TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Katı Substrat Fermentasyonu ile Ham Nişastayı Parçalayan Yeni Bir Fungal Amilaz Üretimi Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

BİLAL BALKAN

Doktora Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN

EDİRNE -2008

ÖZET

Bu çalışmada, yeni bir ham nişasta hidrolizleyen fungal amilazın SSF yöntemi ile üretilmesi, saflaştırılması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ham nişastayı hidrolizleyen amilaz taraması sonucunda en iyi aktiviteye *Penicillium brevicompactum*' un sahip olduğu bulundu ve amilaz kaynağı olarak kullanıldı. Buğday kepeği, pirinç kabuğu ve ayçiçeği küspesi en iyi substratı belirlemek için test edildi. En iyi katı substratın buğday kepeği olduğu belirlendi.

Amilaz üretimi için katı substrat fermentasyon şartları optimize edildi. Optimum fermentasyon şartları, başlangıç nem içeriği % 55, nemlendirici ajan 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 5.0), üretim süresi 7 gün, aşı miktarı 2.5 mL ve üretim sıcaklığı 30 ^{o}C olarak saptandı.

Penicillium brevicompactum amilazı nişasta afinite metodu kullanılarak 45.98 kez saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin çözünür nişasta için K_m değeri 5.71 mg/ml, V_{max} değeri ise 666.6 U/ml olarak hesaplandı.

Enzim 30-50 ^{o}C arasında ve pH 5.0 de maksimum aktivite gösterdi. 30 ^{o}C' de 45 dk. inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesini %100 korudu. pH 4.0-5.0 arasında kararlı idi.

Mn^{+2}, Cu^{+2} and Na^{+} iyonları enzim aktivitesini arttırırken Mg^{+2}, K^{+}, Fe^{+3} ve EDTA enzim aktivitesini inhibe etti.

P. brevicompactum α-amilazının molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 32.5 kDa olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: α-amilaz, katı substrat fermentasyon, ham nişasta sindirimi, saflaştırma, *Penicillium brevicompactum.*

SUMMARY

In this study, it was intended to the production of new a fungal amylase with solid state fermentation, purification and also to determine its some biochemical properties.

It was found that *Penicillium brevicompactum* had the best enzyme activity according to raw starch degrading amylase screening methods, and *P. brevicompactum* was selected as amylase source.

Wheat bran, rice husk and sunflower oil meal were tested to determine the best solid substrate. Wheat bran was determined as the best solid substrate.

The fermentation contitions were optimized for the production of amylase. The optimum fermentation conditions were found to be initial moisture level of solid substrate of 55 %, moistening agent of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.0), incubation period of 7 days, inoculum concentration of 2.5 mL and incubation temperature at 30 ^{o}C.

P. brevicompactum α-amylase was purified 45.98 times by using starch affinity method. The K_m and V_{max} values of α-amylase for soluble starch were 5.71 mg/ml, 666.6 U/ml respectively.

This amylase showed maximum activity at between 30-50 ^{o}C and pH 5.0. Initial enzyme activity was kept to be 100% after incubation at 30 ^{o}C for 45 min. Enzyme was stable in the pH range of 4.0-5.0.

This enzyme was activated by Mn^{+2}, Cu^{+2} and Na^{+} ions, and inhibited by Mg^{+2}, K^{+}, Fe^{+3} and EDTA.

The molecular weight of *P. brevicompactum* α-amylase was found as 32.5 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: α-amylase, solid substrat fermentation, raw starch digesting, purification, *Penicillium brevicompactum*

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, öneri ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN' a,

Tez çalışmalarım sırasında gerek Biyoloji Bölümü gerekse diğer bölümlerin imkan ve olanaklarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Tülin AKTAÇ' a

Mikroorganizmanın teminindeki yardım ve ilgileri için sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN ve Yrd. Doç. Dr. Halide AYDOĞDU' ya

Çalışmamın elektroforez ile ilgili bölümünde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ ve Araştırma görevlisi Suat ÇAKINA' ya

Yoğun çalışma sürecimde her zaman yanımda olan ve bana her türlü desteği veren sevgili eşim Seda BALKAN' a

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesindeki mesai arkadaşlarıma en içten duygularımla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SayfaNo**

ÖZET I
SUMMARY II
TEŞEKKÜRLER III
İÇİNDEKİLER IV
TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....VII

1.GİRİŞ 1
2.GENEL BİLGİLER.....5
2.1. SSF.....5
2.2 .Nişasta 10
2.3.α-Amilaz.....14
2.4.Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) 16
2.5. *Penicillium brevicompactum* 18
3. MATERYAL METOD 20
3.1. Amilaz aktiviteli mikroorganizmaların taranması.....20
3.2. Kullanılan tarama ortamları.....20
3.3. Tarama ortamına ekim ve üretim.....21
3.4. Ekstraselüler amilaz sentezleyen mikroorganizmaların belirlenmesi 21
3.5. Mikroorganizmaların üretimi ve saklanması.....21
3.6. SSF kültür ortamının hazırlanması 21
3.7. SSF kültür ortamında ekim, üretim ve amilaz eldesi.....22
3.8. Amilaz aktivitesinin ölçülmesi 22
3.9. Amilaz enziminin etki tarzının belirlenmesi 23
3.10. Üretim koşullarının SSF'de üretilen *Penicillium brevicom pactum* amilaz sentezi üzerine etkisi.....24
3.10.1. Uygun substrat seçimi 24
3.10.2. Başlangıç nem düzeyinin etkisi.....24
3.10.3. Ortam pH' sının etkisi.....25

3.10.4. Üretim süresinin etkisi 25
3.10.5. Aşı konsantrasyonunun etkisi 25
3.10.6. Üretim sıcaklığının etkisi 25
3.11. Amilaz enziminin farklı nişastalara tutunma yeteneğinin Araştırılması 26
3.12.Amilaz enziminin saflaştırılması 27
3.13.*Penicillium brevicompactum* amilaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 28
3.13.1. İnkübasyon sıcaklığının amilaz aktivitesine etkisi 28
3.13.2. İnkübasyon pH'nın amilaz aktivitesine etkisi 28
3.13.3. Amilaz enziminin termal kararlılığının araştırılması 28
3.13.4. Amilaz enziminin pH kararlılığının araştırılması 28
3.13.5. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi 29
3.13.6. Amilaz enziminin kinetik özelliklerinin araştırılması 29
3.13.6.1Amilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması 29
3.14.Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDSPAGE) 30
3.14.1. Jellerin hazırlanması 30
3.14.2. Örneklerin denatürasyonu ve yüklenmesi 34
3.14.3. Jellerin boyanması ve boyanın alınması 34
3.14.4.SDS-PAGE ile *P.brevicompactum* amilazının molekül ağırlığının hesaplanması 35
4. BULGULAR 36
4.1. Ekstraselüler amilaz sentezleyen mikroorganizmaların Belirlenmesi 36
4.2. Amilaz enziminin nişasta hidrolizindeki etki tarzının belirlenmesi ...36
4.3. SSF' de ki üretim koşullarının *Penicillium brevicompactum* α-amilazının sentezi üzerine etkisi 37
4.3.1. Uygun substrat seçimi 37
4.3.2. Başlangıç nem düzeyinin etkisi 38
4.3.3. Farklı pH'daki nemlendirme sıvılarının etkisi 39

4.3.4. Üretim süresinin etkisi 40
4.3.5. Aşı konsantrasyonu etkisi 41
4.3.6. Üretim sıcaklığının etkisi 42
4.4. α-amilaz enziminin farklı nişastalara tutunma yeteneğinin Araştırılması 43
4.5. α-amilaz enziminin saflaştırılması 44
4.6.*Penicillium brevicompactum* α-amilazının biyokimyasal özelliklerinin Belirlenmesi 45
4.6.1. İnkübasyon sıcaklığının α-amilaz aktivitesine etkisi 45
4.6.2. İnkübasyon pH'sının α-amilaz aktivitesine etkisi.....46
4.6.3. α-amilaz enziminin termal kararlılığının araştırılması 47
4.6.4. α-amilaz enziminin pH kararlılığının araştırılması.....48
4.6.5. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi 49
4.6.6. α-amilaz enziminin Km ve Vmax değerlerinin Hesaplanması 50
4.7. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile *P. brevicompactum* α-amilazının molekül ağırlığının hesaplanması 51

5. TARTIŞMA 53

6. KAYNAKLAR 66

7. ÖZGEÇMİŞ.....77

Tablo ve Şekiller Dizini

Tablo 2.1. SSF'nin uygulama alanları.

Tablo 4.1. α-amilaz sentezine farklı substratların etkileri.

Tablo 4.2. SSF kültürlerinde farklı pH' daki nemlendirme tamponlarının α-amilaz aktivitesine etkisi.

Tablo 4.3. *P. brevicompactum*'dan ekstraselülar α-amilazın saflaştırılması.

Tablo 4.4. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi.

Şekil 4.1. SSF kültürlerinde başlangıç nem içeriğinin α-amilaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.2. SSF kültürlerinde üretim süresinin α-amilaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.3. SSF kültürlerinde aşı konsantrasyonunun α-amilaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.4. SSF kültürlerinde üretim sıcaklığının α-amilaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.5. α-amilaz enziminin ham nişastalara tutunma yeteneği.

Şekil 4.6. İnkübasyon sıcaklığının α-amilaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.7. İnkübasyon pH'sının α-amilaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.8. α-amilaz enziminin termal kararlılığının araştırılması.

Şekil 4.9. α-amilaz enziminin pH kararlılığının araştırılması.

Şekil 4.10. Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.11. SDS-PAGE sonuçları.

Şekil 4.12. Standart proteinlerin log MW değerlerinin Rf değerlerine göre değişimi.

1. GİRİŞ

Willy Kühne 1878 yılında, biyolojik reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler için "hücrede bulunan" anlamına gelen "enzim" deyimini ilk kez kullanmıştır. Enzimlerin, hücre ve canlı metabolizmasındaki önemi çok büyüktür. Bu nedenle tıp, biyokimya ve biyoloji gibi çok geniş bir araştırma alanı bulmuştur.

Endüstriyel açıdan önemi bulunan pek çok reaksiyon, biyolojik ortamlarda çok daha kolay ılımlı koşullarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle enzimlerin endüstride kullanımı kaçınılmaz olmuştur. Enzimlerin endüstride kullanılması ile yüksek basınç ve sıcaklık gibi enerji gerektiren koşulların ortadan kalkması ekonomik açıdan yarar sağlamaktadır (Çetin,1983).

Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1,4 milyar USD dolayında olup, yılda %10'un üzerinde Pazar ağı artışı ve % 4-5 oranında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarındandır. Endüstriyel enzim üretiminin % 75'i gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri içinde yer almaktadır (Cowan, 1996).

Endüstride kullanılan en önemli ham materyallerden biri nişastadır. Nişasta bitkilerde depo polisakkarit formunda bol miktarda bulunmaktadır ve yiyecek endüstrisinde geniş çapta kullanılan glukoz, fruktoz veya maltoz içeren şurupların üretimi için oldukça ucuz bir kaynaktır. Nişasta granüllerinde moleküller iç ve ara moleküler bağlar ile polikristalin fazda yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Bu yüzden soğuk suda çözünmezler. Sıklıkla kimyasallara ve enzimlere karşı dirençlidir.

Nişasta endüstrisinde, glukoz ve maltoz şuruplarını elde etmek için enzimler kullanılmaktadır. Nişastadan şeker elde etme basamağı olan sakkarifikasyonda %15 nişasta içeren bulamaç 105 ºC' ye kadar ısıtılarak jelatinize edilir. Jelatinizasyon işleminde, enzimin nişastaya etki etmesi için kristal yapının açılması sağlanır. Jelatinizasyon bulamacın vizkozitesini arttırır,

karıştırma ve pompalamada problemlere neden olur. Jelatinize nişasta aynı zaman sürecinde yüksek sıcaklıkta α-amilaz ile sıvılaştırılır. Bu işlemden sonra 50-60 ºC gibi daha düşük sıcaklıkta glikoamilaz ile şekerleştirme işlemi gerçekleştirilir (Goyal vd., 2005).

Nişasta endüstrisinde kullanılan bütün bu işlemler yüksek enerjiye ihtiyaç duyar. Bu yüzden nişastayı temel alan ürünlerin üretim fiyatları artar.

Jelatinizasyon işleminde bakteriyal α-amilazlar sakkarifikasyonda ise fungal α-amilazlar kullanılmaktadır. Her iki enzim grubunun aktivite gösterdiği pH değeri değişiktir. Bakteriyal α-amilazlar bazik, fungal α-amilazlar ise asidik pH' da maksimum aktivite göstermektedirler. Jelatinizasyon işleminden sakkarifikasyon işlemine geçilirken ortamın pH'sı da değiştirilmek zorundadır. Bu işlemde sonuç olarak maliyeti arttırmaktadır.

Tek basamakta ham nişastayı hidrolizleyen amilaz ile nişastadan elde edilen glukoz, fruktoz veya maltoz şuruplarının üretim fiyatları oldukça düşük olacaktır. Son yıllarda, jelatinizasyon işlemi olmaksızın ham nişastanın enzimatik sakkarifikasyonu artan bir öneme sahiptir. Kullanılan enerji miktarının azalması ve nişastanın daha etkili kullanılması nişasta endüstrisinde fiyatları düşürmektedir. Bu durum tek basamakta ham nişastayı direk hidrolizliyebilen ve jelatinizasyona ihtiyaç duymayan pek çok amilazın dünya çapında keşfine yol açmıştır (Goyal vd., 2005).

Ham nişastanın polikristalin yapısından dolayı amilazların nişastaya granülleri üzerine olan etkisi jelatinizasyon işlemi ile iç ve ara moleküler bağları kırılmış nişasta üzerine olan etkisinden daha zordur.

Ham nişastayı sindiren amilazlar yiyecek ve meyve suyu endüstrileri için ticari açıdan önemli enzimlerdir. Ham nişastayı sindiren amilazlar fungus, (Abe vd., 1988; Morita ve Fukuoka, 1997; Marlida vd., 2000; Matsubara vd.(b), 2004)

bakteri (Hayashida vd. 1988; Lin vd., 1998) ve mayalardan (Nagasaka vd., 1995) elde edilmişlerdir.

Endüstride kullanılan enzimleri üretmek için Derin Kültür Fermantasyonu (SmF) olarak adlandırılan sıvı süspansiyonlar kullanılmaktadır. Ancak bu güne kadar teşhis edilen mikroorganizmaların yaklaşık olarak % 99' unun yaşamlarını sürdürdükleri doğal ortamlarda serbest su bulunmamaktadır (Hölker vd., 2004). SmF tekniği ile yapılan üretimlerde mikroorganizmaların doğal ortamları sağlanmış olmayabilir ve metabolik verimlilikleri de olumsuz bir şekilde etkilenebilir. Katı substrat fermantasyonu (SSF), SmF' ye alternatif olan enzim üretim tekniğidir. SSF serbest suyun yokluğunda nemli katı materyallerin üzerinde mikroorganizmaların büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Perez-Guerra vd., 2003). Bu fermentasyon sisteminde su miktarı SmF'ye göre çok azdır. Bu yüzden mikroorganizmaların adapte olduğu doğal ortamları sağlanmış olmaktadır.

Düşük enerji tüketimi, az miktardaki atık su, kontaminasyon riskinin az olması, düşük fiyatlı teknoloji, yüksek ürün eldesi SSF'yi SmF'ye göre daha avantajlı kılan diğer durumlardır. Pek çok ekstraselüler katabolik enzim, katabolit veya son ürünün "feed back repressionu" (geri besleme baskılaması) ile etkilenmektedir. Enzim sentezinin katabolik baskılaması bakteri ve funguslar için SmF üretiminde rapor edilmiştir (Nandakumar vd.,1999). SmF'deki katabolik baskılama veya proteazların neden olduğu, protein parçalanması gibi sorunlar SSF'de ya çok az yada hiç bulunmamaktadır (Hölker vd., 2004).

Farklı tarımsal yan ürünler kullanılarak SSF'de fungus ve bakterilerden α-amilaz üretimi bir çok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Krishna ve Chandrasekaran 1996; Francis vd., 2002; Matsubara vd.(a), 2004; Sodhi vd., 2005)

Jelatinizasyon ve sıvılaştırma işlemleri olmaksızın ham nişastanın sakkarifikasyonu ve bunu gerçekleştiren enzimin SSF tekniği gibi çok ucuz bir yöntemle üretimi önemli ölçüde ekonomik avantaj sunacaktır.

Etkili ham nişasta sakkarifikasyonu için yeni enzim üreticilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden etkili enzim üreticileri olan fungusları, ham nişastayı sindirme yeteneğindeki enzimleri sentezleyip sentezlemediklerini araştırmak için bölümümüz küf kültür koleksiyonunu, karbon kaynağı olarak ham nişasta içeren tarama besiyerlerinde test etmek çalışmamızın önceliğini oluşturmaktadır. Daha sonra besiyerlerinde en büyük zon çapı oluşturan fungustan SSF tekniği ile enzim üretmek ve üretilen enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Katı Substrat Fermentasyonu (SSF)

SSF serbest akıcı suyun yokluğunda nemli materyaller üzerinde mikroorganizmaların büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Perez-Guerra vd., 2003).

SSF tekniğinde mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu düşük nem içeriğine sahip katı substrat partikülünün yüzeyinde veya yakınında meydana geldiği için SmF kültürlerinden farklıdır (Pandey vd., 1999).

SSF tekniğinin SmF' ye karşı en önemli avantajlarından biri kullanılan substratların doğada çok bol bulunması ve çok ucuz olmasıdır. Bu substratlar SmF için uygun değildir (Hölker vd., 2004). Tarımsal yan ürünler genellikle SSF'de kullanılan en iyi substratlardır. Bu substratlar enzim üreten mikroorganizmaların üretimi için kullanılır. SSF'de kullanılan substratların bazıları buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır kepeği, buğday samanı, pirinç samanı, pirinç kabuğu, talaş, muz atıkları, çay atıkları, cassava (*Manihot esculenta*) kökünden nişasta elde edilmesi sırasında meydana gelen atıklar, palmiye yağı fabrikası atıkları, buğday unu, mısır unu, nişasta vb. (Pandey vd., 1999).

Filamentli funguslar; fizyolojik, enzimolojik ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı SSF' ye en iyi şekilde adapte olmuş mikroorganizmalardır. Fungal büyümenin hifli şekli filamentli funguslara katı substratın içine işlemesi için güç verir. Bu durum fungusları, mevcut besinlerin kullanımı için tek hücreli mikroorganizmalara karşı avantajlı olmalarını sağlamaktadır. Bakteri ve mayalarda SSF tekniği ile ticari üretim için kullanılmaktadır. Bu teknik kullanılarak bakteriler enzim üretiminde, mayalar ise etanol üretiminde kullanılmaktadırlar (Perez-Guerra vd., 2003).

SSF sisteminde, nem içeriği önemli faktördür. Düşük nem içeriği fungusların sporla üremesini arttırmaktadır. Fakat yüksek nem düzeyi substratların porlu yapısında bir gerilemeye neden olup sistemdeki oksijen transferini azaltmaktadır. Funguslar azalan oksijenden dolayı yeterli düzeyde büyüyemediğinden, SSF sisteminde besin için rekabet yarışında geriye düşeceklerdir. Bu durumda da sistemin bakteriyal kontaminasyon riski artacaktır (Raimbault, 1998).

Biyoteknolojik uygulamalarda SSF sistemleri iki şekilde tasarlanmışlardır:

1-Statik reaktördeki fermentasyonlar

2-Ara sıra veya sürekli havalandırılan fermentasyonlar

İkinci fermentasyon tipinde aflatoksin ve enzimlerin üretimi gerçekleşmektedir.

Ayrıca SSF kullanılan mikroorganizmalara göre 2 çeşide ayrılmaktadır:

1-Doğal SSF; doğal mikrofloranın kullanıldığı SSF sürecidir.

2-Saf kültür SSF; mikroorganizmaların saf kültürleri ya tek veya kombine olarak kullanılır (Nigam ve Singh, 1994).

SSF'de uygun substrat seçimi, nem içeriği, aşı konsantrasyonu, nemlendirici olarak kullanılan tamponların pH'sı maksimum ürün eldesi için optimize edilmesi gereken önemli faktörlerdir.

Bacillus megatarium 16M (Ramesh ve Lonsane, 1987), *Bacillus licheniformis* M 27 (Ramesh ve Lonsane, 1989), *Aspergillus oryzae* (Francis vd., 2002), *Bacillus subtilus* (Baysal vd., 2003), *Bacillus sp*. PS-7 (Sodhi vd., 2005), *Bacillus cereus* MTCC 1305 (Anto vd., 2006), *Penicillium chyrsogenum* (Ertan vd.(a), 2006), *Penicillium griseofulvum'*dan (Ertan vd.(b), 2006) tarımsal yan ürünler kullanılarak SSF sisteminde α-amilaz üretimi çalışılmıştır.

SSF ve SmF arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda SSF tekniği ile daha yüksek ürün elde edildiği farklı araştırıcılar tarafından belirtilmiştir.

Pycnoporus sanguineus'un sentezlediği α-amilazın SSF kültürlerinde SmF kültürlerine göre 4 kat fazla olduğu, *Aspergillus kawachi* IFO 4308'in SSF'de SmF sisteminden daha fazla α-amilaz ürettiği belirtilmiştir (Pandey vd., 1999).

SSF tekniği ile *Melanocarpus albomyces* II S–68' den ksilanaz (Jain, 1995), *Klyveromyces lactis*' den β-galaktozidaz (Becerra ve Gonzales Siso, 1996) üretiminin SmF tekniğine göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Dey ve Agarwal (1999) SSF' de üretilen *Streptomyces megasporus*' un sentezlediği sıcaklıkta kararlı α-amilazın SmF kültürlerine göre 3-4 kat, Beg vd., (2000) *Streptomyces sp.* QG–11–3 ün sentezlediği sıcaklıkta kararlı ksilanazın 2.5 kat Krishna(1999) *Bacillus subtilis* ürettiği selülazın 12 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

SSF'nin bazı ekonomik uygulamaları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir;

Tablo 2.1. SSF' nin uygulama alanları (Pandey vd., 1999)

Ekonomik Sektör	Uygulama	Örnek
Tarımsal Yiyecek Endüstrisi	Ticari yiyecek fermentasyonları	Koji, fermente peynirler
	Yiyecek katkı Maddeleri	Tatlandırıcılar, organik asitler
Tarım	Bioinsektisitler	Trichoderma
	Bitki büyüme Hormonları	Gibberellinler
Endüstiyel Fermentasyon	Enzimler	Amilazlar, selülazlar, proteazlar, pektinazlar, ksilinazlar
	Antibiyotikler	Penisilin, probiyotikler
	Organik asit üretimi	Sitrik asit, fumarik asit, laktik asit
	Fungal metabolitler	Hormonlar

SSF'nin SmF'ye olan üstünlükleri kısaca şunlardır: (Perez-Guerra vd., 2003)

1. SSF ile SmF arasındaki çalışmalar karşılaştırıldığında SSF daha fazla verime sahiptir.
2. SSF'de bakteri ve maya kontaminasyonu daha azdır.
3. SSF'de kullanılan mikroorganizmaların ana grubunu oluşturan funguslar için doğal habitatlarına benzer çevresel koşullar oluşmaktadır.
4. Kültür ortamı genellikle SmF'ye göre çok basittir. Suda çözülmeyen katı substrat, genellikle mikroorganizmanın büyümesi için gerekli besini sağlar.

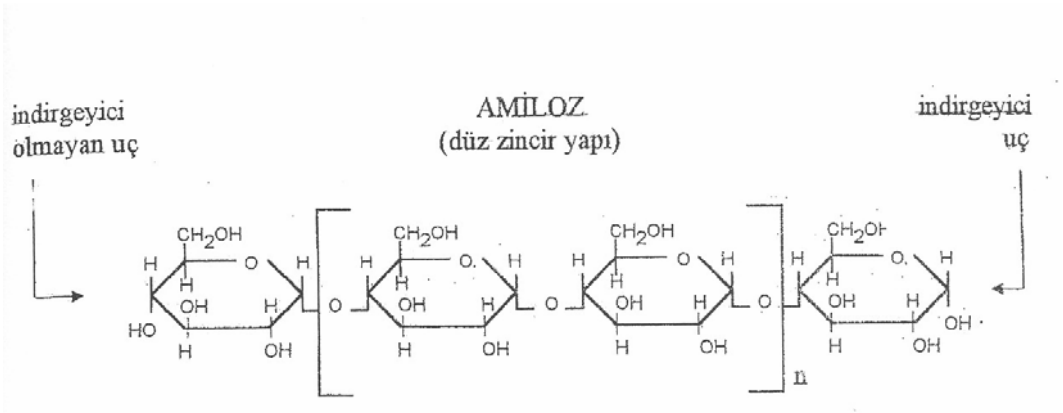
5. Kullanılan düzenekler ekonomik açıdan çok ucuzdur.
6. Atık su çok az olduğundan daha az çevre kirliliğine yol açmaktadır.
7. Geri besleme baskılanması SmF'ye göre daha düşük ya da hiç yoktur.

2.2. Nişasta

Nişasta güneş enerjisi sayesinde bitkiler tarafından fotosentez ile elde edilen temel karbonhidrattır. Soğuk suda çözünmeyen nişasta granülleri bütün tahıl tanelerinin başlıca öğesidir. Yüksek bitkilerde tümüyle α-D-glukozdan oluşan depo maddesidir ve pek çok organizma için özellikle de insanlar için zorunlu enerji kaynağını oluşturur. Besinsel olarak nişasta bütün insan popülasyonlarında beslenmenin başlıca öğesidir (Maldonado ve Lopez, 1995).

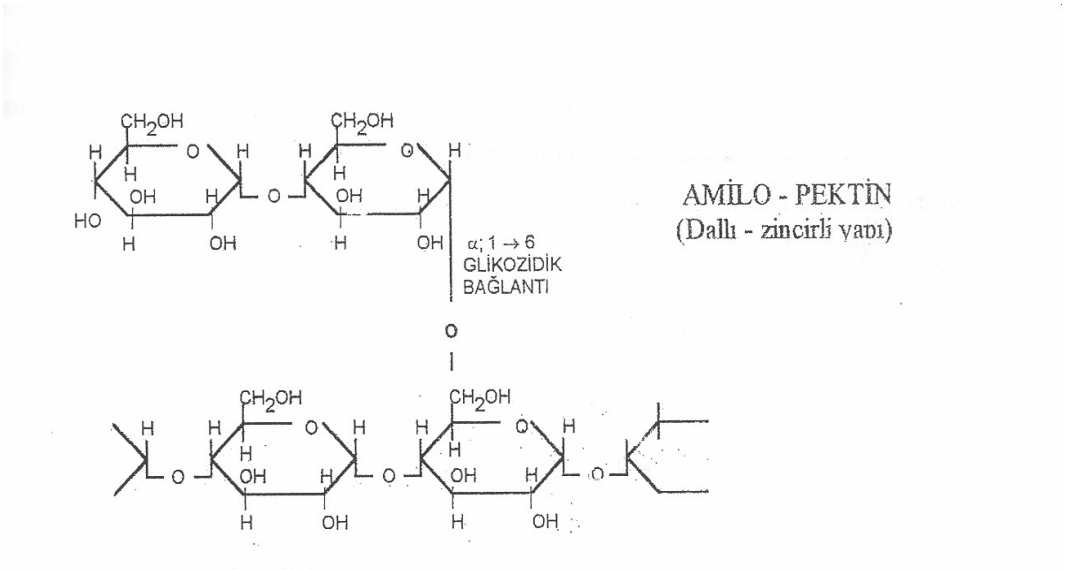
Nişasta α-1,4 ve α-1,6 glikozidik bağları ile birleşen α-glukoz birimlerinden oluşmuştur. İki yüksek molekül ağırlıklı bileşik içerir; amiloz (% 15-25) ve amilopektin (% 75-85). Amiloz glukopiranoz birimlerinin α-1,4 bağlanması ile oluşan doğrusal polimer, amilopektin ise dallanma noktasında α-1,6 glikozidik bağlarını içeren dallanmış polimerdir (Antranikian, 1992; Rüdiger vd., 1994).

Amiloz sıcak suda çözünür ve iyod ile mavi bir renk verir. İndirgen olmayan bir karbonhidrattır (Menevşe ve Menevşe, 1982), 100-700 glukoz birimi içerir. Glukoz birimlerinin oluşturduğu zincir helezon şeklinde kıvrılmış olup her kıvrım 4-6 glukoz birimi içerir (Bailey ve Ollis, 1977).



Şekil 2.1. Amilozun kimyasal yapısı (Ası, 1996)

Amilopektin, her 24 ya da 30 glukoz ünitesinde bir dallanma gösterir (Lehninger, 1982). Zincir ve bundan çıkan yan zincirleri de amilozdaki gibi helezonlaşmıştır (Yenson, 1981). Amilopektin 500-2000 ya da daha fazla glukoz üniteleri içerir. Dallı yapılar 15 glukoz ünitesinden yapılmıştır. Bu molekül suda basınç altında ısıtıldığı zaman çözünür. Molekül ağırlığı 300.000' den birkaç milyona kadardır. Amilopektin oda sıcaklığında bırakıldığında kararlı bir eriyik meydana getirir (Çağatay, 1976). Amilopektin sıcak suda çözünmez ve iyod ile kırmızı renk verir (Menevşe ve Menevşe, 1982).



Şekil 2.2. Amilopektinin kimyasal şekli (Kalaycıoğlu vd., 2000)

Amilozdaki mavi renk, glukoz birimlerinden oluşan helezon kıvrımları boşluklarına iyotun yerleşmesi ile meydana gelir ve spektrofotometrede şiddetli ışık absorbsiyonuna neden olur (Yenson, 1981). Amiloz nişasta tanesinin iç kısmında bulunur ve nişasta türünün % 15-20' sini, amilopektin ise nişasta tanesinin dış kısmında bulunur ve nişasta türünün % 75-80' ini oluşturur (Swinkels, 1985).

Bütün nişasta ürünlerinin yarısından daha fazlası ya prejelatinize veya kimyasal modifiye form şeklinde yiyecek üretimi ve besin ürünlerinde yer alır. Bununla birlikte modifiye nişastalar; kağıt, tekstil, sabun, çamaşır, kozmetik ve farmakoloji endüstrisinde ateşten etkilenmeyen malzeme yapımında, patlayıcı ve

yakıt bağlayıcı ajan olarak ve inşaat endüstrisinde kullanılır. Bu endüstriler özellikle kağıt ve tahta endüstrisi modifiye nişasta gibi işlenmemiş nişastanın çok yüksek miktarını tüketir (Maldonado ve Lopez, 1995).

Mısır, patates, buğday ve pirinç nişastanın elde edildiği genel kaynaklardır. Mısır nişastası granülleri orta büyüklüktedir, yuvarlak veya poligonal şekillidir. Yıllık dünya mısırının sadece % 5' i mısır nişastası üretimi için kullanılmaktadır. Üretilen mısır nişastasının % 70' i mısır şurubu, yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu ve dekstroz haline dönüştürülür.

Patates nişastası granülleri hilumda asentrik olarak yer alan istiridye kabuğu çizgilerine benzer olarak oval şekillidir. Patates nişastası, herhangi bir ticari nişasta granülünden daha büyük granüle sahiptir ve bu patates nişastasının ürünleri yiyecek, kağıt, tekstil ve yapıştırıcı endüstrisinde kullanılır.

Dünyada üretilen buğdayın sadece % 0.4' ü nişasta ve glutene dönüştürülür. Buğdaydaki nişasta prensip olarak endospermin karbonhidrat öğesidir, iki populasyonu temsil eder; küçük küresel granüller ve büyük merceğe benzer granüller.

Pirinç nişastası bütün ticari nişastaların en küçük granüllerine sahip olan çeşididir. Granüller küresel kümeler şeklinde amiloplast içinde agregat yaparlar ve her bir amiloplast 20 ila 60 küçük polihedral granül içerir. Pirinç nişastası kozmetik pudra tozu, puding ve dondurma yoğunlaştırıcısı olarak kullanılır (Maldonado ve Lopez, 1995).

Endüstride nişasta hidrolizinde kullanılan 5 grup enzim vardır;

1. Endo-amilazlar (iç etkili)
2. Ekzo-amilazlar (dış etkili)
3. Dallanmayı kırıcı enzimler
4. İzomerazlar
5. Siklodekstrin glikotransferazlar

İç etkili amilaz α- amilaz (1,4-α-D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) olup; amiloz, amilopektin ve ilgili polisakkaritlerdeki α-1,4 glikozidik bağları kırar fakat amilopektindeki α-1,6 bağlarını kırmaz. Hidroliz ürünleri çeşitli zincir uzunluğundaki oligosakkaritlerdir.

Dış etkili amilazlar glukoamilaz (α-1,4; 1,6-glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.3) ve β-amilaz (1,4-α-glucanmaltohydrolase; EC 3.2.1.2) dır. İç etkili amilazlar gibi aynı substratlar üzerine etki ederler fakat etki tarzları farklıdır. Bu enzimlerin bazısı α- 1,6 zincirlerini ayırma yeteneğindedir fakat reaksiyon hızı α-1,4 bağlarının ki ile karşılaştırıldığında düşüktür. Dış etkili amilazlar indirgenmeyen uçtan substrat bağları üzerine dıştan etki ederler ve düşük moleküler ağırlıklı glukoz ve maltozu üretirler.

Dallanmayı kırıcı enzimler iki tanedir; Pullulanaz (EC 3.2.1.41) ve izoamilaz (EC 3.2.1.68). Pullulanaz, pullulandaki α- 1,6 zincirleri üzerine spesifik etkiye sahiptir. Endüstride glukoamilaz α- veya β-amilaz ile kombine edilerek kullanılır. İzoamilaz amilopektinde yer alan α-1,6 glukozidik bağlarını hidrolizler, endüstride glukoamilaz ile kombine edilerek kullanılır.

Yiyecek endüstrisinde immobilize enzimlerin en önemlisi glukoz izomeraz (EC 5.3.1.5) lardır. Bu enzim sayesinde glukoz, fruktoza dönüştürülür.

Siklodekstrin glukoziltransferaz (EC 2.4.1.19) nişastadan hidroliz ürünü olarak siklodekstrinleri üretir. Siklodekstrinler altı, yedi veya sekiz D-glikopiranozil rezidülerini içeren indirgenmeyen siklomaltooligosakkaritlerdir (Maldonado ve Lopez, 1995).

2.3. α-Amilaz

α-amilaz (1,4-α-D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) nişastadaki α-1,4 bağlarını hidrolizler. Nişastayı hidroliz etme derecesine göre değişen iki kategori içinde sınıflandırılır. Sıvılaştırıcı α- amilazlar nişastanın % 30 ile % 40' ını; şekerleştirici α-amilazlar nişastanın % 50 ile 60' ını hidroliz eder (Vihinen ve Mantsala, 1989).

α- amilaz enziminin hidrolizi ile serbest bırakılan hemiasetal grupları α-optik konformasyona sahip olduklarından bu enzimlere yaygın olarak α- amilaz denilmektedir (Windish ve Mhatre, 1965).

α-amilaz ekmek yapımı, glukoz ve/veya fruktoz şurup üretiminde, nişasta, tekstil, kağıt endüstrisi gibi alanlarda geniş çapta kullanılır (Upadek ve Kottwitz, 1997).

α-amilaz iç etkili bir enzimdir. Rastgele biçimde nişasta polimerlerinin iç kısmındaki zincirleri hidrolizler; dallanmış ve doğrusal oligosakkaritlerin oluşumuna yol açar (Crabb ve Mitchinson, 1997).

Nişastayı işlemede kullanılan jeletinizasyon ve sıvılaşma basamakları olmaksızın ham nişastayı hidroliz eden α-amilazlar farklı fungal (Michelena ve Castillo, 1984; Okolo vd., 2000), ve bakteriyal (Lin vd., 1998; Demirkan vd., 2005) türlerden elde edilmiştir.

Ham nişastayı hidrolizleyen α-amilazların ham nişastayı adsorblama yeteneğine sahip olduğu farklı araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir (Lin vd., 1998; Goyal vd., 2005). Ham nişasta hidrolizi ile ham nişastaya tutunması arasında doğru orantı vardır ama enzimin nişasta granüllerine tutunma mekanizması hala tam olarak belli değildir. Bazı araştırıcılar muhtemelen bunun enzimin sahip olduğu C-terminal bağlayıcı domeyn sayesinde olabileceğini açıklamışlardır (Sarıkaya vd., 2000).

Nişasta granüllerinin enzimatik hidrolizi iki tiptir; birincisi nişasta granülünün yüzeyinden merkezine doğru olan sentripetal hidroliz, ikincisi ise nişasta granülünün dış yüzeyinde etki gösteren sentrifugal hidrolizidir (Sarıkaya vd., 2000).

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen, ham nişastayı direk hidroliz edebilen α-amilazların pH, sıcaklık, molekül ağırlığı, termostabilitesi ve diğer fiziko kimyasal parametreleri farklılık ve benzerlik göstermektedir.

Bacillus sp. I-3' den elde edilen ham nişastayı hidroliz eden α-amilazın pH 7.0' de ve 70 ^{o}C' de maksimum aktivite gösterdiği (Goyal vd.,2005), *Strepromyces sp.* No. 4 tarafından sentezlenen amilaz I' in 50 ^{o}C ve pH 5.5' te, amilaz II' nin 45 ^{o}C ve pH 5.5' te maksimum akivite gösterdiği (Primarini vd., 2000) rapor edilmiştir. Termofilik *Bacillus*'un sentezlediği amilaz I ve II' nin moleküler ağırlıkları 76 ve 53 kDa olarak hesaplanmış her iki enzimin aktivite için optimum sıcaklığı 75-80 ^{o}C, optimum pH' sının 5.5 olduğu bulunmuştur. Hg^{+2}, Cu^{+2} ve Fe^{+3} metallerinin varlığında aktivitenin inhibe olduğu, Zn^{+2} varlığında ise inhibisyonun gözlemlenmediği belirtilmiştir (Mamo ve Gessesse 1999). *Bacillus sp*. IMD 434' ün sentezlediği α-amilazın pH 6.0 ve 65 ^{o}C' de maksimum aktivite gösterdiği moleküler ağırlığının 69200 olduğu (Hamilton vd., 1998), *Bacillus sp*. TS-23' ün ham nişastayı sindiren α-amilazı için moleküler ağırlık 42 kDa olarak hesaplanmış, optimal pH ve sıcaklığın 9.0 ve 70 ^{o}C olduğu, 5 mM Ca^{+2} varlığında enzimin termoaktivitesinin arttığı Hg^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Cu^{+2} varlığında enzimin inhibe olduğu rapor edilmiştir (Lin vd., 1998).

Aspergillus foetidus (Michelena ve Castillo, 1984) ve *Aspergillus niger* AM07 (Omemu vd., 2005) funguslarının sentezlediği ham nişastayı direk hidrolizleyebilen α-amilazların maksimum aktivite için optimum pH ve sıcaklıkları sırası ile 5.0 ve 4.0; 45 ve 60 ^{o}C' dir.

2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elekroforez terimi, bir elektrik alanının etkisi altında yüklü bir partikülün göç etmesi olarak tanımlanabilir. Aminoasitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi önemli biyolojik moleküller iyonize olan gruplar içermektedirler. Böylece herhengi bir pH'da elektrikçe yüklü katyonlar (+) veya anyonlar (-) olarak olarak bulunurlar. Bir elektrik alan etkisi ile bu yüklü partiküller net yüklerine bağımlı olarak katoda veya anoda doğru göç ederler. Elektriksel alanda göç hızları veya mobiliteleri; alanın şiddetine, moleküllerin net yüküne büyüklüğüne, şekillerine, viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır. Elektroforezde, örnek bir destek matriksi üzerinde göç eder. Bu matriks, kağıt, selüloz, aselat, nişasta, jel, agaroz veya poliakrilamid jeli olabilir (Zihnioğlu,1996).

Elektroforezde, örnek moleküller, agaroz ya da poliakrilamid bir jel üzerine uygulanır. Jel burada durgun fazdır. Hareketli faz olarak elektrik akımı kullanılır. Tampon çözeltiler ise elektrolit vazifesi görür. Elektroforezde, bazik pH'da çalışılarak, moleküllerin (-) olması sağlanır. Moleküller pozitif kutba doğru göç ederler. Göç sırasında jel, gözenekli yapısı ile süzgeç gibi çalışır ve ayrışmayı sağlar. Moleküllerin jelden çıkmasını önlemek için küçük molekül ağırlığına sahip (-) yüklü boya (brom fenol mavisi) kullanılır. Boya en önde gider ve jel sonuna gelince işlem bitirilir. Daha sonra protein bantları özgül bir şekilde boyanarak görünür hale getirilir.

Elektroforezde büyük ve asimetrik moleküller yavaş, küçük moleküller ise, hızlı hareket ederler. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) protein ve 1 akb'ın altındaki DNA fragmentlerinin ayrımında kullanılabilen, bir dizi elektroforez teknikleri içerir. Poliakrilamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı bisakrilamidin kopolimerizasyonu ile hızlanır. Akrilamid ve bis akrilamid yüzdeleri değiştirilerek, çeşitli por çaplarında jeller hazırlanabilir. Protein ayrıştırılmasında kullanılan standart akrilamid % 7.5'tir. Bu derişim 10.000-300.000 Da molekül

ağırlığındaki proteinlerin ayrımında kullanılabilir. Jel yüzdesi arttıkça, por çapı küçülür. DNA fragmentlerinin ayrıştırılmasında, 60-400 nükleotid içeren DNA'lar için % 8' lik, 40-200 nükleotid içeren DNA'lar için % 12' lik, 10-100 nükleotid içeren DNA'lar için % 20'lik akrilamid jeller kullanılır.Yüksek molekül ağırlıklı (>5.000.000) makromoleküller için agaroz/poliakrilamid karışımları yada saf agaroz jeller kullanılır.

Proteinler, sodyum dodesilsülfat (SDS) ve bir tiol reaktifi (2-merkaptoetanol ya da dithiothreitol=DDT) içeren ortamda ısıtılarak denatüre edildiklerinde, yaklaşık her iki aminoasit bakiyesi için bir molekül SDS bağlar. Bağlanan SDS, proteinin negatif elektrik yüklenmesine neden olur. Bu durumda proteinler, yalnız molekül ağırlığına göre jelde hareket ederler. Molekül ağırlıkları bilinen standartlardan, molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı bulunur. Proteinin birden fazla alt birimi varsa, değişik molekül ağırlıklı her bir alt birim içinde ayrı bir bant gözlenir.

Sonuç olarak elektroforezde; protein ve DNA gözle görülür. Proteinler ve DNA parçaları büyüklük ve biçimlerine göre birbirinden ayrılır. Proteinin bazı özellikleri örneğin izoelektrik noktası, molekül ağırlığı, DNA'nın molekül ağırlığı ve biçimi saptanabilir (Hames ve Rickwood,1990).

2.5. *Penicillium brevicompactum*

CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar)'da 25 ^{o}C'de 7 günde; koloniler 20-30 mm çapında, ışınsal olarak yarılmış, bazen merkezde yükselmiş, orta derecede derin, yoğun tekstürlü, yüzey tekstürü tipik olarak kadifemsi, bazen yünsü; merkez beyaz, orta derecede derin-derin, dar; miselyum beyaz; konidyogenez hafif-orta derecede, yaygın olarak Dull Green veya Pistachio Green-Glaucous Blue Green fakat bazen daha açık renklerde (özellikle merkeze yakın yerlerde); eksuda genelde var, sıklıkla birkaç damla halinde ve koloni derinlerine gömülmüş fakat bazen bol olarak bulunur, rengi açık-yoğun kırmızımsı kahverengi; çözünür pigment genelde üretilir, bulunduğunda rengi kırmızımsı kahverengi; koloninin tersten görünüşü bazen açık renkte fakat daha çoğunlukla sarımsı-kırmızımsı kahverengi renklerdedir.

MEA (Malt Extracte Agar)'da 25 ^{o}C'de 7 günde; koloniler 12-20 mm çapında, nadiren daha fazla çaplı, düz veya daha az yaygın olarak yarılmış, derinliği az veya orta, yüzey yapısı kadifemsi veya ara sıra yünsü; merkez çok dar, sıklıkla düzensiz; miselyum genelde belirsiz, beyaz; konidyogenez orta-yoğun, Dull Green-Dark Green, arasıra daha açık veya daha mavimsi; eksuda bazen mevcut, bulunduğunda açık kırmızımsı kahverengi,; çözünür pigment yok; kolonini tersten görünüşü açık veya kahverengi renklerde.

G25N (%25 Glukoz Nitrat Agar)' da 25 ^{o}C'de 7 günde; koloniler 16-22 mm çapında, bazı izolatlarda koloni çapı daha az; düz veya ışınsal olarak yarılmış, yoğun penicili tarafından yüzeyin kaplandığı beyaz, yoğun bir miselyum tabakası oluşabilir, konidyogenez hafif-yoğun, Dull Green veya Pistachio Green ve Glaucous Blue Green arasında renklerde, ara sıra daha grimsi; belirgin eksuda var ve kırmızı kahverengi çözünür pigment bazen üretilir; kolonini tersten görünüşü açık, sarı veya kırmızımsı kahverengi renklerde.

CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar)'da 5 ^{o}C'de 7 günde; en azından mikrokoloni oluşumu mevcut, bazen 4mm çapına kadar olabilen makroskobik koloniler üretilir.

CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar)'da 25 ^{o}C'de 7 günde; büyüme yok.

Mikroskobik özellikler: Konidioforlar miselyum yüzeyinden doğar, stipe genellikle uzun ve geniş, 500-800 x 4.0-6.0 µ, düz duvarlı, karakteristik olarak kompakt olarak doğan büyük tervertisillat penicilli mevcut (genelde kuatervertisillat ve bivertisillat penicillalar da oluşur), genellikle 40 µ dan daha az uzunlukta ve 40-50 µ genişliktedir. Bazı izolatlarda düzensiz vertisillat penicillalar baskın olarak bulunur. Konidiler yaygın olarak elipsoidal, 2.5-3.5 x 2.0-2.5 µ ölçülerinde fakat izolattan izolata değişkenlik gösterebilir. Konidi duvarı düz veya çok hafif pürüzlüdür.

Dağılım: *Penicillium brevicompactum* yeryüzünde birçok bölgedeki toprak ve çürümüş vejetasyon habitatlarında çok bol olarak bulunan bir türdür. Bu tür sıklıkla gıdalardan, hububat ürünlerinden, tekstil ürünlerinden, boyalardan ve diğer kaynaklardan da izole edilmektedir (Pıtt J.I., 1979).

3. MATERYAL METOD

3.1. Amilaz aktiviteli mikroorganizmaların taranması

T.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Biriminin küf koleksiyonunda yer alan 63 adet saf fungus kültürü (Aydogdu, 2006) amilaz enzimi sentezlemeleri yönünden tarandı.

3.2. Kullanılan tarama ortamı

Amilaz enziminin varlığını gözlemlemek için % 2.0'lik ham pirinç nişastası içeren Czapek-Dox sıvı (CDS) temel besi ortamı, % 2.5 oranında agarın eklenmesi ile katılaştırılarak kullanıldı. Besiyerinin pH'sı 1 N HCL veya 1 N NaOH çözeltileri ile 5.5'e ayarlandıktan sonra 121 ^{o}C'de 15 dk. süreyle otoklavda steril edildi. Ham pirinç nişastası 140 ^{o}C'de ayrı olarak 1 saat süreyle otoklavda steril edildi. Otoklavda steril edilmiş besiyerine soğuduktan sonra ham pirinç nişastası steril şartlarda ilave edilerek homojen olarak besiyerinin karışması sağlandı. Bu çalışmada kullanılan Czapek-Dox Agar ortamının içeriği aşağıdaki gibidir:

Ham pirinç nişastası	20 gr
$NaNO_3$	1 gr
K_2HPO_4	1 gr
$MgSO_47H_2O$	0.5 gr
$FeSO_4$	0.01 gr
Distile su	1000 mL
Agar	25 gr

3.3. Tarama ortamına ekim ve üretim

Czapek-Dox + % 2.0'lik ham pirinç nişastasından oluşan katı besiyerini içeren petri plaklarına Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinden 3 nokta ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan petri plakları 30 ^{o}C' lik etüvde üretime bırakıldı.

3.4. Ekstraselüler amilaz sentezleyen mikroorganizmaların belirlenmesi

Mikroorganizmaların ortamdaki ham pirinç nişastasını parçalayıp parçalamadığını gözlemlemek amacı ile üretimin 7. gününde % 1.0'lik iyot çözeltisi ile kültür ortamları boyandı. En büyük koloni çapı/zon çapına sahip mikroorganizmalar daha sonraki çalışmalarda en iyi amilaz sentezleyen fungusu bulmak için test edildi.

3.5. Mikroorganizmaların üretimi ve saklanması

Stok fungus kültürleri ayda bir PDA besiyerlerine pasaj edildi. Ekim için bir haftalık fungus kültürleri kullanıldı. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere fungus kültürleri +4 ^{o}C' de saklandı.

3.6. SSF kültür ortamın hazırlanması

Substrat olarak kullanılan buğday kepeği 80 ^{o}C' de 24 saat kurutulduktan sonra 250 mL' lik Erlen mayerlere 5 gr olacak şekilde konuldu. Besiyerinin nem içeriği distile su ile ayarlandı. Hazırlanan üreme ortamı 121 ^{o}C' de 20 dk. otoklavda steril edildi.

3.7. SSF kültür ortamına ekim, üretim ve amilaz eldesi

Bir haftalık PDA besiyerlerinin her birine 7 mL steril distile su eklenerek spor süspansiyonu hazırlandı. Spor süspansiyonları mililitrede 1×10^6 spor içerecek şekilde ayarlandı. Hazırlanan spor süspansiyonu ile SSF ortamına ekim yapılarak 30 ^oC' de 7 gün üretime bırakıldı. Üretim süresinin sonunda besiyerlerine 50 mL distile su konarak 200 rpm'lik çalkalamalı etüvde 1 saat çalkalandı. İşlemin sonunda ekstrakt sırası ile steril gazlı bezden ve Whatman No:1 kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.8. Amilaz aktivitesinin ölçülmesi

Amilaz aktivitesi, ham nişastanın enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan redüktör şekerlerin dinitrosalisilik asit (DNS) ile belirlenmesi sonucu ölçüldü (Miller, 1959). Enzim aktivitesini belirlemek için kör, kontrol ve örnek tüpleri hazırlandı.

Kör tüpü; 1mL tampon + 1mL DNS
Kontrol tüpü; 0.5mL enzim + 1.0 mL tampon
Örnek tüpü; 0.5mL enzim + 1.0 mL substrat

Örnek tüplerine; 1ml %1'lik 0.1 M, pH 5.0 olan Asetat tamponunda süspanse edilmiş ham pirinç nişastasından, 0.5 mL'de kaba enzimden konuldu. Örnek tüpleri 40 ^oC'de 30 dk. çalkalamalı su banyosunda inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için 5 dk. kaynar suda bekletildi. Daha sonra tüpler 3000 dev./dk. 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki süpernatanttan 1mL alındı ve 1mL DNS içeren tüplere konuldu. 5dk. kaynar suda bekletildi. Üzerlerine 8 mL distile su konuldu. Örnek ve Kontrol tüplerinin OD değerleri 550 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometre de (Cecil 5000 Series UV/VİS spectrophotometer) kör tüpüne karşı okundu. Kontrol tüpünün absorbans değeri örnek tüplerinin absorbans değerlerinden çıkartıldı. Böylece enzim tarafından açığa çıkarılan redüktör şekerlerin OD değerleri belirlenmiş oldu. Daha önceden 550 nm dalga

boyunda DNS ile çıkarılmış olan glukoz standart grafiğinden yararlanılarak enzim aktivitesi ünite/mL olarak hesaplandı. Ham nişastayı hidroliz eden amilazın bir ünitesi standart deney koşullarında dakikada 1 μmol redüktör şekeri (glukoz) açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.9. Amilaz enziminin etki tarzının belirlenmesi

Amilazın etki tarzını incelemek için Abou-Zeid (1997) tarafından açıklanan iyot boyama testi kullanılmıştır. Amilaz aktivitesini ölçmek için kör, kontrol ve örnek tüpleri hazırlandı. Kör tüpü spektrofotometreyi sıfırlamak için kullanıldı. Kontrol tüpü, başlangıçtaki nişastanın miktarını 620 nm'de (Wilson vd., 1982) optik dansite cinsinden belirlemek amacı ile hazırlandı. Örnek tüpü ise enzimin aktivite gösterdiği tüptür. Substrat çözeltisi olarak %1'lik çözünür nişasta, 0.1 M KH_2PO_4 NaOH tamponunda (pH 5.0) kaynatılarak hazırlandı.

Kör tüpünün içeriği;

0.2 mL tampon, 0.1 mL enzim, 5 mL taze iyot çözeltisi

Kontrol tüpünün içeriği;

0.2 mL substrat çözeltisi, 5 dk. 40 ^{o}C'de inkübasyondan sonra 5 mL taze iyot çözeltisi ve 0.1 ml enzim

Örnek tüpünün içeriği;

0.2 mL substrat çözeltisi, 0.1 mL enzim, 5 dk. 40 ^{o}C'de inkübasyondan sonra 5 mL taze iyot çözeltisi

Taze iyot çözeltisinin içeriği;

% 5 KI içinde hazırlanmış % 0.5 I_2 stok çözeltisinden 1 mL alınarak 5N HCL'in 5 mL'sini içeren distile suyun 50 mL'sine eklenilmesi ile hazırlandı.

Hazırlanan tüm tüplerin absorbans değerleri, 620nm. ile ayarlanmış spektrofotometrede (Cecil 5000 Series UV/VIS spectrophotometer) kör tüpüne karşı okundu. Kontrol tüplerinin verdiği OD değerinden örnek tüplerinin verdiği OD değerleri çıkartılarak fark OD yani enzim tarafından parçalanan nişastanın OD değeri bulundu.

Bir ünite amilaz aktivitesi, dakikada 0.1 mg nişastayı 40 ^{o}C'de parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.10. Üretim koşullarının SSF'de üretilen *Penicillium brevicompactum* amilaz sentezi üzerine etkisi

SSF'de fungustan enzim üretiminde uygun substrat, başlangıç nem düzeyi, farklı pH'daki nemlendirme sıvıları, üretim süreleri, aşı konsantrasyonu ve üretim sıcaklığı optimize edilmesi gereken önemli parametrelerdir. Bizde çalışmalarımıza bu parametreleri optimize ederek başladık. Her bir parametreyi birbirinden bağımsız olarak test ettik. Optimize ettiğimiz parametreyi bir sonraki deneyde sabitledik.

3.10.1. Uygun substrat seçimi

Penicillium brevicompactum 'dan enzim üretiminde en uygun substratı belirlemek için SSF'de buğday kepeği, pirinç kabuğu, ayçiçek küspesi substrat olarak kullanıldı. Substratlar 80 ^{o}C' de 24 saat kurutuldu. 5 gr tartılarak 250 mL' lik Erlen Mayer'lere konuldu. Substratların nem düzeyleri distile su ile % 65'e ayarlandı. Besiyerleri otoklavda 121 ^{o}C'de 20 dk. steril edildi. 7 günlük yatık PDA besiyerlerine 7 mL distile su ilave edilerek hazırlanan spor süspansiyonundan 2.0 mL kültür ortamlarına aşı yapıldı. 30 ^{o}C'de 7 gün inkübasyondan sonra besiyerlerine 50 mL distile su konularak 200 rpm'de çalkalamalı etüvde 1 saat süreyle çalkalandı. Ortam steril gazlı bezden süzüldü ve Whatman no:1 kağıdı ile filtre edilerek partikül ve miseller uzaklaştırıldı. Elde edilen süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.10.2. Başlangıç nem düzeyinin etkisi

SSF kültürlerinin başlangıç nem düzeyleri distile su ile % 45, 55, 65, 75, 85, 95 (v/w) olarak ayarlandı. Substrat olarak buğday kepeği kullanıldı. Buğday kepeği 80 ^{o}C' de 24 saat kurutulduktan sonra 5 gr olacak şekilde tartılarak 250 mL' lik Erlen Mayerlere konuldu. Otoklavda 121 ^{o}C' de 20 dk. steril edildi. Besiyerlerine 2.0 mL ekim yapıldı. 7 gün 30 ^{o}C' de besiyerleri üretime bırakıldı.

3.10.3. Ortam pH' sının etkisi

Optimum pH' yı belirlemek için farklı pH'daki tamponlar; asetat tamponu (4.0, 5.0), fosfat tamponu (6.0, 7.0, 8.0) ve distile su (pH; 6.5) kullanıldı. Besiyerlerinin nem düzeyleri bu nemlendiriciler ile % 55 olarak ayarlandı. Besiyerleri otoklavda 121 ^{o}C' de 20 dk. steril edildi. Besiyerlerine 2.0 ml aşı yapılarak 30 ^{o}C' de 7 gün üretime bırakıldı.

3.10.4. Üretim süresi

Penicillium brevicompactum' un maksimum enzim sentezlediği üretim süresini bulmak için enzim aktivitesinin düşüş gösterdiği güne kadar 3. günden itibaren günlük enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Besiyerlerinin başlangıç nemi % 55 olarak ayarlandı. Nemlendirme sıvısı olarak asetat tamponu (0.1M; pH 5.0) kullanıldı. 2.0 mL aşı yapıldı. Besiyerleri 30 ^{o}C'de üretime bırakıldı.

3.10.5. Aşı konsantrasyonunun etkisi

Aşı konsantrasyonunu optimize etmek için 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 ml spor (1×10^{6}) süspansiyonları kullanıldı. Başlangıç nem düzeyi % 55, inkübasyon sıcaklığı 30 ^{o}C, üretim süresi 7 gün, nemlendirici olarak Asetat tamponu (0.1 M, pH 5.0) kullanıldı.

3.10.6. Üretim sıcaklığının etkisi

Üretim sıcaklığını optimize etmek için 30, 40, 50, 60 ^{o}C' lik sıcaklıklarda üretim gerçekleştirildi. Başlangıç nem miktarı % 55, üretim süresi 7 gün, nemlendirici sıvı olarak Asetat tamponu (0.1 M; pH 5.0) kullanıldı. Aşı konsantrasyonu 2.5 mL olarak uygulandı.

3.11. Amilaz enziminin farklı nişastalara tutunma yeteneğinin araştırılması

Amilaz enzimi farklı ham nişastalara tutunma yeteneğinin araştırılması için test edildi. 5 mL enzim, % 1' lik ham pirinç, buğday ve mısır nişastalarının 1 mL' si ile karıştırılıp +4 ^{o}C' de 30 dk. bekletildi. Süre sonunda süspansiyonlar +4 ^{o}C' de 11.000 rpm' de 10 dk. santrifüj edildi. Üstteki süpernatant' tan aktivite tayini yapıldı ve orijinal enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak aşağıdaki formülden tutunma oranı bulundu (Goyal vd., 2005).

$$\text{Tutunma oranı (\%)} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

A; Orijinal amilaz aktivitesi

B; Süpernatant' taki amilaz aktivitesi

3.12. Amilaz enziminin saflaştırılması

P. brevicompactum amilazının saflaştırılması tek basamakta Najafi ve Kembhavi (2005) tarafından uygulanan metodun küçük bir modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Enzim saflaştırma prosedürümüz aşağıdaki akış şemasında belirtilmiştir:

100 mL kaba enzim → protein ve aktivite tayini

+

% 2 ham pirinç nişastası

↓buz içinde 60 dk. karıştırılır.

10000 rpm de 4 ^{o}C 10 dk santrifüj

↓→ Süpernatant' ta aktivite ve protein tayini

Çökelek, 100 mL 0.1M asetat tamponu (pH 5.0) ile 5 dk. buz içinde yıkandıktan sonra 10000 rpm de 4 ^{o}C 10 dk santrifüj

↓→ Süpernatant'ta aktivite ve protein tayini

Çökelek, 40 ^{o}C' de beklemiş 50 mL 0.1 M asetat tamponu (pH 5.0) ile 1 saat karıştırılarak elüe edilir. 10000 rpm de 4 ^{o}C 10 dk. santrifüj

↓

Süpernatant'ta aktivite ve protein tayini

Enzim aktivite tayini bölüm 3.8.' de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerdeki protein miktarı Lowry yöntemi (1951) ile belirlenmiştir.

3.13. *Penicillium brevicompactum* amilaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

3.13.1. İnkübasyon sıcaklığının amilaz aktivitesine etkisi

Farklı inkübasyon sıcaklıklarının enzim aktivitesine etkisinin araştırılması için enzim substrat karışımı 30, 40, 50, 60 ^{o}C' lik su banyolarında 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon, pH 5.0 olan 0.05 M $CaCl_2$ içeren 0.1 M asetat tamponunda gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası enzim aktivitesi hesaplanarak sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi belirlendi.

3.13.2. İnkübasyon pH' nın amilaz aktivitesine etkisi

Penicillium brevicompactum amilazının optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için, substrat çözelti pH' ları 4.0, 5.0 (Asetat tamponu), 6.0, 7.0 (Fosfat tamponu) olan 0.05 M $CaCl_2$ içeren farklı tamponlarda hazırlandı. İnkübasyon 40 ^{o}C' de 30 dk. olarak gerçekleştirildi. Her bir örneğin enzim aktivitesi belirlenerek optimum pH değeri bulundu.

3.13.3. Amilaz enziminin termal kararlılığının araştırılması

Amilaz enziminin gittikçe artan farklı sıcaklık derecelerinde 45 dk. bekletildiğinde aktivitesini ne kadar koruyabileceği araştırıldı. Enzim 30, 40, 50, 60 ^{o}C' lik sıcaklıklarda 45 dk. substrat ilave edilmeksizin bekletildi. Süre sonunda 0.5 mL enzime 1 mL % 1' lik substrat eklenerek aktivitesi ölçüldü. İnkübasyon 40 ^{o}C ve pH 5.0 (0.05 M $CaCl_2$ içeren 0.1 M Asetat tamponu)'te 30 dk. olarak gerçekleştirildi.

3.13.4. Amilaz enziminin pH kararlılığının araştırılması

Çalışmanın bu bölümünde 0.5 mL tampon (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0) 0.5 mL enzim deney tüpüne konularak 40 ^{o}C' de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. pH 5.0

olan asetat tamponunda hazırlanmış % 2' lik ham pirinç nişastasından süre sonunda 0.5 mL ilave edildi. İnkübasyon 40 ^{o}C'de 30 dk. olarak gerçekleştirildikten sonra enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.13.5. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine Ca^{+2}, Mg^{+2}, Cu^{+2}, K, Fe^{+3}, Mn^{+2}, Na^{+} gibi bazı metal iyonları ve EDTA' nın etkisini araştırmak amacı ile farklı iki konsantrasyonda (5 mM ve 10 mM) hazırlanmış metal tuzları ve EDTA enzim örneği ile 10 dk. 40 ^{o}C'de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda ortama substrat ilave edildi. Enzim aktiviteleri ölçülerek bu ajanların hiçbirini içermeyen enzim örneğinin aktivite değeri ile karşılaştırıldı.

3.13.6. Amilaz enziminin kinetik özelliklerinin araştırılması

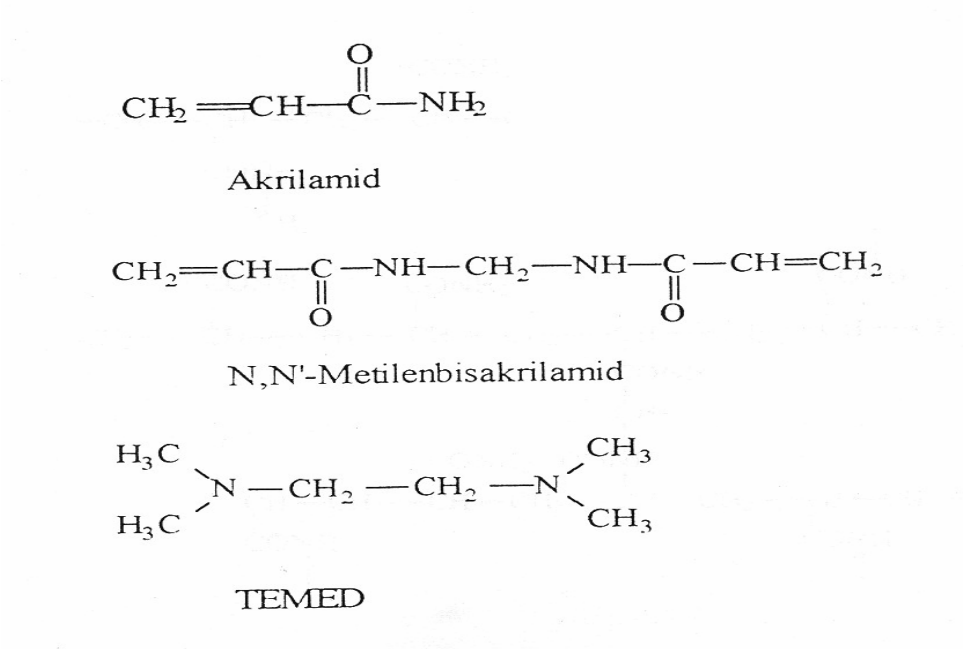
3.13.6.1. Amilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

Enzimin çözünür nişasta için K_m değerinin bulunması amacı ile artan konsantrasyonlarda substrat çözeltisi hazırlandı. Her bir konsantrasyon için enzim aktivitesi ölçüldü. 1/[S] ve 1/V değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak *Penicillium brevicompactum* amilazının çözünür nişasta için K_m ve V_{max} değerleri bulundu.

3.14. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

3.14.1. Jellerin hazırlanması

Polimer matriksi hazırlamak için kullanılan bileşikler, akrilamid, N,N'-metilenbis akrilamid jel monomerleri, N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) ise polimerizasyon başlatıcıları olarak kullanılmıştır. Formüller aşağıda verilmiştir.



Akrilamid

N,N'-Metilenbisakrilamid

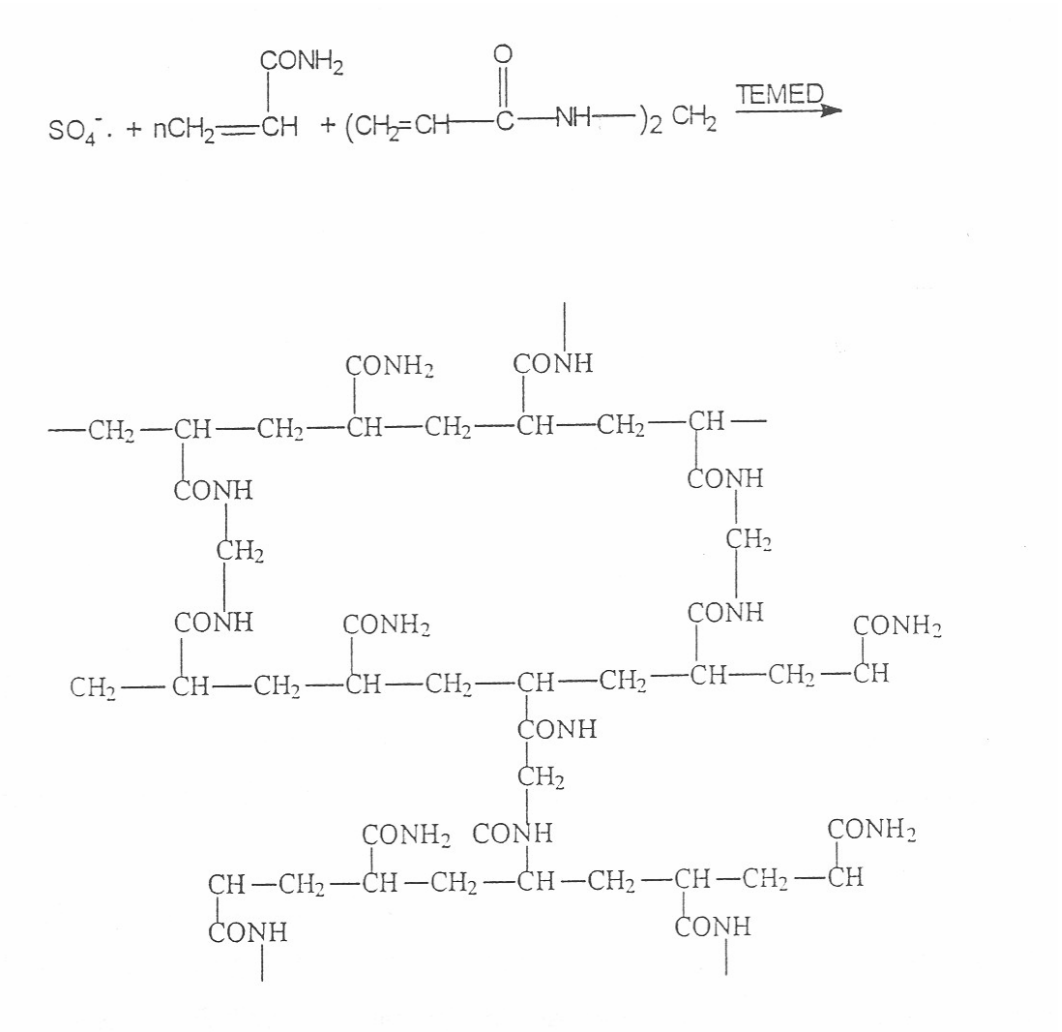
TEMED

APS, suda çözündüğü zaman serbest radikaller oluşturur.

$$S_2O_8^{-2} \rightarrow 2SO_4^{-}$$

Bu serbest radikaller akrilamid ile etkileştiğinde, akrilamid molekülü içinde serbest radikaller oluşturur. Radikallerin başlattığı zincir polimerizasyonu ile poliakrilamid polimer zinciri meydana getirir.

N,N' –Metilen-bisakrilamid molekülleri paralel poliakrilamid zincirleri arasında çapraz bağlanmalar ile gözenekli kopolimer jelini meydana getirir. Kopolimer jelin oluşumu şematik olarak aşağıda verilmiştir (Kılıç, 1996).



Çalışmanın amacına uygun olarak SE 600 dikey dilim jel elektroforezi hazırlandı. Cam plaklar arasına 1.5 mm' lik aralık bırakılarak, jelin dökülmesi için döküm ayağına monte edildi. Cam plakların alt yüzeyi sızıntı olmaması için yağlandı (yağ: Cello-Seal grease). Ayrıştırıcı jel için TEMED hariç tüm maddeler pipetlenerek % 10' luk ayrıştırıcı jel karışımı hazırlandı. Jel karışımı süzüldü ve havası alındı. TEMED eklendikten sonra hızla hava kabarcığı oluşturulmadan iki cam arasına yukarıdan 4 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Polimerleşmeye bırakıldıktan sonra, düzgün bir yüzey oluşturulması için üzerine suya doygun n-bütanol çözeltisi eklendi. Polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra suya doygun

n-bütanol çözeltisi jel yüzeyinden alındı ve jel yüzeyi birkaç kez deiyonize su ile yıkandı. Benzer şekilde sıkışrıcı jel hazırlandı ve ayrıştırıcı jelin üzerine döküldü. Tarak dikkatlice yerleştirildi ve jel polimerleşmeye bırakıldı. Jel polimerleştikten sonra, tarak dikkatlice çıkarıldı ve örnekler uygulanmadan önce kuyucuklar rezervuar tamponu ile yıkandı.

Kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanması:

Rezervuar Tamponu (0.025 M Tris, % 0.1 SDS, pH 8.3)

Tris	2.5 gr
Glisin	72 gr
SDS (%10)	50 mL
H_2O	5 lt ye tamamlandı

Ayrıştırıcı Jel Tamponu (pH 8.8)

3 M Tris-HCI; 9.075 gr Tris, 12 mL 1 M HCI ile karıştırılır. pH 8.8' e ayarlandıktan sonra, bidistile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Whatman No:1' den süzüldü.

Sıkıştırıcı Jel Tamponu (pH 6.8)

0.5 M Tris- HCI; 1,5 gr Tris, 10 ml bidistile su ile karıştırılarak, 1 M HCI ile pH'ı 6.8'e ayarlandı. Bidistile su ile 25 mL' ye tamanlandıktan sonra, Whatman No:1' den süzüldü.

Akrilamid- Bisakrilamid Stoğu (30/0.8)

9 gr akrilamid, 0.24 gr bisakrilamid tartıldı, bidistile su ile 30 mL' ye tamamlandı.

% 1.5 Amonyum Persülfat (APS)

0.045 gr APS tartılıp, bidistile su ile 3 mL' ye tamamlandı (taze olarak hazırlandı).

5xSDS-PAGE yükleme çözeltisi

% 20 SDS	2.5 mL
Sukroz	5 gr
1 M Tris	0.5 mL
0.1 M EDTA	0.5 mL
0.8 M β-Merkaptoetanol	5 mL
1 mg/ml Bromfenol mavisi	1 mL

Yukarıdaki maddeler karıştırıldıktan sonra karışımın pH' sı 8.0'e ayarlandı ve su ile 10 mL' ye tamamlandı.

% 10'luk Ayrıştırıcı Jel İçin Karışım (40 mL)

Akrilamid-bisakrilamid karışımı	13.3 mL
Ayrıştırıcı jel tamponu	5.0 mL
% 10 SDS	0.4 mL
% 1.5 APS	2.0 mL
TEMED	0.015 mL
H_2O	19.285 mL

Sıkıştırıcı Jel için Karışım (15 mL)

Akrilamid-bisakrilemid karışımı	1.875 mL
Sıkıştırıcı jel tamponu	3.750 mL
% 10 SDS	1.5 mL
%1.5 APS	0.75 mL
TEMED	0.01 mL
H_2O	8.475 mL

3.14.2. Örneklerin denatürasyonu ve yüklenmesi

SDS-PAGE için molekül ağırlığı standartı olarak miyozin, β-Galaktozidaz, fosforilaz, BSA (sığır serum albümin), ovalbümin (yumurta albümini), karbonik anhidraz içeren standart kit (Moleculer Weight Marker Kit Sigma) kullanıldı. 100 µl örnek, 30 µl 5x SDS-PAGE yükleme çözeltisinden eklendi. Örnekler 90 sn, standartlar ise 60 sn kaynar su banyosunda bekletilerek denatüre edildi ve soğumaya bırakıldı. Örnekler 20 µl olacal şekilde, kuyucuklara otomatik pipet ile uygulandı. Kuyucuk başına 3 mA sabit akım verilerek elektroforez (CBS SCIENTIFIC CO. California AG-250-02) başlatıldı. İşaret boya bandı jelden çıkmadan elektroforez işlemi durduruldu.

3.14.3. Jellerin boyanması ve boyanın alınması

Jel elektroforez kabininden çıkarıldıktan sonra boyama çözeltisi içine konuldu ve 48 saat süre ile boya içersinde bırakıldıktan sonra, boyama çözeltisinden çıkarılarak bidistile su ile yıkandı. Daha sonra boya çıkarma 1 çözeltisinden 3-4 saat süre ile karıştırıcı ile çalkalanarak bekletildi. Bu sürenin sonunda boya çıkarma çözeltisi II'ye alındı. Böylece jel yüzeyindeki boya tamamen uzaklaştığında sadece protein bantları boyalı kaldı.

Boyama çözeltisinin hazırlanışı (% 0.025 CBBR, % 40 Metanol, % 7 Asetik asit)
0.5 Coomassie brillant blue R-250, 800 ml metanol içinde çözülünceye kadar karıştırıldı. 140 ml asetik asit ilave edilip hacim, su ile 2 litreye tamamlandı.

Boya çıkarma çözeltisi I'in hazırlanışı (% 50 metanol, % 10 asetik asit)
500 ml metanol üzerine 100 ml asetik asit (glasial) ilave edildikten sonra toplam hacim su ile 1 litreye tamamlandı.

Boya çıkarma çözeltisi II'nin hazırlanışı (% 5 metanol, % 7 asetik asit)
100 ml metanol üzerine 140 ml asetik asit (glasial) ilave edildikten sonra toplam hacim su ile 2 litreye tamamlandı.

3.14.4. SDS-PAGE ile *Penicillium brevicompactum* amilazın molekül ağırlığının hesaplanması

SDS-PAGE sonucu elde edilen jel üzerinde işaret boyanın aldığı yol ve standart protein bantlarının yürüdüğü mesafe ölçülerek, Rf değerleri hesaplandı. Standart proteinlerin log MW değerlerine karşı, Rf değerleri grafiklendi. Bu grafik yardımı ile amilazın molekül ağırlığı hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraselüler amilaz sentezleyen mikroorganizmaların belirlenmesi

Karbon kaynağı olarak ham pirinç nişastası içeren petrilere ekilen funguslar ham nişastayı sindiren ekstraselüler amilaz sentezliyorsa ham nişasta parçalanacaktır. Besiyerlerine lugol döküldüğünde de koloniler etrafında şeffaf zon oluşacaktır. Bu prensip çerçevesinde 68 tane fungusun şeffaf zon oluşturup oluşturmadığına bakıldı ve en büyük şeffaf zon oluşturan *Penicillium brevicompactum* SSF kültürlerinde üretime alındı.

4.2. Amilaz enziminin nişasta hidrolizindeki etki tarzının belirlenmesi

İç etkili enzimler amiloz ve amilopektindeki α-1,4 glikozidik zincirleri hidrolizlerler fakat amilopektindeki α-1,6 zincirlerini hidrolizleyemezler. Hidroliz ürünleri değişik zincir uzunluğundaki oligosakkaritlerdir. Bu enzimler substratın iç bölgesindeki bağlara etki ederek jelatinize nişastanın vizkozitesinde hızlı bir gerilemeye sebeb olurlar. Buna paralel olarak ta iyot ile nişastanın boyanmasında bir gerileme meydana gelir (Maldonado ve Lopez, 1995).

Amilaz enziminin etki tarzını belirlemek için yapılan iyot ile boyama (Abou-Zeid, 1997) testinde örnek tüpleri kontrol tüpleri ile karşılaştırıldığında nişastanın iyot ile boyanma kapasitesinde hızlı bir gerileme meydana geldiği gözlemledi. Bu nedenle *Penicillium brevicompactum* amilazının iç etkili bir enzim olan α-amilaz olduğuna karar verildi.

4.3. SSF' de ki üretim koşullarının *Penicillium brevicompactum* α-amilazının sentezi üzerine etkisi

4.3.1. Uygun substrat seçimi

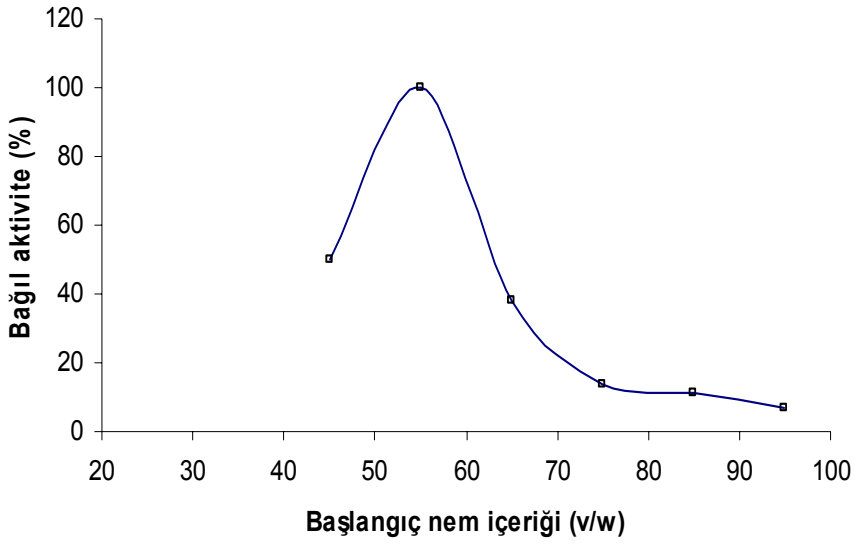
Substrat olarak SSF besiyerlerinde ayçiceği küspesi, pirinç kabuğu ve buğday kepeği kullanıldı. En yüksek enzim sentezinin buğday kepeği içeren SSF ortamında gerçekleştiği yapılan aktivite ölçümleri sonucu belirlendi. Substrat olarak ayçiceği küspesi içeren SSF ortamında hiç α-amilaz sentezi olmadığı, pirinç kabuğu içeren SSF ortamında ise % 5' lik bir α-amilaz sentezi gerçekleştiği bulundu (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. α-amilaz sentezine farklı substratların etkisi

Substrat	Bağıl aktivite (%)
Ayçiçek küspesi	0
Pirinç kabuğu	5
Buğday kepeği	10

4.3.2. Başlangıç nem düzeyinin etkisi

Farklı oranlarda başlangıç nem düzeylerine sahip olan SSF besiyerlerinde yapılan enzim aktivitesi ölçümleri sonucu en iyi nem miktarının % 55 olduğu tespit edildi. % 45, 65, 75, 85, 95 nem düzeylerinde aktivitelerde sırasıyla % 50; 62.5; 85.72; 89.29; 92.86 kayıp olduğu bulundu (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. SSF kültürlerinde başlangıç nem içeriğinin α-amilaz aktivitesine etkisi

4.3.3. Farklı pH'daki nemlendirme sıvılarının etkisi

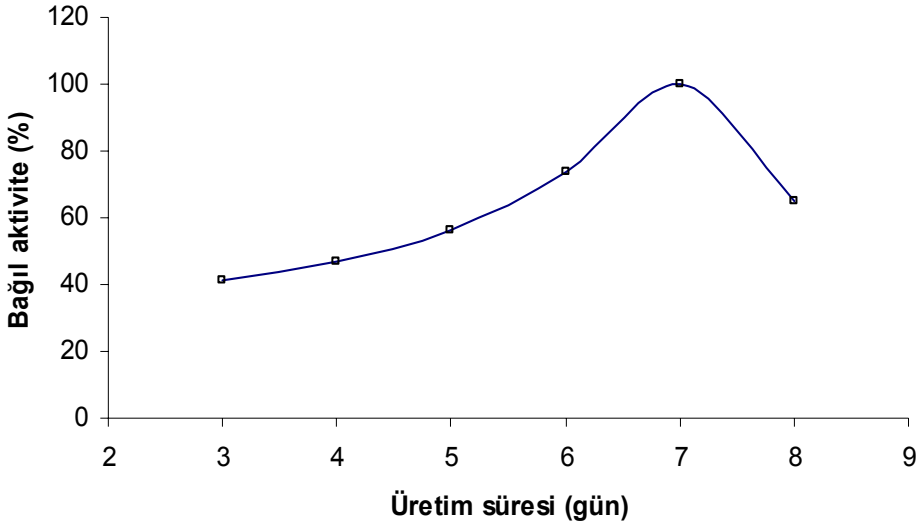
Asetat tamponu (pH 4.0-5.0), fosfat tamponu (6.0, 7.0, 8.0) ve distile su (pH 6.5) ile SSF kültürlerinin nemlendirmesi yapıldı**.** Yapılan aktivite ölçümlerinde en iyi nemlendirme sıvısının pH 5.0 olan asetat tamponu olduğu bulundu. pH 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve distile su ile yapılan nemlendirmeler sonucundaki aktivitelerde, pH 5.0 ile karşılaştırıldığında sırası ile % 30; 33; 62; 65; 7' lik bir azalma olduğu saptandı (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. SSF kültürlerinde farklı pH' daki nemlendirme tamponlarının α-amilaz aktivitesine etkisi

Nemlendirme sıvıları	**Bağıl aktivite (%)**
pH 4.0 (0.1M Asetat tamponu)	70
pH 5.0 (0.1M Asetat tamponu)	100
pH 6.0 (0.1M Asetat tamponu)	67
pH 7.0 (0.1M Fosfat tamponu)	38
pH 8.0 (0.1M Fosfat tamponu)	35
Distile su	93

4.3.4. Üretim süresinin etkisi

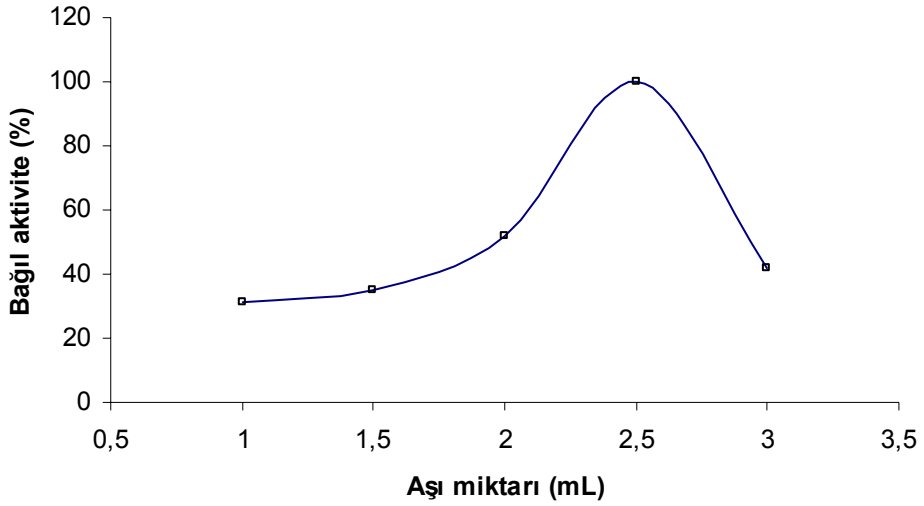
Üretim süresinin optimizasyonu çalışmasında maksimum enzim sentezinin 7. günde gerçekleştiği yapılan enzim aktivite tayinleri sonucu belirlendi. Üretimin 3. gününde enzim aktivitesi % 41.7; 6. gününde % 73.52; 8. gününde % 64.70 olarak ölçüldü. Maksimum enzim aktivitesi üremenin 7. gününde belirlendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. SSF kültürlerinde üretim süresinin α-amilaz aktivitesine etkisi

4.3.5. Aşı konsantrasyonunun etkisi

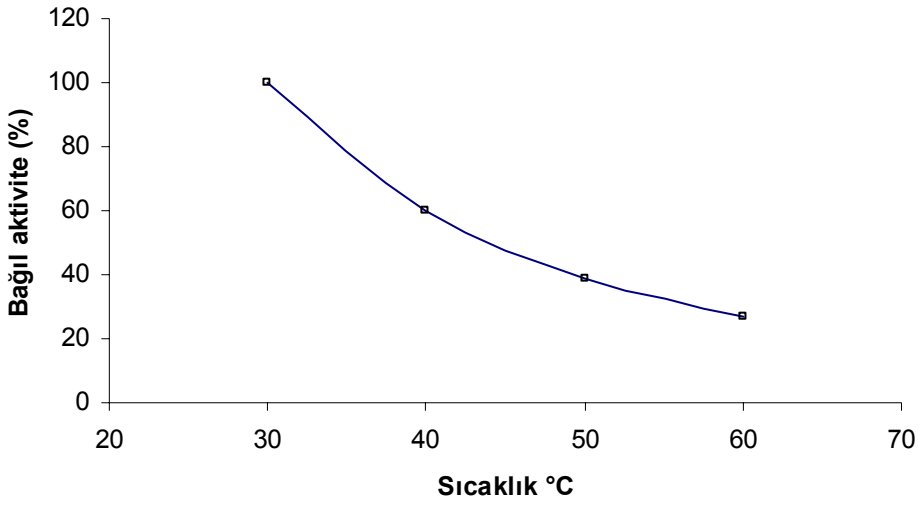
2.5 mL aşı miktarında maksimum enzim sentezi gerçekleştiği yapılan enzim aktivite ölçümleri sonucu bulundu. 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mL aşı (mililitrede 1×10^6 spor) konsantrasyonlarındaki bağıl aktiviteler sırası ile % 31.25; 35.41; 52.08; 41.66 olarak ölçüldü (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. SSF kültürlerinde aşı konsantrasyonunun α-amilaz aktivitesine etkisi

4.3.6. Üretim sıcaklığının etkisi

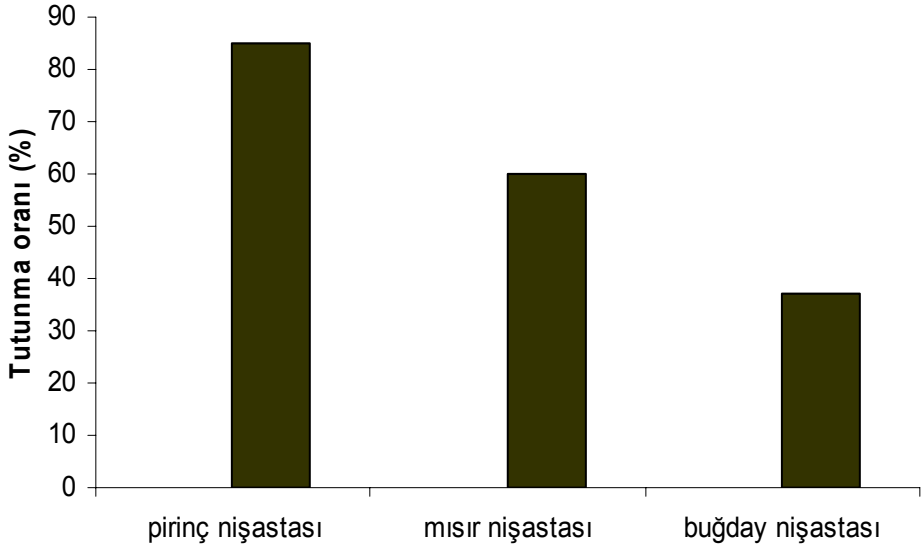
Farklı sıcaklıklarda üretime bırakılan SSF kültürlerinde 30 ^{o}C' de maksimum enzim sentezi meydana geldiği yapılan aktivite ölçümleri sonucu bulundu. 40, 50 ve 60 ^{o}C sıcaklıklardaki bağıl aktivitelerin sırası ile % 60; 33.3 ve 26.6 oranında olduğu belirlendi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. SSF kültürlerinde üretim sıcaklığının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.4. α-amilaz enziminin farklı ham nişastalara tutunma yeteneğinin araştırılması

Yapılan enzim aktivitesi ölçümleri sonucunda enzimin ham pirinç, mısır ve buğday nişastalarına sırası ile % 84.6, 60 ve 37 oranında tutunduğu bulundu (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. α-amilaz enziminin ham nişastalara tutunma yeteneği

4.5. α-amilaz enziminin saflaştırılması

P. brevicompactum amilazının saflaştırılması tek basamakta Najafi ve Kembhavi (2005) tarafından uygulanan metodun küçük bir modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.3.).

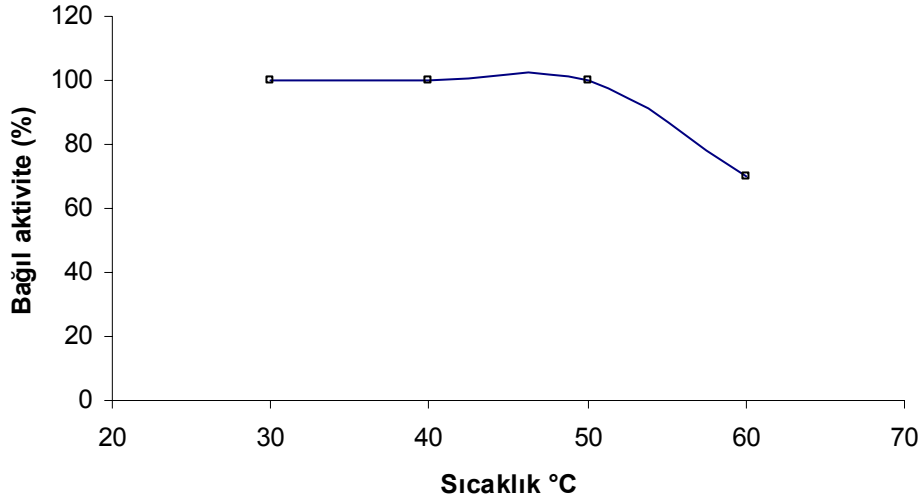
Tablo 4.3. *P. brevicompactum'* dan ekstraselülar α-amilazın saflaştırılması

Saflaştırma basamakları	Total aktivite (U)	Total protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma (kez)
Kaba Homojenat	**178**	**23.9**	**7.44**	**100**	**1**
Nişasta adsorbsiyon/elüsyon	**160.8**	**0.47**	**342.12**	**90.3**	**45.98**

4.6. *Penicillium brevicompactum* α-amilazının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

4.6.1. İnkübasyon sıcaklığının α-amilaz aktivitesine etkisi

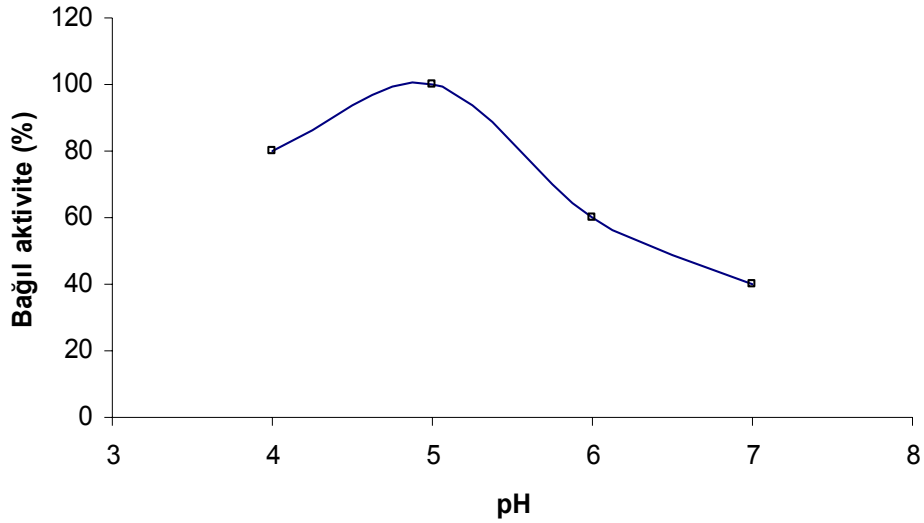
İnkübasyon sıcaklığının amilaz aktivitesine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60 ^{o}C) inkübasyon sonrası aktivite değerleri ölçüldü. α-amilaz aktivitesinin 30 - 50 ^{o}C' de maksimum olduğu, 60 ^{o}C' de ise % 30 oranında azaldığı saptandı (Şekil 4.6.).



Şekil 4. 6. İnkübasyon sıcaklığının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.6.2. İnkübasyon pH'sının α-amilaz aktivitesine etkisi

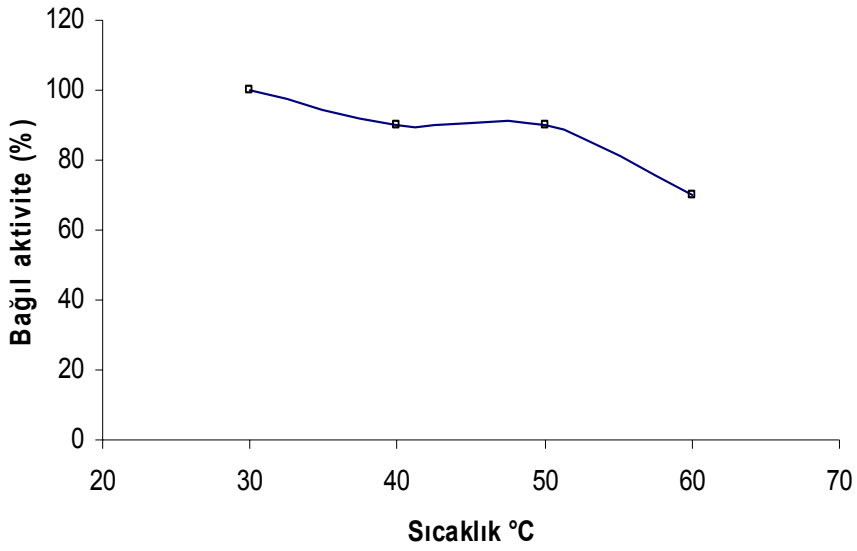
Penicillium brevicompactum amilazının en iyi çalıştığı pH değerini saptamak amacı ile yapılan bu çalışmada α-amilaz aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri 5.0 olarak saptandı (Şekil 4.7.).



Şekil 4. 7. İnkübasyon pH'sının α-amilaz aktivitesine etkisi

4.6.3. α-amilaz enziminin termal kararlılığının araştırılması

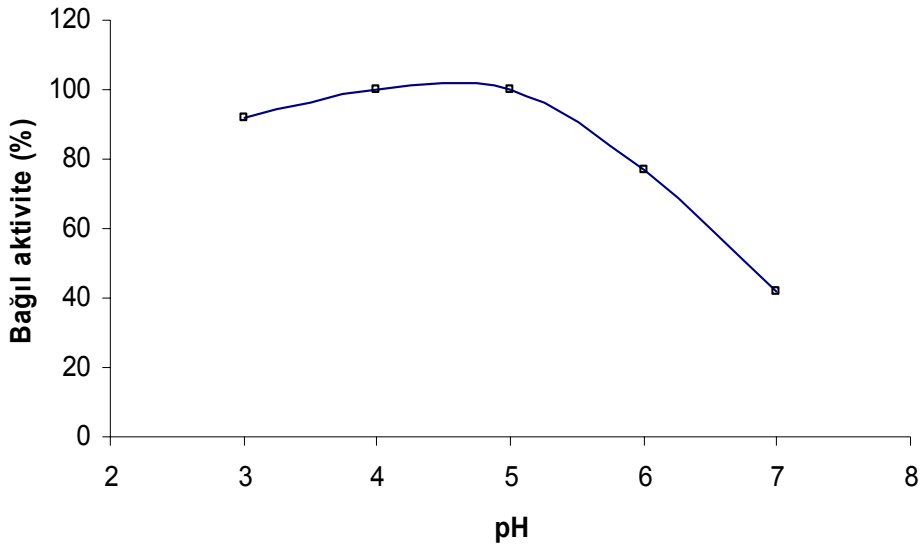
Amilaz enziminin gittikçe artan farklı sıcaklık derecelerinde 45 dk. bekletildiğinde aktivitesini ne kadar koruyabileceği araştırıldı. 30 ^{o}C' de enzimin aktivitesini tamamen koruduğu, 40 ^{o}C ve 50 ^{o}C' de aktivitenin % 10'ununu kaybettiği, 60 ^{o}C'de ise aktivitenin % 30' unu kaybettiği gözlendi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. α-amilaz enziminin termal kararlılığının araştırılması

4.6.4. α-amilaz enziminin pH kararlılığının araştırılması

Farklı pH' larda 30 dk. süre ile bekletilmiş olan enzimlerin aktiviteleri ölçüldüğünde, pH 4.0-5.0 aralığında enzim aktivitesinin maksimum değerini koruduğu gözlendi. pH 3.0; 6.0 ve 7.0' de sırası ile % 20, 23 ve 58 oranında enzim aktivitesinin azaldığı belirlendi (Şekil 4.9.).



Şekil 4. 9. α-amilaz enziminin pH kararlılığının araştırılması

4.6.5. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi

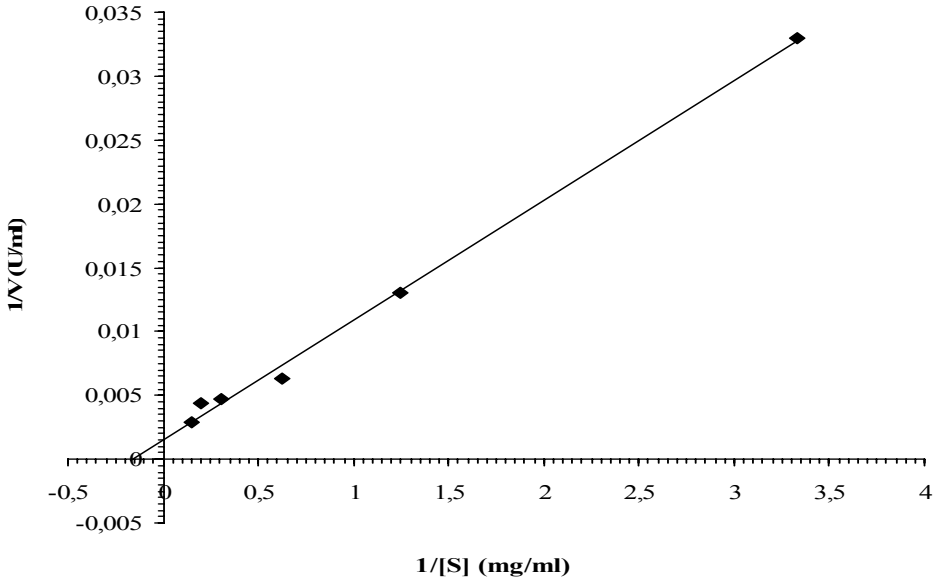
Bazı metal iyonlarının 5 ve 10 mM' lık konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi araştırıldığı zaman enzim aktivitesini en fazla artıran metallerin Mn^{+2} ve Cu^{+2} olduğu, Fe^{+3}' ün ise 10 mM konsantrasyonda aktiviteyi tamamen inhibe ettiği bulundu (Tablo 4.4.).

Tablo 4. 4. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi

Bağıl Aktivite (%) (5mM)		**Bağıl Aktivite (%) (10Mm)**	**Bağıl aktivite (%)**
$CaCl_2$	98	105	_
$MgCl_2$	75	45	_
$CuSO_4$	170	315	_
KCL	30	50	_
EDTA	35	20	_
$FeCl_3$	5	0	_
$MnCl_2$	340	220	_
NaCl	175	165	_
Kontrol	_	_	100

4.6.6. α-amilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

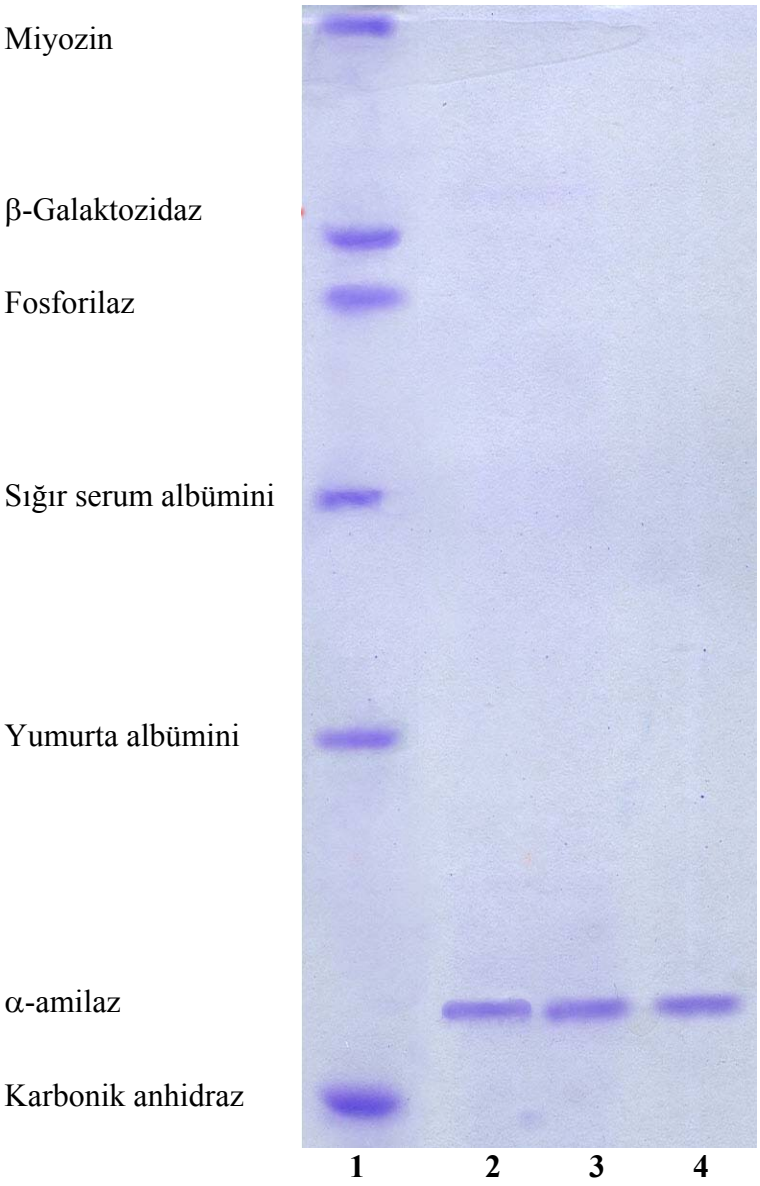
P. brevicompactum α-amilazı için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek çözünür nişasta için K_m değeri yaklaşık olarak 5.71 (mg/ml), V_{max} değeri ise 666.6 (U/ml) olarak hesaplandı (Şekil 4.10.).



Şekil 4. 10. Lineweaver-Burk grafiği

4.7. SDS-PAGE ile *P.brevicompactum* α-amilazının molekül ağırlığının hesaplanması

P. brevicompactum' dan saflaştırılan α-amilaz enziminin SDS-PAGE sonuçları Şekil 4.11' da verilmiştir.

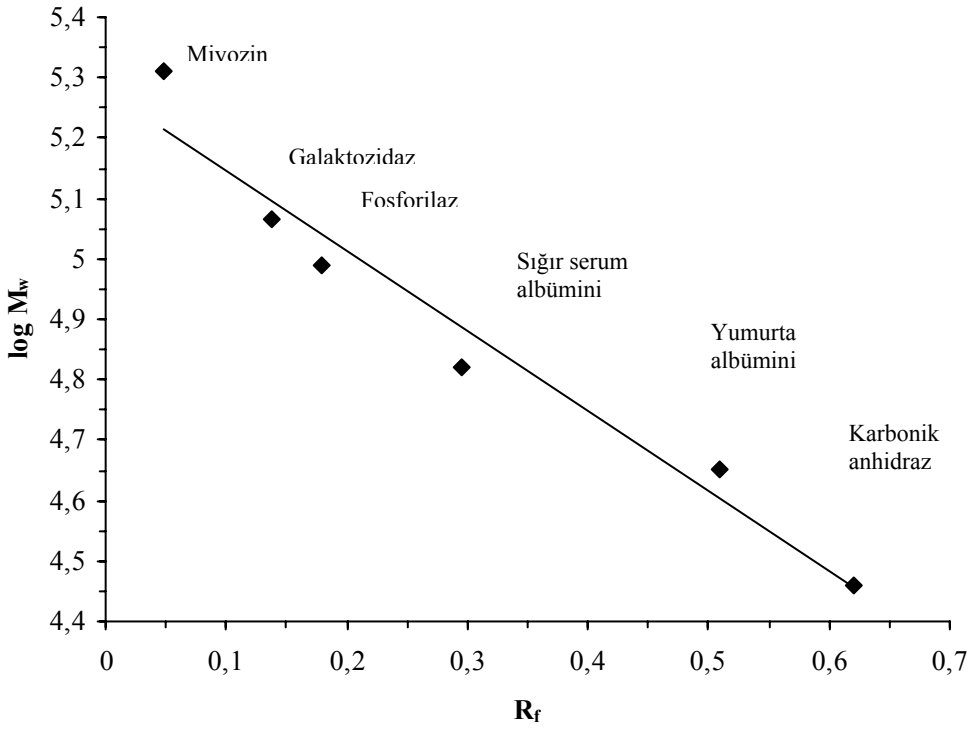


Şekil 4.11. SDS-PAGE sonuçları: Soldan 1. Sütun standart proteinler; Miyozin (205.000 Da); β-Galaktozidaz (116.000 Da); Fosforilaz (97.400Da); Sığır serum albümini (66.000 Da); Yumurta albümini (45.000 Da); Karbonik anhidraz (29.000 Da); Soldan 2.,3. ve 4. sütünlar *P. brevicompactum* α-amilazı.

SDS-PAGE sonucu jel üzerindeki her bir protein bandı için Rf değerleri ölçüldü.

$$Rf = \frac{\text{Protein bandının aldığı yol}}{\text{İşaret boyanın aldığı yol}}$$

Her bir standart protein molekül ağırlığının logaritması alınarak, bulunan Rf değerlerine karşı grafiklendi. Bu grafik yardımı ile *P. brevicompactum* α-amilazının 32.5 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu bulundu.



Şekil 4. 12. Standart proteinlerin log MW değerlerinin Rf değerlerine göre değişimi

5. TARTIŞMA

Nişasta pek çok tahıl ve yumrudan bol miktarda elde edilir. Glukoz, fruktoz, maltoz ve dekstrinlerin üretimi için oldukça ucuz bir kaynaktır. Endüstride nişasta 105 ^{o}C' lik sıcaklıkta jelatinisazyon işlemi ile jel kıvamına getirilir. Daha sonra jel kıvamdaki nişasta yüksek sıcaklıkta aktif olan bakteriyal α-amilazlar ile sıvılaştırılır. Sıvılaşan nişastaya 50-60 ^{o}C' de fungal amilazlar (glukoamilaz ve α-amilaz) ilave edilerek sakkarafikasyon denilen şekerleştirme işlemi gerçekleştirilerek glukoz, maltoz ve dekstrinler elde edilir. Amilazların ham nişasta üzerine olan etkisi sıvılaştırılmış nişasta üzerine olan etkisinden daha zordur (Itkor vd.,1989). Pek çok organizma ekstraselüler amilaz üretme yeteneğindedir ancak bu organizmaların pek azı ham nişastayı parçalama yeteneğinde olan amilazları üretebilir. Bu nedenle etkili ham nişasta sakkarafikasyonu için yeni enzim üreticilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Sasaki vd., 1986).

Yapılan bu çalışmada etkili bir şekilde ham nişastayı hidrolizleyen yeni fungal amilazların belirlenmesi için 68 tane fungus türü karbon kaynağı olarak ham pirinç nişastası içeren katı besiyerlerine ekildi, 7 gün süreyle 30 ^{o}C' de üretime bırakıldı. Üretim sonrası koloni çapı/zon çapı oranı yüksek olan ve daha önce amilolitik aktivite yönünden çalışılmamış olan *P. brevicompactum* SSF besiyerinde üretim için seçildi. Arzu edilen ürünlerin ticari olarak kabul edilebilir üretimi için uygun mikroorganizmanın seçimi SSF'de en önemli basamaklardan biridir (Nigam ve Singh, 1994). SSF sürecini etkileyen pek çok önemli faktör vardır. Bunlar, uygun substrat seçimi, başlangıç nem düzeyi, nemlendirici ajanlar, üretim süresi, aşı konsantrasyonu ve üretim sıcaklığıdır. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında yukarıda sayılan parametreler araştırılarak SSF' de fermentasyon şartları optimize edildi. Çalışmanın bundan sonraki kısımları için enzim üretimi optimum şartlarda gerçekleştirildi.

SSF'de kullanılan katı substratlar ikiye ayrılır;

1) Sentetik olanlar; Sentetik polimerler, agar ve jelatin gibi maddeler.
2) Doğal ajanlar; Tarımsal ürünler, tarımsal endüstriyel atıklar ve yan ürünler karbon kaynağı olarak kullanılır.

Doğada polimerik formda bulunan polisakkaritler (selüloz, hemiselüloz, pektin ve nişasta), lignin ve protein farklı mikroorganizmalar tarafından enerji kaynağı olarak metabolize edilir. Bu substratlar suda çözülmezler, matriksleri üzerine suyu absorblarlar, mikroorganizmanın metabolik aktivitesi ve büyümesi için SSF sisteminde gerekli olan nemi sağlar. Fungal miseller besin için substrat partiküllerinin içine işlerken, bakteri ve maya kültürleri, substrat fibrilleri ve partikülerinin yüzeyi üzerinde büyür. Filamentli funguslar serbest suyun yokluğunda SSF kültürlerinde büyüyebilirler. Fakat bakteri ve mayalar gibi tek hücreli organizmalar her zaman büyüdüğü çevrede biraz serbest suya ihtiyaç duyar (Nigam ve Singh, 1994). Bu yüzden SSF ile üretim şekli funguslar için daha uygundur.

Bu çalışmada uygun substrat seçimi için SSF kültürlerinde buğday kepeği, pirinç kabuğu ve ayçiçeği küspesi substrat olarak kullandı. Yapılan enzim aktivitesi tayinlerinde en uygun substratın buğday kepeği olduğu bulundu (Tablo 4.1.). Mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu için fermentasyon sistemine uygun katı substratın belirlenmesi oldukça önemlidir. Kullanılan üç substrat büyümeyi desteklerken ayçiçek küspesi enzim sentezini desteklemedi. Bunun nedeni ayçicek küspesinin içeriğinde nişasta ya da benzeri maddelerin bulunmaması olabilir. En iyi substratın buğday kepeği olduğu farklı araştırıcılar tarafından da rapor edilmiştir (Ellaiah vd., 2002, Hag vd., 2003, Baysal vd., 2003).

Başlangıç nem içeriğini optimize etmek için SSF kültürleri distile su ile % 45,55, 65, 75, 85, 95 (v/w) oranında nemlendirildi. Üretim sonunda yapılan enzim aktivite ölçümlerinde en iyi başlangıç nem miktarının % 55 olduğu belirlendi (Şekil 4.1.). SSF kültürlerinde başlangıç nem içeriği enzim

salınımını ve biyosentezini etkilediği için en önemli faktörlerden biridir. Yüksek nem içeriğinin buğday kepeğinin porlu yapısında bir azalmaya neden olduğuna ve bu yüzden de oksijen transferinin kısıtlandığına, düşük nem içeriğinin de substrattaki besinlerin çözünürlüğünü azalttığına inanılmaktadır (Ellaiah, 2002).

Büyüme ve substrat kullanımı için optimum nem içeriği % 30 ila % 80 arasındadır. Bu durum üretim için kullanılan substrat ve organizmaya göre değişmektedir. Örneğin; cassava ve buğday kepeği gibi nişastalı substratlar üzerinde *Aspergillus niger'*in üretiminde başlangıç nem düzeyi kahve palpı ve şeker kamışı posası'nın kinden daha düşüktür (Raimbault, 1998). *Penicillium chrysogenum'*dan enzim üretmek için substrat olarak mısır koçan yaprağı, buğday kepeği, buğday samanı ve pirinç samanı kullanılarak hazırlanan SSF kültürlerinde başlangıç nem içeriklerinin % 55 ve % 75 arasında olduğu belirtilmiştir (Balkan ve Ertan, 2007). Muhtemelen bu durum substratların su tutma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. Substrat olarak buğday kepeği kullanılan SSF kültürlerinde *Aspergillus sp.* için başlangıç nemi % 80 (Ellaiah, 2002), *Aspergillus oryzae* için % 70 (Francis vd.,2002), *Bacillus subtilis* için % 30 (Baysal, 2003) olarak rapor edilmiştir.

Katı substratın doğası pH gibi parametrelerin ölçümünde zorluk yaratır (Nigam ve Singh, 1994). Çünkü pH elektrotları nemli katıların pH' sını ölçme yeteneğinde değildir. (Lonsane vd., 1992). Her bir mikroorganizma büyümesi ve optimum aktivite göstermesi için belli bir pH aralığına sahiptir. SSF üretimi sırasında pH değişkenliği probleminin üzerinden gelmek için biyolojik aktivite üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmayan bileşiklerden oluşan tampon kullanılır. Su ve farklı tamponlar çeşitli araştırıcılar tarafından nemlendirici ajan olarak kullanılmıştır (Sodhi vd., 2005). Bu çalışmada distile su (pH 6.5), 0.1 M Asetat tamponu (pH 4.0, 5.0, 6.0) ve 0.1 M Fosfat tamponu (pH 7.0, 8.0) nemlendirici çözelti olarak kullanıldı. Buğday kepeği için en iyi nemlendirme sıvısı olarak pH 5.0 olan 0.1 M' lık asetat tamponu olduğu aktivite ölçümleri sonucunda bulundu (Tablo 4.2.). Ancak Sodhi vd., (2005),

Bacillus sp. PS-7*'* den α-amilaz üretmek için yaptıkları SSF kültürlerinde buğday kepeği için en iyi nemlendirme sıvısının distile su (pH 6.8) ve çeşme suyu (pH 6.5) olduğunu rapor etmişlerdir.

Üretim süresinin optimizasyonu için üremenin 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. günlerinde enzim aktiviteleri ölçüldü. Maksimum enzim aktivitesi üretimin 7. günde belirlendi. Üretimin 7. gününden sonra enzim aktivitesinde düşüş gözlendi (Şekil 4.2.). Mikrobiyal büyüme besinler tükendiği için durgunluk evresine girer ve sekonder metabolitlerin üretimi başlayarak, enzim sentezi ve aktivitesi azalma gösterir (Francis vd., 2002). Ayrıca besiyerindeki diğer bileşikler ile etkileşimden dolayı meydana gelen enzim denatürasyonu yüzünden de enzim sentezi ve aktivitesi azalmaktadır (Ramesh ve Lonsane, 1987).

Bacillus subtilis CBTK 106 (Krishna ve Chandrasekaran, 1996) ve *Bacillus sp.* PS-7 (Sodhi vd., 2005) üretim süresinin 2. gününde; *Aspergillus oryzae* IFO-30103 (Ramachandran vd.,2004) ve, *Bacillus cereus* MTCC 1305 (Anto vd., 2006) 3. gününde; *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 (Francis vd., 2002) ise 4. günde maksimum α-amilaz sentezlediği rapor edilmiştir.

Aşı konsantrasyonunu optimize etmek için farklı miktarlarda spor süspansiyonları kulandık. En yüksek enzim üretimi en yüksek ve en düşük miktardaki aşı miktarları ile karşılaştırıldığında 2.5 ml (1×10^6 spor/ml) spor süspansiyonu ile aşı yapılan SSF kültürlerinde elde edildi (Şekil 4.3.).

Bacillus subtilis (Baysal vd., 2003), *Aspergillus oryzae* IFO-30103 (Ramachandran vd.,2004) ve *Bacillus cereus* MTCC 1305 (Anto vd., 2006)' den α-amilaz üretiminde sırası ile 2.0, 0.5 ve 1.0 ml aşı ile maksimum enzim sentezinin gerçekleştiği rapor edilmiştir.

SSF' de aşılama genelde sporlar ile yapılır. Sporlar, katı besiyerlerinden su ile yıkama sayesinde hazırlanır. Düşük aşı miktarlarında hücrelerin büyüyüp

substratı verimli bir şekilde kullanmaları için daha uzun zamana ihtiyacı vardır. Yüksek aşı miktarlarında ise hızlı bir büyüme ve biyokütle sentezi gerçekleşmektrdir. Besinler için rekabet gerçekleşip organizmanın metabolik aktivitesinde gerileme meydana gelmektedir (Francis vd., 2002). Bu yüzden aşı miktarının ayarlanması SSF' de önemli parametrelerden birisidir.

Üretim sıcaklığının enzim sentezi üzerindeki etkisini incelemek için SSF kültürleri farklı sıcaklıklarda üretime bırakıldı. 30 ^{o}C de üretim sonucu maksimum enzim aktivitesi gözlendi (Şekil 4.4.). SSF kültürlerinde üretim sıcaklığı fermentasyonda kullanılan mikroorganizmanın büyüme kinetiklerine göre değişmektedir. (Lonsane vd., 1985). Ramesh ve Lonsane (1989) substrat olarak buğday kepeği kullanarak *Bacillus licheniformis'* ten α-amilaz üretmişler ve optimum üretim sıcaklığını 35 ^{o}C olarak belirlemişlerdir. Krisha ve Chandrasekaran (1996) substrat olarak muz kabuğu kullandıkları SSF kültürlerinde *Bacillus subtilis'* ten α-amilaz üretmişler ve optimum üretim sıcaklığının 35 ^{o}C olduğunu bulmuşlardır. Francis ve ark. (2002) bira yapımında kullanılan buğday atıkları, Ramachandran ve ark. (2004) Hindistan cevizi atıkları ile *Aspergillus oryzae'* den α-amilaz üretmişler ve optimum inkübasyon sıcaklığının 30 ^{o}C olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgular Krisha ve Chandrasekaran (1996)' ın öne sürdüğü üretim sıcaklığının SSF'de kullanılan substratın cinsine göre değil mikroorganizmanın büyüme kinetiğine bağlı olduğu tezini doğrular niteliktedir.

Enzimin ham nişastaya tutunma oranını belirlemek için ham pirinç, mısır ve buğday nişastaları ile deneyler gerçekleştirildi. Pirinç nişastasına tutunma oranı % 84.6, mısır nişastasına % 60 ve buğday nişastasına % 37 olduğu belirlendi (Şekil 4.5.).

Ham nişastayı sindiren amilazların nişasta granüllerine bağlanması enzimdeki C-terminal domeyn tarafından etkilenmektedir. Fungal amilazların nişasta granüllerini parçalamaları için bu durumun gerekli olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bakteriyal α-amilazların bazılarının nişasta

granüllerini sindirmek için benzer şekilde nişasta granüllerine bağlanmalarına gerek yoktur (Goyal vd., 2005).

Kelly vd. (1995) *Bacillus sp.* IMD 370, Hamilton vd. (1998, 1999(b)) *Bacillus sp.* IMD 434 ve *Bacillus sp.* IMD 435 α-amilazlarının ham nişasta sindiriminde herhangi bir pH' da nişastanın hiçbir çeşidine bağlanmadığını rapor etmişlerdir.

Bacillus sp. TS-23 α-amilazının mısır nişastasına % 98.3, pirinç nişastasına % 84.9 oranında, buğday nişastasına ise % 52.4 oranında tutunduğu (Lin vd., 1998); *Bacillus sp.* I-3 α-amilazının ham patates granüllerine % 94 oranında tutunduğu (Goyal vd., 2005) ayrıca bildirilmiştir.

Nişasta endüstrisinde kullanılan, ham nişastayı sindiren amilazlar enzim saflaştırmasının yüksek maliyetinden dolayı kaba enzim formunda kullanılmaktadır. Ticari olarak fermentasyon besiyerinden amilazların saflaştırılması; katı besiyerinden ekstraksiyondan sonra kültür filtratının santrifüjünü, ultrafiltrasyon ile süpernatantın ayrılmış konsantrasyonunu, amonyum sülfat veya etanol gibi organik çözücü ile enzimin ayrılmış presipitatını bunu müteakip afinite veya iyon değiştirici kromotografi ve jel filtrasyonu takip eder. Aseton presipitasyonu, amonyum sülfat presipitasyonu, hidrofobik etkileşim ve iyon değiştirici kromotografiyi içeren pek çok tek basamak veya iki basamak hızlı saflaştırma metodu amilazların kısmi saflaştırması için geliştirilmiştir (Goyal vd., 2005). Yapılan bu çalışmada bunlardan farklı şekilde enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Enzim ham pirinç nişastasına % 84.6 oranında güçlü bir şekilde bağlandığından *P. brevicompactum* α-amilazının saflaştırması; enzimin ham pirinç nişastasına tutunması ve tutunduktan sonra nişastadan ayrılması esasına göre gerçekleştirildi. Ham pirinç nişastasına tutunan enzimin elüsyonunu 0.1 M pH 5.0 olan asetat tamponu ile gerçekleştirildi. Bu zamana kadar yapılan benzer çalışmalarda Saha ve Shen (1987) farklı sıcaklıklar ve pH daki tamponlar ile enzimin elüsyonu için araştırmalar yapmışlar. Bu parametrelerin enzimin

elüsyonunda önemli bir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Lin vd. (1998) *Bacillus sp.* TS-23 amilazını süpernatanta ham mısır nişastası ekleyerek saflaştırmışlar, enzimin ham nişastadan elüsyonunu maltoz içeren Tris-HCL tamponu ile gerçekleştirmişlerdir.

P. brevicompactum amilazı nişastaya tutunma yöntemi ile tek basamakta 45.98 kez saflaştırıldı (Tablo 4.3.).

Kaneko vd. (2005) *Streptomyces sp.* α-amilazını nişastaya tutundurma yöntemi ile 32.7 kez; Najafi ve Kembhavi (2005) *Vibrio sp.* α-amilazını nişastaya tutundurma yöntemi ile 163.5 kez; Okolo vd. (2000) *Aspergillus carbonarius* amilazını S-Sepharose ve Q-Sepharose kolonları ile 2.8 kez; Mamo ve Gessesse (1999) termofilik *Bacillus*' tan izole ettikleri α-amilaz I ve II enzimlerini iyon değiştirici ve jel filtrasyonu ile 65 ve 40.7 kez; Hamilton vd. (1998) *Bacillus* IMD 434 amilazını α-CD Sepharose GB afinite kromotografisi ile 375 kez; Iefuji vd. (1996) *Cryptococcus sp.* S-2 α-amilazını α-siklodekstrin-Sepharose 6B kolonu ile 140 kez; Hayashida ve Teramoto (1986) *Aspergillus ficum* α-amilazını Sephacryl S-300 ve DEAE-Cellulofine AH kullanarak 6.1 kez saflaştırmışlardır.

P. brevicompactum α-amilazının biyokimyasal özellikleri araştırıldığında 30 ve 50 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda optimum aktivite gösterdiği bulundu (Şekil 4.6.).

Aspergillus ve *Rhizopus* türlerinin ham nişastayı sindirme yeteneğindeki amilazları ürettikleri ve ham nişasta sindirimlerinin % 1' lik konsantrasyon-larda 30-50 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda meydana geldiği rapor edilmiştir (Hamilton vd.(a), 1999).

Streptomyces limosus (Fairbairn vd., 1986), *Aspergillus ficum* (Hayashida ve Teramoto, 1986), *Cryptococcus sp.* S-2 (Iefuji vd., 1996), *Bacillus sp.* TS-23 (Lin vd., 1998), *Bacillus sp.* IMD 434 (Hamilton vd., 1998), *Bacillus sp.*

TS-435 (Hamilton vd., 1999(a)), *Bacillus amyloliquefaciens* (Demirkan vd., 2005), *Eisenia foetida* (Ueda vd., 2008) ve *Bacillus sp.* YX-1 (Liu and Xu, 2008) α-amilazlarının optimum inkübasyon sıcaklıklarının sırası ile 35, 45, 60, 70, 65, 65, 55, 50, 50 ^{o}C olduğu rapor edilmiştir.

Termofilik *Bacillus*' un sentezlediği α-amilaz I ve II nin optimum inkübasyon sıcaklığının sırası ile 75 ^{o}C ve 80 ^{o}C olduğu (Mamo ve Gessesse, 1999), *Streptomyces sp.* No. 4' ün sentezlediği α-amilaz I ve II nin optimum inkübasyon sıcaklıklarının sırası ile 50 ^{o}C ve 45 ^{o}C olduğu (Primarini, vd., 2000) bildirilmiştir.

P. brevicompactum α-amilazının optimum inkübasyon pH' sı 5.0 olarak bulundu (Şekil 4.7.).

Farklı araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalarda α-amilaz enziminin optimum inkübasyon pH' ları *Streptomyces limosus* (Fairbairn vd., 1986) için 7.0, *Aspergillus ficum* (Hayashida ve Teramoto, 1986) için 5.2, *Bacillus sp.* TS-23 (Lin vd., 1998) için 9.0, *Bacillus sp.* IMD 434 (Hamilton vd., 1998), *Bacillus sp.* TS-435 (Hamilton vd. (b), 1999) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (Demirkan vd., 2005) için 6.0, *Eisenia foetida* (Ueda vd., 2008) için 5.5 ve *Bacillus sp.* YX-1 (Liu and Xu, 2008) için 5.0 olarak bulunmuştur.

P. brevicompactum α-amilazının termal kararlılığını araştırmak için, substratsız enzim çözeltileri 45 dk. süre ile farklı sıcaklıklarda bekletildi. Enzimin 30 ^{o}C' de 45 dk. bekletildiği zaman başlangıç akivitesini % 100 koruduğu gözlendi. 40 ve 50 ^{o}C' lerde başlangıç aktivitesinin sadece % 10 azaldığı; 60 ^{o}C' de ise % 30' luk bir azalma meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.8.).

Streptomyces limosus α-amilazı 20-45 ^{o}C arasında 1 saat (Fairbairn vd. 1986), *Bacillus stearothermophilus* α-amilazı 60-70 ^{o}C arasında 1 saat (Kim vd., 1989) *Bacillus stearothermophilus* NCA 26 60 ^{o}C' de 2 saat (Dettori-

Campus vd., 1992) *Cryptococcus sp.* S-2 α-amilazı 30-90 ^{o}C arasında 30 dk. (Iefuji vd., 1996), *Bacillus sp.* TS-23 α-amilazı 40-60 ^{o}C 10 dk.(Lin vd., 1998), *Bacillus sp.* IMD 434 α-amilazı 40 ^{0}C 1 saat (Hamilton vd. 1998) aktivitelerini koruduğu ayrıca termofilik *Bacillus*' un sentezlediği α-amilaz I ve II' nin de 80 ^{o}C' de 1 saat süreyle aktivitesinin % 50'sini koruduğu bildirilmiştir (Mamo ve A. Gessesse, 1999).

α-amilazların sıcaklıkta kararlı ve sıcaklıkta kararsız olmak üzere iki çeşidi vardır. Sıcaklıkta kararlı α-amilazlar bakteriyal orjinlidir ve *Bacillus* türlerinden elde edilir. 90 ^{o}C' ye kadar ki sıcaklıklarda aktif ve kararlıdırlar (Maldonado ve Lopez, 1995). Sıcaklıkta kararsız α-amilazlar genelde fungal orjinlidir ve maksimum 50-60 ^{o}C' ye kadar Ca^{+2} iyonlarının varlığında kararlıdırlar. Daha yüksek sıcaklıklarda kararlı değildirler. Bu yüzdende fungal α-amilazlar nişasta endüstrisinde şekere dönüştürme aşamasında kullanılmaktadır.

P. brevicompactum α-amilazının pH kararlılığının araştırılması için enzim 30 dk. +4 ^{o}C' de farklı pH' larda bekletildi ve pH 4.0-5.0 arasında stabil olduğu bulundu (Şekil 4.9.)

Aspergillus ficum α-amilazı pH 4.0-9.0 (Hayashida ve Teramoto, 1986), *Bacillus sp.* α-amilazı pH 4.0-9.0 (Hamilton vd. 1998), termofilik *Bacillus*' un sentezlediği α-amilaz I ve II pH 5.5-9.0 arasında (Mamo ve Gessesse, 1999), *Bacillus sp.*I-3 α-amilazı pH 5.0-5.5 (Goyal vd., 2005), *Bacillus amyloliquefaciens* α-amilazı pH 5.8-8.0 (Demirkan vd. 2005), *Eisenia foetida* α-amilaz I ve II' nin pH 7.0-9.0 (Ueda vd., 2008) ve *Bacillus sp.* YX-1 α-amilazı pH 4.5-11 (Liu and Xu, 2008) arasında stabil olduğu rapor edilmiştir. pH kararılığı ile ilgili yapılan çalışmadan elde edilen bulgular, daha önceki çalışmaların bulguları ile örtüşmemektedir. *P. brevicompactum* α-amilazı dar bir pH aralığında kararlılığını koruyabilmektedir. Sadece *Bacillus sp* I-3 amilazı daha dar bir spektrumda kararlılık göstermektedir.

Metal iyonlarının *P. brevicompactum* α-amilazının aktivitesi üzerine etkileri araştırıldığında $MnCl_2$, $CuSO_4$ ve NaCL' un 5 mM ve 10 mM' lık konsatrasyonlarda α-amilaz aktivitesini arttırdığını, $MgCl_2$, KCl, $FeCl_3$ ve EDTA' nın 5 mM ve 10 mM' lık konsatrasyonlarda aktiviteyi inhibe ettiğini, $CaCl_2$' ün aktivite üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı saptandı (Tablo 4.4.).

Okolo vd. (2000), ham nişastayı sindiren amilazların Co^{+2}, Mn^{+2} ve Fe^{+2} gibi divalent katyonlara maksimum aktivite için ihtiyaç duyduğunu, Hg^{+2}, Ca^{+2} Mg^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2} gibi katyonlar ve EDTA ve *N*-bromosüksinamit gibi inhibitörler ile inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Bu bütün amilazları içeren bir tanımlamadır. Amilazlar α-, β- ve glukoamilazlar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. İnhibitör olarak ifade edilen Ca^{+2} katyonunun α-amilaz aktivitesini inhibe etmediği gibi stabilite ve konformasyonda büyük öneme sahip olduğu ileri sürülürken (Demirkan vd. 2005), aynı Ca^{+2} katyonu β-amilaz aktivitesini inhibe etmektedir (Okolo vd., 2000).

Lin vd. (1998) *Bacillus sp.* TS-23 α-amilazının aktivitesini 1 mM konsantrasyonda Hg^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Cu^{+2} metallerinin inhibe ettiği, Ca^{+2}, un ise arttırdığı; Goyal vd. (2005) *Bacillus sp.* I-3 α-amilazının $FeSO_4$, $CuSO_4$ ve $MnSO_4$ varlığında aktivitesinin arttığını, $HgCl_2$ ve EDTA varlığında da inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Her iki araştırıcı da enzim aktivitesinin metal iyonları ile etkilendiğini ve maksimum aktivite için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyduğu için enzimi metalloprotein olarak adlandırmışlardır. Ayrıca EDTA' nın enzim aktivitesini inhibe etmesinin de bu durumu desteklediğini belirtmişlerdir.

Bacillus stearothermophilus NCA 26 α-amilaz aktivitesinde 2 mM $CaCl_2$ ve 0.1 mM EDTA' nın herhangi bir etkiye sahip olmadığı (Dettori-Campus vd., 1992); 1 mM konsantrasyonlarda Hg^{+2}, Ag^{+}, Cu^{+2} ve Zn^{+2}, nin *Cryptococcus sp.* S-2 α-amilazını sırası ile % 25, 51, 52 ve 87.6 oranında

inhibe ettiğini, Na^{+}, Mg^{+2}, Ca^{+2} ve EDTA' nın enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı (Iefuji vd., 1996) rapor edilmiştir.

Termofilik *Bacillus*' un sentezlediği α-amilaz I ve II' nin 5 mM Fe^{+3}, Hg^{+2} ve Cu^{+2} varlığında inhibe olurken (Mamo ve Gessesse, 1999), *Streptomyces sp.* No. 4' ün sentezlediği α-amilaz I ve II nin aktivitesi 1mM Hg^{+2} tarafından inhibe olduğu EDTA' nın α-amilaz I' i inhibe, α-amilaz II' yi aktive ettiği belirtilmiştir (Primarini, vd., 2000).

Demirkan vd. (2005), 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda metal iyonlarının *Bacillus amyloliquefaciens* α-amilaz aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlar; 1 mM metal iyonlarının 5 mM olanlardan aktivite üzerinde daha etkili olduğunu, Mg^{+2}, Ba^{+2} ve Cu^{+2} enzim aktivitesini arttırırken Hg^{+2}, Fe^{+2}, Zn^{+2} ve Ag^{+2}' nin enzim aktivitesini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

P. brevicompactum α-amilazı için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek çözünür nişasta için K_m değeri yaklaşık olarak 5.71 mg/ml, V_{max} değeri ise 666.6 U/ml olarak hesaplandı (Şekil 4.10.).

Bacillus sp. TS-23 α-amilazının çözünür nişasta için K_m değeri 2.7 (mg/ml), γ-siklodekstrin için K_m değeri 12.8 (mg/ml) (Lin vd., 1998); *Bacillus sp.* IMD 434 α-amilazının maltotrioz için K_m değeri 1.9 mm, amiloz için K_m değeri 0.26 olarak (Hamilton vd., 1998) rapor edilmiştir.

Demirkan vd. (2005), *Bacillus amyloliquefaciens* α-amilazının çözünür nişasta için K_m değerini 1.92 (mg/ml), V_{max} değerini 351 (U/ml) olduğunu bildirmişlerdir.

Michelena ve Castillo (1984), *Aspergillus foetidus* α-amilazının amilopektin, çözünür nişasta ve amiloz için K_m değerlerini sırası ile 1.14, 2.19 ve 7.65 mg/ml olarak; V_{max} değerlerini ise amilopektin ve çözünür nişasta için sırası ile 313.606 ve 1748 mg/mg olarak belirtmişlerdir.

P. brevicompactum α-amilazının SDS-PAGE ile 32.5 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ve monomerik yapıda olduğu bulundu (Şekil 4.12).

Bacillus sp. IMD 434 α-amilazının moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 69200 Da, Pronaz E ile inkübe edildikten sonra orijinal peptidin iki tane küçük kısma ayrıldığını bunlarında SDS-PAGE' de 13000-56200 Da molekül ağırlığında olduğu belirtilmiştir (Hamilton vd. (a), 1999).

Bacillus sp. IMD 435 α-amilazının moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 63000 Da Pronaz E ile muameleden sonra 44000 ve 19000 Da ağırlığında iki küçük fragment şeklinde SDS-PAGE ile görüntülemişlerdir (Hamilton vd. (b) , 1999).

Yapılan diğer çalışmalarda *Aspergillus foetidus* α-amilazı için moleküler ağırlık 41 500 (Michelena ve Castillo, 1984), *Cryptococcus sp.* S-2 α-amilazı için 66 kDa (Iefuji vd., 1996), *Bacillus sp.* TS-23 α-amilazı için 42 kDa (Lin vd., 1998) olarak hesaplanmıştır.

Nagasaka vd. (1998) lerinin *Corticum rolfsii'* den izole ettikleri 1, 2 ve 3 kod numaralı amilazların moleküler ağırlıklarının 78, 78 ve 79 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Liu ve Xu (2008) *Bacillus sp.* YX-1' den izole ettikleri α-amilazın 56 kDa, Ueda vd. (2008) *Eisenia foetida'* dan izole ettikleri α-amilaz I ve II' nin 60 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, öncelikle ham nişastayı jeletinizasyon işlemi olmaksızın doğrudan hidrolizleyebilen amilaz için yeni bir kaynak bulundu. *P. brevicompactum* havadan izole edilen bir mikrofungus olup, doğada yaygın olarak bulunan yabanıl bir kaynaktır. SSF' de üretim için de uygun bir fungustur. Yapılan üretim çalışmalarında bu fungustan oldukça düşük maliyet ile verimli amilaz üretimi gerçekleştirildi. Üretim şartları optimize edildi ve

maksimum enzim üretimi sağlandı. Elde edilen enzim çözünür nişastayı hidroliz ederek, iyot boyama gücünde hızlı bir azalmaya neden oldu. Bu durum, enzimin nişasta hidrolizinde iç etkili bir amilaz olduğunun belirteci olduğundan enzimin α-amilaz olduğuna karar verildi. Üretilen enzim, yüksek afinitesinden dolayı, tek basamakta pirinç nişastasına tutunma ile saflaştırıldı. Oldukça düşük maliyetle ve az kayıpla saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş olup, daha yüksek saflık dereceleri kullanım amacı için gereksizdir. Bilindiği gibi enzim saflaştırmasının amacı bir sonraki işlemlerde kullanabilmek için hazırlamaktır (Telefoncu, 1997). Saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri de belirlenerek endüstriyel açıdan uygulanabilirliği araştırıldı. Yapılan çalışmaların ışığı altında *P. brevicompactum'* un yeni ve iyi bir ham nişasta sindiren amilaz kaynağı olduğu ve hazırlanan enzimin endüstriyel uygulamalarda, özellikle maliyeti düşürmesi açısından iyi bir alternatif olacağı söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

Abe J.I, Bergmann F.W., Obata K., Hizukuri S., 1988, Production of the raw starch digesting amylase of *Aspergillus sp. K-27,* Applied Microbiology and Biotechnology, 27, 447-450.

Abou Zeid A. M., 1997, Production, purification and characterization of an extracellular amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*, Microbios, 89, 55-66.

Anto H., Trivedi U., Patel K., 2006, Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation, Food Technology and Biotechnology., 44, 241-245.

Antranikian G., 1992, Microbial degradation of starch, In; Winkelmann G (eds), Microbial degradation of natural products, Vol.2, 28-50.

Ası T., 1996, Tablolarla Biyokimya, Tayf Ofset, 71-116.

Aydogdu H., 2006, Edirne ilindeki kreş ve gündüz bakımevlerinin iç ve dış ortamında havayla taşınan funguslar ve bakteriler. Doktora tezi, Trakya üniversitesi Biyoloji Anabilimdalı.

Bailey J.E., Ollis D.F., 1977, Biochemical Engineering Fundamentals; International Student Edition, Chapter 1-7, 39-50.

Balkan B., Ertan F., 2007, Production of α-amylase from *Penicillıum chrysogenum* under solid state fermentation by using some agricultural by products, Food Technology and Biotechnology, 45 (4), 439-442.

Baysal Z., Uyar F., Aytekin Ç., 2003, Solid state fermentation for production of α-amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water, Process Biochemistry, 38, 1665-1668.

Becerra M., Gonzalez Siso M.I., 1996, Yeast β-galactosidase in solid state fermentations, Enzyme and Microbial Technology, 19:39-44.

Beg QK., Bhushan B., Kapoor M., Hoondal GS., 2000, Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its aplication in biobleaching of eucalyptus kraft pulp, Enzyme and Microbial Technology, 27: 459-466.

Crabb W.D., Mitchinson C., 1997, Enzymes involved in the processing of starch to sugars, Trends Biotechnology, No. 15, 349-352.

Cowan D., 1996, Industrial enzyme technology, TIBTECH, No. 14, 177-178.

Çağatay M., 1976, Bitki biyokimyası, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları (A.Ü. Basımevi) Sayfa; 98-109.

Çetin E.T., 1983, Endüstriyel mikrobiyoloji, İstanbul tıp fakültesi vakfı, Bayda yayın, I. baskı, 2, 145-146.

Demirkan E. S., Mikami B., Adachi M., Higasa T. and Utsumi S., 2005, α-amylase from B. amyloliquefaciens: purification, characterization, raw starch degradation and expession in *E. coli,* Process Biochemistry, 40, 2629-2636.

Dey S., Agarwal S.O, 1999, Characterization of a thermostable alpha amylase from a thermophilic *Streptomyces magasporus* strain SD12, Indian Journal of Biochemistry and Biophysic, 36:150-157.

Dettori-Campus B.G., Priest F.G. and Stark J.R., 1992, Hydrolysis of starch granüles by the amylase from *Bacillus stearothermophilus NCA 26*, Process Biochemistry, 27, 17-21.

Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P., Srinivasulu B., 2002, Optimization of process parameters for Glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, Process Biochemistry, 38, 615-620.

Ertan F., Balkan B., Balkan S., Aktac T.(a), 2006, Solid state fermentation for the production of α-amylase from *Penicillium chrysogenum* using mixed agricultural by-products as substrate, Biologia, 6, 657-661.

Ertan F., Yagar H., Balkan B.(b), 2006, Some properties of free and immobilized alpha-amylase from *Penicillium griseofulvum* by solid state fermentation. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 36(1):81-91.

Fairbairn D. A., Priest F. G. and Stark J. R., 1986, Extracellular amylase synthesis by *Streptomyces limosus*, Enzyme and Microbial Technology, Vol 8.,89-92.

Francis F., Sabu A., Nampoothiri K. M., Szakacs G., Pandey A., 2002, Synthesis of α-amylase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation, Journal of Basic Microbiology, 42, 320-326.

Goyal N., Gupta J.K. and Soni S.K., 2005, A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus sp. I-3* and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch, Enzyme and Microbial Technology, 37 (7), 723-734.

Hag I., Ashraf H., Igbal J., Qadeer M.A., 2003, Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, Bioresource Technology, 87, 57-61.

Hames B.D., Rickwood D., 1990, Gel electroforesis of proteins, A practical approach, Oxford University Press, 1-149.

Hamilton L.M., Kelly C.T. and Fogarty W. M., 1998, Raw starch degradation by the non-raw starch-adsorbing bacterial alpha amylase of *Bacillus sp. IMD 434*, Carbohydrate Research, 314, 251-257.

Hamilton L. M. (a), Kelly C.T. and Fogarty W.M., 1999, Purification and properties of the raw starch-degrading α-amylase of *Bacillus sp. IMD 434*, Biotechnology Letters, 21, 111-115.

Hamilton L. M. (b), Kelly C. T. and Fogarty W. M., 1999, Production and properties of the raw starch digesting α-amylase of *Bacillus sp. IMD 435*, Process Biochemistyr, 35, 27-31.

Hayashida S. and Teramoto Y., 1986, Production and Characteristics of raw starch digesting α-amylase from a protease negative *Aspergillus ficum* mutant, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 52, 5, 1068-1073.

Hayashida S., Teramoto Y. and Inoue T., 1988, Production and characteristics of raw potato starch digesting α-amylase from *Bacillus subtilis* 65, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, 6., 1516-1522.

Hölker U., Höfer M., Lenz J., 2004, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 175-186.

Iefuji H., Chino M., Kato M. and Iimura Y., 1996, Raw starch digesting and thermostable α-amylase from the yeast *Cryptococcus sp. S-2*: purification, characterization, cloning and sequencing, Biochemistry Journal, 318, 989-996.

Itkoor P., Shida O., Tsukagoshi N. and Udaka S., 1989, Screening for raw starch digesting bacteria, Agricultural Biology and Chemistry, 53, 53-60.

Jain A., 1995, Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68, Process Biochemistry, 30:705-709.

Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamioğlu M., Başpınar N., Tiftik A. M., 2000, Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, 163-165, 246-247.

Kaneko T., Ohno T. ve Ohisa N., 2005, Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces sp.* isolated in a milling factory. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 69(6), 1073-1081.

Kelly C.T., Tigue M.M., Doyle E.M., Fogarty W.M., 1995, The raw starch degrading alkaline amylase of *Bacillus sp.* IMD 370, Journal of Indian Microbiology, 15: 446-448.

Kılıç İ., 1996, Düşük molekül ağırlıklı polipeptilerin poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılması, Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 54.

Kim J., Nanmori T. and Shinke R. , 1989, Thermostable raw-starch-digesting amylase from *Bacillus stearothermophilus,* Applied and Environmental Microbology, vol.55, 6, 1638-1639.

Krishna C., and Chandrasekaran M., 1996, Banana waste as substrate for α-amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid state fermentation, Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 106-111.

Krishna C., 1999, Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes, Bioresource Technology, 69:231-239.

Kühne, W. 1878. The photochemistry of the retina. Translated and edited by Michael Foster in Dr. W. Kühne on Photochemistry of the Retina and on Visual Purple, London: Macmillan and Co.

Lehninger A.L., 1982, Principles of Biochemistry; First printing, Worth Publisher, 432-478.

Lin L. L., Chyau C.C. and Hwei Hsu W., 1998, Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp. TS-23,* Biotechnology and Applied Biochemistry, 28, 61-68.

Liu X.D., Xu Y., 2008, A novel raw starch digesting α-amylase from a newly isolated *Bacillus sp.* YX-1: Purification and characterization, Bioresource Technology, 99; 4315-4320.

Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiatman S. and Ramakrishna S.V., 1985, Engineering aspects of solid state fermentations, Enzyme and Microbial Technology, 7., 258-265.

Lonsane B.K., Castaneda G.S., Raimbault M., Roussos S., Viniegra G., Ghildyal N.P., Ramakrishna M., Krishnaiah M.M., 1992, Scale up strategies for solid state fermentation systems, Process Biochemistry, 27, 259-273.

Lowry O.H., Rosebough N.J. Farr A.L. and Randall R.J., 1951, Protein measurment with the folin phenol regent, Journal of Biology and Chemistry, 193, 265-275.

Mamo G.and Gessesse A., 1999, Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α-amylases from a thermophilic *Bacillus*, Enzyme and Microbial Technology, 25, 433-438.

Maldonado H.G. and Lopez O. P., 1995, Amylolytic enzymes and products derived from starch, Critical Rewievs in Food Science and Nutrition, 35, 373-403.

Marlida Y., Saari N., Hassan Z. and Radu S., 2000, Improvement in raw sago starch degrading enzyme production from *Acremonium sp.* endophytic fungus using carbon and nitrogen sources, , Enzyme and Microbial Technology, 27, 511-515.

Matsubara T.(a), Ammar Y. B., Anindyawati T., Yamamoto S., Ito K., Iizuka M. and Minamiura N., 2004, Degradation of raw starch granules by alpha amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37(4), 422-428.

Matsubara T.(b), Ammar Y. B., Anindyawati T., Yamamoto S., Ito K., Iizuka M. and Minamiura N., 2004, Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of raw starch digesting α-amylase from *Aspergillus awamori* KT-11, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 37, 4., 429-438.

Menevşe A., Menevşe S., 1982, Temel Biyokimya, A.İ.T.İ.A., Gazetecilik ve Halkla İlişkiler Yüksek Okulu Basımevi, Ankara, 144.

Michelena V.V., Castillo F.J., 1984, Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of the enzyme, Journal of Applied Bacteriology, 56, 395-407.

Miller G.L., 1959, Use of dinitro-salicylic acid reagent for determination of reducing sugars, Analitic Chemistry, Nq. 31, 426-428.

Morita H., Fukuoka Y.F., 1997, High specific activity of raw-starch digesting glukoamylase producing *Rhizopus sp.* A-11 in liquid culture, Starch, 49, 293-296.

Nagasaka Y., Muraki N., Kimura A., Suto M., Yokota A., Tomita F., 1995, Cloning of Corticium rolfsii glukoamylase cDNA and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 44, 451-458.

Najafi, M. F., Kembhavi A., 2005, One step purification and characterization of an extracelular α-amylase from marine *Vibrio sp.* Enzyme and Microbial Technology. 36, 535-539.

Nandakumar M.P., Thakur M.S., Raghavarao K.S.M.S. and Ghildyal N.P., 1999, Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthsis of fungal amylases, Letters in Applied Microbiology, 29, 380-384.

Nigam P., Singh D., 1994, Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology, Journal of Basic Microbiology, 34, 405-423.

Okolo B. N., Ire F. S., Ezeogu L. I., Anyanwu C.U. and Odibo F.JC., 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.

Omemu A.M., Akpan I., Bankole M.O. and Teniola O.D., 2005, Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AMO7 isolated from the soil, African Journal of Biotechnology, 1, 19-25.

Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R. and Nigam P., 1999, Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, Bioresource Technology, 77, 149-162.

Perez-Guerra N., Torrado- Agrasar A., Lopez-Macias C. and Pastrana L., 2003, Main characteristics and applications of solid substrate fermentation, Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry, No.2(3).

Pitt J.I., 1979, The genus penicillium and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, New York; 371-374.

Primarini D., Ohta Y. ve Hiroshima H.,2000, Some enzyme properties of raw starch digesting amylases from *Streptomyces sp. No. 4*, Starch, 52, 28-32.

Raimbault M., 1998, General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, Electronic Journal of Biotechnology, 3, 1-15.

Ramachandran S., Patel A. K., Nampoohiri K. M., Chandran S., Szakacs G., Soccol C.R. and Pandey A., 2004, Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and it properties, Brazilian Archives of Biology and Technology, 2, 309-317.

Ramesh M.V., Lonsane B.K., 1987, Solid state fermentation for production of α-amylase by *Bacillus megaterium* 16M, Biotechnology Letters, 5, 323-328.

Ramesh M.V., Lonsane B.K., 1989, Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable alpha amylase with two peaks for ph optima by *Bacillus licheniformis* M 27, Biotechnology Letters, 1, 49-52.

Rüdiger A., Sunna A., Antranikian G.,1994, Enzymes from extreme thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria, Carbohydrases, 946-961.

Saha B.C., Shen G.J., 1987, Behaviour of a novel thermostable β-amylase on raw starch. Enzyme and Microbial Technology, 9; 598-601.

Sarıkaya E., Higasa T., Adachi M. and Mikami B., 2000, Comparison of degradation abilities of α- and β-amylases on raw starch granules, Process Biochemistry, 35, 711-715.

Sasaki H., Kurosawa K. and Takao S., 1986, Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production, Agricultural Biology and Chemistry, 50, 1661-1664.

Sodhi H. K., Sharma K., Gupta J.K., Soni S.K., 2005, Production of a thermostable α-amylase from *Bacillus sp*. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, Process Biochemistry, 40, 525-534.

Swinkels J.J.M., 1985, Composition and properties of commercial native starches, Starch, 37, 1-5.

Telefoncu A., 1997, Enzimoloji, Ege Üniversitesi Yayınevi, 1-3, 139-144, 256.

Ueda M., Asano T., Nakazawa M., Miyateke K., Inouye K., 2008, Purification and characterization of novel raw starch digesting and cold adapted α-amylase from *Eisenia foetida*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 150, 125-130.

Upadek H., Kottwitz B., 1997, Application of amylases in detergents, Enzymes in detergency, Inc, NewYork, 203-212.

Vihinen M., Mantsala P., 1989, Microbial amylolytic enzymes. Crit. Rev. Biochemistry and Molecular Biology, 24, 329-418.

Wilson J.J., Khactourians C.G., Ingledew W.M., 1982, Biotechnology Letters, 4; 333-338.

Windish W.W., Mhatra N.S., 1965, Microbial amylase, Advanture Applied Microbial., 7, 273-304.

Yenson M., 1981, İnsan Biyokimyası, İst. Üniv. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü, 143-145.

Zihnioğlu F., 1996, Protein saflaştırması ve karakterizasyonu elektroforetik yöntemler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir, 150.

7. ÖZGEÇMİŞ

08.04.1975 Edirne doğumluyum. İlk, orta ve lise tahsilimi Edirne'de yaptım. Trakya Üniversitesi S.H.M.Y.O Tıbbi Laboratuar bölümünden mezun olduktan sonra T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdim. 2001-2003 yıllarında T.Ü Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansımı yaptım. 1998 yılından beri T.Ü Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuarında çalışmaktayım.