzim aktivitesi doğrusallıktan sapmaktadır. Bu nedenle standart enzim aktivite deneyleri 20 dakikalık inkübasyonlarda yapıldı. İnkübasyon periyodları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.4. *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon Süresi (dk)	Enzim aktivitesi (U/mL) (ORT. $\pm$ S. H.)	x
5	1688 $\pm$ 271	a
10	2487 $\pm$ 89	a
15	4204 $\pm$ 218	be
20	5402 $\pm$ 463	cd
25	5183 $\pm$ 538	bd
30	3688 $\pm$ 389	e



Şekil 4.14. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

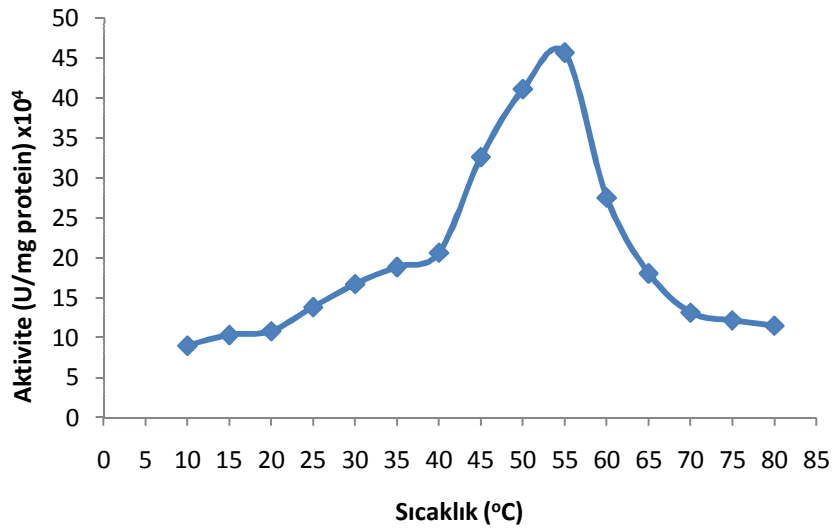
$\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 10 ile 80°C arasında 5°C'lik aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.5 ve Şekil 4.15'te gösterildi. Enzim aktivitesi 10°C'de en düşük değerde olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivite doğrusal bir şekilde artarak 55°C'de maksimum seviyeye ulaştı. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitenin hızla düştüğü görüldü. 55°C'deki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 45, 50 ve 60°C'lerde aktivite değişimi sırasıyla % 71, 90 ve 60 olduğu görüldü.

Çizelge 4.5. *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	% Aktivite
10	90106 $\pm$ 2895	a	20
15	103414 $\pm$ 3604	ab	23
20	108127 $\pm$ 2999	ac	24
25	138347 $\pm$ 6484	d	30
30	167181 $\pm$ 3812	e	37
35	188529 $\pm$ 9869	ef	41
40	206273 $\pm$ 6671	f	45
45	326044 $\pm$ 19875	g	71
50	411159 $\pm$ 6267	h	90
55	456628 $\pm$ 12034	ı	100
60	275308 $\pm$ 9712	i	60
65	180489 $\pm$ 7683	e	40
70	131416 $\pm$ 6723	cd	29
75	121712 $\pm$ 1000	bcd	27
80	115058 $\pm$ 555	acd	25

**ORT:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

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

Şekil 4.15. *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

#### 4.10. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

$\alpha$ -Amilaz stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.6, 4.7 ve Şekil 4.16, 4.17’de gösterildi. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla enzim, farklı sıcaklıklarda (25, 40, 55, 60, 70 ve 80°C) inkübe edildi. Enzim çözeltisinden belli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edildi ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlendi.

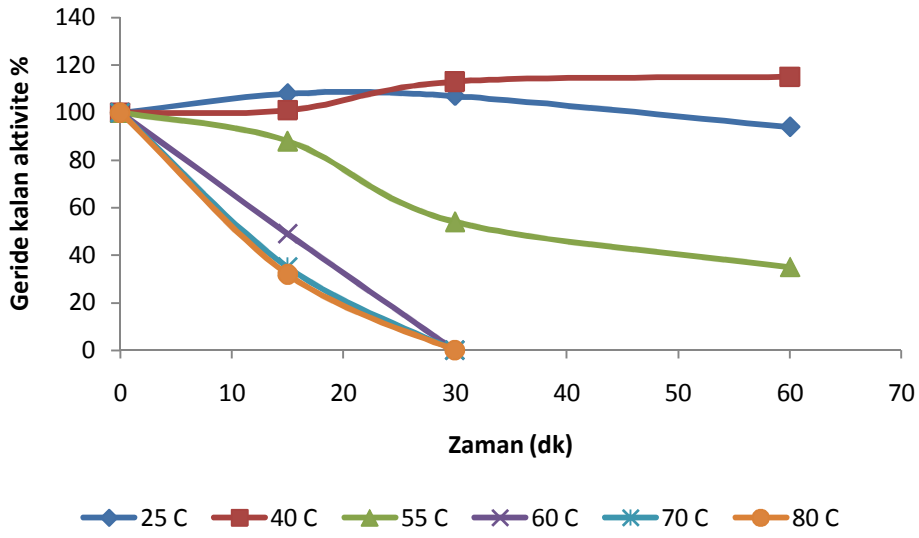
$\alpha$ -Amilazın 25 ve 40°C’de 24 saatlik inkübasyonda kontrole göre enzim aktivitesindeki değişim istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü. 55°C’de 15, 30 ve 60 dakikalık inkübasyonlar sonunda kontrol ile arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu ( $p<0.05$ ), 60 dakika sonunda aktivitesinin % 35’nin korunduğu görüldü. 60, 70 ve 80°C’lerde ise ilk 15 dakikada aktivitede önemli bir düşüş olduğu saptandı.

Çizelge 4.6. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi

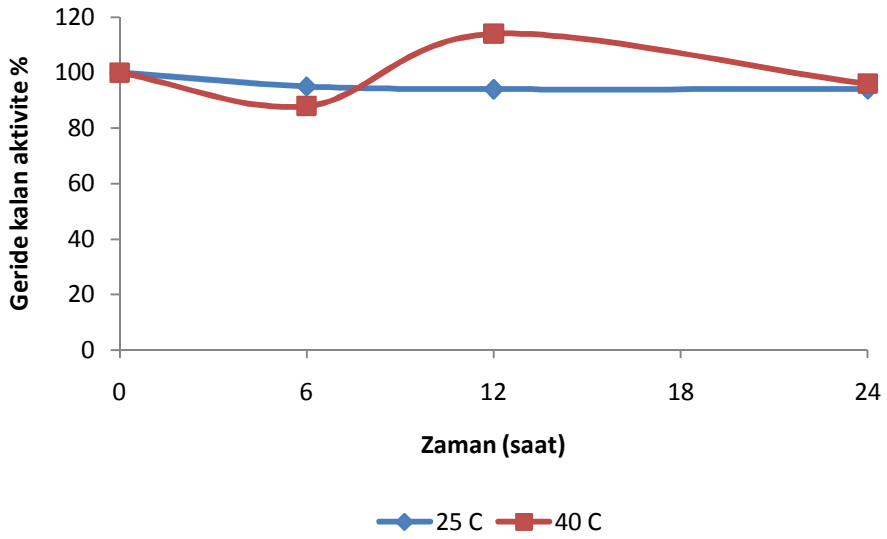
İnkübasyon süresi	Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesindeki değişim											
	25 °C (ORT. $\pm$ S. H.)	x	40 °C (ORT. $\pm$ S. H.)	x	55 °C (ORT. $\pm$ S. H.)	x	60 °C (ORT. $\pm$ S. H.)	x	70 °C (ORT. $\pm$ S. H.)	x	80 °C (ORT. $\pm$ S. H.)	x
<b>Kontrol</b>	3513 $\pm$ 163	a	5256 $\pm$ 1794	a	279466 $\pm$ 9712	a	279466 $\pm$ 9712	a	279466 $\pm$ 9712	a	279466 $\pm$ 9712	a
<b>15 dk</b>	3794 $\pm$ 80	a	5317 $\pm$ 1916	a	247305 $\pm$ 10436	b	137515 $\pm$ 1000	b	98423 $\pm$ 3124	b	90106 $\pm$ 2464	b
<b>30 dk</b>	3771 $\pm$ 7	a	5954 $\pm$ 2240	a	151378 $\pm$ 0	b	-	-	-	-	-	-
<b>60 dk</b>	3316 $\pm$ 24	a	6041 $\pm$ 2153	a	97314 $\pm$ 1663	b	-	-	-	-	-	-
<b>6 saat</b>	3326 $\pm$ 27	a	4602 $\pm$ 1688	a	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>12 saat</b>	3316 $\pm$ 176	a	5992 $\pm$ 2233	a	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>24 saat</b>	3309 $\pm$ 82	a	5030 $\pm$ 1875	a	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.7. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite yüzdesi

İnkübasyon süresi	Geride kalan aktivite %					
	25 °C	40 °C	55 °C	60 °C	70 °C	80 °C
<b>Kontrol</b>	100	100	100	100	100	100
<b>15 dk</b>	108	101	88	49	35	32
<b>30 dk</b>	107	113	54	-	-	-
<b>60 dk</b>	94	115	35	-	-	-
<b>6 saat</b>	95	88	-	-	-	-
<b>12 saat</b>	94	114	-	-	-	-
<b>24 saat</b>	94	96	-	-	-	-



Şekil 4.16.  $\alpha$ -Amilazın farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite yüzdesi



Şekil 4.17.  $\alpha$ -Amilazın 1 günlük geride kalan aktivite yüzdesi

#### 4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

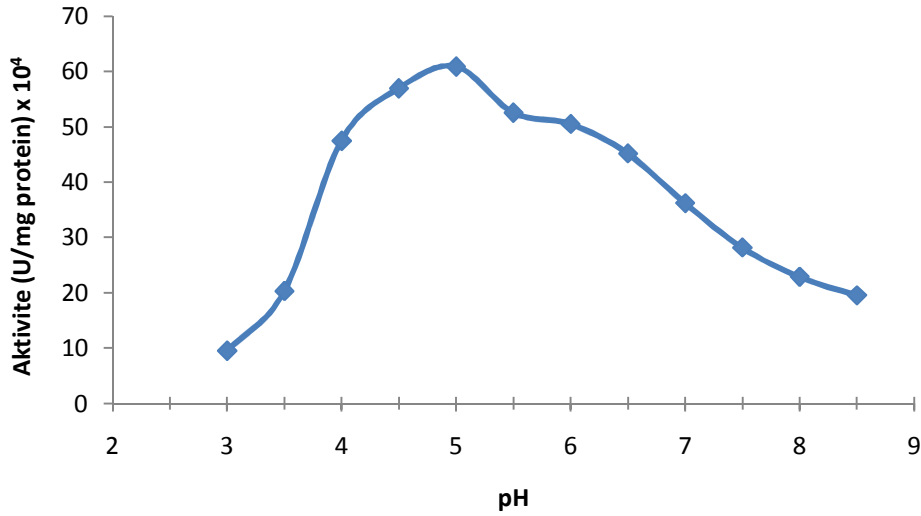
$\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.18'de gösterildi. Enzim aktivitesi pH 3.0'te en düşük seviyede olup, pH'daki 0.50'şer birimlik artışlarla beraber enzim aktivitesi de istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdi. Enzim aktivitesi pH 5.0'te maksimum seviyeye ulaştı. pH 5.5'tan itibaren enzim aktivitesi önemli bir düşüş gösterdi. Her ne kadar maksimum enzim aktivitesi pH 5.0'te görüldü ise de, pH 4.0, 4.5, 5.5, 6.0 ve 6.5'te maksimum aktivitenin, sırasıyla % 78, 94, 86, 83 ve 74'ü görüldü.

Çizelge 4.8. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	% Aktivite
3.0	94819 $\pm$ 5194	a	16
3.5	202669 $\pm$ 6193	b	33
4.0	474649 $\pm$ 6193	ch	78
4.5	569468 $\pm$ 7763	d	94
5.0	608837 $\pm$ 3149	e	100
5.5	525663 $\pm$ 21948	f	86
6.0	505146 $\pm$ 22340	cf	83
6.5	451637 $\pm$ 13368	h	74
7.0	362086 $\pm$ 10623	g	59
7.5	281684 $\pm$ 3668	i	46
8.0	2287299 $\pm$ 9373	b	38
8.5	1951829 $\pm$ 2464	b	32

**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.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



#### 4.12. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.9, 4.10 ve Şekil 4.19, 4.20'de gösterildi. pH 3.0'te ilk 30 dakikalık inkübasyonda hiçbir enzim aktivitesi saptanamadı.

pH 4.0'te ilk 30 dakikadaki düşüş istatistiksel olarak önemsiz, ancak diğer inkübasyon periyodlarındaki düşüş önemli bulundu. 24 saatin sonunda aktivitenin % 49'u geri elde edildi. pH 5.0'te ilk 30 dakikadaki enzim aktivitesindeki artışın kontrol ile istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). 60. dakikada enzim aktivitesi kontrole göre önemsiz, diğer inkübasyonlarda ise enzim aktivitesindeki azalış önemli bulundu. pH 6.0'da ilk 30 dakikadaki enzim aktivitesindeki artışın kontrol ile istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Diğer inkübasyonlarda ise enzim aktivitesindeki değişimin kontrole göre önemsiz olduğu görüldü. pH 7.0 ve pH 8.0'de 24 saatlik inkübasyondaki enzim aktivitesinin değişimi kontrole göre önemsiz olduğu görüldü.

Çizelge 4.9. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının farklı pH'lardaki stabilitesi

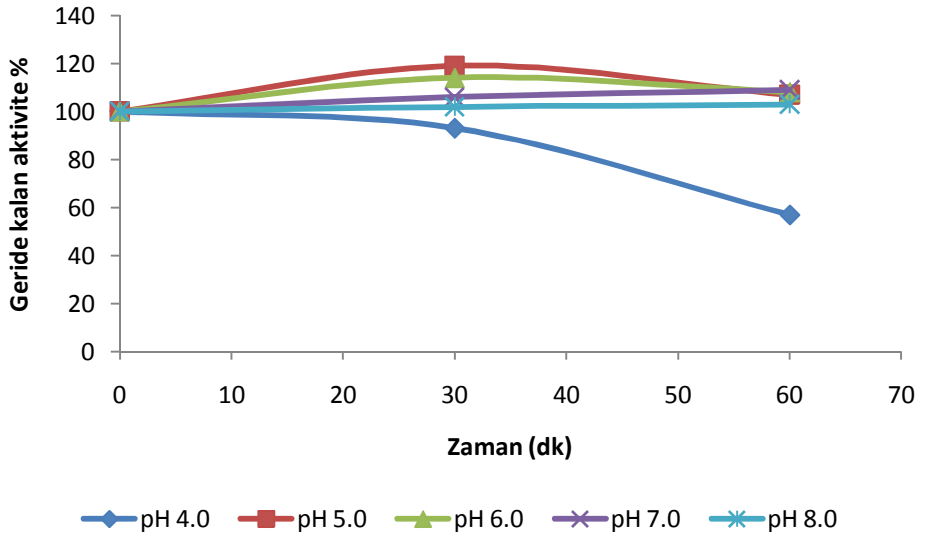
Zaman	Farklı pH'lardaki enzim aktivitesi (U/mg protein)									
	pH 4.0		pH 5.0		pH 6.0		pH 7.0		pH 8.0	
	(ORT. $\pm$ S. H.)	x	(ORT. $\pm$ S. H.)	x	(ORT. $\pm$ S. H.)	x	(ORT. $\pm$ S. H.)	x	(ORT. $\pm$ S. H.)	x
<b>0</b>	1749 $\pm$ 25	a	2032 $\pm$ 82	a	2151 $\pm$ 39	a	1525 $\pm$ 30	a	119771 $\pm$ 6131	a
<b>30 dk</b>	1619 $\pm$ 117	a	2415 $\pm$ 20	b	2449 $\pm$ 74	b	1611 $\pm$ 120	a	121712 $\pm$ 3881	a
<b>60 dk</b>	993 $\pm$ 20	b	2168 $\pm$ 89	a	2328 $\pm$ 37	a	1668 $\pm$ 129	a	123930 $\pm$ 5412	a
<b>12 saat</b>	895 $\pm$ 30	b	1527 $\pm$ 49	b	2259 $\pm$ 58	a	1403 $\pm$ 133	a	123930 $\pm$ 6808	a
<b>24 saat</b>	853 $\pm$ 28	b	1186 $\pm$ 28	b	2150 $\pm$ 63	a	1401 $\pm$ 23	a	125871 $\pm$ 3474	a

**ORT:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

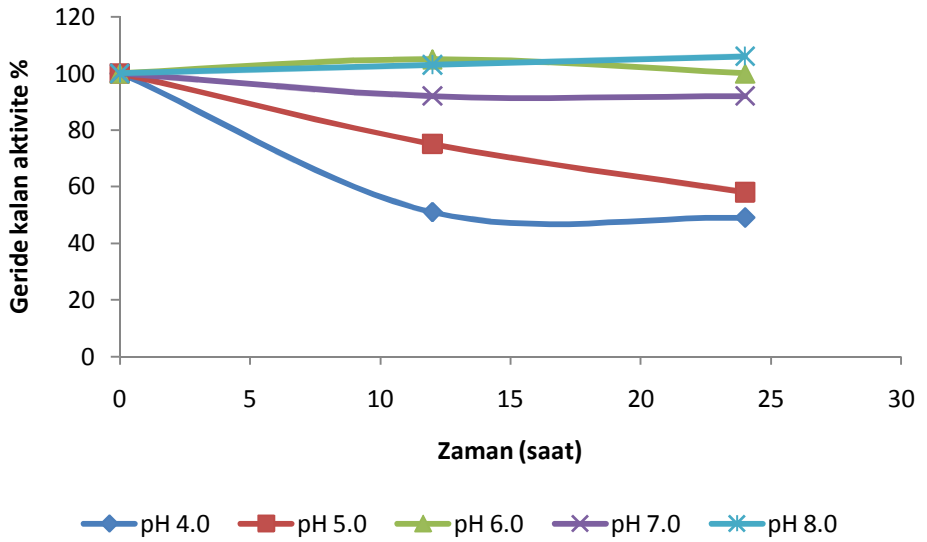
**x :** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.10. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının farklı pH'larda geride kalan aktivite yüzdesi

İnkübasyon Süresi	Farklı pH'lardaki geride kalan aktivite %				
	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<b>0</b>	100	100	100	100	100
<b>30 dk</b>	93	119	114	106	102
<b>60 dk</b>	57	107	108	109	103
<b>12 saat</b>	51	75	105	92	103
<b>24 saat</b>	49	58	100	92	106



Şekil 4.19.  $\alpha$ -Amilazın farklı pH'lardaki (4.0-8.0) stabilitesi



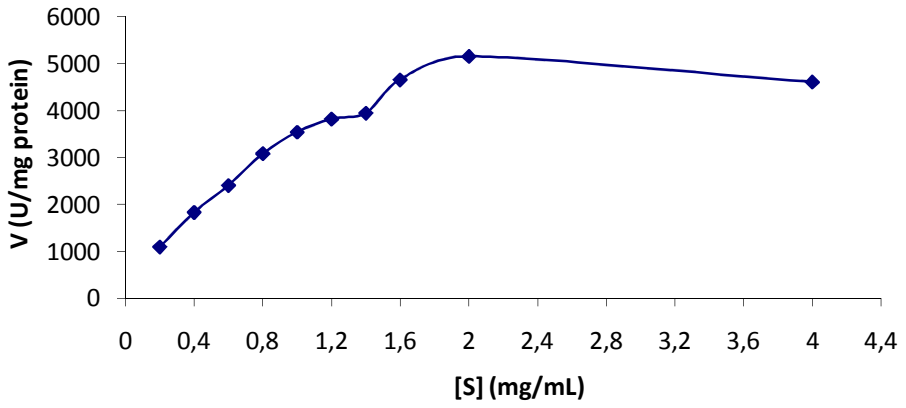
Şekil 4.20.  $\alpha$ -Amilazın farklı pH'lardaki (4.0-8.0) stabilitesi

### 4.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

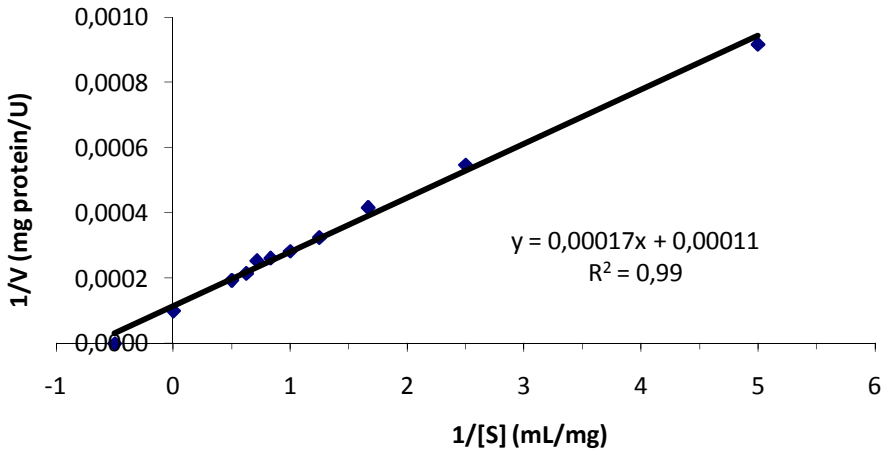
$\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine substrat (çözünür patates nişastası) konsantrasyonunun etkisi Çizelge 4.11'de gösterildi. Substrat konsantrasyonunun 0.2 mg/mL'den, 4.0 mg/mL'ye kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığı ve bu değerler arasındaki farkın da istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü. Substrat konsantrasyonuna karşı enzim aktivite grafiği çizildiğinde enzimin Michaelis-Menten kinetiği izlediği görülmektedir (Şekil 4.21).  $\alpha$ -Amilazın maksimum hızını ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabitesini ( $K_m$ ) saptamak için, Lineweaver-Burk  $y = ax + b$  doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği,  $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$  olarak çizildi (Şekil 4.22). Bu grafiğin doğru denklemi ise,  $y = 0.00017x + 0.00011$  olarak, tamamlayıcılık katsayısı ( $R^2$ ) ise 0.99 bulundu. Denklemin doğrunun dikey eksenini kestiği nokta  $1/V_{max} = 0,00011$  değerini verdiğinden,  $V_{max}$  değeri 9091 U/mL olarak hesaplandı. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise,  $-1/K_m = -0.647$  değerinde olup,  $K_m$  değeri 1.55 mg/mL olarak bulundu.

Çizelge 4.11. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine substrat (çözünür patates nişastası) konsantrasyonunun etkisi

[S]	V (Ort $\pm$ S.H.)	x	1/V	1/[S]
0.2	1091 $\pm$ 39	a	0.000916	5.00
0.4	1828 $\pm$ 39	b	0.000547	2.50
0.6	2403 $\pm$ 38	c	0.000416	1.67
0.8	3080 $\pm$ 55	d	0.000325	1.25
1.0	3539 $\pm$ 47	e	0.000283	1.00
1.2	3819 $\pm$ 63	f	0.000262	0.83
1.4	3947 $\pm$ 91	f	0.000253	0.71
1.6	4655 $\pm$ 194	h	0.000215	0.63
2.0	5153 $\pm$ 117	i	0.000194	0.50
4.0	4605 $\pm$ 59	h	0.000217	0.25



Şekil 4.21.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafiği)



Şekil 4.22.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine çözünür patates nişasta konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

#### **4.14. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi**

$\alpha$ -Amilazın substrat spesifitesi Çizelge 4.12'de gösterildi. Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla % 0.5 ve % 1'lik maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz, amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası ve çözünür patates nişastası kullanıldı. Çözünür patates nişastası kontrol olarak kullanıldı.

Denenen substratların içerisinde rafinoz hariç, enzimin tüm substratlarla aktivite gösterdiği görüldü. Ayrıca, substratlar içerisinde kontrol grubuna göre en iyi enzim aktivitesi maltoz, maltotrioz, dekstrin ve amilozda saptandı.

Çizelge 4.12. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının substrat spesifitesi

Substrat	%0.5		% Aktivite	%1		% Aktivite
	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x		Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	
<b>Çözünür Patates Nişastası</b>	265327 $\pm$ 3751	a	100	305528 $\pm$ 3604	a	100
<b>Amiloz</b>	340461 $\pm$ 12762	b	128	321608 $\pm$ 2731	a	105
<b>Amilopektin</b>	204886 $\pm$ 5268	b	77	206273 $\pm$ 6496	b	68
<b>Glikojen</b>	204886 $\pm$ 5268	b	77	245365 $\pm$ 1441	b	80
<b>Maltoz</b>	517068 $\pm$ 8541	b	195	912424 $\pm$ 8657	b	299
<b>Maltotrioz</b>	371235 $\pm$ 19336	b	140	808733 $\pm$ 52257	b	265
<b>Dekstrin</b>	400624 $\pm$ 13259	b	151	430844 $\pm$ 13446	b	141
<b>Rafinoz</b>	0 $\pm$ 0	b	0	0 $\pm$ 0	b	0
<b>Buğday Nişastası</b>	280853 $\pm$ 30501	a	106	321608 $\pm$ 6081	a	105
<b>Mısır Nişastası</b>	249801 $\pm$ 17620	a	94	350442 $\pm$ 14615	a	115
<b>Pirinç Nişastası</b>	254791 $\pm$ 6537	a	96	255346 $\pm$ 10876	a	84

#### 4.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

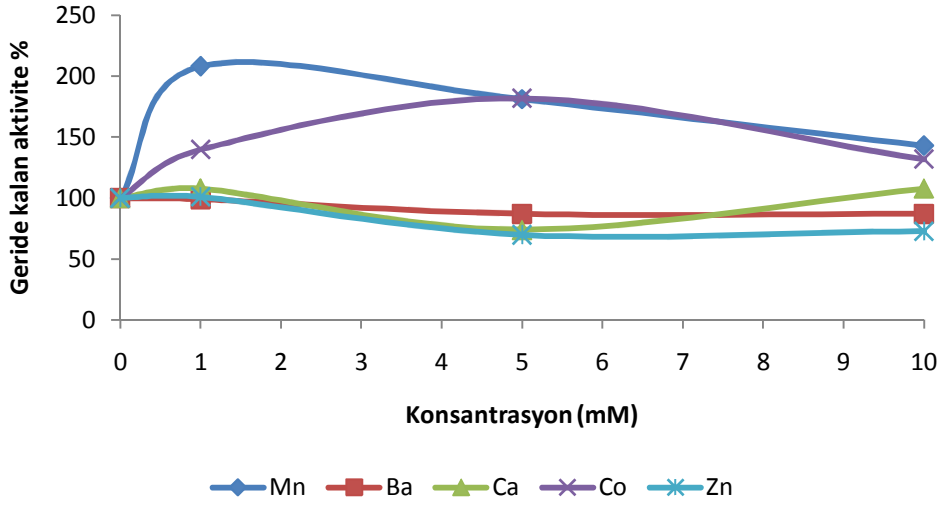
$\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının (NaCl, KCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) ve EDTA'nın etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.13 ile Şekil 4.23, 4.24, 4.25 ve 4.26'da gösterildi.

Mn<sup>2+</sup> ve Co<sup>2+</sup> iyonlarının 1, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları  $\alpha$ -amilaz aktivitesini kuvvetli bir şekilde aktive etti. 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda, Mn<sup>2+</sup> için sırasıyla % 208, 181 ve 143, Co<sup>2+</sup> için ise, % 140, 182, 132 olarak ölçüldü. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu (p<0.05). Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Al<sup>3+</sup>'un 1mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini çok fazla etkilemezken 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini önemli bir şekilde düşürdü. Hg<sup>2+</sup>'nın 1 mM konsantrasyondaki geride kalan aktivitesi % 45 iken, diğer konsantrasyonlarda ise Hg<sup>2+</sup> enzimi tamamen inhibe etti. Diğer metal iyonları ise, kontrole göre enzim aktivitesinde bir azalma göstermelerine rağmen, enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği görüldü.

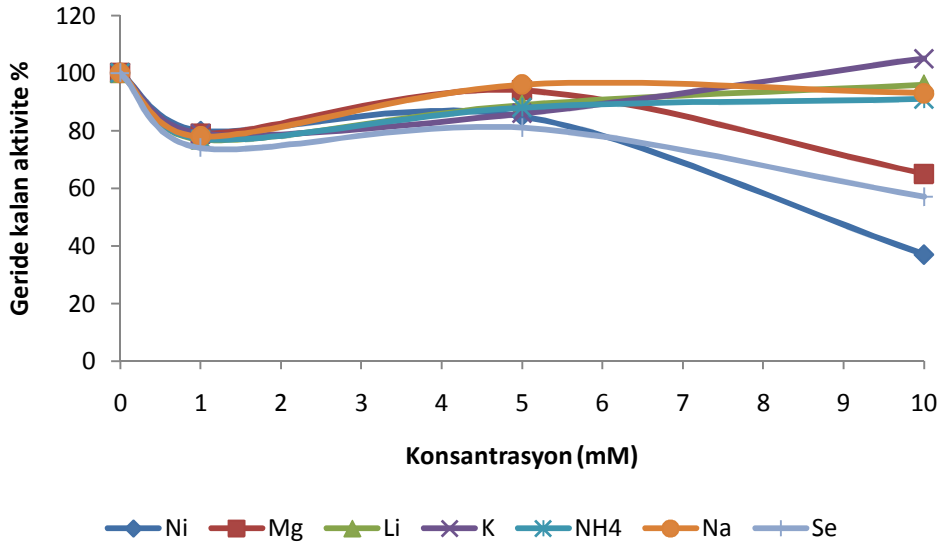


Çizelge 4.13. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi

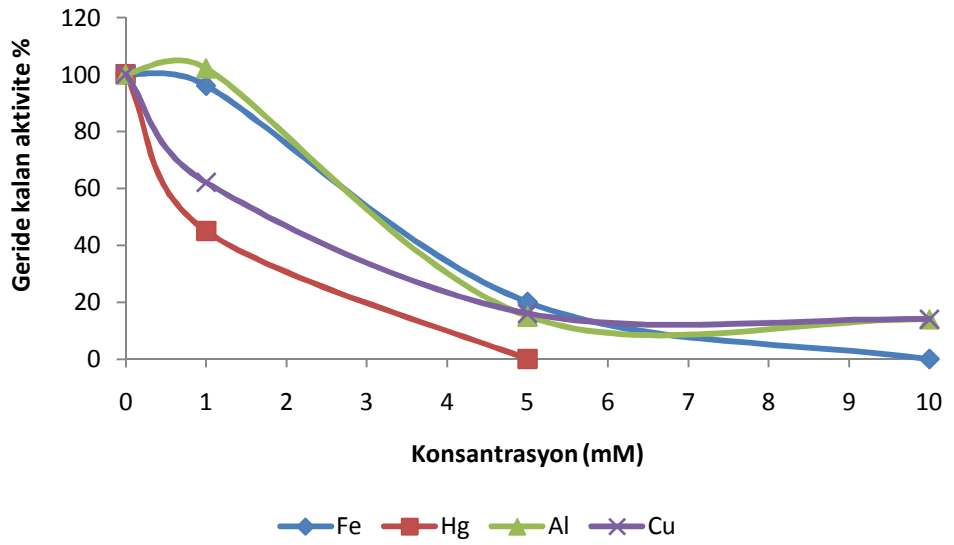
Metal iyonu	Farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi (U/mg protein) ve geride kalan aktivite %								
	1 mM (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite	5 mM (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite	10 mM (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite
<b>Kontrol</b>	650702 $\pm$ 14889	a	100	650702 $\pm$ 14889	a	100	650702 $\pm$ 14889	a	100
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	1355467 $\pm$ 21445	b	208	1178305 $\pm$ 18798	b	181	932386 $\pm$ 15246	b	143
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	910760 $\pm$ 12458	b	140	1182186 $\pm$ 12396	b	182	857529 $\pm$ 5082	b	132
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	701161 $\pm$ 16383	b	108	480471 $\pm$ 12387	b	74	704488 $\pm$ 22339	b	108
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	644602 $\pm$ 26879	a	99	564477 $\pm$ 13937	b	87	565864 $\pm$ 2417	b	87
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	659019 $\pm$ 13937	a	101	457737 $\pm$ 12265	b	70	472154 $\pm$ 21638	b	73
<b>NaCl</b>	507642 $\pm$ 1818	b	78	622422 $\pm$ 3124	a	96	603846 $\pm$ 8644	b	93
<b>KCl</b>	513464 $\pm$ 8350	b	79	556714 $\pm$ 12085	b	86	683694 $\pm$ 5998	b	105
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	511523 $\pm$ 1271	b	79	609669 $\pm$ 11323	b	94	422249 $\pm$ 8541	b	65
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	520118 $\pm$ 17646	b	80	553942 $\pm$ 1271	b	85	237879 $\pm$ 4401	b	37
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	501265 $\pm$ 23693	b	77	570854 $\pm$ 15958	b	88	592202 $\pm$ 10164	b	91
<b>LiCl<sub>2</sub></b>	504037 $\pm$ 12894	b	77	580003 $\pm$ 4304	b	89	622977 $\pm$ 2201	a	96
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	479639 $\pm$ 9039	b	74	526217 $\pm$ 20216	b	81	371235 $\pm$ 5461	b	57
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	402010 $\pm$ 12075	b	62	106741 $\pm$ 21903	b	16	90660 $\pm$ 1731	b	14
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	621591 $\pm$ 25977	a	96	130861 $\pm$ 1544	b	20	0 $\pm$ 0	b	0
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	664564 $\pm$ 20447	a	102	96482 $\pm$ 1731	b	15	91215 $\pm$ 3269	b	14
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	295547 $\pm$ 8648	b	45	0 $\pm$ 0	b	0	0 $\pm$ 0	b	0
<b>EDTA</b>	392861 $\pm$ 8859	b	60	467163 $\pm$ 9039	b	72	474095 $\pm$ 2401	b	73



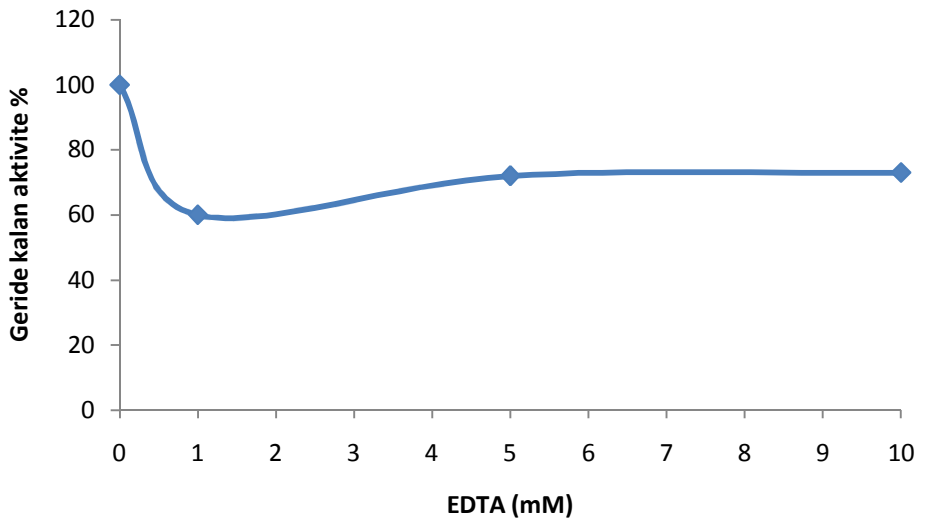
Şekil 4.23.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine Mn, Ba, Ca, Co ve Zn iyonlarının etkisi



Şekil 4.24.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine Ni, Mg, Li, K,  $\text{NH}_4$ , Na ve  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  iyonlarının etkisi



Şekil 4.25.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine Fe, Hg, Al ve Cu iyonlarının etkisi



Şekil 4.26.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

#### 4.16. Enzimin Tuz Toleransı

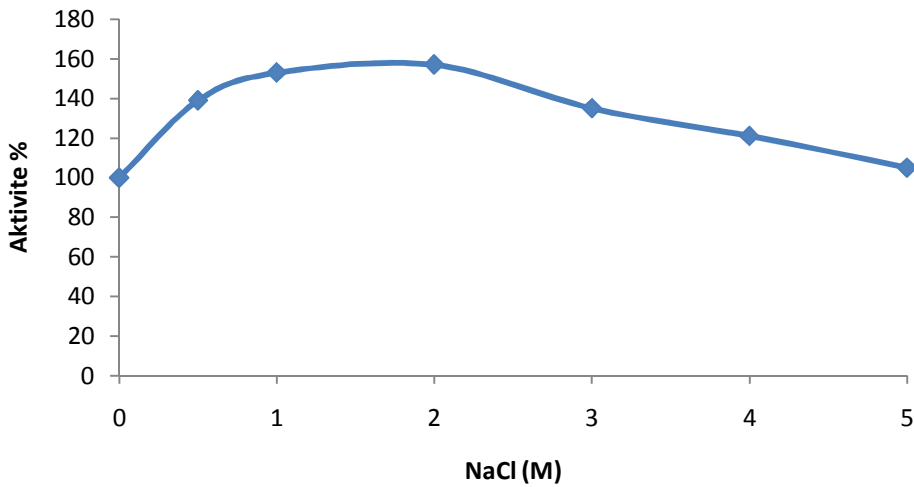
$\alpha$ -Amilazın tuz toleransı Çizelge 4.14 ve Şekil 4.27'de gösterildi. 1 saatlik inkübasyondan sonra  $\alpha$ -amilaz aktivitesi denenen tüm tuz konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre önemli bir artış gösterdi ( $p < 0.05$ ). 0.5-2.0 M NaCl konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesinde kademeli bir artış oldu. Tuz konsantrasyonunun arttırılması ile aktivitede yavaş yavaş bir azalma görüldü. Ancak 5.0 M'daki değer ile kontrol arasındaki fark önemsiz olduğu saptandı.

Çizelge 4.14. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının tuz toleransı

NaCl Konsantrasyonu (M)	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	% Aktivite
Kontrol	310241 $\pm$ 480	a	100
0.5	432507 $\pm$ 8414	b	139
1.0	474372 $\pm$ 20466	b	153
2.0	488234 $\pm$ 23948	b	157
3.0	418090 $\pm$ 19620	b	135
4.0	374008 $\pm$ 12161	b	121
5.0	324380 $\pm$ 8331	a	105

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 4.27.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisi

#### 4.17. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inhibitörler ve denatürantların etkisi Çizelge 4.15, 4.16, Şekil 4.28 ve 4.29’da sunulmuştur.

Triptofan spesifik inhibitörü olan NBS, denenen tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe etti. Serin inhibitörü olan PMSF’nin 1mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitesinde az miktar artış görüldü ve kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). PMSF’nin 5 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitesinde % 46’lık bir azalma görülmüş ve kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

SH-grubu redükleyici ajanı olan  $\beta$ -merkaptoetanol ve DTT’nin 1 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitesinde sırasıyla % 20 ve 44’lük bir artış görüldü ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0.05$ ).  $\beta$ -merkaptoetanol ve DTT’nin 5 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitesinde sırasıyla % 24 ve 8’lik bir azalma görüldü.

Karboksil grubu spesifik inhibitörü olan CMC’nin 1 mM ve 5 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitelerinde sırasıyla % 8 ve 35’lik bir azalma görüldü ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

Sistein spesifik inhibitörü ve aynı zamanda sülfidril grubu oksitleyici ajanı olan DTNB’nin 1 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitesinde % 9’luk bir azalma görüldü. Ancak 5 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitesinde % 66’lık artış görüldü ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Sistein ve histidin alkilleyici ajanı olan İAA’nın 1 mM ve 5 mM’lık konsantrasyonundaki enzim aktivitelerinde sırasıyla % 9 ve 43’lük bir azalma görüldü ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

Protein denatürantı olan üre ve SDS'nin 1 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini etkilemezken, 5 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesinde sırasıyla % 36 ve 37'lik bir azalmaya neden oldu ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

Çizelge 4.15. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki inhibitörler ve denatürantların etkisi

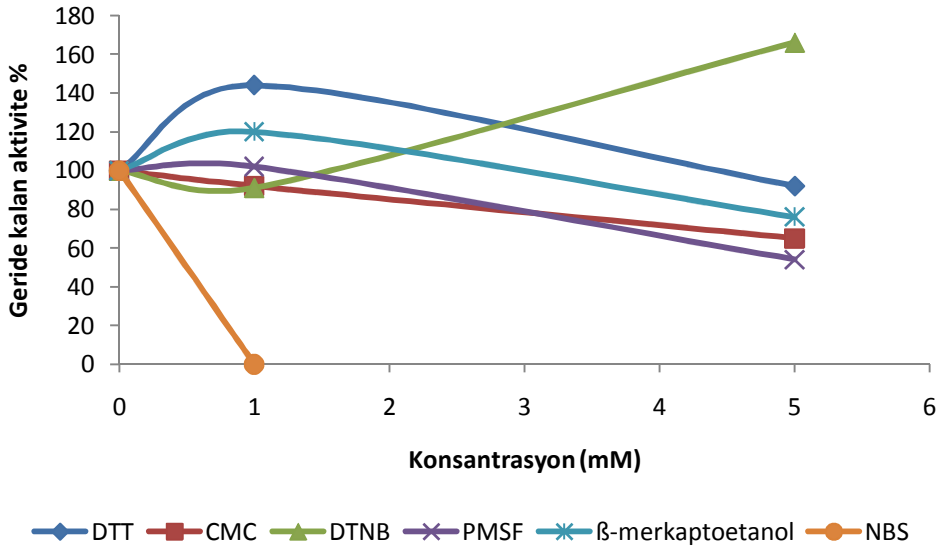
İnhibitör Konsantrasyon (mM)	Farklı inhibitör konsantrasyonlarında geride kalan aktivite %														
	PMSF (ORT. $\pm$ S. H.)			Dithiothreitol (ORT. $\pm$ S.H.)			CMC (ORT. $\pm$ S. H.)			$\beta$ -merkaptöetanol (ORT. $\pm$ S. H.)			DTNB (ORT. $\pm$ S. H.)		
	ORT.	x	%	ORT.	x	%	ORT.	x	%	ORT.	x	%	ORT.	x	%
<b>Kontrol</b>	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	a	100
<b>1</b>	347669 $\pm$ 2881	a	102	490729 $\pm$ 13976	b	144	313568 $\pm$ 3361	b	92	410882 $\pm$ 8997	b	120	308855 $\pm$ 4027	b	91
<b>5</b>	185202 $\pm$ 5268	b	54	314954 $\pm$ 5789	a	92	220135 $\pm$ 6814	b	65	259504 $\pm$ 12559	b	76	566418 $\pm$ 12596	b	166

**ORT:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

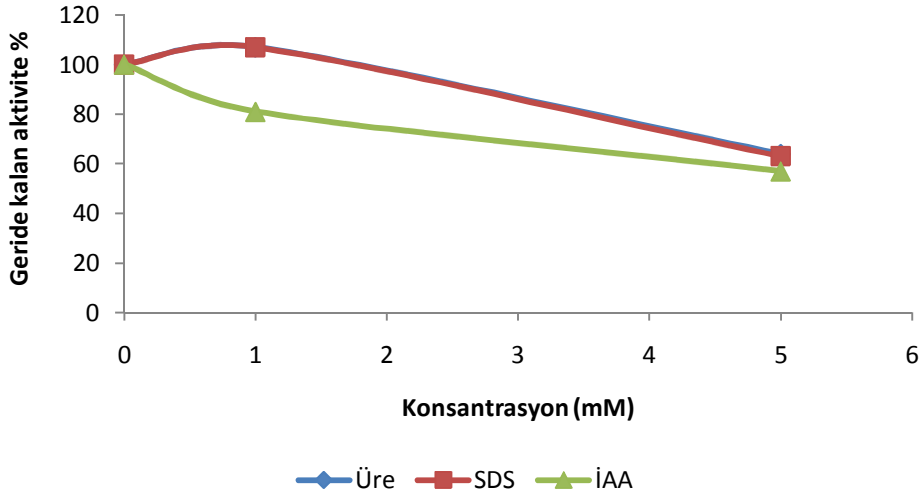
**x :** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.16. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki inhibitörler ve denatürantların etkisi

İnhibitör Konsantrasyon (mM)	Farklı inhibitör konsantrasyonlarında geride kalan aktivite %										
	Üre (ORT. $\pm$ S. H.)			SDS (ORT. $\pm$ S.H.)			İAA (ORT. $\pm$ S. H.)			NBS (ORT. $\pm$ S. H.)	
	ORT.	x	%	ORT.	x	%	ORT.	x	%	ORT.	%
<b>Kontrol</b>	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	a	100	341015 $\pm$ 2201	100
<b>1</b>	364581 $\pm$ 14167	a	107	363195 $\pm$ 7895	a	107	277248 $\pm$ 7925	b	81	0	0
<b>5</b>	219303 $\pm$ 7335	b	64	215145 $\pm$ 28419	b	63	195460 $\pm$ 9373	b	57	0	0



Şekil 4.28.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatürantların etkisi



Şekil 4.29.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatürantların etkisi



#### 4.18. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

$\alpha$ -Amilazın farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı Çizelge 4.17’de gösterildi.  $\alpha$ -Amilazın en iyi adsorbe olduğu nişasta kaynağı, % 48’lik oranla mısır nişastasası olarak bulundu.  $\alpha$ -Amilazın başlangıç aktivitesi ile pirinç nişastasına adsorpsiyonu sonrasında kalan aktivite arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz, mısır ve buğday nişastasası ile önemli bulundu ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.17. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı

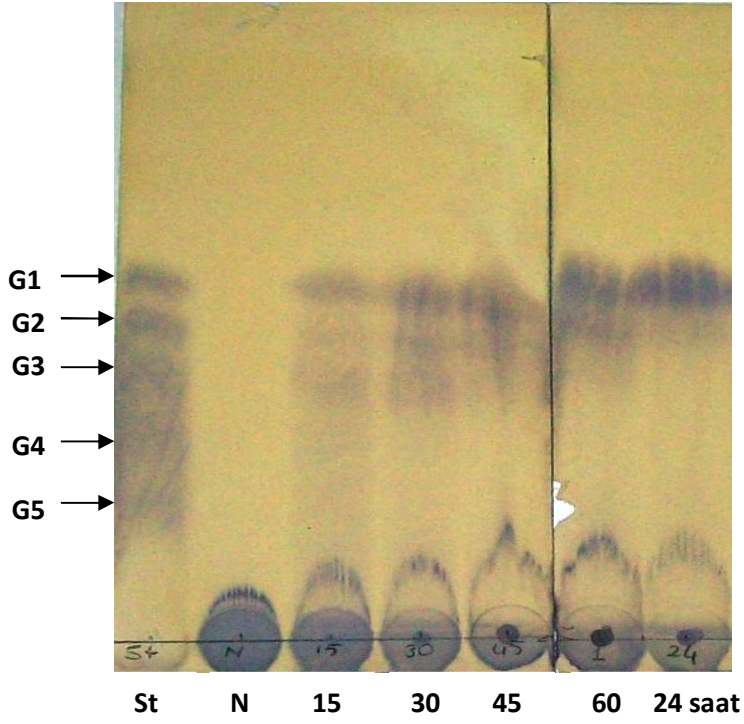
Nişasta	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	Adsorpsiyon %
<b>Kontrol</b>	288893 $\pm$ 9915	a	100
<b>Pirinç Nişastasası</b>	262277 $\pm$ 6814	a	9
<b>Mısır Nişastasası</b>	151378 $\pm$ 9592	b	48
<b>Buğday Nişastasası</b>	245087 $\pm$ 12056	b	15

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata.

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

#### 4.19. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi ve enzim tipinin belirlenmesi için ince tabaka kromatografisi kullanıldı. İnce tabaka kromatografi analizi sonucunda, nişastanın zamana bağlı enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan son ürünün glukoz, maltoz ve maltotrioz olduğu bulundu (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Nişastanın enzimatik hidrolizi G1: Glikoz, G2: Maltoz, G3: Maltotrioz, G4: Maltotetroz, G5: Maltopentoz, St: Standart, N: Nişasta, 15-60 dakika inkübasyon süresi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler endüstride birçok alanda uygulamalara sahiptir. Bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilmektedir. Ancak, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan enzimlerin saf olarak elde edilebilmesi oldukça zor ve pahalı bir işlemdir. Elde edilen enzimlerin endüstriyel uygulama potansiyelleri oldukça yetersizdir. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin; üretiminin kolay ve ucuz olması, biyokimyasal çeşitliliklerinin çok fazla olması ve farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen oldukça farklı enzimleri üretmesinden dolayı endüstriyel uygulamalarda tercih edilirler. Mikrobiyal kaynaklı enzimler; ilaç, analitik kimya, nişastanın sakkarofikasyonu, tekstil, deterjan, gıda ve kâğıt endüstrileri gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir. Endüstride en çok kullanılan enzimlerin başında lipazlar, proteazlar ve amilazlar gelmektedir. Endüstride kullanılan mikrobiyal kaynaklı enzimlerin % 25'lik kısmını mikrobiyal amilazlar oluşturmaktadır. Amilazların ticari üretiminde daha çok bakteri ve fungus türleri kullanılmaktadır. Amilaz üretiminde ilk sırayı gram pozitif bakteriler ve özellikle *Bacillus* cinsi almaktadır. Fungusların (küflerin) amilaz üreten en yaygın cinsi ise özellikle *Aspergillus*'tur. Mikroorganizmaların hepsi endüstriyel olarak kullanılmamakla birlikte "endüstriyel mikroorganizmalar" ürettikleri bir veya birden fazla spesifik ürüne göre çok dikkatli bir şekilde klasik tarama teknikleriyle doğadan seçilmektedirler (Pandey vd., 2000).

### 5.1. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi

Çalışmamızda havadan izole edilmiş ve tanısı yapılmış 11 *Aspergillus* cinsinde amilolitik tarama yapılmış (Møller vd., 2004) ve tarama sonucunda 7 fungusta amilaz aktivitesi görülmüştür. Birçok fungus türünde yapılan amilolitik tarama sonuçlarında çoğunlukla *Aspergillus* cinsine ait türlerde amilaz üretme yeteneği daha fazladır (Gopinath vd., 2005; Omemu vd., 2005). Amilaz aktivitesi gösteren türler içerisinde, aflatoksin testi sonucunda ışımaya yapmayan, en iyi zon çapı gösteren ve üretim koşulları daha kolay olan *A. fumigatus* HBF50 suşu amilaz

üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçilmiştir. Amilaz aktivitesi gösteren diğer türler, daha sonraki çalışmalar için bir kaynak oluşturmak üzere kültür koleksiyonuna kaydedilmiştir.

### **5.2. *A. fumigatus* HBF50'nin Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi**

İnkübasyon süresine bağlı olarak *A.fumigatus* HBF50 1. günde lag fazında olup biyomas en düşük seviyededir. Biyomas miktarı artarak 8. güne kadar log fazında olup, 8. günden sonra ise biyomas miktarı azalarak durgunluk fazına girmiş ve büyüme durmuştur.

Redüktör şeker miktarı ise, biyomas artışına paralel olarak 1. günden itibaren ortamda artmış, 3. gün maksimum seviyeye ulaşmıştır. Log fazının bitiminde redüktör şeker miktarı minimum seviyeye inmiştir. Kültür ortamının pH'sı log fazının sonuna doğru artmaya başlayarak durgunluk fazında alkali bir pH'ya ulaşmıştır. Enzim aktivitesi log fazının sonlarına doğru hızla artarak durgunluk fazının ortasında (10. gün) maksimum seviyeye ulaşmıştır. Enzim aktivitesinin yüksek olduğu bu fazda redüktör şeker miktarının minimum seviyeye inmesi kullanılan besin kaynaklarını azalttığından dolayı, hücreler arasında bir rekabetin başladığını söyleyebiliriz. Ayrıca, hücrelerin bir kısmı üreme özelliği ve canlılığını korurken bir kısmı ise ölmektedir. Bu durumda mikroorganizmaların zamana göre biyomasında net bir artış veya azalış gözlenmemiştir. Enzim aktivitesinin bu dönemde yüksek çıkması; hücreler depoladığı maddeleri veya metabolik ürünler gibi diğer enerji kaynaklarını amilaz üretimi için kullanmış olabilir ya da bu fazda hücre lizisinin görülmesinden dolayı aktivitede bir artış olabilir.

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 de etkilemektedir. pH değeri, enzim sentezini başlatan veya bitiren indikatör görevini de görmektedir (Gupta vd., 2003).

Amilaz üretimi ile ilgili yapılan bir çok araştırmaya göre amilazların üretimi durağan fazda maksimum seviyeye ulaşmıştır (Abou-Zeid, 1997; Goto vd., 1998; Mohapatra vd., 1998; Yang ve Wang, 1999; Bignell vd., 2000; Marlida vd., 2000; Okolo vd., 2000; Petrova vd., 2000; Cherry vd., 2004).

### 5.3. Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi

*A. fumigatus* HBF50'nin en iyi amilaz ürettiği sıcaklık 30°C ve pH ise 4.0 olarak bulundu. Fiziksel parametreler arasında, büyüme ortamının pH'sı, enzim salgılanması ve organizmadaki morfolojik değişimlerde önemli rol oynamaktadır. Organizmanın gelişimi esnasında gözlenen pH değişimi ortamdaki ürün stabilitesini de etkilemektedir (Gupta vd., 2003).

Amilaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi organizmanın gelişimi ile ilişkilidir. Funguslar ile yapılan birçok amilaz üretim çalışması, şimdye kadar 25-37°C arasında gelişen mezofilik funguslarda yapılmıştır. *A. oryzae* α-amilazın optimum üretim sıcaklığı 30-37°C arasında saptanmıştır (Gupta vd., 2003)

Optimum düzeyde amilaz üretimi, *Talaromyces emersonii*, *Thermomonospora fusca* ve *Thermomyces lanuginosus* gibi termofilik fungal kültürler için 50-55°C arasında kaydedildi (Sivaramakrishnan vd., 2006).

### 5.4. Enzimin Saflaştırılması

Enzim safleştırmalarının çoğunda, birden fazla kromatografik teknik aynı anda kullanılarak safleştirme yapılmaktadır. Safleştirme katsayısı ve verim kullanılan yöntemlere göre büyük farklılık göstermektedir.

Safleştirmede kullanılan tekniklerin sayısı arttıkça, enzimin veriminde büyük kayıplar olabileceği bilinmektedir. Safleştirmenin kısa zamanda, tek bir adımda ve ucuz olan metotlarla yapılması tercih edilmektedir.

Enzim, ultrafiltrasyon, DEAE-sepharoz CL-6B, fenil-sepharoz CL-4B ve sefadeks G-100 ile 3.0 kat, % 1.92 'lik bir verim ile saflaştırıldı.

*Bacillus sp.* YX-1  $\alpha$ -amilazı ile yapılan bir çalışmada enzim amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-sepharoz ve sefadeks G-75'ten oluşan saflaştırma adımlarıyla 34 kat saflaştırma ve % 6.6'lık verimle saflaştırılmıştır (Liu, X.D. ve Yan Xu, 2008). *Tricholoma matsutake*  $\alpha$ -amilazı ile yapılan bir çalışmada enzim Toyopearl-DEAE, jel fitrastrasyon ve Mono Q kolon kromatografisinden oluşan saflaştırma adımlarıyla 3580 kat saflaştırma ve % 10.5'lik verimle saflaştırılmıştır (Kusuda vd., 2003). *Aspergillus tamarai*  $\alpha$ -amilazı ile yapılan bir çalışmada enzim aseton çöktürmesi, DEAE-selüloz ve ultrafiltrasyondan oluşan saflaştırma adımlarıyla 10.1 kat saflaştırma ve % 55.1'lik verimle saflaştırılmıştır (Moreira vd., 2004). Yapılan birçok enzim saflaştırma sonuçlarında görüldüğü gibi saflaştırma katsayısı ve verim kullanılan yöntemlere göre büyük farklılık göstermektedir.

## 5.5. Elektroforez ve Zimografi

Saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın saflığını ve molekül ağırlıklarını tayin etmek için SDS-PAGE ve bunun zimografisi yapılmıştır.  $\alpha$ -Amilazın zimografi ile görüntülenmesi yapıldığında, tek enzim bandı saptanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak hesaplanmıştır.

Çeşitli mikrobiyal kaynaklardan elde edilen  $\alpha$ -amilazların molekül ağırlığı 10 ile 210 kDa arasında değişir. Ancak, fungal kaynaklı  $\alpha$ -amilazların molekül ağırlığı genellikle 41.5 ile 76 kDa arasındadır (Gupta vd., 2003). *Thermomyces lanuginosus*  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı 55 kDa olarak saptanmıştır (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001). *Candida antarctica* CBS 6678  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı 50 kDa olarak saptanmıştır (De Mot ve Verachtert, 1987).

Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum*  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı 36 kDa olarak saptanmıştır (Aquino vd., 2003).

*A. tamarii*  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı 37.5 kDa olarak saptanmıştır (Moreira vd., 2004). *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının moleküler ağırlığı 52.5 kDa olarak saptanmıştır (Khoo vd., 1994). Bu sonuçlar bizim enzimimizin molekül ağırlığı ile uygunluk göstermektedir.

## 5.6. 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. Bu nedenlerden dolayı, ideal inkübasyon süresinin saptanması düşünülmüştür. Çalışmamızda enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübe edildiklerinde enzim aktivitesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Özellikle ilk 20 dk doğrusal olarak artmasından dolayı inkübasyon süresi olarak seçilmiştir.

*A. flavus* HBF34 izolatına ait glukoamilazın inkübasyon süresine bağlı olarak indirgenen şeker miktarı zamana bağlı olarak artsa da, ilk 30 dk'lık artış doğrusaldır. Bu araştırma inkübasyon süresi 30 dk olarak belirlenmiştir (Koç ve Metin, 2010). Yine yapılan bir araştırmada inkübasyon süresinin amilaz aktivitesine etkisi üzerine bir deney planı ile belirtmemiş olmasına rağmen aktivite ölçümlerinde inkübasyon süresi olarak 30 dk alınmıştır (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

## 5.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesini etkileyen önemli parametrelerden biri olan sıcaklığın  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, optimum aktivite sıcaklığını 55°C olduğu bulunmuştur.

35, 40, 45, 50, 60 ve 65°C'deki sıcaklıklarda optimum aktivitenin sırasıyla % 41, 45, 71, 90, 60 ve 40'ını gösterdiği bulunmuştur. Aktivitenin 35 ve 65°C'de arasında büyük bir kısmının görünmüş olması enzimimizin endüstriyel işlemlerde kullanılabilceğini göstermektedir.

$\alpha$ -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık mikroorganizmanın büyüme sıcaklığı ile yakından ilişkilidir (Gupta vd., 2003).  $\alpha$ -Amilaz'ların genellikle optimum aktivite sıcaklığının 50 ve 70°C arasında olduğu bilinmekte (Sharma ve Shukla, 2008; Gupta vd., 2003) ve sonucumuz bu genel ifadeyle uygunluk göstermektedir. *A. fumigatus*  $\alpha$ -amilazının maksimum aktivite sıcaklığının 50°C, *A. flavus* LINK  $\alpha$ -amilazının maksimum aktivite sıcaklığının 55°C olduğu bulunmuştur (Gupta vd., 2003).

### **5.8. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Enzim stabilizasyonu, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için oldukça önemli bir özelliktir. Bu amaçla  $\alpha$ -amilazın sıcaklık stabilitesi araştırıldığında, 25°C ve 40°C'de 24 saat sonra aktivitenin % 90'dan fazlasının korunduğu görülmüştür. Ancak yüksek sıcaklıklarda  $\alpha$ -amilazın çok fazla stabil olmadığı görülmektedir. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının 25 ve 40°C'de uzun süre stabilitesini korumuş olması, bu sıcaklıklarda işlem yapan endüstriyel uygulamalar için uygun olabileceğini göstermektedir. Ancak 55°C'nin üzerinde işlem yapan endüstriyel işlemler için çok uygun değildir.

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).

Yapılan çalışmalarda, *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının 50°C'de 1 saat stabil olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994).



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

Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum*  $\alpha$ -amilazının 50°C'de 1 saat stabil olduğu, enzimin yarı ömrünün 55°C'de 25 dk ve 60°C'de 12 dk olduğu bulunmuştur (Aquino vd., 2003). *A. tamarii*  $\alpha$ -amilazının 65°C'de birkaç saat tamamen aktif olduğu, enzimin yarı ömrünün 70°C'de 30 dakika olduğu ve 75°C'de ise stabil olmadığı bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda yapılan şekerleştirme yöntemlerinde genellikle yüksek termostabiliteye sahip mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (Gomes vd., 2005). Şekerleştirme yöntemleri, 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).

Elde ettiğimiz enzimin yüksek sıcaklıklarda stabil olmaması nedeniyle, daha sonraki çalışmalarda stabilizasyonu arttıracak işlemler denenmesi hedeflenmektedir. Bunun için nişasta, organik çözücüler ve  $Ca^{2+}$  gibi iyonların stabilizasyona etkisi araştırılarak, enzimimizin yüksek sıcaklıklardaki endüstriyel işlemler için uygun hale getirilmesine çalışılacaktır.

### **5.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Enzimler protein yapısında olmasından dolayı ortam pH'sı enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisidir.

Bu amaçla,  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde maksimum aktivite pH 5.0'te saptanmıştır. pH 4.0'e kadar maksimum aktivitenin % 78'den fazlasını, pH 7.0'ye kadar ise % 59'dan fazlasını gösterdiği, pH 7.5'den sonra ise aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür.

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 söylenebilir.  $\alpha$ -Amilazın geniş pH aralığında çalışması, çoğu endüstriyel işlemlerde kolaylıkla kullanılabileceğini de göstermektedir.

Nişastanın sıvılaştırılmasında  $\alpha$ -amilaz, şekerleştirilmesinde ise glukoamilaz kullanılmaktadır. Bu işlemler pH 4.2 ile 6.2 arasında yapılmaktadır (Moreira vd., 1999). Bu nedenle enzimimiz bu işlemlerde kullanılabilceğini söyleyebiliriz.  $\alpha$ -Amilazın optimum pH'sı 2 ile 12 arasında değişir.  $\alpha$ -Amilazlar alkali, nötral ve asidik pH'lar arasında değişen optimum pH'ya sahiptirler (Pandey vd., 2000).

*Aspergillus*  $\alpha$ -amilazlarıyla yapılan çalışmalarda *A. foetidus* ATCC 10254 pH 5.0, *A. fumigatus* pH 6.0, *A. flavus* LINK pH 6.0, *A. awamari*'nin optimum pH'sının 5.0 olduğu bulunmuştur (Gupta vd., 2003). *A. tamarii* optimum pH'sı 4.5-5.0 olduğu bulunmuştur (Moreira vd., 2004). *Scytalidium thermophilum* optimum pH'sının 6.0 olduğu bulunmuştur (Aquino vd., 2003).

### **5.10. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Ekstrem pH'larda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için, enzim stabilizasyonu oldukça önemli bir özelliktir. Enzimin geniş bir pH aralığında ve uzun süre aktivitesini koruyor olması, endüstri için tercih edilen bir özelliktir. Bu amaçla *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazı ile yaptığımız pH stabilizasyon çalışmaları sonucunda enzimimizin geniş bir pH aralığında oldukça stabil olduğu bulunmuştur. *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının asidik ve alkali pH aralığında stabil olması endüstriyel işlemlerde kullanılabilceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* F<sub>1</sub> GA ve  $\alpha$ -amilazının pH 4.0'da oda sıcaklığında 24 saat tamamen stabil oldukları, pH 5.0 ve 6.0 arasında ise % 80'nin geri kazanıldığı bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

*A. flavus*  $\alpha$ -amilazının pH 5.0 ile 8.5 aralığında stabil olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994). Ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake*  $\alpha$ -amilazının geniş pH aralığında (4.0 ile 10.0) stabil olduğu bulunmuştur (Kusuda vd., 2003).

### 5.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

*A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun (çözünür patates nişastası) etkisi incelendiğinde, substrat konsantrasyonunun belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin de buna bağlı olarak hızla arttığı görülmüştür. Bu durumda enzimatik reaksiyon birinci dereceden (first-order) bir kinetik göstermiştir. Ancak, belli bir substrat konsantrasyonundan sonra aktivitenin artık daha fazla artmadığı ve sabit kaldığı görülmüştür. Bu da enzimin substratına karşı doymuş hale geldiğini ve maksimum hızla çalıştığını göstermektedir. Bu durumda enzimatik reaksiyon sıfırıncı dereceden (zero-order) bir kinetik göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının Michaelis-Menten kinetiği gösterdiğini söyleyebiliriz.

Michaelis-Menten grafiğinden enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin saptanması oldukça zor olması nedeniyle, Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. Bu grafiğe göre, *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  değeri 1.55 mg/mL ve  $V_{max}$  değeri 9091 U/mL olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda, *Aspergillus foetidus* ATCC 10254  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  değeri 2.19 mg/mL, *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  değeri 3.845 mg/mL olarak bulunmuştur (Gupta vd., 2003). Bizim bulduğumuz  $K_m$  değeri bu değerlerden daha düşük olması nedeniyle substrata ilgisi daha fazladır.  $K_m$  değerinin düşük olması endüstriyel işlemlerin hızlı ve kolay olarak yapılmasına olanak sağlayacağından,  $\alpha$ -amilazın endüstriyel potansiyelinin de yüksek olduğunu söyleyebiliriz. *Cryptococcus flavus* (Wanderley vd., 2004), *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ve *A. flavus* (Khoo vd., 1994)  $\alpha$ -amilazlarının nişasta için  $K_m$  değeri sırasıyla 0.056 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 g/L olarak bulunmuştur. Bu değerler bizim değerlerimize göre daha düşük olduğu görülmektedir.

## 5.12. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

$\alpha$ -Amilazın substrat spesifitesi mikroorganizmadan mikroorganizmaya göre değişir. Genellikle  $\alpha$ -amilazlar amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz karşı çok yüksek substrat spesifitesine sahiptirler (Gupta vd., 2003).

*A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazı, % 0.5 ve 1'lik bu substratlar içinde en yüksek aktiviteyi maltoz, maltotrioz, dekstrin ve amiloza karşı göstermiştir. Ancak, rafinoz hariç denenen tüm substratlara karşı aktivite göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğunu ve substratın polimerizasyon derecesi arttıkça  $\alpha$ -amilazın substrat spesifitesinin nispeten azaldığını söyleyebiliriz.

Yapılan bir çalışmada *A. tamarrii*  $\alpha$ -amilazının nişasta, amilopektin ve amilozu hidrolizleme oranının yüksek olduğu, glikojen ve pullulanı çok yavaş hidrolizlediği, siklodekstrinleri ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) hidrolizleyemediği bulunmuştur (Moreira vd.,2004). Termofilik fungus *T. lanuginosus* F<sub>1</sub>  $\alpha$ -amilazı ve glukoamilazının amilozu hızlı bir şekilde hidrolizlediği, pullulanı ise çok az hidrolizlediği bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001). *Cryptococcus flavus*  $\alpha$ -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).

## 5.13. Enzim 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. Bu sebeple, *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelendiğinde, Mn<sup>2+</sup> ve Co<sup>2+</sup> tarafından bütün konsantrasyonlarda Ca<sup>2+</sup>'un ise 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Bu iyonlarda özellikle  $Mn^{2+}$  enzim aktivitesini % 108,  $Co^{2+}$  % 82 ve  $Ca^{2+}$  ise % 8 oranda arttırmıştır. Bu iyonların enzimin stabilizasyonunda veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini sağladığını düşünmekteyiz.

*A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz aktivitesi  $Ni^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Se^{3+}$  ve  $Na^+$  gibi metal iyonlarının tüm konsantrasyonlarında çok fazla etkilenmediği,  $Se^{3+}$  iyonunun 10 mM'lık konsantrasyonunda % 43 oranda,  $Mg^{2+}$  iyonunun 10 mM'lık konsantrasyonunda % 35 oranda,  $Ni^{2+}$  iyonunun 10 mM'lık konsantrasyonunda % 63 oranda inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Bu iyonların enzim yapısı ve substrat ile etkileşime girmediği veya yapıya katılmış olsalar dahi üç boyutlu yapıyı değiştirmediklerini düşünmekteyiz.

$Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ 'nin 1 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini çok fazla inhibe etmezken, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları yüksek oranda inhibisyona neden olmuştur.  $Hg^{2+}$  1 mM'lık konsantrasyonda % 55 oranında inhibisyona neden olurken, özellikle 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir.  $Cu^{2+}$ 'nin 1 mM'lık konsantrasyonu enzim aktivitesini yaklaşık olarak % 38 oranında inhibe ederken, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları inhibisyon oranını arttırmaktadır. Bu metal iyonları  $\alpha$ -amilazın substrat bağlama bölgesine ve katalitik merkezinde görev alan aminoasitlerle etkileşerek inhibisyona neden olduğunu, ayrıca yapıya katılarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiğini veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini etkilediğini düşünmekteyiz.

Bir metal tutucu ajan olan EDTA, denenen konsantrasyonlarda enzim aktivitesini % 28-40 oranında inhibe etmiştir.  $\alpha$ -Amilaz'ın metal tutucu bir ajan olan EDTA tarafından yaklaşık % 40 oranında inhibe olması,  $\alpha$ -amilaz'ın bir metalloenzim olmadığı düşüncesini akla getirmektedir. Çünkü enzim EDTA tarafından yüksek konsantrasyonlarda bile tamamen inhibe olmamıştır.

Metal iyonlarının amilazlar üzerine etkisi ile yapılan çalışmalar sonucunda enzim aktivitelerini çok farklı bir şekilde etkiledikleri bulunmuştur.

Bunlardan bazıları enzim aktivitesini artırırken, bazıları inhibe etmiş veya hiç etkilememiştir. Termofilik fungus *T. lanuginosus* F<sub>1</sub>'in  $\alpha$ -amilaz aktivitesi 2 mM  $\text{Co}^{2+}$  (% 78),  $\text{Mn}^{2+}$  (% 24),  $\text{Zn}^{2+}$  (% 13),  $\text{Ca}^{2+}$  (% 11) ve  $\text{Fe}^{2+}$  (% 8) tarafından aktive edildiği,  $\text{Ba}^{2+}$  (% 11), EDTA (% 46) ve  $\text{Hg}^{2+}$  (% 90) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

*Scytalidium thermophilum*  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Na}^+$  iyonları % 4-8 oranında bir artışa sebep olurken,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  ve  $\text{NH}_4^+$  sırasıyla % 47, 17, 12 ve 12 oranında, özellikle  $\text{Hg}^{2+}$  ile  $\text{Cu}^{2+}$  ise % 85 ile 75 oranında inhibisyona sebep olmuştur. 10 mM konsantrasyonda ise aktivitede  $\text{Na}^+$  iyonu % 10'lük bir artış göstermiş,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  iyonları yaklaşık olarak % 18'lik inibisyona ve özellikle  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  iyonları ise % 93, 96 ve 100'lük inhibisyona neden olmuştur (Aquino vd., 2003).

*Cryptococcus flavus*'un  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde 4 mM  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları sırasıyla % 4, 5, 15, 30, 71, 80 ve 100 azalmaya sebep olmuştur (Wanderley vd., 2004). *A. tamarisii*  $\alpha$ -amilazı 10 mM  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  tarafından % 90-98 oranında inhibe edilmiş,  $\text{Ba}^{2+}$  tarafından % 23 oranında aktive edilmiş ve denenen diğer metal iyonları tarafından önemli bir şekilde etkilenmediği bulunmuştur (Moreira vd., 2004).

Yukarıda  $\alpha$ -amilaz üzerine yapılan çalışma sonuçlarından da görüleceği üzere, bunların birçoğu çalışmamızla uygunluk göstermektedir. Enzimimizin birçok metal iyonu varlığında aktivitesinin çok fazla değişmemesi veya bazı metal iyonlarıyla aktive olması, endüstriyel işlemlerde kullanılma potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

#### 5.14. Enzimin Tuz Toleransı

*A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazı, 0.5-5.0 M NaCl konsantrasyonları arasında enzim aktivitesinde artış (% 57) olmuştur. Tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesi kontrole göre yüksek bulunmuştur.

Bu durum, *A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının tuz toleransının oldukça yüksek olduğunu gösterir. Bu sonuca göre enzimin yüksek tuz konsantrasyonu gerektiren endüstriyel işlemlerde de kullanıma uygun olabileceği söylenebilir. Nişastanın şekerleştirme işlemlerinde ve endüstrideki farklı uygulamalarda kullanılan amilazlar için, yüksek tuz toleransına sahip olmanın yararlı bir özellik olduğu bildirilmiştir (Mohapatra vd., 1998). Tuz toleransı testinin, kirlilik kontrol mekanizmalarında, selüloz, nişasta ve yüksek oranda tuz içeren atık suların işlenmesinde önemli olduğu belirtilmiştir (Banerjee vd., 2001 ; Cordeiro vd., 2002).

### **5.15. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi**

*A. fumigatus* HBF50  $\alpha$ -amilazının aktif merkezinde hangi aminoasitlerin katalitik işlev yaptığını anlamak için çeşitli inhibitörlerin etkisi incelendi. Bir triptofan inhibitörü olan NBS,  $\alpha$ -amilaz aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Serin spesifik inhibitörü olan PMSF, karboksil grubu spesifik inhibitörü CMC, sistein ve histidin alkilleyici İAA'nın 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini % 35-46 oranlarında inhibe etmiştir. Bu sonuçlara dayanarak enzimimizin aktif merkezinde özellikle triptofanın önemli bir rol oynadığını, ayrıca serin, histidinin ve karboksil grubuna sahip olan aminoasitlerin de katalitik süreçte önemli bir rol oynadığını düşünebiliriz.

Sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril grubu oksitleyici ajanı olan DTNB 5 mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesini % 66 arttırmıştır.

Sülfidril redükleyici ajanlar olan DTT ve  $\beta$ -merkaptöetanol 1 mM'lık konsantrasyonda aktiviteyi sırasıyla % 44 ve 20 artırırken, 5 mM'lık konsantrasyonda çok az bir inhibisyona neden olmuştur.

Bu sonuçlara dayanarak enzimimizin aktif merkezinde sistein aminoasitinin önemli bir rol oynamadığını düşünebiliriz.

Protein denatürantı olan üre ve SDS 1 mM'lık konsantrasyonda enzimin aktivitesini çok fazla etkilememesi enzimimizin üre ve SDS'e karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir. Üre ve SDS 5 mM'lık konsantrasyonda ise enzim aktivitesinde yaklaşık olarak % 37'lik bir inhibisyona neden olmuştur.

Yapılan çalışmada *A. carbonarius* amilazı 2 mM NBS tarafından % 49 oranında inhibe edilmiştir (Okolo et al., 2000). *Thermomyces lanuginosus*  $\alpha$ -amilazı CMC ve NBS tarafından inhibe edilmiş ve bu sonuçlara göre enzimin aktif merkezinde karboksil grupları ve triptofan aminoasidinin olduğu ileri sürülmüştür (Petrova et al., 2000). *Penicillium citrinum* HBF62  $\alpha$ -amilazı PMSF, CMC ve NBS tarafından inhibe olmuş, DTT,  $\beta$ -merkaptotanol ve DTNB tarafından çok az aktive olmuştur. Bu sonuçlar bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir (Metin, K. vd., 2010).

### **5.16. Ham Nişasta Adsorpsiyonu**

Çeşitli ham nişasta granüllerini parçalayabilen enzimler, ekonomik olarak caziptir. Bu enzimler, direkt hidroliz için nişasta kaynaklarının alanını genişletebilirler (Liu, X.D. ve Yan Xu, 2008).

$\alpha$ -Amilazın ham nişasta kaynaklarını sindirebilme yetenekleri ve immobilizasyonu endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Bu amaçla farklı nişasta kaynaklarına  $\alpha$ -amilazın adsorpsiyon oranı bulmak için ham mısır nişastasası, pirinç nişastasası ve buğday nişastasası kullanıldığında, adsorpsiyon oranı sırasıyla % 48, 9 ve 15 olarak bulundu.

*A. fumigatus*  $\alpha$ -amilazının mısır nişastasasına adsorpsiyon kapasitesinin, pirinç ve buğday nişastasasına göre daha iyi olduğu görülmektedir. Ancak enzimin ham nişasta adsorbsiyonu literatür bilgilerine göre düşük çıkmıştır.



*Bacillus sp. YX-1*  $\alpha$ -amilazının % 1'lik konsantrasyondaki mısır, buğday ve patates nişasta granüllerinin parçalanma oranları, 8 saatte sırasıyla % 57.5, 53 ve 45.1 ve 12 saatte sırasıyla % 63.2, 56.4, 48.6'dır (Liu, X.D. ve Yan Xu, 2008).

### 5.17. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

$\alpha$ -Amilaz enzimleri, nişasta molekülünün  $\alpha$ -1,4 bağlarını gelişigüzel hidrolizleyerek dekstrin, maltoz ve çok az miktarda glikoz meydana getirir. İnce tabaka kromatografisi, kâğıt kromatografisi veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi tekniklerle enzimatik son ürünler tespit edilerek amilolitik enzimlerin tanısı yapılmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda *A. fumigatus* HBF50 tarafından üretilen enzimin tanısını yapmak için ince tabaka kromatografisi kullanılarak, nişastanın enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan son ürünün glikoz, maltoz ve maltotrioz olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara göre enzimimizin  $\alpha$ -amilaz olduğu sonucuna varılmıştır.

Birçok mikroorganizma tarafından üretilen amilolitik enzimlerin tanısını için yapılan çalışmalarda nişastanın hidrolizi sonucu oluşan son ürün analizi, ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Örneğin; *Penicillium citrinum* HBF62, *Tricholoma matsutake*, *Scytalidium thermophilum*, *Aspergillus tamarii* ve *Cryptococcus flavus*  $\alpha$ -amilazlarının tanısı ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır (Metin, K. vd., 2010; Kusuda vd., 2003; Aquino vd., 2003; Moreira vd., 2004; Wanderley vd., 2004).

Sonuç olarak;

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı stok kültürlerinde kayıtlı havadan izole edildikten sonra tanısı yapılmış olan 11 *Aspergillus* cinsinde kalitatif amilaz taraması yapıldı.

Havadan izole edilerek tanısı yapılmış 11 fungusun kalitatif amilaz taraması sonucunda 7 türde amilolitik aktivite saptanmıştır.

Daha sonra bu türlerin aflatoksin üretip üretmediği kontrol edilmiştir. Aflatoksin üretmeyen türlerden en iyi amilaz aktivite zon çapı gösteren funguslardan biri olan *A. fumigatus* HBF50 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçilmiştir.

Diğer amilolitik aktivite gösteren suşlar ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür koleksiyonuna kaydedilmiştir.

Fermentasyon ortamında *A. fumigatus* HBF50'nin  $\alpha$ -amilaz üretimi yapıldı.  $\alpha$ -amilaz çeşitli kromatografik yöntemler ile 3.00 kat saflaştırıldı. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak bulundu.

Saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın optimum pH'sı 5.0 ve sıcaklığı 55°C olarak bulundu.  $\alpha$ -amilazın 40°C'ye kadar olan sıcaklıklarda ve pH 5.0-8.0 aralığında uzun süre stabil olduğu saptandı. Enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında çalışıyor olması endüstriyel olarak oldukça önemli olduğu göstermektedir.

$\alpha$ -Amilaz,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  tarafından aktive edildiği,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve özellikle  $Hg^{2+}$  tarafından inhibe edildiği ve diğer iyonların ise aktiviteyi etkilemediği bulundu. Buda endüstriyel açıdan oldukça önemli bir özelliktir.

$\alpha$ -Amilazın NaCl'ye karşı toleransının yüksek olarak bulunması zor koşullarda gerçekleşen endüstriyel işlemler için önemli bir özelliktir.

Bir triptofan inhibitörü olan NBS, serin spesifik inhibitörü olan PMSF, karboksil grubu spesifik inhibitörü CMC, sistein ve histidin alkilleyici İAA'nın enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Bu sonuçlara dayanarak enzimimizin aktif merkezinde özellikle triptofanın önemli bir rol oynadığını, ayrıca serin, histidinin ve karboksil grubuna sahip olan aminoasitlerin de katalitik süreçte önemli bir rol oynadığını düşünebiliriz.

Sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril grubu oksitleyici ajanı olan DTNB, sülfidril redükleyici ajanlar olan DTT ve  $\beta$ -merkaptoetanol enzim aktivitesini aktive etmiştir. Bu sonuçlara dayanarak enzimimizin aktif merkezinde sistein aminoasitinin önemli bir rol oynamadığını düşünebiliriz. Protein denatürantı olan üre ve SDS sadece yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesini inhibe etmiştir.

İnce tabaka kromatografisi ile amilazın  $\alpha$ -amilaz olduğu saptandı.

*A. fumigatus* HBF50 tarafından elde edilen  $\alpha$ -amilazın karakterizasyon özelliklerine bakılarak endüstriyel işlemler için kullanım potansiyelinin olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle ileride endüstriyel potansiyel açısından bu enzimin uygulanabilirliğini araştırmayı düşünüyoruz. Ayrıca ileride *A. fumigatus* HBF50'nin üretim ortamının optimizasyonunun (azot ve karbon kaynakları) yapılması düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Abou-Zeid, A.M. 1997. Production, purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. **Microbios**, 89: 55-66, Egypt.
- Aquino, A.C.M.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M. 2003. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 61: 323-328, Brazil.
- Banerjee, D., Mondal, K.C., Pati, B.R. 2001. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DFB 9. **J. Basic Microbiol**, 41 (6): 313-318, India.
- Barredo, J.L. 2005. Methods in Biotechnology<sup>TM</sup> 17: Microbial enzymes and biotransformations. 1-27. Human Press, Totowa, New Jersey.
- 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. Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusarium solani*. **Food Chemistry**, 103: 338-343, Pakistan.
- Bignell, G.R., Bruce, I.J. & Evans, I.H. 2000. Amylolytic enzymes of *Lipomyces starkeyi*: purification and size-determination. **Biotechnology Letters**, 22: 1713-1718, Netherlands.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, Athens.

- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 23: 85-112, France.
- Cherry, H.M., Md. Towhid Hossain and Anwar, M.N. 2004. Extracellular Glucoamylase from the Isolate *Aspergillus fumigates*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 7 (11): 1988-1992, Bangladesh.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B. 2002. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Thermophilic Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33: 57-61, Brazil.
- De Mot, R. and Verachtert, H. 1987. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. **Eur. J. Biochem**, 164: 643-654, Heverlee.
- Dönmez, S. 1986. Gıda Sanayiinde Kullanılan Enzimler ve Ülkemizdeki Durumu. **Gıda**, Yıl: 11, Sayı: 4, Ankara.
- Ekşi, A., 1998. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği yayınları No:9, 127 s., Ankara.
- Elgün, A., Ertugay, Z., 1995. Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No:356 s., Erzurum.
- Gomes, E., De Souza, S.R., Grandi, R.P., Da Silva, R. 2005. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* a 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36: 75-82, Brazil.
- Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Hilda, A. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, 46: 119-126, Tokyo.

- Goto, C.E., Barbosa, E.P., Kistner, L.C.L., Moreira, F.G., Lenartovicz, V., Peralta, R.M. 1998. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing  $\alpha$ -methyl-D-glycoside, a syntetic analogue of maltose, as substrate. **FEMS Microbiology Letters**, 167: 139-143, Brazil.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, 38: 1599-1616, India.
- Ha, Y.M., Lee, D.G., Yoon, J.H., Park, Y.H. & Kim, Y. 2001. Rapid and simple purification of a novel extracellular  $\beta$ -amylase from *Bacillus sp.* **Biotechnology Letters**, 23: 1435-1438, Korea.
- Hasenekoğlu, İ. 1991. Toprak Mikrofungusları. Cilt 1: 324-325, Atatürk Üniversitesi Yayınları No. 689, Erzurum.
- James, J.A. and Lee, B.H. 1997. Glucoamylases: Microbial Sources, Industrial Applications and Molecular Biology. **Journal of Food Biochemistry**, 21: 1-52, Tallahassee.
- Jensen, B., Thorsen, T.S., Johnsen, A.H., Josefsen, K. 2006. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1764: 671-676, Denmark.
- Kantarcioğlu, A.S., Yücel, A. 2003. *Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleri. **Cerrahpaşa J Med**, 34: 140-157, İstanbul.
- 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, Penang.

- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. **KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi**, 9 (1), Kahramanmaraş.
- Koç, Ö. and 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, Aydın.
- Kurakake, M., Ueki, M., Hashimoto, S. and Komaki, T. 1997. Adsorption of  $\alpha$ -amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin. **Carbohydrate Polymers**, 34: 55-59, Japan.
- Kusuda, M., Nagai, M., Hur, T.C., Ueda, M., Terashita, T. 2003. Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. **Mycoscience**, 44: 311-317, Tokyo.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-5, Cambridge.
- Liu, X.D. ve Yan Xu 2008. A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus sp.* YX-1: Purification and characterization. **Bioresource Technology**, 99: 4315-4320, China.
- Marlida, Y., Saari N., Radu, S. & Bakar, F.A. 2000. Production of an amylase degrading raw starch by *Gibberella pulicaris*. **Biotechnology Letters**, 22: 95-97, Netherlands.
- Metin, K. 2007. Moleküler Biyoloji, Protein sentezi ve yıkımı. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. (editörler), Nobel Yayın Dağıtım, 555-576 s., Ankara.
- Metin, K., Koç, Ö., Ateşlier, Z.B., Bıyık, H.H. 2010. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9 (45), pp. 7692-7701, Aydın.

- 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: 133-117, India.
- Møller, K., Sharif, M.Z., Olsson, L. 2004. Production of fungal  $\alpha$ -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. **Journal of Biotechnology**, 111: 311-318, Denmark.
- Moreira, F.G., Lenartovicz, V. and Peralta, R.M. 2004. A thermostable maltose-tolerant  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus tamari*. **J. Basic Microbiol**, 44 (1): 29-35, Brazil.
- Morita, H. and 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, Weinheim.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V. 2000. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1543: 253-274, Germany.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J.M., Young, M.M. 2006. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, 24: 80-85, Iran.
- Odibo, F.J.C. and Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Thermostable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus F<sub>1</sub>*. **Acta Biotechnol**, 21 (2): 141-153, Germany.
- Okolo, B.N., Ire, F.S., Ezeogu, L.I., Anyanwu, C.U. and Odibo, F.J.C. 2000. Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81: 329-336, Nigeria.



- Omemu, A.M., Akpan, I. Bankole, M.O. and Teniola, 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, Nigeria.
- Pandey, A., Nigman, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem**, 31: 135-152, India.
- Petrova, S.D., Ilieva, S.Z., Bakalova, N.G., Atev, A.P., Bhat, M.K. & Kolev, D.N. 2000. Production and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). **Biotechnology Letters**, 22: 1619-1624, Netherlands.
- Sarıkaya, E. 1988. *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilazı üretimini değişik ortamlarda incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi (Yayınlanmamış), 37s., Ankara.
- Sharma, D., and Shukla, A.K. 2008. Starch hydrolysis and  $\alpha$ -amylase activity of *Aspergillus* and *Chaetomium*. **Asian Journal of Biochemistry**, 3 (5): 284-289, India.
- Shenoy, B.C., Katwa, L.C., Appu Rao, A.G. and Raghavendra Rao, M.R. 1985. Fungal glucoamylases. **J. Biosci.**, Vol. 7, Numbers 3& 4, pp. 399-419, India.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R. and Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources. **Food Technol. Biotechnol.**, 44 (2): 173-184, India.
- Sunna, A., Moracci, M., Rossi, M., Antranikian, G. 1997. **Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles**, Extremophiles 1: 2-13, Germany.

- Suresh, C., Dubey, A.K., Srikanta, S., Kumar, S.U., Karanth, N.G. 1999. Characterisation of a starch-hydrolysing enzyme of *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol Biotechnol**, 51: 673-675, India.
- Tanrıseven, A., Uludağ, Y.B., Doğan, Ş. 2002. A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce from maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, 30: 406-409, Kocaeli.
- Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**, 94: 137-155, Netherlands.
- Yang, S.S. and Wang, J.Y. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* submerged and solid state cultivations. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, 40: 259-265, Taiwan
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Morales, L.M.P., Ulhoa, C.J. 2004. Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**, 231: 165-169, Brazil.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ahsen Uçar  
Doğum Yeri ve Tarihi : Tekirdağ 12.10.1985

### EĞİTİM DURUMU

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

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Katıldığı Projeler:

International Conference on Sciences 2009, Romanya

### İLETİŞİM

E-posta Adresi : ahsenucar\_61@hotmail.com  
Tarih :14.01.2011