

**DEKSTRANAZ ENZİMİNİN *Paecilomyces lilacinus*' TAN
ELDESİ, OPTİMİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

**OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF
DEXTRANASE ENZYME PRODUCED BY
*Paecilomyces lilacinus***

TUĞBA SUBAŞIOĞLU

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOLOJİ Ana Bilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman) :
Prof Dr. Emir CANSUNAR

Üye :
Prof Dr. Nazif KOLANKAYA

Üye :
Prof Dr. Nilüfer AKSÖZ

Üye :
Prof Dr. Nevin KESKİN

Üye :
Prof Dr. Münevver ARISOY

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof Dr. Erdem YAZGAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Her zaman yolumu aydınlatan eşim,

Murat' a

DEKSTRANAZ ENZİMİNİN *Paecilomyces lilacinus*' TAN ELDESİ, OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Tuğba Subaşıoğlu

ÖZ

Dekstranaz (α -1,6-D-glukan-6-glukanohidrolaz; EC3.2.1.11), bir polisakkarit olan dekstranın hidrolizinde rol oynayan bir enzimdir. Dekstranazların pratikte kullanılması, bu enzimlerin çeşitli ortamlarda problem yaratan mikrobiyal kaynaklı dekstran birikimlerini depolimerize edebilmelerinden kaynaklanmaktadır. Dekstran dış plağına yol açtığından, dekstranazlar dış bakım ürünlerinde kullanılabilir. Diğer yandan, şeker endüstrisinde fungal kaynaklı dekstranaz eklenmesi, şeker işlemlerinde verimi arttırmaktadır. Dekstranaz kullanımı ayrıca glukoz polimerlerinin yapısal çalışmalarında ve saflaştırma işlemlerinde de sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, *Paecilomyces lilacinus*, 19 farklı fungus arasından en iyi dekstranaz üreten kaynak olarak seçildi. Besiyeri ve dekstranaz üretim koşulları optimize edildi. En yüksek enzim üretimi, karbon kaynağı olarak 10g/L dekstran, azot kaynağı olarak 0.5g/L NaNO₃ kullanılarak, 30°C' de, pH 6' da, 100 rpm'de 7 günlük inkübasyonla 2x10⁵ inokülasyon miktarı ile elde edildi. Enzim aktivitesini etkileyen faktörlerden, reaksiyon zamanı, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu bulundu. Enzimin optimum aktivitesini pH 5 ve 50°C' de gösterdiği; bununla birlikte, pH 4.0-8.0 aralığında 24 saat, ayrıca 50°C' de 24 saate kadar stabil kaldığı görüldü. Dekstranazın, CuSO₄.5H₂O, K₂Cr₂O₇, CdCl₂ ve HgCl₂ ile inaktive olduğu bulundu. Değişik matrikslere immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücreleri ile 6 döngü boyunca dekstranaz üretimi gerçekleştirildi. Agar ve alginat boncuklarının ilk döngüde yüksek enzim aktivitesi verdikleri gözlenirken, poliüretan süngerin dördüncü döngüde maksimum aktiviteyi verdiği bulundu.

Anahtar sözcükler: Dekstranaz, dekstran, endüstriyel enzim, fungus, immobilizasyon, *Paecilomyces lilacinus*.

Danışman: Prof Dr Emir CANSUNAR, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı

OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF DEXTRANASE ENZYME PRODUCED BY *Paecilomyces lilacinus*

Tuğba Subaşıoğlu

ABSTRACT

Dextranase is an enzyme that acts on the hydrolysis of dextran which is a polysaccharide. Dextranases are of practical importance since these enzymes can depolymerise various troublesome microbial dextran deposits. Since dextran is involved in dental plaque formation, dextranases are also used in the manufacture of sophisticated dentifrices as an additive for prevention of dental caries. On the other hand, in the sugar industry, the addition of a fungal dextranase could improve the efficiency of raw sugar processing. The uses of dextranases had also been extended to structural studies of glucose polymers and purification processes.

In this study, *Paecilomyces lilacinus* was selected as the best fungal source to dextranase production among 19 different fungi strain. Culture medium and the production conditions of dextranase were optimized. The highest production of dextranase was obtained when 10g/L dextran was used as the carbon source and 0.5 g/L NaNO₃ as the nitrogen source at 30°C, pH 6, 100 rpm for 7 days with the 2x10⁵ inoculation dosage. Factors affecting enzyme activity were also found. The basic parameters, i.e. reaction time, pH, temperature, and substrate concentration, were standardized. The enzyme showed optimal activities at pH 5 and 50°C, meanwhile stable over a pH range from 4.0 to 8.0 at for 24 h and stable over a day at 50°C. Dextranase was inactivated by CuSO₄.5H₂O, K₂Cr₂O₇, CdCl₂ and HgCl₂. Dextranase production from the immobilized cells of *P.lilacinus* on various supports was carried out for 6 cycles. The enzyme activity of whole cells immobilized in agar and alginate beads was very high at the first cycle, while the dextranase activity from polyurethane sponge cubes was the highest at the fourth cycle.

Keywords: Dextranase, dextran, fungi, immobilization, industrial enzyme, *Paecilomyces lilacinus*.

Advisor: Prof Dr Emir CANSUNAR, Hacettepe University, Science Faculty, Department of Biology, General Biology Section

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi boyunca fikirleri ve yardımlarıyla desteğini daima sürdüren, rehberliğiyle bana yol gösteren tez hocam Sayın Prof Dr. Emir Cansunar' a, değerli önerileriyle tezimin tamamlanmasına katkıda bulunan, tez izleme komitelerinde ve tez jürimde bulunan hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bana sunduğu laboratuvar imkanlarından dolayı Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr. Nilüfer Aksöz' e, bu çalışmada kullandığım mikroorganizmanın temin edilmesini sağlayan Sayın Prof Dr. Nevin Keskin' e ve fungusun identifikasyonunu gerçekleştiren Sayın Doç Dr. Alev Haliki' ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her zor anımda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak hiçbir yardımı esirgemeyen Dr. Işıl Seyis'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimde kullandığım fungusun identifikasyon çalışmalarında büyük emeği olan, ayrıca her konuda desteğini aldığım sevgili arkadaşım Bihter Hansoylu' ya, elektron mikroskop çalışmalarında yardımcı olan Evren Çubukçu' ya, ayrıca bana destek olan Biyoteknoloji ve Genel Biyoloji Anabilim Dalı' ndaki çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Sadece tezimde değil, hayatım boyunca hep arkamda olan anneme ve babama, bir gün bile eksik etmediği destek ve sevgisiyle bana hep cesaret veren eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 0601601002 no.lu Lisans Üstü Öğrenim Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir, üniversitemiz Bilimsel Araştırmalar Birimi' ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Endüstriyel Enzimler	3
2.2. Dekstranın Yapısı ve Özellikleri	5
2.2.1. Dekstranın molekül ağırlığı	8
2.3. Dekstranın Uygulama Alanları	9
2.3.1. Stabilize ediciler.....	9
2.3.2. İki faz ayrımı	9
2.3.3. Serum solüsyonları	9
2.3.4. Kozmetikler	10
2.3.5. Dekstran kompleksleri	10
2.3.6. Dekstranlar ile kolona spesifik ilaç kullanımı.....	11
2.3.7. Gıda endüstrisi uygulamaları	12
2.3.8. Dekstranın Sindirimi.....	13
2.4. Dekstran Hidrolize Eden Enzimler	14
2.4.1. Dekstran hidrolize eden enzimlerin sınıflandırılması.....	14
2.4.2. Dekstran hidrolize eden enzimlerin kaynakları.....	15
2.4.3. Fungusların sentezlediği endodekstranazlar (EC 3.2.1.11)	18
2.4.4. Bakterilerin sentezlediği endodekstranazlar	19
2.4.5. Glukoz oluşturan ekzodekstranazlar.....	19
2.4.6. İzomaltoz oluşturan ekzodekstranazlar.....	20
2.4.7. İzomaltotrioz oluşturan ekzodekstranazlar.....	20
2.4.8. Dallanmış ekzodekstranazlar.....	20
2.4.9. Sikloizomalto-oligosakkarit glukano transferaz	21
2.5. Dekstranazların Biyolojik Fonksiyonları	21
2.5.1. Dekstran üreten mikroorganizmalarda dekstranazın rolü	21
2.6. Dekstranazların Kullanım Alanları.....	23
2.6.1. Şeker prosesinde dekstranaz	23
2.6.2. Diş sağlığında dekstranaz	27
2.6.3. Biyomateryallerde dekstranaz.....	28
2.6.4. Biosensörlerde dekstranaz	30
2.6.5. Endokardit tedavisinde dekstranaz	30
2.7. Hücre İmmobilizasyonu	32
2.7.1. Hücre immobilizasyon teknikleri.....	34
2.7.1.1. Yüzeye bağlanma	34
2.7.1.2. Bariyer arkasında alıkoyma	36
2.7.1.3. Hücrelerin kendiliğinden kümelenmesi	37
2.7.1.4. Porlu matriks içinde tutuklama	38
2.8. Alternatif Üretim Ortamları Olarak Atıklar	40
2.8.1. Şeker fabrikası atığı melas	40
2.8.2. Zeytin fabrikası atığı pirina.....	41

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Ekim ve Üretimi	44
3.2. Funguslarda Dekstranaz Enziminin Taranması İçin Uygun Besiyerinin Hazırlanması	44
3.3. Ekim	45
3.4. Kültürlerde Üremenin Ölçümü	46
3.5. Ayraçların Hazırlanması	46
3.5.1. Dinitro Salisilik Asit (DNS) ayracının hazırlanması	46
3.5.2. Lowry ayracının hazırlanması	47
3.6. Glukoz Standardı Çizilmesi	47
3.7. Enzim Aktivitesinin Ölçümü	47
3.8. Protein Standardı Çizilmesi	48
3.9. Protein Ölçümü	48
3.10. <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' ta Enzim Üretim Ortamı İçin Uygun Besiyerinin Seçilmesi ve Hazırlanması	49
3.11. <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' un Dekstranaz Üretimini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşulların Saptanması	50
3.11.1. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin saptanması	50
3.11.2. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığının saptanması	51
3.11.3. Dekstranaz üretimi için optimum başlangıç pH değerinin saptanması	51
3.11.4. Dekstranaz üretimi için optimum çalkalama hızının saptanması	51
3.11.5. Dekstranaz üretimi için optimum inokülasyon miktarının saptanması	52
3.11.6. Değişik karbon kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	52
3.11.7. Karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	53
3.11.8. Değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	53
3.11.9. Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	53
3.12. Reaksiyon Ortamında <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' tan Üretilen Dekstranaz Aktivitesini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşulların Saptanması	54
3.12.1. Inkübasyon süresinin dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması	54
3.12.2. Inkübasyon sıcaklığının dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması	55
3.12.3. Inkübasyon pH'sının dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması	55
3.12.4. Inkübasyon substrat konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması	55
3.13. Dekstranaz Enziminin Kararlılığının Saptanması	56
3.13.1. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığının saptanması	56
3.13.2. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresinin saptanması	56
3.13.3. Dekstranaz enziminin pH kararlılığının saptanması	57
3.14. Dekstranaz Eldesi İçin Artıkların Alternatif Besiyerleri Olarak Kullanılması	57

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.14.1. Alternatif besiyeri olarak melas kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	57
3.14.2. Alternatif besiyeri olarak pirina kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	58
3.14.3. Alternatif besiyeri olarak melas ve pirinanın beraber kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	58
3.14.4. Alternatif besiyeri olarak artıklar ve dekstranın beraber kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	59
3.15. Çeşitli Maddelerin Dekstranaz Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi.....	59
3.16. <i>Paecilomyces lilacinus</i> Hücrelerinin Tutuklanması ve Tutuklanmış Mikroorganizmadan Dekstranaz Enziminin Üretimi	60
3.16.1. Agara tutuklama çalışmaları	61
3.16.2. Kalsiyum alginata tutuklama çalışmaları	62
3.16.3. Poliüretan süngere tutuklama çalışmaları	63
3.16.4. Tutuklanmış ve serbest <i>P. lilacinus</i> hücreleri ile dekstranaz üretiminin karşılaştırılması	66
3.16.5. Tutuklanmış <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitelerindeki değişimin saptanması	66
3.16.5.1. Agara tutuklanmış <i>P. lilacinus</i> hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması	67
3.16.5.2. Kalsiyum alginata tutuklanmış <i>P. lilacinus</i> hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması	68
3.16.5.3. Süngere tutuklanmış <i>P. lilacinus</i> hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması	69
3.16.6. Süngere tutuklanmış <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin elektron mikroskobu görüntüleri	70
4. BULGULAR.....	75
4.1. Fungusların Dekstranaz Aktivitesi Bakımından Taranması	75
4.2. <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' ta Enzim Üretim Ortamı İçin Uygun Besiyerinin Seçilmesi ve Hazırlanması	77
4.3. <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' un Dekstranaz Üretimini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşullar.....	78
4.3.1. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon süresi	78
4.3.2. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığı.....	79
4.3.3. Dekstranaz üretimi için optimum başlangıç pH değeri	80
4.3.4. Dekstranaz üretimi için optimum çalkalama hızı	81
4.3.5. Dekstranaz üretimi için optimum inokülasyon miktarı	82
4.3.6. Değişik karbon kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi	83
4.3.7. Karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi	84
4.3.8. Değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi.....	85
4.3.9. Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi.....	86
4.4. Reaksiyon Ortamında <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' tan Üretilen Dekstranaz Aktivitesini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşullar	87
4.4.1. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon süresinin dekstranaz aktivitesine etkisi.....	87
4.4.2. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon sıcaklığının dekstranaz aktivitesine etkisi.....	88

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.4.3. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon pH'sının dekstranaz aktivitesine etkisi.....	89
4.4.4. Reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisi.....	90
4.5. Dekstranaz Enziminin Kararlılığı.....	91
4.5.1. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığı.....	91
4.5.2. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresi.....	92
4.5.3. Dekstranaz enziminin pH kararlılığı.....	95
4.6. <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' tan Dekstranaz Eldesi İçin Alternatif Besiyeri Ortamları Denenmesi	96
4.6.1. Alternatif besiyeri ortamı olarak melas kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	96
4.6.2. Alternatif besiyeri ortamı olarak pirina kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması	97
4.6.3. Alternatif besiyeri ortamı olarak melas ve pirinanın beraber kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması.....	98
4.6.4. Alternatif besiyeri ortamı olarak kullanılan artıklara dekstran eklenmesiyle oluşturulan besiyerinin dekstranaz üretimine etkisinin saptanması.....	99
4.7. Çeşitli Maddelerin Dekstranaz Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi.....	100
4.8. <i>Paecilomyces lilacinus</i> Hücrelerinin İmmobilizasyonu ve İmmobilize Mikroorganizmadan Dekstranaz Enziminin Üretimi	102
4.8.1. İmmobilize ve serbest <i>P. lilacinus</i> hücreleri ile dekstranaz üretiminin karşılaştırılması.....	102
4.8.2. Agara immobilize edilmiş <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması.....	103
4.8.3. Kalsiyum alginata immobilize edilmiş <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması.....	104
4.8.4. Poliüretan süngere immobilize edilmiş <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması.....	105
4.8.5. İmmobilize <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin farklı matrikslerdeki karşılaştırılması	106
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	107
KAYNAKLAR.....	133
ÖZGEÇMİŞ	148

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Çeşitli endüstriyel enzim sektörlerinin payları	4
Şekil 2.2. Dekstranın yapısı	6
Şekil 2.3. Sukrozun kimyasal yapısı	6
Şekil 2.4. Dekstran kontaminasyonuna maruz kalmış ve uzamış şeker kristalleri ..	24
Şekil 2.5. Basit bir IPN materyalinin şematik olarak gösterilmesi	29
Şekil 2.6. Kalpte meydana gelen oluşumlar	31
Şekil 2.7. İmmobilize hücre sisteminin komponentleri	32
Şekil 2.8. Yüzeye bağlanma yönteminin şematize edilmiş şekli	36
Şekil 2.9. Bariyer arkasında alıkoyma yönteminin şematize edilmiş şekli	37
Şekil 2.10. Hücrelerin kendiliğinden kümelenmesi yönteminin şematize edilmiş şekli	37
Şekil 2.11. Porlu matriks içine tutuklama yönteminin şematize edilmiş şekli	38
Şekil.3.1. Neubauer hemasitometre	45
Şekil 3.2. Diyaliz işleminin şematik görünümü	60
Şekil 3.3. Petri kabındaki spor süspansiyonu- agar karışımı	61
Şekil 3.4. <i>P.lilacinus</i> hücrelerinin tutuklandığı agar boncukları	62
Şekil 3.5. Ca-alginat boncuklarının oluşturulduğu düzenekler	64
Şekil 3.6. <i>P.lilacinus</i> hücrelerinin tutuklandığı Ca-alginat boncukları	64
Şekil 3.7. <i>P.lilacinus</i> hücrelerinin tutuklandığı sünger küp	65
Şekil 3.8. Agara tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren boncukların inkübasyon öncesinde (a) ve 6 döngü sonundaki (b) şekil değişikliği. ...	67
Şekil 3.9. Kalsiyum alginata tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren boncukların inkübasyon öncesi (a) ve 6 döngü sonundaki (b) şekil değişikliği.	68
Şekil 3.10. Süngere tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren küplerin inkübasyon öncesi (a) ve 6 döngü sonundaki (b) şekil değişikliği.	69
Şekil 3.11. Serbest haldeki <i>P.lilacinus</i> hücreleri, (5000x büyütme)	70
Şekil 3.12.a) Tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren poliüretan sünger (86x büyütme)	71
Şekil 3.12.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (86x büyütme)	71
Şekil 3.13.a) Tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren poliüretan sünger (250x büyütme)	72
Şekil 3.13.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (250x büyütme)	72
Şekil 3.14.a) Tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren poliüretan sünger (1000x büyütme)	73
Şekil 3.14.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (1000x büyütme)	73
Şekil 3.15.a) Tutuklanmış <i>P.lilacinus</i> hücrelerini içeren poliüretan sünger (2000x büyütme)	74
Şekil 3.15.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (2000x büyütme)	74
Şekil 4.1. Funguslarda dekstranaz üretimi ile bağlantılı üreme değerleri.	75
Şekil.4.2. Funguslarda dekstranaz üretimi.	76
Şekil 4.3. <i>Paecilomyces lilacinus</i> ' un değişik besiyerlerindeki dekstranaz aktivitesi ve üreme grafiği	77
Şekil 4.4. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon süresi	78
Şekil 4.5. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığı	79
Şekil 4.6. Dekstranaz üretimi için optimum başlangıç pH değeri	80
Şekil 4.7. Dekstranaz üretimi için optimum çalkalama hızı	81
Şekil 4.8. Dekstranaz üretimi için optimum inokülasyon miktarı	82
Şekil 4.9. Değişik karbon kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi	83

Şekil 4.10. Karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi	84
Şekil 4.11. Değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi	85
Şekil 4.12. Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi	86
Şekil 4.13. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon süresinin dekstranaz aktivitesine etkisi.....	87
Şekil 4.14. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon sıcaklığının dekstranaz aktivitesine etkisi.....	88
Şekil 4.15. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon pH'sının dekstranaz aktivitesine etkisi.....	89
Şekil 4.16. Reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisi.....	90
Şekil 4.17. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığı.....	91
Şekil 4.18. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresi(1/2 – 7 saat)	93
Şekil 4.19. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresi (1-8 gün).....	94
Şekil 4.20. Dekstranaz enziminin pH kararlılığı	95
Şekil 4.21. Besiyeri olarak değişik oranlarda melas kullanımının dekstranaz üretimine etkisi.	96
Şekil 4.22. Besiyeri olarak değişik oranlarda pirina kullanımının dekstranaz üretimine etkisi.	97
Şekil 4.23. Besiyeri olarak değişik oranlarda melas ve pirinanın birlikte kullanımının dekstranaz üretimine etkisi.....	98
Şekil 4.24. Besiyeri olarak kullanılan melas ve pirina ortamlarına dekstran eklenmesinin dekstranaz üretimine etkisi.	99
Şekil 4.25. Çeşitli maddelerin dekstranaz enzim aktivitesine etkileri	101
Şekil 4.26. Agara, kalsiyum alginata ve süngere immobilize edilen hücreler ile serbest hücrelerin dekstranaz üretiminin karşılaştırılması.	102
Şekil.4.27. Agara immobilize edilmiş <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin altı döngü boyunca kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması.....	103
Şekil 4.28. Kalsiyum alginata immobilize edilmiş <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin altı döngü boyunca kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması.....	104
Şekil 4.29. Poliüretan süngere immobilize edilmiş <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin altı döngü boyunca kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması.....	105
Şekil 4.30. İmmobilize <i>P. lilacinus</i> hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin farklı matrikslerde birbiri ile karşılaştırılması	106

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Mikroorganizmalardan elde edilen bazı dekstran hidroliz eden enzimler.	16
Çizelge 2.2. Hücre immobilizasyon yöntemleri	35
Çizelge 2.3. İmmobilize hücrelerle üretilen bazı enzimler ve immobilizasyon yöntemleri	39
Çizelge 2.4. Melasın bazı özellikleri	41
Çizelge 2.5. Pirina ve pirina yağı üretim aşamaları	42
Çizelge 2.6. Taze ve işlenmiş pirinanın bileşimi	43
Çizelge 3.1. Funguslarda dekstranaz enziminin taranması için kullanılan besiyeri içeriği	45
Çizelge 3.2. Besiyeri A' nın içeriği	49
Çizelge 3.3. Besiyeri B' nin içeriği	49
Çizelge 3.4. Besiyeri C'nin içeriği	50
Çizelge 3.5. Süngerin fiziksel özellikleri.....	65

1. GİRİŞ

Çok sayıdaki endüstriyel enzim arasında yer alan dekstranaz enzimi (α -1,6-D-glukan-6-glukanohidrolaz; EC3.2.1.11), dekstranın α -1-6 glikozidik bağının hidrolizini katalizlemektedir. Dekstran, α -1,6 ve çok sayıdaki yan zincirlerin α -1,2, α -1,3 veya α -1,4 bağlarıyla ana zincire bağlanmış D-glukoz ünitelerinden oluşmuş yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin ortak adıdır. Dekstranı yıkan enzimler, değişik karbohidraz ve transferaz gruplarından form almaktadır (Khalikova et al., 2005).

Dekstranaz enziminin, hayvan ve insan dokularında, yüksek bitkilerde, fungus, bazı maya ve bakterilerde bulunduğu bildirilmiştir. Ancak dekstranı yıkabilen enzimlerin en iyi üreticilerinin filamentöz funguslar olduğu ve bu mikroorganizmaların, ekstraselüler endodekstranazları en fazla miktarda sentezledikleri belirtilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar da, funguslar üzerinde yoğunlaşmaktadır (Rogalski et al., 1997).

Dekstranaz enzimi, dekstran polimerinin yıkımını gerçekleştirdiğinden, uygulama alanları çeşitlilik göstermektedir. Bu enzimin, özellikle çeşitli problemler yaratan mikrobiyal oluşumlu dekstran birikimlerini depolimerize edebilmesi, önemli endüstriyel uygulamalara sahip olmasının sebebi olarak gösterilebilir (Khalikova et al., 2005).

Dekstranaz enziminin başlıca kullanım alanı olarak şeker üretim endüstrisi gösterilebilir. Mikrobiyal kaynaklı dekstran oluşumu, şeker prosesinde çok sayıda probleme yol açmaktadır. Bu problemlerin çözümü için ise en pratik yol, dekstranaz enziminin işlemler sırasında kullanılmasıdır. Bunun yanı sıra diş plağı oluşumunda da bakteriyel kaynaklı dekstran söz konusu olduğundan, dekstranaz enziminin bu dental plak oluşumunu engellediği, ve bu konuda çalışmalar olduğu bilinmektedir. Ayrıca tıp ve biyokimya alanındaki bazı çalışmalarda, dekstran polimerinin yıkımı için dekstranaz kullanılmaktadır (Eggleson and Monge, 2004; Abdel-Naby et al., 1999; Rogalski et al., 1997; Safarik, 1990).

Bu çalışmada fungal bir kaynak olarak *Paecilomyces lilacinus*’ tan dekstranaz enziminin eldesi amaçlandı. Bu fungustan dekstranaz üretimi sürecinde, besiyeri ve fiziksel koşulların optimizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra enzimin aktivitesini etkileyen fizyolojik koşullar incelenerek optimize edildi. Bunun ardından, elde edilen enzimin kararlılık süreçleri ve bazı iyonların enzime etkileri incelendi. Son olarak dekstranaz enzimi, agar, sodyum alginat ve poliüretan sünger gibi çeşitli matrikslere immobilize edilmiş *Paecilomyces lilacinus* hücrelerinden üretildi ve bu üretim sonunda elde edilen enzim, serbest hücrelerden elde edilen enzim ile karşılaştırıldı. Tüm bu çalışmalar sonucunda, dekstranaz için yaygın bir kaynak olmayan *Paecilomyces lilacinus* ‘tan, miktar ve kalite olarak endüstriyel anlamda iyi değerlere sahip dekstranaz enzimi eldesi gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endüstriyel Enzimler

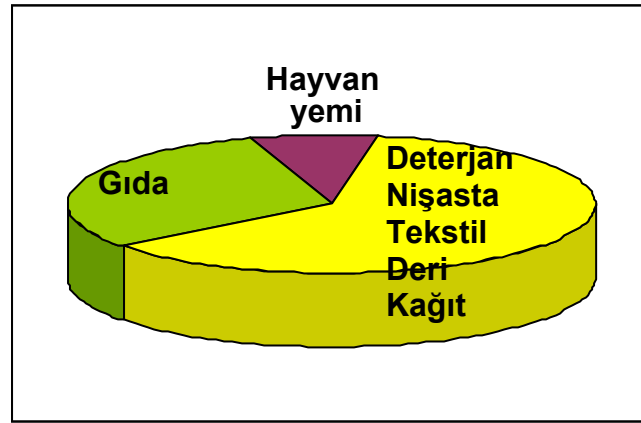
Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen, sahip oldukları biyolojik aktivite sayesinde organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks protein molekülleridir. Enzimlerin, diğer katalizörlerden farklı olan özellikleri, son derece hızlı çalışmaları, reaksiyonları özgül olarak kataliz etmeleri ve bu biyokimyasal reaksiyonları az enerji ile başarmalarıdır (Gözükara, 1994). Enzimler in vitro koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmalardan üretilip izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Enzimlerin bu şekilde endüstriyel süreçlerde kullanılmaları işlemleri topluca “enzim teknolojisi” olarak bilinir. Enzim teknolojisi, mikrobiyal işlemler (üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.), enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri (büyük ölçekte üretimi için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar), katalitik etkinliğin artırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği), izolasyonları ve immobilizasyonları (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar (Topal, 2007).

Enzimlerle ilgili ilk çalışmalar, 1760 ile 1825 yılları arasında Berzellius’ un gözlemleri ile başlamıştır. Berzellius, buğdaygillerden elde edilen enzim karışımının nişastayı parçaladığını fark etmiştir. Bunun üzerine enzimlerle ilgili sistematik çalışmalar başlamış ve bu çalışmalar günümüze kadar devam etmiştir. Enzimler bugün hücre dışına çıkmış ve günlük hayatımızın içine girerek pek çok endüstride kullanım alanı bulmuştur (Gözükara, 1994).

Enzim endüstrisi, modern biyoteknoloji sayesinde, özellikle son 40 yıldır hızlı bir ilerleme kaydetmiştir. Doğada bulunan enzimler, bildiğimiz gibi çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Enzimlerin kullanıldığı pek çok işlem, hem kendiliğinden üreyen mikroorganizmalardan, hem de mikroorganizmaların ortama eklenerek hazırlandığı koşullara bağlı gerçekleşir. Rekombinant gen teknolojisi ile üretim daha da gelişmiş ve ticari enzimlerin kolaylıkla elde edilmesi mümkün hale

gelmiştir. Bunun yanı sıra modern biyoteknolojideki son gelişmelerle birlikte protein mühendisliği, endüstriyel enzimlerin ilerleme kaydetmesini sağlamıştır. Dünya çapındaki endüstriyel enzim kullanımı, 1995' te 1 milyar dolar iken, 2000 yılında 1,5 milyar dolara yükselmiştir (Kirk et al., 2002).

Enzim sektöründe en büyük dilimi olan, teknik enzim olarak adlandırılan dilim, % 65' lik kullanımı ile deterjan, nişasta, tekstil, deri, kağıt ve kağıt ürünleri ile kişisel bakım ürünlerini içine almaktadır (Şekil 2.1). Gıda enzimleri, pazarın % 25'lik kısmında ikinci büyük dilimde yer alır. Bunlar da süt ve süt ürünleri, ekmek, pasta mamulleri, şarap ve meyve suları, bira ile yağ endüstrilerini içerirler. Üçüncü olarak da hayvan yemi sanayinde kullanılan enzimler, % 10'luk bir dilimde yer alırlar (Cherry and Fidantsef, 2003; Kirk et al., 2002).



Şekil 2.1. Çeşitli endüstriyel enzim sektörlerinin payları (Kirk et al., 2002).

Enzimler, kimyasal katalizör görevlerinden öte, önemli ve giderek daha da önem kazanan avantajlar sağlarlar. Yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilmeleri, biyolojik olarak yıkılabilmeleri, sıcaklık ve pH'nın ılımlı koşullarında çalışabilmeleri ve reaktan ile ürün stereo kimyasına karşı oldukça duyarlı seçicilikleri, enzimlerin bazı avantajlarından. Enzimler, sundukları avantajlarla bazı kimyasalların yerini almalarına rağmen, çok ucuz maliyetli olan, oturmuş geleneksel kimyasal işlemlerle yine de rekabet etmek zorundadırlar. Modern biyoteknolojideki gelişmelerle birlikte, özellikle de geniş ölçekli fermantasyon ve rekombinant DNA teknolojisi sayesinde sadece enzimler ekonomik olarak uygun hale getirilmekle kalmamış, aynı zamanda inorganik solventler gibi farklı doğal olmayan

ortamlarda performans gösterebilen çeşitli enzimler yaratılmıştır (Cherry and Fidantsef, 2003).

Bugün, endüstriyel enzimlerin % 90' ı, maksimum ürün saflığı ve üretim maliyetinin düşürülmesi için rekombinant olarak üretilmektedir. Ekspresyonu ise, istenmeyen bölge aktiviteleri uzaklaştırılarak ve genlerin ekspresyonu artırılarak modifiye edilmiş fungal veya bakteriyel bir konakta uygulanmaktadır. Bu şekilde normalin 4 katı ürün eldesi sağlanmaktadır. Enzimleri özel endüstriyel proseslere uyarlamak için bazı teknikler geliştirilmiştir. Bazı PCR metodları, kaset mutagenesi ve doyma mutagenesi, hedef geni kendiliğinden değiştirmek için farklı derecelerde başarıyla çalışırlar (Beilen and Li, 2002; Cherry and Fidantsef, 2003).

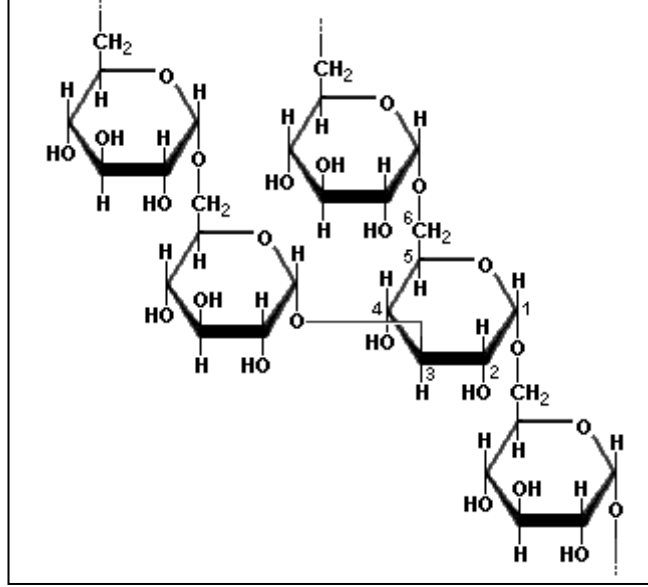
Endüstriyel enzimler arasında yer alan dekstranaz enzimi, yüksek bitkilerde, memeli dokularında, fungus, bazı maya ve bakterilerde bulunan bir enzimdir. Dekstranaz enzimi (α -1,6-D-glukan-6-glukanohidrolaz), bir polisakkarit olan dekstranın α -1-6 glikozidik bağının hidrolizini katalizler. Dekstran, α -1,6 bağlarıyla bağlanmış α -D-glukopiranoz moleküllerinin oluşturduğu bir homoglukandır. Glukoz omurgasındaki dallanma nedeniyle dekstran polimerleri, zincir uzunlukları ve fizikokimyasal özellikleri açısından dikkat çekici bir çeşitliliğe sahiptir. Önceleri, bu enzimler sadece endo ve ekzodekstranazlar olarak sınıflandırılmaktaydı, ancak farklılıkları sebebiyle bu enzimler substratlarına ve ürünlerine göre gruplara yerleştirilerek daha detaylı olarak tanımlanmaya başlandı (Khalikova et al., 2005).

Dekstranaz enziminin yapı ve özelliklerine geçmeden önce, bu enzimin hidroliz ettiği dekstran polimerinin yapısına ve bazı özelliklerine değinilecektir.

2.2. Dekstranın Yapısı ve Özellikleri

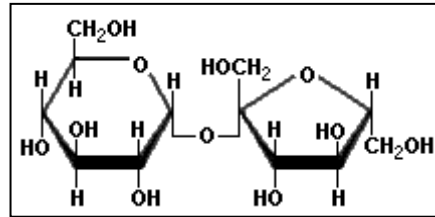
Dekstran, α -1,6 ve çok sayıdaki yan zincirlerin α -1,2, α -1,3 veya α -1,4 bağlarıyla ana zincire bağlanmış D-glukoz ünitelerinden oluşmuş yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin ortak adıdır (Şekil 2.2).

Sukrozdan bu glukanoları sentezleyen enzimler, genel terimiyle dekstransukraz olarak bilinirler (1,6- α -D-glukan-6- α -glukoziltransferaz, EC2.4.1.5.). Dekstranlar, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfrancisco* ve bazı *Streptococcus* türüne ait bakteriler ile bazı *Rhizopus* türleri tarafından üretilirler (Sidebotham, 1974).



Şekil 2.2. Dekstranın yapısı (www.scientificpsychic.com, 2008)

Diğer dekstran üreten bakteriler, *Acetobacter capsulatus* (yeni adıyla *Glucanobacter oxydans*) ve *Acetobacter viscosus*, dekstrin dekstranazları üretirler (EC2.4.1.2), ki bu enzim de dekstrinleri dekstranlara dönüştürür. *Leuconostoc mesenteroides* türleri indüklenebilir ve son zamanlarda izole edilmiş mutant türleri hariç, dekstran biyosentezi için ortamlarında sukroza gereksinim duyar (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Sukrozun kimyasal yapısı (www.scientificpsychic.com, 2008)

Streptococcus türüne ait bakteriler, genellikle konstitütiftir ve enzim ekspresyonu için üreme ortamlarında sukroza gereksinim duymazlar (Eifuku et al. 1989; Sims et al., 2001).

Dekstransukraz, ana zincirinde % 50 veya daha fazla α -1,6 glukozidik bağ içeren glukan sentezini katalizler. Bakteriyel dekstranların yapıları ve özellikleri, mikrobiyal türler ile üreme oranları ve reaksiyon koşullarına göre değişebilir. Dallanmış zincirlerin pozisyonu, dallanma derecesi, dallanmış zincirin uzunluğu ve molekül ağırlığının dağılımı, dekstranın fizikokimyasal özelliklerini etkiler. Örneğin, dallanma derecesi arttıkça, suda çözünürlük derecesi düşer. Bir başka deyişle, % 43' ten daha fazla dallanmış 1,3- α zincirlerine sahip dekstran, suda çözünmez olarak tanımlanır (Mehvar, 2000).

Leuconostoc mesenteroides' in önemli suşları olan NRRL B-512 ve B-512F'den elde edilen en geniş ölçüde çalışılmış dekstransukraz, α -1,6 bağlı dekstran zincirleriyle beraber, düz zincirli yaklaşık %5'lik rastgele dağılmış α -1,3 dallı, 50-100 kadar kısmı sentezler. Uzun dallar dekstranın özellikleri için önemli faktörlerdir. Bunun yanı sıra diğer *Leuconostoc* türlerinin glukanların sentezini sonuçlandıran, suda çözünebilir fraksiyonların ve suda çözünmeyen veya daha az çözünebilir kısımları içeren bazı dekstransukrazları ürettiği bilinir (Santos, 2000).

Leuconostoc mesenteroides'in B-1299 suşu, 2 tip dekstran sentezleyebilen hem ekstraselüler hem de intraselüler dekstransukraz üretir. Bunlar, %27 α -1,2 ve %1 α -1,3 dala sahip L fraksiyonu ile %35 α -1,2 dallı zincire sahip S fraksiyonlarıdır. *Leuconostoc mesenteroides* B-742 şusunun da α -1,6 dallara ek olarak, %14 α -1,4 ve %1 α -1,3 dallı L fraksiyonu ile %50 α -1,6, %50 α -1,3 dallarını içeren ve hiç α -1,4 dallı zinciri olmayan S fraksiyonunu üreten 2 tip dekstransukrazı ifade ettiği bildirilmektedir (Kim and Robyt, 1995).

Düşük düzeyde dallı dekstranlar, *Penicillium* türlerine ait endodekstranazlar tarafından hidrolize edilebilir, ancak *Leuconostoc mesenteroides*'in B-1142, B-742 ve B-1299 suşları tarafından üretilen yüksek düzeyde dallanmış dekstranlar, endodekstranaz hidrolizine dirençlidir. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355

suşu, 2 farklı glukan sentezler. L fraksiyonu, *Leuconostoc mesenteroides* B-512 dekstranına benzer, ancak S fraksiyonu değişik sırası olan %53 α -1,6 ve α -1,3 dallara sahiptir ve alternan olarak adlandırılır (Misaki,et al., 1980).

Streptokoklar tarafından üretilen glukanların detaylı kimyasal yapı ve özellikleri, pek çok yayında gösterilmiştir. Bazı *Streptococcus* türüne ait bakteriler, 2 grup glukosiltransferaz oluşturmaktadır. Bunlar, önceden dekstranlar olarak sınıflandırılan suda çözünebilir glukanları sentezleyen α -1,6 bağları içerenler ve suda çözünmeyen glukanları sentezleyenlerdir. *Streptococcus mutans* OMZ176'nın sentezlediği suda çözünmeyen glukan, %90 α -1,3- glukozidik bağ zincir içerir. Bunun aksine, *Streptococcus sanguis* 804'ten elde edilen jelatinsi glukan, normal miktarda α -1,3 ve α -1,6 glukozidik bağ içerir (Khalikova et al., 2005).

2.2.1. Dekstranın molekül ağırlığı

Molekül ağırlıkları 1000 ile 2.000.000 arasında değişebilmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı dekstranlar, daha az dallanma gösterirken, moleküler ağırlık dağılım alanını daraltırlar. Molekül ağırlığı 10.000'in üzerinde olan dekstranlar, oldukça dallanmış yapıdadırlar. Molekül ağırlığı arttıkça dekstranlar daha fazla simetri kazanırlar. Molekül ağırlığı 2.000'den az olanlar, daha çok çubuksu yapıda iken 2.000-10.000 arasındakiler daha sarmal yapı gösterirler. Fraksiyonların molekül ağırlıkları anahtar özellik taşıyıcı ve fraksiyonları karakterize etmek için jel kromatografisinden yararlanılır. Dekstran fraksiyonları, esnek ve genişletilmiş polimerler gibi davranırlar ve solüsyon içinde genişleyebilir sarmal şeklinedirler (Dextran fractions, 2001).

2.3. Dekstranın Uygulama Alanları

2.3.1. Stabilize ediciler

Enzimleri, mikroorganizmaları, liyofilizasyon ve vakumla kurutma esnasında hücreleri stabilize edebilmektedir. Stabilizasyon özelliği, özellikle aşılama da oldukça önem kazanmaya başlamıştır. Dekstran, gevşek biyomoleküllerin kuru ortamda biyokorunumu için yeni bir metot geliştirilmesini sağlamaktadır. İşlem, kurutma sırasında donuk faza çevrilirken ortama dekstran veya benzeri bir maddenin eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Dekstranın, donma-erime sırasında krioprotektif ajan (donmayı önleyici) olarak ortama eklenmesi, literatürde yer almaktadır. Solüsyon içindeki hassas biyomoleküllerin stabilitesinin arttırılmasında dekstranın % 20 gibi düşük konsantrasyonlarının etkili olduğu gözlenmiştir (Dextran fractions, 2001).

2.3.2. İki faz ayrımı

Sulu iki faz sistemleri biyomoleküller ve hücre altı partiküller için başarılı bir ayırım yöntemidir. Dekstranın da % 6 gibi düşük konsantrasyonlarının polietilen glikol ile birlikte kullanılması, nükleik asitler, virüsler, enzimler, ve diğer proteinlerin fraksiyonlarına ayrılmasında kullanılmaktadır (Walter et al., 1985).

2.3.3. Serum solüsyonları

Uygun organlarda soğuk depolama için serum solüsyonlarına dekstran eklenmesi oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu sayede hücre bütünlüğü korunur, hücrenin şişmesi önlenir ve hücre, serbest radikal hasarından korunmuş olur (Howden et al., 1990).

2.3.4. Kozmetikler

Dekstran, kozmetiklerin bileşeni olmak için pek çok çekici özelliğe sahiptir. Bunlar arasında nötral ve suda çözünebilen bir madde olması, yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilmesi, kusursuz biyouygunluğa ve klinik olarak güvenli kullanıma sahip olması, yüksek saflık derecesinde kullanışlı olması, çok fazla nemlendirici özelliğe sahip olması ve viskozitesinin, pH' ya bağımlı olmaması sayılabilir (Dextran fractions, 2001).

2.3.5. Dekstran kompleksleri

Dekstranın sentezi ve biyolojik özellikleri, biyoaktif maddelerle birleştirilmesini mümkün kılar. Buna en iyi örnek, demir ve koloidal dekstran kompleksi ile gadolinyum-dekstran kompleksidir. Bu uygulamalar, manyetik rezonans teknikleriyle tümör taramasında çok önemli fayda sağlamıştır. Koloidal demir kompleksleri çoğunlukla domuz ve buzağı yavrularının anemi tedavisinde kullanılmaktadır (Dextran fractions, 2001).

Dekstranın, dekstran sülfonat ve dekstran sülfat gibi türevlerinin antikoagülan olarak kullanımı olduğu, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca fenilasetat-dekstran türevi (NaPaC) meme kanserinde hücre proliferasyonunu engellemekte ve bunların endotelial hücrelerle bağlantılarını modifiye etmektedir (Kosmala et al., 2000).

Dietil aminoetil dekstran, bir polikasyonik dekstran türevidir. Yüksek saflık derecesi ve kontrol edilmiş mikrobiyolojik kalitesi ile DEAE dekstran, moleküler biyoloji ve sağlık sektörü uygulamalarında çok kullanılmaktadır. Uygulamaları çeşitli tıbbi konularda olabilir. Örneğin aşı yapımı esnasında, veterinerlikte, enjeksiyondan önce antijene genellikle % 10-15 oranında eklenmektedir. DEAE dekstran hücrelerin protein ve nükleik asit alımını artırır. İnsan makrofajlarına DNA transferi teknikleri ile karşılaştırıldığında olağanüstü bir transfeksiyon sağlar. DEAE dekstranın adenovirüs kaynaklı gen terapisini herhangi bir toksisitesi olmadan arttırdığı bulunmuştur ve hücre kültürlerinde viral enfektiviteyi arttırdığı

bildirilmiştir. Bunların yanı sıra, protein stabilizasyonunda, vakumla kurutulmuş ve solüsyondaki enzimlerin etkili bir şekilde stabil kalabilmelerinde rol oynar. Örneğin gliserol kinaz yalnızca vakumla kurutulduğunda aktivite kaybına uğrar. Ancak ortamda DEAE dekstran ve laktitol varken kurutulduğunda aktivite sabit kalır. Ayrıca flokülasyon ajanı olarak su arıtımında da kullanılmaktadır (http://www.dextran.dk/deae_index.htm).

Dekstran, birçok analitik metotta ve özellikle kromatografik uygulamalarda da destek materyali olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kan açıcı, kan hacmini arttırıcı özelliğe sahip olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca glukoz polimerlerinin yapısal çalışmalarında ve saflaştırma proseslerinde uygulaması bulunmaktadır (Finnegan et al., 2004).

2.3.6. Dekstranlar ile kolona spesifik ilaç kullanımı

Günümüzde, dekstran prodruglarına karşı duyulan ilgi sürekli olarak artmaktadır. İlaç moleküllerinin dekstran molekülüne bağlandığı çeşitli dekstran içeren “prodrug”ları, mide ile ince bağırsak tarafından absorblanmaz ve bozulmadan kalır. Ancak bu prodrug, her gramında 10^{11} *Bacteroides* içeren bağırsak mikro florasına girdiğinde, dekstran zincirine rastgele bağlanır ve terminal bağlar ilacı kolonda serbest bırakır (Sinha and Kumria, 2001). Bununla ilgili ilk çalışma, 1989’da naproksenin dekstranla konjugesiyle gerçekleşmiştir. Ketoprofen-dekstran, naproksen-dekstran ve ibuprofen-dekstran, molekül ağırlığı 10.000-500.000 olan dekstranla kullanıldığında, domuzda spesifik olarak kolon bölgesinde salınımı olmaktadır (Harboe et al., 1989).

Bir başka çalışma, 72.600 molekül ağırlığındaki dekstranla yapılmıştır. Metil prednizolon ve deksametazon prodrugları dekstranla hazırlanmıştır. Glukokortikoidler dekstrana bağlanmak için fonksiyonel gruba sahip olmadığından, spacer molekül kullanılmıştır. Bunun sonucunda, dekstranın üst gastrointestinal sistemde çok az hidroliz olduğunu, buna karşılık sekal ve kolonik içerikle tamamen yıkıldığı gözlenmiştir. Bu polimerik prodrugların, yapılan çalışmalar sonucunda ilacın kendisinden daha etkili olduğu bildirilmiştir (McLeod

et al., 1994) . Bu sistem, ilacı spesifik olarak kolona taşıdığından, kolon hedefli durumlarda oldukça kullanışlıdır. Prodrugların yanı sıra, çapraz bağlayıcı ajan olarak diizosiyanat kullanılarak, ratların körbağırsağında dekstranazlarla tamamen yıkılabilir bir dekstran hidrojel elde edilmiştir. Bunun dışında yine kolona spesifik ilaç konusunda glutaraldehit çapraz bağlı dekstran kapsülleri yapılmıştır. Ayrıca kolonda yıkılabilir gastrik ve intestinal akıntılarda çözünmeyen dekstran yağ asidi esterleri sentezlenmiştir (Sinha and Kumria, 2001).

2.3.7. Gıda endüstrisi uygulamaları

Gıda uygulamalarında kullanılan, bir laktik asit bakterisi olan *Leuconostoc mesenteroides* tarafından sukroz şekerinden üretilen dekstran polisakkaritinin fırın mamullerinde kullanımı, gıda komiteleri tarafından kabul edilmiştir. Bu kullanım alanının yanı sıra dekstranlar, klinik beslenme, fruktoz şuruplarında, fermente ürünlerde ve benzeri ürünlerde de kullanılmaktadır. Ayrıca şekerleme ve dondurma ürünlerinin içeriklerinde de bulunmaktadır. Fırın mamullerinde dekstranaz kullanımı, yumuşaklık, gevreklik ve ekmek hacmi sağlamaktadır. Ancak kullanım düzeyi son üründe %5 oranında olacak şekilde ayarlanmaktadır. Dekstran ayrıca, özellikle eklenmediği halde balda da görülmektedir. Filipinler’ de yapılan ve ticari olarak satışa sunulan “nata” tatlısının içeriğini de suda çözünmeyen dekstranın meyve şuruplarıyla tatlandırılmış hali oluşturmaktadır. Dekstranın alkolde çözünmüyor olması, alkollü içecek yapımı üretimi için bu şeker ve şeker şuruplarının uygun olmadığı anlamına gelmektedir. (Scientific committee on food, 2000).

Leuconostoc mesenteroides, gıda ürünü sukrozun, dekstrana biyodönüşümünde birincil fermantasyonda kullanılır. İkincil fermantasyonda, fruktoz biyodönüşüm karışımından uzaklaştırılır. Toz formunun hazırlanabilmesi için, fermentasyon *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilir. Sıvı formda dekstran üretmek için ise, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus sanfrancisco* ile fermantasyon yapılır.

Leuconostoc mesenteroides ve *Saccharomyces cerevisiae*, “U.S. Food and Drug Administration” kuruluşu tarafından belirlenen GRAS (Generally Recognised as Safe) kategorisine girip, patojen olmayan mikroorganizmalar olarak bilinirler ve çok çeşitli gıda maddelerinin veya içeriklerinin hazırlanmasında güvenilir bir geçmişe sahiplerdir.

Leuconostoc mesenteroides, peynir başlangıç kültüründen izole edilir ve genellikle Avrupa’ daki peynir çeşitlerinin yapımında kullanılır. *Saccharomyces cerevisiae* ise pek çok gıda fermantasyon prosesinde sıklıkla kullanılan bir mayadır. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus sanfrancisco*, fermente süt ürünleri ve maya olarak kullanılan ekşi hamurun hazırlanmasında ticari olarak oldukça elverişli kullanıma sahip iki mikroorganizmadır. *Saccharomyces cerevisiae* hariç tüm türler, laktik asit bakteri kategorisine aittir ve bu bakterilerin, sukroz varlığında ekzopolisakkaritleri ürettiği iyi bilinmektedir. Son ürünlerine bakıldığında, spesifik koşullar dahil hiçbir durumda ve üründe toksin veya antibiyotik aktivitesine rastlanmamıştır (Scientific committee on food, 2000).

2.3.8. Dekstranın Sindirimi

Ratlarda ve insanlarda dekstranın oral yoldan alınması, kan şekerinin ve karaciğerdeki glikojen seviyesinin hızla artmasına sebep olmaktadır. Ratlarda sindirim ve kolonun duruma uygunluğu fazladır. Hayvan, gelişimi için sindirilmiş dekstranı kullanır. Bu polisakkarit, yalnızca bakteriyel hareketle değil, bağırsaktaki enzimlerle de hidroliz edilir. Enzimler, ince bağırsak mukozası içinde yerleşirler. Kalın bağırsak ve körbağırsak, çok az miktarda dekstran hidroliz aktivitesi gösterir. Son zamanlarda yapılan çalışmalardan alınan bilgilere göre, dekstran % 90 oranında monosakkaritlere kadar hidroliz edilmektedir ve kalan dekstran da, karboksilik asitlere fermente olmaktadır (Scientific committee on food, 2000).

Kolondaki (kalın bağırsağın altı) dekstranaz aktivitesi, anaerobik Gram (-) bağırsak bakterilerinden özellikle *Bacteroides* ile gösterilmiştir. Dekstranın ayrıca

insan dışkısında bakteriyel faaliyet ile de yıkılabildiği gözlenmiştir (Sinha and Kumria, 2001).

2.4. Dekstran Hidrolize Eden Enzimler

Dekstran hidroliz eden enzimlere ilk başlarda duyulan ilgi, dekstranın yapısını açıklamayı ve *Leuconostoc mesenteroides* tarafından kısmen hidroliz edilen dekstran polimerini elde etmeyi amaçlayan çalışmalarda görülmüştür (Ingelman, 1948). Dekstranazlar ayrıca çeşitli problemler yaratan mikrobiyal oluşumlu dekstran birikimlerini depolimerize edebildiğinden, önemli bir endüstriyel uygulamaya sahip olmuşlardır. Dekstran polimeri, birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmak üzere dekstranazlar tarafından modifiye edilebilir.

Dekstran hidroliz eden enzimler üzerine 1500'den fazla sayıda bilimsel makale ve 100' den fazla sayıda patent çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaların temeli, *Cellvibrio fulva*' dan 1940 yılında elde edilen dekstranazın rapor edilmesiyle atılmıştır. Bu güne kadar çalışılmış bir seri mikroorganizma gurubu arasında da en önemli dekstranaz kaynağı, funguslar olmuştur. Yüksek organizmaların da dekstran hidroliz etme aktiviteleri olduğu bilinse de, bu konuda oldukça kısıtlı sayıda çalışma ve yayın bulunmaktadır (Khalikova et al., 2005).

2.4.1. Dekstran hidrolize eden enzimlerin sınıflandırılması

Dekstranı yıkan enzimler, değişik karbohidraz ve transferaz gruplarından form alırlar. Bu enzimler, çalışma prensiplerine göre genellikle endo- ve ekzodekstranazlar olarak sınıflandırılırlar ve dekstranazlar olarak adlandırılırlar. Uluslararası terminolojide biyokimya ve moleküler biyoloji bilim dallarınca kabul edilmiş bir komite olan "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUB-MB) standartlarına göre, katalizlenen reaksiyonun tipine ve ürün özelliğine göre bu enzimler dekstranaz (EC3.2.1.11), gluklan-1,6- α -D-glukosidaz (EC3.2.1.70), gluklan-1,6- α -izomaltosidaz (EC3.2.1.94), dekstran-1,6- α -D-izomaltotriosidaz (EC3.2.1.95) ve dallanmış

dekstran ekzo-1,2- α -glukosidaz (EC3.2.1.115) olarak sınıflandırılmışlardır. Sikloizomaltooligosakkarit glukano-transferaz (CITase) da dekstran hidrolize edebilir. Hatta bağlantısız bir enzim olan α -glukosidaz (EC3.2.1.20) da ekzodekstranazlara (EC3.2.1.70) benzer reaksiyonları katalizleyebilir (Khalikova et al., 2005).

Bir başka sınıflandırma sisteminde glikosilhidrolazlar ve glikosiltransferazlar, aminoasit dizi benzerlikleri temel alınarak 2 aileye bölünmüşlerdir (Henrissat, 1991). “The Carbohydrate Active Enzymes” (CAZy) veri tabanına göre, glikozidik bağları yıkan, modifiye eden veya yaratan enzim aileleri tanımlanmaktadır. Dekstran hidroliz eden enzimlerin analog sınıflandırma sistemi, dekstranazlarla beraber 4 aileye ayrılmıştır. IUB-MB sistemin aksine CAZy veri tabanı, enzimlerin hem yapısal hem de mekanik özelliklerine göre dizayn edilmiştir. Değişik substrat özgüllüklerine sahip enzimler, aynı ailede bulunabilmekle beraber, aynı substratı hidroliz eden enzimler bazen farklı ailelerde yer alabilmektedir.

Dizi benzerliklerine göre, dekstran-glukosidazlar (EC3.2.1.70), glikosilhidrolaz familyası 13 ve 15’e dahil edilmiştir. İzomaltodekstranaz (EC3.2.1.94) ve izomaltotriosidaz (EC3.2.1.95), farklı yapılardadır ve sırasıyla glikosilhidrolaz ailesi 27 ve 49’a dahil edilmişlerdir. Endodekstranazlar, glikosilhidrolaz ailesi 49 ve 66’da bulunurlar (Henrissat and Davies, 2000).

2.4.2. Dekstran hidrolize eden enzimlerin kaynakları

Dekstran hidrolize eden enzimlerin canlı dokulardan ve mikroorganizmalardan bulunması ve saflaştırılması, birçok araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Mikroorganizmalardan elde edilen bazı dekstran hidroliz eden enzimler (Khalikova et al., 2005).

Enzim grubu ve kaynağı	Mikroorganizma
Endodekstranaz (EC3.2.1.11) Küf	<i>Penicillium luteum</i> (ekstraselüler)
	<i>Penicillium funiculosum</i> (ekstraselüler)
	<i>Penicillium lilacinum</i> (ekstraselüler)
	<i>Penicillium notatum</i> (ekstraselüler)
	<i>Penicillium aculeatum</i> (ekstraselüler)
	<i>Aspergillus carneus</i> (ekstraselüler)
	<i>Chaetomium gracile</i> (ekstraselüler)
	<i>Fusarium sp</i> (ekstraselüler)
	<i>Sporothrix schencki</i> (ekstraselüler)
Endodekstranaz (EC3.2.1.11) Maya	<i>Lypomyces starkeyi</i> (ekstraselüler)
Endodekstranaz (EC3.2.1.11) Bakteri	<i>Bacteroides oralis</i> (ekstraselüler)
	<i>Flavobacterium sp.</i> (ekstraselüler)
	<i>Pseudomonas sp.</i> (ekstraselüler, intraselüler)
	<i>Thermoanaerobacter sp.</i> (ekstraselüler)
	<i>Cytophaga sp.</i> (ekstraselüler)
	<i>Streptococcus sobrinus</i> (ekstraselüler)
	<i>Streptococcus mutans</i> (ekstraselüler)
	<i>Bacillus circulans</i> (ekstraselüler)
	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> (ekstraselüler)

Çizelge 2.1. (devam ediyor)

Glukoz oluşturan ekzodekstranazlar	<i>Bacteroides oralis</i> (ekstraselüler, intraselüler)
Bakteri	<i>Arthrobacter globiformis</i> (ekstraselüler)
	<i>Pseudomonas sp.</i> (intraselüler)
	<i>Streptococcus mitis</i> (intraselüler)
Glukoz oluşturan ekzodekstranazlar	<i>Lypomyces lipofer</i> (ekstraselüler)
Maya	
Glukan 1,6-α-izomaltosidaz (EC3.2.1.94)	<i>Arthrobacter globiformis</i> (ekstraselüler)
Dekstran 1,6-α-izomaltotriosidaz (EC3.2.1.95)	<i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>dextranolyticum</i> (ekstraselüler)
Dekstran endo-1,2-α-glukosidaz (EC3.2.1.115)	<i>Flavobacterium sp.</i> (ekstraselüler)
Sikloizomalto-oligosakkaritglikanotransferaz (EC3.4.1)	<i>Bacillus sp.</i> (ekstraselüler)

Buna göre dekstranaz enzimi, hayvan ve insan dokularında, yüksek bitkilerde, fungus, bazı maya ve bakterilerde bulunmaktadır. Ancak dekstran depolimerize enzimlerinin en iyi üreticilerinin filamentöz funguslar olduğu ve bu mikroorganizmaların, ekstraselüler endodekstranazları en fazla miktarda ürettikleri belirtilmiştir. Dekstranaz aktivitesi, ayrıca toprak örneklerinde de gösterilmiştir. Dekstranaz sentezleme yeteneğine sahip olan başlıca

mikroorganizmalar arasında řu türler sayılabilir: *Penicillium pinophilum*, *P. funiculum*, *P. minioluteum*, *P. purpurogenum*, *P. aculeatum*, *P. lilacinum*, *Aspergillus niger*, *A. carneus*, *A. flavipes*, *A. nidulans*, *A. ustus*, *Chaetomium gracile*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solanii*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus formosensis*, *Lipomyces starkeyi*, *Sporothrix schenckii*, *Bacillus* spp, *Brevibacterium fuscum*, *Actinomyces israeli*, *Arthrobacter globiformis*, *Flavobacterium* sp, *Pseudomonas* sp. (Dragan-Bularda and Kiss, 1972; Hattori et al., 1981; Koenig and Day, 1988; Preobrazhenskaya et al., 1974; Rogalski et al., 1997; Sidebotham, 1974; Walker, 1978).

2.4.3. Fungusların sentezlediği endodekstranazlar (EC 3.2.1.11)

Bu güne kadar pek çok dekstranaz sentezleyen fungus literatüre geçmiştir. Küf dekstranazı, 1,6- α -D-glukan 6 glukanohidrolaz (EC3.2.1.11), dekstranın rastgele bölgelerindeki α -1,6-D-glikosid bağlarının endohidrolizini katalizleyen bir enzimdir. İzomaltoz, izomaltotrioz ve küçük miktarda D-glukozla beraber, çok az miktardaki yüksek oligomerler, ana reaksiyon ürünleridir. Ancak reaksiyon ürünlerinde ve farklı kaynak dekstranazların substrat özgülüğünde değişiklikler olabilir. Örneğin, bir *Penicillium* türünden elde edilen endodekstranaz, siklodekstranları izomaltoz ve glukozu yıkar. Bütün küf dekstranazları (EC3.2.1.11) çapraz bağlı dekstran “Sephadex”i yıkabilir (Khalikova et al., 2005).

Küfler, ekstraselüler endodekstranazların en yaygın kaynağıdır ve bunun yanı sıra, bakteriler ve mayalardan çok daha yüksek enzim aktivitesi gösterirler. İntraselüler küf dekstranazları sadece *Penicillium funiculosum* NRRL 1132 ve *Penicillium lilacinum* NRRL 896 türlerinde gözlenmiştir. Küf dekstranazları ayrıca oligoşekerleri de hidroliz edebilir. D-glukoz, *Penicillium lilacinum* dekstranazı ile izomaltotrioz ve daha yüksek homologlardan, izomaltoheptozdan salınır. Hidroliz, redükte sonun ilk zincirinde gerçekleşir. Enzim ayrıca oldukça yavaş, konsantrasyon bağımlı izomaltoz yıkımını katalizler. Bu olay belki de D-glukoz ve izomaltotrioz çıkan ilk zincirin hidrolizini takiben izomaltotetraoz yoğunlaşmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Benzer bir durum, *Aspergillus carneus* ve *Penicillium luteum* dekstranazlarında da vardır (Hutson and Weigel, 1963).

2.4.4. Bakterilerin sentezlediği endodekstranazlar

Endodekstranazlar *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Streptococcus*, *Bacteroides* ve *Bacillus* türlerinden elde edilmiştir (Çizelge 2.1). Bakteriyel endodekstranazlar, fungal endodekstranazlara benzerler ve her organizma için ayrı bir çalışma şekli gösterebilirler. Selüloz yıkan bakteri *Cellvibrio fulva*, dekstranı nispeten büyük parçalara hidroliz eder. Dolayısıyla molekülün yıkımı sonucu D-glukoz veya disakkaritler gözlenmez. Örneğin anaerobik *Lactobacillus bifidus*, dallanmamış zincirli *Streptomyces bovis* veya dallanmış *Leuconostoc* dekstranında ürediğinde, elde edilen ekstraselüler endodekstranaz, oligosakkarit karışımı üretir, ancak glukoz veya izomaltos ortaya çıkarmaz (Ingelman, 1948, Khalikova et al., 2003).

Çoğu bakteriyel dekstranaz üreticisi, bazı α -glukosidazları sentezleyebilme yeteneğine de sahiptirler. Bakteriler arasında ortamda dekstran olduğunda hem ekstraselüler, hem de intraselüler dekstranazları sentezleyebilen türler bulunmaktadır (Khalikova et al., 2005).

2.4.5. Glukoz oluşturan ekzodekstranazlar

Ekzodekstranazlar, örneğin glukodekstranaz (EC3.2.1.70; glukon 1,6- α -glukosidaz), dekstranın redükte uçlarının adım adım hidrolizini katalizler ve türemiş oligosakkaritlerden sadece β -D-glukoz üretir. Hidroliz, karbon-1'in ters dönmesine eşlik eder, bu yolda yeni redükte uçlar sadece β -konfigürasyonunda salınır. Yalnızca birkaç tür bakteri ve mayanın glukodekstranazları sentezleyebildiği bilinmektedir.

Intraselüler dekstran glukosidazlar, dekstrandan α -D-glukoz üretirler ve *Streptococcus mitis*' in bazı suşlarından elde edilmişlerdir. *Streptococcus mitis* 439' dan elde edilen intraselüler enzim, glukodekstranaza oldukça yakın olan bir aktivite modeline sahiptir, ancak glukoz kısımları, α -konfigürasyonundaki bu enzimin faaliyetiyle izomaltopentoz ve dekstrandan salınır ve bu da bir glukosidaz olduğunu kanıtlamaktadır (Khalikova et al., 2005).

2.4.6. İzomaltoz oluşturan ekzodekstranazlar

Bir toprak bakterisi olan *Arthrobacter globiformis* T6' dan izole edilen izomaltodekstranaz (EC3.2.1.94; 1,6- α -D-glukan izomaltohidrolaz), redükte olmayan uçlardan izomaltoz ünitelerini başarılı bir şekilde uzaklaştırarak dekstranı hidroliz etme yeteneğine sahip yeni bir ekstraselüler ekzoenzimdir (Sawai et al., 1974). Enzimin, izomaltoz oluşturmak üzere glukooligosakkaritlerin sadece α -1,6 zincirlerini değil, bunun yanı sıra α -1,2 , α -1,3 ve α -1,4 zincirleri de parçalaması özelliği, alışılmışın dışındadır. Enzim, dekstranı parçalayabilir, dolayısıyla anomerik karbon atomların α -konfigürasyonu hidroliz ürünleri arasında kalır, ayrıca konsantre solüsyonlarda izomaltotetraoz üretmek üzere, izomaltoz transfer ve kondensasyon aktivitelerine sahiptir. Bunun yanında, panozun α -1,4 glukozidik bağlarını ve izomaltotrioz ve pullulanın α -1,6-glukozidik bağlarını ayırabilir. Enzim molekülünde, izomalto - dekstranaz ve izopullulanaz aktivitesinden sorumlu olarak, α -1,6- ve α -1,4-glukozidik bağların parçalanmasında, sadece bir aktif bölgenin olduğu belirtilmiştir (Sawai et al., 1974; Takayanagi et al., 2001).

2.4.7. İzomaltotrioz oluşturan ekzodekstranazlar

Ekzoizomaltotriohidrolaz (EC3.2.1.95), *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* (Çizelge 2.1) tarafından üretilir. Bu enzim, izomaltotriozu, dekstranın redükte olmayan uçlarından uzaklaştıran ve izomaltodekstrinlere çeviren bir glikoproteindir. İzomaltotriodekstranaz, α -1,6-glukozidik bağlar dışında hidroliz yapmaz (Khalikova et al., 2005).

2.4.8. Dallanmış ekzodekstranazlar

Dallanmış dekstran ekzo-1,2- α -glukosidaz (EC3.2.1.115), bir toprak bakterisi olan *Flavobacterium* sp. kültür süpernatantında Mitsuishi ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Dekstran 2-glukohidrolazın genel özellikleri elektroforetik homojen preparasyon ile araştırılmıştır. Enzimin, redükte şeker olarak sadece serbest D-

glukoz üreten dekstran ve bağlantılı polisakkaritlerin dallanma noktasındaki 1,2- α -D-glukozidik bağlar için kesin bir özgüllüğü bulunmaktadır. Düz zincirli 1,2- α -glukozidik bağları içeren disakkarit veya oligosakkaritler, bu enzim tarafından hidroliz edilmez (Mitsuishi et al., 1979).

2.4.9. Sikloizomalto-oligosakkarit glukano transferaz

SiTaz, Sikloizomalto-oligosakkarit glukano transferaz, dekstranın siklodekstrana dönüşmesini katalizleyen yeni bir enzimdir. SiTaz, *Bacillus circulans* T-3040 kültüründen saflaştırılmıştır (Çizelge 2.1) ve 3 siklik izomaltooligosakkariti (sikloizomalto-heptaoz, -oktaoz, -nonaoz) üretir. Bunlar arasında sikloizomalto-oktaoz başlıca üründür. Enzim, amilopektin ve pullulanda aktivite göstermez. Siklodekstranlar, dekstransukraz reaksiyonunun hem redükte şeker, hem de dekstran üretim aktivitelerini inhibe eder. Bu inhibisyon, siklodekstran konsantrasyonuna bağlıdır. SiTaz ve siklomaltodekstrin glukano transferaz (EC2.4.1.19) enzimlerinin genel özellikleri birbirine benzer (Finnegan et al., 2004; Khalikova et al., 2005).

2.5. Dekstranazların Biyolojik Fonksiyonları

2.5.1. Dekstran üreten mikroorganizmalarda dekstranazın rolü

Dekstranın biyolojik rolü, bu polimeri üreten mikroorganizmalar için, sadece koruyucu ve yapıştırıcı etkisi ile değil, bu mikroorganizmalar için şeker depolamayı sağlaması ve bunları depolimerize etmesi açısından kazançtır. Enteresan olarak, bazı ekstraselüler dekstranazlar, dekstranları hücre yüzeyi içinde korumak üzere özel bölgelere sahiptirler ve buralardan hücreye glukoz üniteleri ekonomik olarak taşınır. Hücre dışına gıda depolama yeteneği, özellikle mikroorganizmaların içindeki büyük miktarda oligoşekerlere ulaşması açısından çok avantajlıdır. Bu gibi durumlarda, muhtemelen dekstran polimerine zaten bağlı durumda olan ekstraselüler enzimlerce, dekstran oldukça hızlı bir şekilde

sentezlenir. Bu arada da, transglikozilasyon ile oluşturulan monoşekerler metabolizma için hızlıca harcanmaktadır. Mikroorganizma açısından bakılacak olursa, polimerizasyon-depolimerizasyon aktiviteleri ve özellikleri bakımından dekstran ortamının optimizasyonu karmaşık bir iştir (Khalikova et al., 2005).

Sukroz, insan diyetinin en önemli bileşenidir. Hem suda çözünen, hem de çözünmeyen glukanlar, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. criceus* ve *S. rattus* gibi oral streptokoklar tarafından sentezlenir. Bunların, diş plaklarının oluşumundan ve diş yüzeyindeki çürüklerin indüksiyonundan sorumlu olduklarına inanılmaktadır. Dolayısıyla bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır (Hamada and Slade, 1980). Glukan üreten streptokoklardan *S. sanguis*, *S. mutans* ve *S. bovis*, diş çürüklerinin yanı sıra, insanlardaki endokardit ile en çok bağlantı kurulan mikroorganizmalardır. Bu glukanların kimyasal ve fiziksel özellikleri, onları birbirlerinden ayırmaktadır. Hem çözünebilen, hem de çözünemeyen glukanlar, diş plaklarındaki hücre-hücre ve hücre-yüzey yapışma etkileşimlerinde önemlidir. Temiz bir diş yüzeyinde, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* ve *S. gordonii*, ilk kolonileşen bakteriler olarak baskın türlerdir. Bu bakterilerin, diş yüzeyindeki biyofilm plağının oluşumunda etkileri olduğu bilinmektedir (Colby and Russell, 1997).

S. sanguis, dekstranaz enzimini hiç sentezleyemeyen veya çok az miktarda sentezleyebilen bir bakteridir ve sadece çözünebilir glukanları değil, aynı zamanda α -1,6-bağlı çözünmeyen glukanları da üretebilir. Yapılan çalışmalarda, α -1,3 bölgelerinin glukanı suda çözünmez kılarken, α -1,6 bağlı yan zincirlerin, çözünmeyen glukanların diş yüzeyine tutunmalarına izin vererek, dışarıdan gelen dekstranazlara gösterilen dirence katkıda bulundukları gösterilmiştir. Glukanların toplam miktarları ve yapıları, sadece glikoziltransferaz aktivitesi tarafından değil, ekstraselüler dekstranazların varlığından da etkilenir. Oral streptokoklar, dekstranazların en baskın üreticilerindendir (Hamada and Slade, 1980). *S. mutans*, endo ve ekzodekstranazların ikisini de üretebilirken, *S. sobrinus* yalnızca ekzodekstranazları sentezleme yeteneğine sahiptir. Endodekstranaz enzimi, α -1,6'nın α -1,3 bağlarına olan oranını değiştirerek ve glukan substratının çözünürlük ve yapışkanlık özelliklerini etkileyerek daha sağlam bir forma dönüşmesini sağlayıp, böylelikle glukan sentezini düzenliyor olabilir. Öyleyse

dekstranaz aktivitesi bakterilerin sukroza bağımlı tutunma özelliklerini etkilemektedir (Walker et al., 1981).

2.6. Dekstranazların Kullanım Alanları

Dekstranaz kullanımı, birkaç alanda yaygındır. Örneğin bu enzimin dekstran kökenli dental plak oluşumunu engellediği bilinmektedir. Ayrıca glukoz polimerlerinin yapısal çalışmalarında ve saflaştırma proseslerinde uygulaması bulunmaktadır. Dekstranazlar, biyokimya alanında da dekstran jellerin çözünbilmesi için kullanılmaktadır (Safarik, 1990). Suda çözünmeyen dekstranazın, klinik dekstranın ticari üretiminde potansiyel bir uygulama alanı vardır. Abdel-Naby ve arkadaşları, teorik ve pratik amaçlarla dekstranaz enzimi kullanımının oldukça geniş olduğunu, yedek kan ünitesi hazırlanmasında kullanılan doğal dekstranın kısmi yıkımı sırasında kullanıldığını belirtmişlerdir (Abdel-Naby et al., 1999). Bunların dışında, dekstranın şeker prosesinde sebep olduğu çeşitli problemlerin giderilmesinde, dekstranaz enzimin rolü büyüktür. Bu kontaminasyon ile başa çıkmanın en geçerli yolu da, dekstranaz kullanmaktır (Rogalski et al., 1997).

2.6.1. Şeker prosesinde dekstranaz

Dekstran, şeker prosesindeki problemlerden sorumludur. Şeker üretimi, mikroorganizma enfeksiyonuna ve bu mikroorganizmaların ürettiği dekstran hasarına açıktır. Dekstran üretebilme yeteneğine sahip bakteriler, hasarlı dokulardan içeriye girerek kontaminasyona neden olurlar. Harmanlama ve öğütmedeki gecikmeler, donmaya ve hasara, bunu müteakip nakliyyede daha fazla enfeksiyon ve deteriorasyona neden olmaktadır. Bu da mikroorganizmanın ve dolayısıyla dekstran seviyesinin artması demektir. (Clarke et al., 1997; www.dextran.co.uk).

Dekstranın dekstrorotator karakteristiği, suyun polarizasyonunu etkiler, bu da su saflığı okumalarında ve sakaroz miktarının saptanmasında hataya sebep olur.

Dekstrandan kaynaklanan problemler, ham şeker üretimi süresince sukroz geri alınımında ve son şekerin kalitesinde ortaya çıkar. Üründeki sukroz saflığını düşürür ve şeker suyu viskozitesini artırır. Yüksek viskozite, kristalizasyon ve filtrasyonda problemlere sebep olduğu gibi, aynı zamanda ısı transferinin azalmasına ve buharlaşma oranının yavaşlamasına neden olmaktadır. Filtrasyondaki problemleri, karbonatlama sırasındaki kalsiyum karbonat kristalleri ile bir araya gelen dekstranların oluşturduğu da bilinmektedir. Kristalizasyon prosesinde dekstranın etkisi, lateral yüzeyin genişlemesinin önlenerek, iğne biçimli kristallerin oluşumu şeklinde kendini göstermektedir (Şekil 2.4). Dekstran ayrıca şerbet arıtımı esnasında bazı çözünmez partiküllerin bir araya gelmesine ve çökmesine engel olur. (Chaplin and Bucke, 1990; Garcia and Rodriguez, 2000; Leblebici, 1999).



Şekil 2.4. Dekstran kontaminasyonuna maruz kalmış ve uzamış şeker kristalleri (www.dex.co.uk).

Dekstranın diğer etkileri arasında ise, hesaplanamayan sukroz kaybı, kristal elastikiyet, kristal büyüme hızı azalması, yanlış tane oluşumu, santrifüjde zorlanma ve finalde çıkan melasın çok fazla saf olması sayılabilir. Dekstranın bu işlemlerde sebep olduğu bir seri problem, proses ekipmanında çözünemez polimerlerin birikintisi olarak da işleme yansır (Cuddihy et al., 1999).

Şeker fabrikalarındaki karışık suda bulunan dekstran seviyesi, kısaca 3 kaynaktan dolayıdır:

1. Hasattan sonra form alan dekstran
2. Harmanlama ve öğütme arasında form alan dekstran (sevkiyat ve depoda bekleme aşamasında)
3. Öğütölme sırasında form alan dekstran (Cuddihy et al., 1999).

Dekstran kontaminasyonu ile başa çıkmanın en geçerli yolu, dekstranaz (α -1,6-D-glukan-6-glukanohidrolaz) kullanmaktır. Bu da dekstrandaki α -1,6 bağlarını hidrolize ederek moleküler ağırlığı hızla düşürür ve suyun viskozitesi de dolayısıyla düşer. Dekstranaz enzimi, şeker üretimi süresince sukroz geri alınımında ve son şekerin kalitesinde çıkan problemlerin sorumlusu dekstranı parçalar, üretilen şekerin kalitesini artırır (Cuddihy et al.,2000).

Dekstranaz kullanımı, dekstran redüksiyonu sağlar. Bu problemle başa çıkabilmek için, dekstran-laden prosesine başvurulur. Bu aşamada dekstranazın özelliklerinin artırılabilmesi ve ürünün kullanım maliyetinin düşürülebilmesi açısından, bir çok dekstranaz uygulama noktası denenir (Cuddihy et al., 1999).

Dekstranın bozulmuş şeker seviyesindeki azalması, uygun maliyetli olarak bu enzimin, şeker prosesi süresince genellikle 55-60°C' de ortama eklenmesiyle sağlanır. Bu prosesin etkinliği şeker prosesinde yüksek sıcaklıkta stabil kalan dekstran eklenmesiyle artırılabilir. Dekstranaz uygulaması, pH, sıcaklık, yerleşme zamanı (Rt), karıştırma, substrat konsantrasyonu, uygulanan enzimin tip ve konsantrasyonu ve ortamdaki mevcut dekstran seviyesi ile idare edilmektedir (Eggleston and Monge, 2004).

Dekstranaz, yıllardan beri teknik literatürde çalışılan ve tartışılan bir konu olmakla birlikte, yüksek maliyeti ve düşük uygulanabilirliği nedeniyle geniş skalada bir uygulaması mümkün olmamaktaydı. Ancak son zamanlarda bu durum değişerek dekstranaz, ekonomik açıdan kullanılabilir ve fabrikalara önemli miktarlarda ürün geri dönüşümü yaptıran bir faktör haline gelmiştir. Yaklaşık 8 kat az maliyet ve fabrika düzeyindeki kapsamlı pratik testlerle dekstranaz, sukroz geri alınımı için uygun bir ürün haline gelmiştir (Cuddihy et al., 1999).

Şeker endüstrisinde dekstranaz enziminin kullanılması, 1970'li yıllarda Avustralya' da başarıyla gerçekleştirilmiş ve öncülük yapılmıştır. Günümüzde artık pek çok ülkede dekstranaz enzimi kullanımı görülmektedir. Meksika şeker endüstrisinin dekstranaz tüketiminin, 1989 'da 4 ton olduğu ve yalnızca değirmenlerin % 40 'ına uygulandığı bildirilmiştir. Normal enzim dozajı 10 - 120 ppm arasında, onarım için uygun zamana ve kontaminasyon derecesine bağlı olarak değişmekte, bu değer bazı olumsuz koşullarda 15.000 ppm' e kadar çıkabilmektedir (Madhu et al., 1984).

ABD'de fungal kaynaklı ticari dekstranaz, konsantre ve konsantre olmayan formlarda kullanılmaktadır. En son yapılan çalışmalarda ise, "konsantre" dekstranaz uygulanmasının, "konsantre olmayan" dekstranaza göre daha ekonomik olduğu bildirilmiştir (Eggleston and Monge, 2004).

Ülkemizde şeker pancarından şeker üretimi gerçekleştirilmektedir. Şeker kamışında olduğu gibi şeker pancarında da *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Betacoccus arabinosaceus* ve bazı diğer bakterilerin üremesi sonucu, bakteriyel dekstran meydana gelmektedir. Fazla miktarda pancar üretimi ve iklim şartlarından kaynaklanan problemler, dondurulmuş ve sonrasında çözülmüş pancarlar ile çalışılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu durumda dekstran oluşumu kaçınılmaz olmaktadır (Leblebici, 1999).

Şeker prosesinde dekstran, arıtım ve filtrasyonu olumsuz şekilde etkileyerek fabrika üretim kapasitesini 1/3 oranına kadar düşürebilir. Yine şeker kamışından elde edilen şeker prosesindeki problemlere benzer olarak şeker kristallerinin bozulması ve pişme süresinin uzamasına sebep olur. Ayrıca şeker ürünlerinin kullanıldığı önemli alanlardan biri olan alkol üretiminde ve şekerlemelerde, dekstranla kontamine olmuş şeker kullanıldığında istenmeyen bir bulanıklık oluşmaktadır. Tüm bu istenmeyen durumlar, işlemler sırasında maliyet artışına neden olmaktadır (Leblebici, 1999).

Sonuç olarak, dekstran polimerinin şeker prosesinde çok zararlı etkileri olduğu, ürün kalitesine direkt olarak etkisi olduğu bilinmektedir, ancak dekstranı yıkan enzimlerin kullanımıyla bu problemlerin üstesinden gelinebilir.

2.6.2. Diş sağlığında dekstranaz

Dekstranaz enziminin, dekstran kökenli dental plak oluşumunu engellediği bilinmektedir. Diş yüzeyine bağlı bakteriyel bir film olan dental plak, birbirine sıkıca bağlı bakterilerden ve hücresel olmayan materyalden oluşmuştur. Kabaca, diş plağının kuru ağırlığının % 20' si suda  z nmeyen glukanlardan oluşmuştur (Marotta et al., 2002). Biyokimyasal ve klinik çalışmalar sonucu, bu α -D-glukanların, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* gibi bazı oral streptokoklar tarafından yapıldığı anlaşılmıştır. α -D-glukanlar, diş yüzeyindeki mikroorganizma birikiminin ve dolayısıyla oluşan diş çürüklerinin en büyük etmenlerindendir. α -D-glukanların yapı analizleri göstermiştir ki, glukoz şekerlerinin α -1,3 , α -1,4 ve α -1,6-D-glukozidik bağlarla temeli yapılmıştır. α -1,3 bağlarının, suda  z nmemeli özelliğine yardım ettiğini düşünülmektedir. α -1,6 bağlı yan zincirleri de bu polisakkaritlerin yapışkanlık özelliğine katkıda bulunmaktadır (Marotta et al., 2002; Marsh and Bradshaw, 1995).

Plaklar, diş çürüklerine sebep olur, çünkü karyogenik streptokok bakterilerinin hali hazırda kolonize olduğu koruyucu bir matriks sağlar. Plakları önlemeye karşı yapılan fırçalama ve diş ipiyle temizleme gibi sıradan çabalara rağmen, diş yüzeylerinde bazı lezyonlar oluşur (Marotta et al., 2002). Kısaca tanımlanacak olursa, diş plakları, ağızdaki tükürük akımıyla yerlerinden kopmayacak kadar sağlam bir şekilde diş yüzeyine yapışmış, kalsiyum içermeyen yoğun, bakteriyel kökenli yapılardır. Diş plağının temel yapı taşları, glukan ve fruktan polimerleri, plak bakterileri tarafından sentezlenen hücre dışı polimerlerdir. Glukanlar, erirlikleri, dallanma tipleri ve molekül ağırlıkları açısından oldukça karmaşık bir gruptur. Bu grubun büyük bir kısmını, α -1,6 glikozidik bağlarla bağlı glukanlar (dekstran) oluşurmaktadır. Diş plağı ile ilgili araştırma ve incelemelerin çok yaygın oluşunun başlıca nedeni, diş çürükleri ve çeşitli dişeti hastalıklarının oluşumunda plakların önemli bir yer tuttuğunun anlaşılmış olmasıdır (Cansunar, 1979).

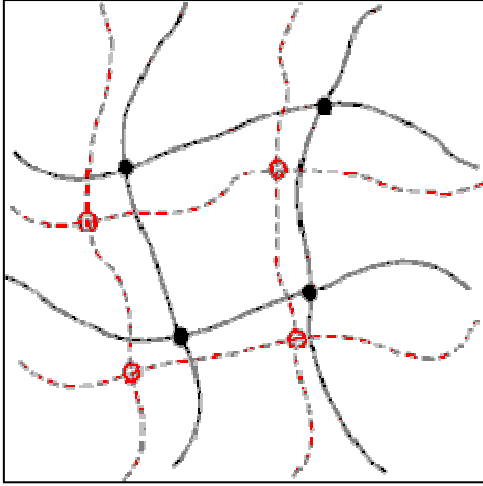
Diş plaklarının oluşumunu engellemek veya oluşan plakları yok etmek için bazı enzimler kullanılabilir. Bu enzimler, mikroorganizmalar tarafından üretilen, glukanların α -1,3, α -1,4 ve α -1,6 bağlarını hidroliz eden enzimlerdir. Problemin üstesinden gelebilmek için bazı ticari sertifikalı gıdasal enzim preparasyonları bu tip oral streptokok kaynaklı glukan bağlarını hidroliz etmesi bakımından taranmıştır. Bunun sonucunda, diş plağı kontrol ajanı olarak ticari dekstranaz enzimlerinin kullanılabileceği saptanmıştır (Marotta et al., 2002).

Igarashi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda, dekstranaz enziminin diş plağında ekolojik olarak iki rolü bulunduğu bildirilmiştir. Bunlardan birincisi, potansiyel depo polisakkaritleri olan glukanların hidrolizini gerçekleştiren bakterilere besin sağlamaktır. Diğeri ise glukanların doğada daha sağlam ve yapışkan olabilmeleri için moleküler yapılarını modifiye etmektir (Igarashi et al., 2002).

2.6.3. Biyomateryallerde dekstranaz

Birbirinin varlığında çapraz bağlanma yapan homojen veya heterojen polimerlerden form alan 3 boyutlu ağlar, IPN, veya “interpenetrating polymeric network” yapıları olarak bilinmektedir. Bu yapılar, birbirinin varlığında çapraz bağlanma yapan homojen veya heterojen polimerlerden form alırlar. Bireysel ağlar, kendiliğinden veya dizisel olabilir, kimyasal olarak olabilir veya olmayabilirler. Bu birbiri içine geçmiş polimer ağlardan form alan materyaller, her bir ağın karakteristik özelliğini paylaşırlar (Kosmala et al., 2000).

Şekil 2.5’ te basit bir IPN yapısı şematize edilmiştir. Ağlardan biri siyah renk ile, diğeri ise kırmızı kesikli çizgi ile gösterilmiştir. Küçük daireler de zincirlerin bağlantı yaptığı noktaları göstermektedir.



Şekil 2.5. Basit bir IPN materyalinin şematik olarak gösterilmesi (<http://www.pslc.ws/macrog/mpm/ipn/index.htm>).

Protein ve polisakkaritlerden oluşan enzimatik olarak yıkılabilir polimer ağlar, bir süredir bilinmekte ve kullanılmaktadır. Bu tip protein - polisakkarit materyallerden sıklıkla kullanılan bir çift de jelatin ve dekstrandır. Bu iki materyalin de tek başına biyomateryal olarak büyük potansiyeli vardır. Ancak kombine edilmiş özellikleriyle meydana gelen hidrojel, enzimatik olarak yıkılabilir, ancak hidrolitik olarak yıkılamaz. Bu da dolayısıyla materyali avantajlı bir madde haline getirir (Kosmala et al., 2000).

Hidrojeller, biyomedikal uygulamalar için oldukça kullanışlı biyomateryallerdir. Bu maddeler, sahip oldukları yüksek su içerikleri, ayrıca yumuşak ve elastiki yapılarından dolayı, canlı dokulara oldukça benzerlik gösterirler (Vyavahare and Kohn, 1994). Bozunmayan hidrojellerin de medikal alanda kullanımları olmasına rağmen (yara bantları, kontak lensler, vs.), biyolojik olarak yıkılabilen hidrojellerin gelişimi, artan bir hızla devam etmektedir. Bu moleküllerin salınım mekanizmalarının temelleri, çeşitli uygulamalarla geniş ölçüde çalışılmaktadır. Hidrojinin yıkımı, çoğunlukla çapraz bağların veya polimer iskeletin yıkımı temeline dayanır. İskeletin yıkımı ise, yıkıcı ünitelerin polimer içine sokulmasıyla veya polimer ağının uygun bir enzimle temasa geçirilmesiyle yapılabilir (Meyvis et al., 2001). Bununla birlikte, ilaç servis sistemlerinde, ilacın içeriği, yalnızca biyolojik enzimlerle alınabilmektedir. Dekstranaz enziminin biyomateryallerde

kullanımı daha çok tıbbi uygulamalarda olmaktadır (Kosmala et al., 2000). Dekstran çiftleri, ilaç dizaynında karşılaşılan birçok problemi halledebilecek çözümler sunar. Çiftin toksisitesi, genellikle aktif ilaçtan daha azdır. Çözünebilen ilaçların yavaş yavaş çözünmesini sağlar, hassas ilaçların stabilitesini artırır ve çiftin plazma yarı ömrünü artırır (Dextran fractions, 2001).

2.6.4. Biosensörlerde dekstranaz

İnce filmlerin, enzimlerin varlığında degradasyonu, çok hassas geri dönüşümlü biyosensörler üretmek için kullanılabilir. Bu alandaki son gelişmeler, yeni bir sensörün gelişmesine olanak vermiştir. Bu da enzim katalizli polimer kaplamaları ve elektrot çözünmesi süresince oluşan kapasite değişimlerini ölçmeye dayalı bir biyosensördür (Sumner et al., 2001).

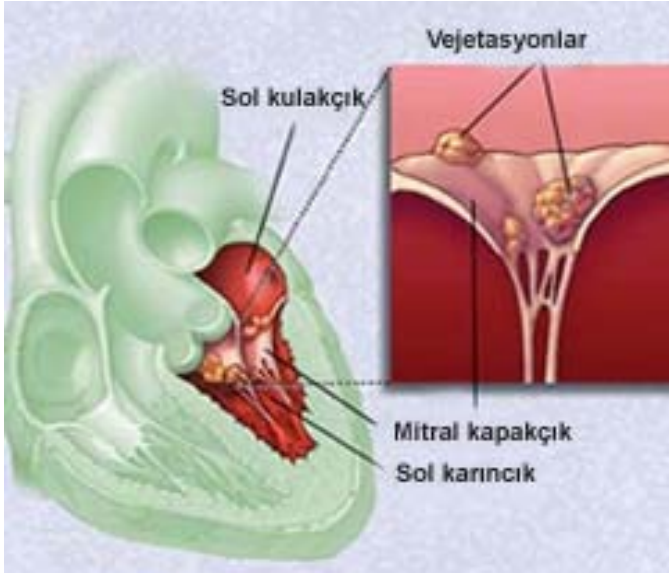
Biyolojik olarak yıkılabilir polimer filmlerin çözünmesini katalizleyen enzim esaslı biyosensörlerde, bazı polimer - enzim sistemleri denenmiştir. Bunlar arasında dekstranaz tarafından yıkılan dekstran hidrojeli de bulunmaktadır. Dekstran hidrojeli ve dekstranaz çifti, bu denemede çok fazla hassasiyet göstermemesine rağmen, az miktardaki enzim konsantrasyonlarında dahi, çok iyi bir parçalanma oranı göstermiştir (Sumner et al., 2001).

2.6.5. Endokardit tedavisinde dekstranaz

Kalbin içi, endokardium denilen ince bir zarla ayrılan dört odacıktan ve dört kapakçıktan oluşur. Endokardit, kalbin içini döşeyen dokunun, sıklıkla kalp kapakçıklarını da etkileyebilen bir enfeksiyon şeklidir (Şekil 2.6). (<http://www.herseyinbasisaglik.com/tr/mayoclinic/hastalik.asp?sid=198&tid=1787>) Endokardit tipik olarak ağız gibi vücudun diğer bir kısmından gelen bakteriler veya diğer mikroplar kan dolaşımına yayılıp kalbe yerleştiğinde oluşur. Endokardit, tedavi edilmezse kalp kapakçıklarını hasara uğratabilir veya parçalayabilir ve ölümcül sonuçlar doğurabilir. Endokardit riski altındaki kişiler,

belli bazı tıbbi veya dental prosedürlerden önce antibiyotiklere ihtiyaç duyabilir. (<http://www.herseyinbasisaglik.com/tr/mayoclinic/hastalik.asp?sid=198#>).

Viridans streptokok, doğal endokarditin en büyük nedenini oluşturmaktadır. Bu streptokok, bir ekzopolisakkarit olan ve ağırlıklı olarak insan ağız florasındaki dekstrandan oluşmuş glikokaliks yapısını meydana getirmektedir. Bu dekstran oluşumu, deneysel olarak gösterilmiştir.



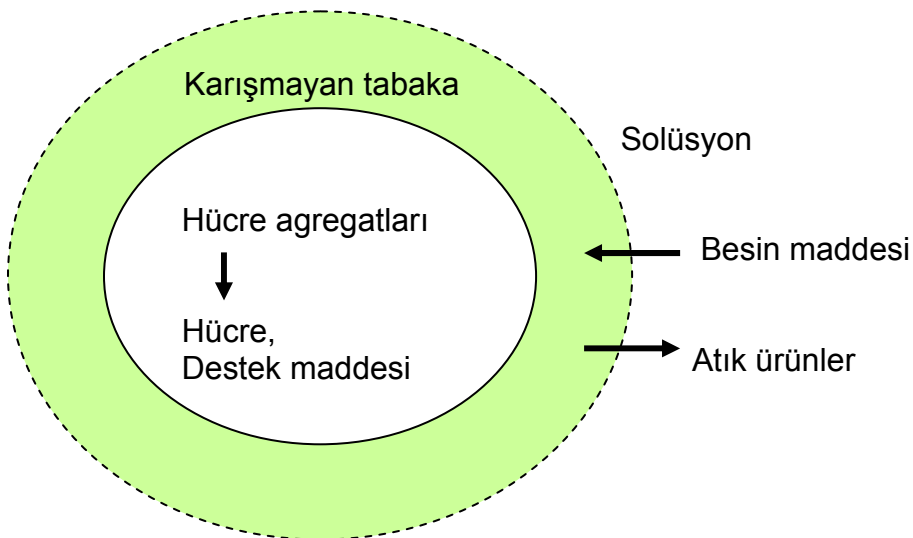
Şekil 2.6. Kalpte meydana gelen oluşumlar (http://www.herseyinbasisaglik.com/tr/mayoclinic/hastalik.asp?sid=198&tid=1787/images/DS00409_2.jpg)

Endokardit tedavisinde, viridans streptokoklar tarafından ekzopolisakkarit üretimi, kardiyak oluşumlarda antimikrobiyal etkinlik ile bağdaştırılmıştır. Endokardit tedavisindeki zorluklar, fibrin etkisi yapan bazı antibiyotiklerin difüzyonunda veya organizmaların metabolik aktivitelerinin azalmasından kaynaklanmaktadır (Mghir et al., 1994). Ancak ekzopolisakkaritlerin bazı organizmalarca salınımı gibi diğer faktörler, bu zorlukların aşılmasını sağlayabilmektedir. Viridans streptokok etrafındaki glikokaliks varlığının, kardiyak oluşumdaki penisilin etki yeteneğine ters etki ettiği gözlenmiştir. Ancak penisilin, dekstranaz enzimi ile kombine edildiğinde, enzimin bu bakteriyel glikokaliksin % 20-90 kadarını hidroliz edebildiği bildirilmiştir (Pulliam et al., 1985).

Yapılan çalışmalarda varılan sonuç; bazı antibiyotiklerin dekstranaz enzimiyle kombine edildiğinde, kullanılan antibiyotiğin tedavide daha etkili hale geldiğidir. Bu alanda kullanılan önemli bir antibiyotik olan termafloxacin dekstranaz ile kombine edildiğinde, enfekte bölgede bakteriyel glikokaliksin azaldığı ve antibiyotik etkisinin arttığı, elektron mikroskobu çalışmaları ile gösterilmiştir (Mghir et al., 1994).

2.7. Hücre İmmobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu, sağlam bir hücrenin bazı istenilen katalitik aktivitelerinin korunarak, tanımlanmış belirli bir bölgede fiziksel olarak hapsedilmesi veya bir yerden çıkmasını önleyerek yerinin sabitlenmesi olarak tanımlanabilir (Karel et al., 1985). Bu işlem esnasında immobilize hücre “agregat” olarak ifade edilir. Her bir agregat; hücre, destek materyali ve agregatın içinde bulunduğu solüsyondan oluşmak üzere 3 bileşen içermektedir. Destek materyali katı veya sıvı olabilmektedir. Agregat içinde bulunduğu solüsyonun kimyasal özellikleri, esas gövdenin içindeki solüsyonun özelliklerinden farklı olabilir. Bu doğa olayı da literatürde bir mikroçevre meydana getirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Mühendislik temellerinde bu mikroçevre geometrik açıdan düşünülmekte ve agregat küresel olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İmmobilize hücre sisteminin komponentleri (Karel et al., 1985)

İmmobilize hücrelerin kullanımındaki avantajlar, yıllardır bilinmektedir. 1970'te yayımlanan ilk makaleden günümüze kadar, oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bir mikrobiyal populasyon, fiziksel davranış olarak bir besi ortamında birbirinden ayrı hücreler halinde yayılır. Bir başka deyişle bireysel hücreler, süspanse edildikleri sıvının elemanları gibi davranırlar. Yani eğer sıvı, kabından ayrılırsa, hücreler de ayrılırlar. Bu da, böyle sistemlerin operasyonunda önemli bir limitasyon olduğunun göstergesidir, çünkü hücrelerin daha sonraki işlemler için ortamda kalması istenir. Hücrelerin alıkoyulabilmesi için, fermantasyon ortamından ayrılması gerekir. Hücrelerin, kendilerini çevreleyen ortam dışında kendi fiziksel özelliklerini gösterebilmeleri için de, immobilizasyon dediğimiz işlem gerçekleştirilmektedir. İmmobilizasyon, hücre veya enzimlerin, suda çözünen veya çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması veya hapsedilmesidir (Webb and Dervakos, 1996).

Hücrelerin immobilizasyonu, doğal bir proses veya kimyasal / fiziksel yollarla indüklenen bir işlem olabilir. Doğal immobilizasyona örnek olarak atık su arıtım sistemlerinde veya dış yüzeyinde bakterilerin toplanmasıyla filmlerin oluşması verilebilir.

Enzimlerin immobilizasyonu, mikroorganizmaların immobilizasyonundan daha önce gelişmiştir. Ancak enzimlerin bazı özelliklerinin işlemler esnasında kaybolabilmesi sebebiyle enzim üretim maliyeti yükselmektedir. Bunun üstesinden gelebilmek için canlı mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu bazı durumlarda daha avantajlı olabilmektedir. Ekstraselüler enzimlerle çalışılıyorsa, enzim immobilizasyon sonrasında kararlı değilse, mikroorganizmanın içerdiği enzimler birbirini etkilemiyorsa, substrat ile oluşan ürünler düşük molekül ağırlıklı ise, mikrobiyal hücreleri immobilize etmek çok daha avantajlı olabilmektedir. Bugüne kadar yapılmış araştırmalarda, immobilize hücrelerin avantajları görülmektedir (Ramakrishna and Prakasham, 1999; Webb and Dervakos, 1996). Özetlenecek olursa;

- Biyolojik stabilitenin geliştirilmesi,
- Biyokitle korunumunun sağlanması,
- Kitlenin transferinin mümkün olması,

- Ürün veriminin arttırılması,
- Hücre ve ürün ayrıştırılmasının kolaylaştırılması,
- “Downstream” sürecinin geliştirilmesi, maliyetin azaltılması,
- Ürün stabilitesinin sağlanması,
- Hücrelerin tekrar kullanımının sağlanması,
- Fermantasyon ortamındaki değişimlere dayanıklılığın arttırılması,
- Diğer immobilize sistemlere oranla daha ekonomik olması,

immobilize hücrelerle çalışmanın sağladığı avantajlar olarak sayılabilir (Başıaçık, 2004; Webb and Dervakos, 1996).

2.7.1. Hücre immobilizasyon teknikleri

Hücre immobilizasyon yöntemleri, çalışma prensiplerine göre ayrılırlar. Bu gruplandırma, temelde benzer olmakla birlikte, farklı yazarlara göre değişiklik göstermektedir (Ramakrishna and Prakasham, 1999; Webb and Dervakos, 1996). Fiziksel mekanizmalarına göre immobilizasyon yöntemleri 4 grupta toplanır (Çizelge 2.2).

1. Yüzeye bağlanma
2. Bariyer arkasında alıkoyma
3. Hücrelerin kendiliğinden kümelenmesi
4. Porlu matriks içinde tutuklama (Karel et al., 1985; Webb and Dervakos, 1996)

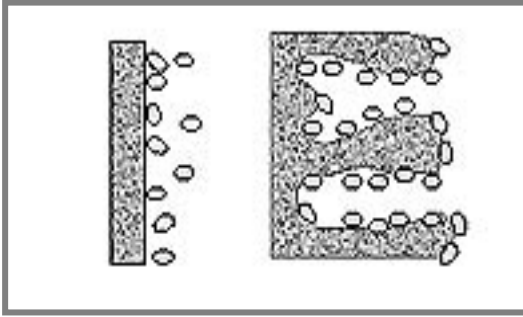
2.7.1.1. Yüzeye bağlanma

İmmobilizasyonda en sık kullanılan, oldukça basit ve eski bir yöntem olan, mikrobiyal hücreleri katı yüzeylere bağlamadır (Şekil 2.8). Bu yöntemde bağlanma tipine bakılmaksızın hücrelerin herhangi bir yüzeye bağlanması esas alınır. İşlem, doğal bağlanma ile veya kimyasal bağlayıcılarla gerçekleştirilebilir.



Çizelge 2.2. Hücre immobilizasyon yöntemleri (Karel et al., 1985)

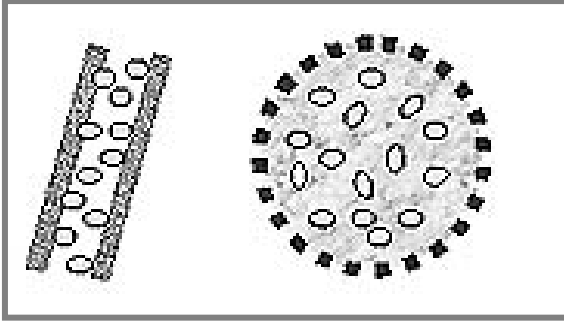
Destek materyalleri arasında tahta, cam, seramik, plastik malzemeler gibi farklı yüzeyler olabilir. Doğal bağlanmanın mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, hücrelerin yüzeylere bağlanması çok eski zamanlardan beri, sirke oluşumu gibi işlemlerde gerçekleşen bir doğa olayıdır. Bunun yanı sıra dış yüzeylerindeki mikroorganizma toplanmasıyla oluşan filmler de bu yönetime bir örnektir. Bu yöntemle immobilizasyonun popüler olması, yöntemin basit olmasından kaynaklanır. (Karel et al.,1985; Ramakrishna and Prakasham, 1999).



Şekil 2.8. Yüzeyle bağlanma yönteminin şematize edilmiş şekli (www.rcub.bg.ac.yu/~todorom/tutorials/rad15.html).

2.7.1.2. Bariyer arkasında alıkoyma

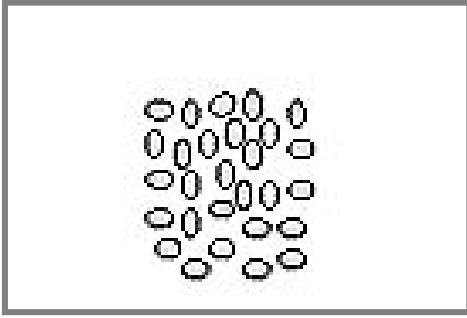
Hücreler, bir bariyerin arkasında hapsedilebilir, bu bariyer daha önceden oluşmuş olabilir veya o ortamda oluşabilir (Şekil 2.9). Bu tip hücre immobilizasyonu, bazı özelleşmiş sistemler için idealdir. Hücrelerin, kültür sıvısından ayrılması gerekiyorsa, veya yüksek molekül ağırlıklı bir ürünün ayrılması gerekiyorsa, bu kullanışlı olabilir. Bu yöntemde bariyer, birbiriyle karışmayan 2 sıvı arasındaki sıvı - sıvı ortak yüzey fazı kadar basit olabilir. Bu yarı geçirgen membran sayesinde, difüzyon ile hücre içine besin akışı sağlanırken, çıkan ürünler de ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu arada hücreler ile yüksek molekül ağırlıklı ürünlerin dışarıya çıkması engellenir. Dolayısıyla bu sistem, mikrokapsülleme ile oldukça fazla benzerlik göstermektedir. Ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membranları bu işlem için kullanılabilir (Karel et al., 1985; Ramakrishna and Prakasham, 1999).



Şekil 2.9. Bariyer arkasında alıkoyma yönteminin şematize edilmiş şekli (www.rcub.bg.ac.yu/~todorom/tutorials/rad15.html).

2.7.1.3. Hücrelerin kendiliğinden kümelenmesi

Büyük topaklar oluşturmak üzere flokülasyon yapılarak hücrelerin immobilize edilmesi mümkündür. Hücrelerin doğal yollarla kendiliğinden toplanması veya floklaşması da immobilizasyon olarak kabul edilir (Şekil 2.10).

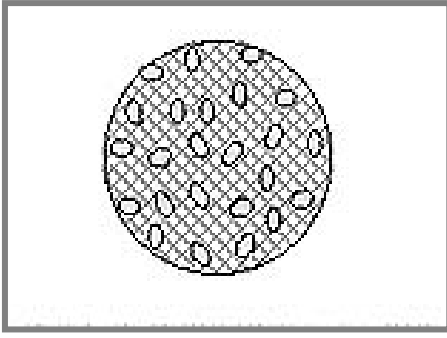


Şekil 2.10. Hücrelerin kendiliğinden kümelenmesi yönteminin şematize edilmiş şekli (www.rcub.bg.ac.yu/~todorom/tutorials/rad15.html).

Geniş çaplı agregatlar, immobilize hücrelerin reaktörlerde kullanımları için uygundur. Atık arıtım sistemleri, buna örnek olarak gösterilebilir. Bu kategoriye giren hücre tipleri, küfler ve bitki hücreleridir. Doğal yollardan birleşemeyen hücreler için yapay flokülasyonu sağlayıcı ajanlar veya çapraz bağlama ajanları ortama ilave edilebilir (Karel et al.,1985; Ramakrishna and Prakasham, 1999).

2.7.1.4. Porlu matriks içinde tutuklama

İmmobilizasyonun en önemli kategorilerinden biri de, porlu bir matrikse tutuklama yöntemidir (Şekil 2.11). Bu tip immobilizasyonda 2 yöntem mevcuttur. Birincide, hücreler önceden oluşmuş bir matrikse diffüze olurlar. Hücreler çoğalmaya başladıktan sonra, bunların hareketleri, matriks ve diğer hücreler tarafından engellenir. Dolayısıyla bu hücreler, etkili bir şekilde tutuklanmış olur. İkinci yöntemde, porlu matriks, immobilize edilecek hücrelerin etrafında in situ olarak sentezlenir. Hücrenin canlılığını kaybetmesine engel olmayacak bir sıcaklıkta, polimer ve hücre birleştirilerek, istenilen şekil ve boyutlarda jelleşme sağlanır veya, jel düz bir yüzeye dökülerek donduktan sonra istenilen şekilde kesilebilir. (Karel et al.1985).



Şekil 2.11. Porlu matriks içine tutuklama yönteminin şematize edilmiş şekli (www.rcub.bg.ac.yu/~todrom/tutorials/rad15.html).

Agar, alginat, karragenan, selüloz ve türevleri, kollajen, jelatin, epoksi rezin, poliakrilamit, polyester, polistren, poliüretan köpük, sünger, tahta parçaları ve kum bu yöntemde sıklıkla kullanılan matrikslerdir. Bunlar arasında alginat, kullanılan prosedürün basit olmasından dolayı en çok tercih edilen materyallerden biridir (Karel et al.,1985; Ramakrishna and Prakasham, 1999).

Hücre fizyolojisi ve morfolojisi, immobilizasyon işlemi sırasında değişebilir. Bunun birçok sebebi vardır. Immobilizasyon işlemi, hücrelerin metabolik aktivitesini veya canlılığını etkileyebilir. Hücrelerin içine girdikleri mikro çevre, bulundukları kültür

ortamlarına göre farklıdır. Üremekte olan hücrelerin etraflarının sarılmış olması, onları fiziksel stres altına sokar (Karel et al., 1985).

Bugüne kadar yapılmış çok sayıdaki araştırmada, çok değişik immobilizasyon materyalleri ve yöntemleri ile, farklı organizmalardan değişik ürünler elde edilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. İmmobilize hücrelerle üretilen bazı enzimler ve immobilizasyon yöntemleri (Ramakrishna and Prakasham, 1999).

Enzim	Organizma	Yöntem
Peptidaz	Maya	ENT-2000
β -amilaz	<i>Bacillus megaterium</i>	Akrilamid
Glukoamilaz	<i>Aurobasidium pullulans</i>	Ca-alginat
Ribonükleaz	<i>Aspergillus clavatus</i>	PVA
Proteaz	<i>Humicola lutea</i>	Agar
Alkalın fosfataz	<i>Escherichia coli</i>	k-karragenan
Glukoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>	Çavdar, buğday
Kitinaz	<i>Micromonospora chalybeata</i>	Ca-alginat
Hidantiaz	<i>Pseudomonas</i> sp.	Poliakrilamid
Pektinaz	<i>Aspergillus niger</i>	Buğday
İnvertaz	Maya	Polimer
α -amilaz	<i>Escherichia coli</i>	k-karragenan
Amiloglukosidaz	<i>Aspergillus niger</i>	Ca-alginat
Selülaz	<i>Trichoderma reesei</i>	Selülozik fiber
Penisilin açılaz	<i>Escherichia coli</i>	Poliakrilamid, agar
Kloroperoksidaz	<i>Caldariomyces fumago</i>	k-karragenan

Çizelge 2.3. (Devam ediyor)

Lipaz	<i>Sporotrichum thermophile</i>	Alginat
Lignin peroksidaz	<i>Phanerochaete chrysogenum</i>	Polistren divinilbenzen
Pullulanaz	<i>Clostridium</i> sp.	Ca-alginat
Ksilanaz	<i>Aspergillus sydowii</i>	Ca-alginat

2.8. Alternatif Üretim Ortamları Olarak Atıklar

Son yıllarda atık maddelerin geri dönüşümü ve tekrar kullanılması, çevreyle uyumlu olarak çalışan teknolojilerin hedefi olmuştur. Çoğu endüstride hammadde işlenerek geriye atık ve artık maddeler çıkarılmaktadır. Bu atık maddelerin değerlendirilmesi amacıyla bu çalışmada şeker fabrikası atığı olan melas ile zeytin fabrikası atığı olan pirina ile enzim üretimi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

2.8.1. Şeker fabrikası atığı melas

Şeker Fabrikalarında şeker pancarı ve şeker kamışı üretiminde fabrikasyon kademesinde şekerinin fabrikasyona geri alınamayan son şuruptur. Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarında 4 kg kadar melas oluşmaktadır. Bu koyu kahve renkli koloidal atık maddenin içeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan bileşikler, koyu kahve renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi bazı organik asitler de bulunmaktadır (Kahyaoğlu and Konar, 2006). Melas, içeriğinin yaklaşık % 50'sini oluşturan sakkaritlerden dolayı ticari açıdan değerlidir ve çeşitli fermentasyonlarda karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra, gübre içeriği olarak ve evcil hayvanların yemlerinde sıklıkla kullanıldığı belirtilmiştir (Dahiya et al., 2001). Çizelge 2.4'te melasın bazı özellikleri verilmektedir.

Çizelge 2.4. Melasın bazı özellikleri (Najafpour and Shan, 2003).

Özellik	
Renk	Kahverengi - koyu kahverengi
Viskozite (cp)	22.1(10 rpm' de) - 30.6 (7 rpm' de)
Dansite g/ml	1.441 - 1.354
Su içeriği %	47 - 35
Asılı katı parçalar %	38 - 58.6
Başlangıç şeker konsantrasyonu g/L	18.7 - 194
Son şeker konsantrasyonu g/L	600 - 611

Yurdumuzda her yıl 60 ilde, 450-500 bin hektar alana pancar ekilerek 1820 milyon ton pancar üretilmektedir. Bu pancarın işlenmesiyle her kampanya döneminde 2,0-2,6 milyon şeker ile yan ürün olarak 6-7 milyon ton pancar posası ve 800-900 bin ton melas elde edilmektedir. Şeker fabrikası yan ürünlerinden pancar posası hayvan yemi olarak, melas ise başta alkol, maya ve yem olmak üzere pek çok sanayinin ana girdisi olarak kullanılmaktadır. Günde 3000 ton pancar işleme kapasitesine sahip fabrikada bir kampanya döneminde yaklaşık 50 bin ton şeker ile 16 bin ton melas elde edilmiştir (www.sanayi.gov.tr).

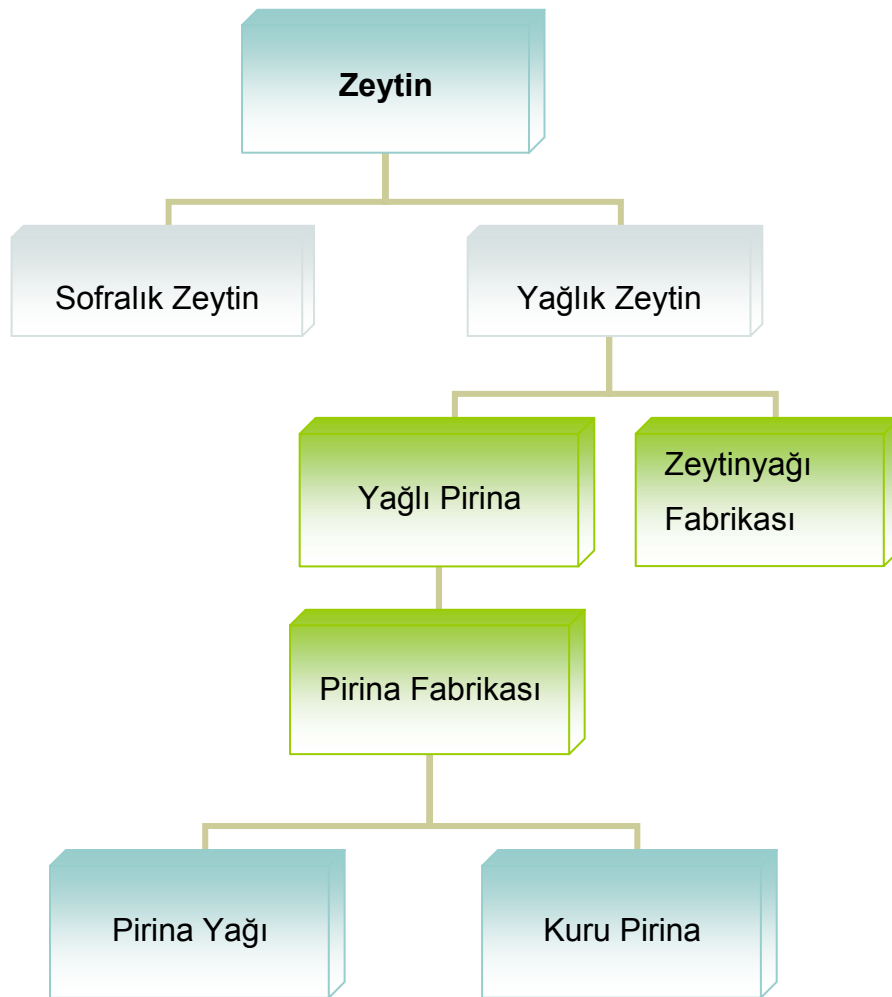
2.8.2. Zeytin fabrikası atığı pirina

Zeytin meyvesi, doğasından gelen özellikleri nedeniyle doğrudan tüketilememektedir. Bu nedenle, öncelikle sofralığa ve yağa işlenerek gıda sanayine ve zeytinyağı üretim aşamasında, pirina, pirina yağı ve karasu gibi yan ürünler elde edilmesiyle diğer sanayi dallarına hammadde kaynağı oluşturmaktadır. Yan ürünler arasında yer alan yağlı pirina, ya da diğer bir adı ile yağlı zeytin küspesi önemli bir zeytin yan ürünüdür (Çizelge 2.5). Teknik tanımı ile zeytinyağı fabrikalarında zeytinlerin sıkılmasından sonra arta kalan zeytin küspesine Pirina (Yağlı Pirina); pirinadan organik çözücülerle ekstraksiyon sonucu elde edilen yağa Pirina Yağı, bu yağın elde edilmesiyle ilgili fabrikaların

Çalışma şekilleri, kapasiteleri ve faaliyet sonuçlarının tümüne ise Pirina Sanayi denilmektedir (www.aeri.org.tr).

Pirina, zeytinlerin mekanik olarak yağa işlenmesinden sonra arta kalan katı alt üründür. Taze ve işlenmiş pirinanın ortalama bileşimi izelge 2.6' te gösterildiği gibidir.

Çizelge 2.5. Pirina ve pirina yağı üretim aşamaları (www.aeri.org.tr).



100 kg zeytinden ortalama olarak 15 - 22 kg zeytinyağı ile 35-45 kg pirina elde edilmektedir. 100 kg pirinadan ise ortalama olarak 6 - 7.5 kg pirina yağı ile 60 - 70 kg kuru pirina elde edilmektedir (www.zae.gov.tr).

Zeytinden elde edilecek pirina ve pirina yağı miktarları her ne kadar zeytinin yetiştirme tekniğine, iklim, toprak, çeşit özelliğine zeytinin işleyiş şekillerine ve uygulanan teknolojik işlemlere bağlı ise de genellikle zeytinyağı fabrikalarında üretilen zeytinyağı miktarının iki katı ağırlıkta pirina elde edilmektedir.

Çizelge 2.6. Taze ve işlenmiş pirinanın bileşimi (www.zae.gov.tr).

	Taze Pirina	İşlenmiş Pirina
Yağ	6.9 - 9.0	0.1 - 0.3
Çekirdek	42 - 54	9.0 - 11
Kabuk	10 - 11	20 - 22
Hamur	21 - 33	10 - 15

Pirina, içerisinde yağ dahil olmak üzere; su, çekirdek ve pulp kısımlarından oluşmaktadır. Zeytinyağı fabrikalarının tipi ve işleyiş biçimleri, her ne kadar pirinanın içeriğini değiştiriyorsa da yağlı pirina ortalama %5-8 yağ ve %20-30 rutubet içermektedir. Böylece 100 kg pirinadan ortalama 6-8 kg pirina yağı, 60-70 kg yağsız kuru pirina elde edilmektedir. Elde edilen pirina yağı, pirinanın hemen işlenmesi ve çıkan yağın rafine edilmesi şartıyla ancak yemeklik olarak kullanılabilir. Pirina yağı kendine has kokusu olan koyu yeşil renkli bir yağdır. Kimyasal olarak, asit bileşimi bakımından zeytinyağına oldukça benzemektedir fakat daha fazla miktarda sabunlaşan maddelere ve serbest yağ asitlerine sahip olmaktadır (www.aeri.org.tr).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Ekim ve Üretimi

Bu çalışma için, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı ve Uygulamalı Biyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan 18 adet fungus (*Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Alternaria alternata*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma viride* A2, *Trichoderma harzianum* D2, *Humicola insolens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Beauveria bassiana*, *Ascosphaera apis*, *Gibberella fujikuroi* ve *Candida albicans*), genel üretim için yatık olarak hazırlanmış PDA (potato dextrose agar) tüplerine ekildi. Ekim yapıldıktan sonra 30°C' deki etüvde, statik koşullarda 5 gün üremeye bırakıldı. Elde edilen kültürler 1 ay sonunda tekrar pasajlanarak +4°C' deki buzdolabında saklandı.

3.2. Funguslarda Dekstranaz Enziminin Taranması İçin Uygun Besiyerinin Hazırlanması

İçeriğinde karbon kaynağı olarak yalnızca dekstran bulunan besiyerinin bütün funguslar için ilk baştaki üreme dönemi açısından uygun olmadığına karar verildi ve genel besiyeri olarak literatür taraması sonrasında içeriğinde dekstranın yanı sıra maya özütü de bulunan sıvı besiyeri tercih edildi (Abdel-Naby et al., 1999; Fukumoto et al., 1971; Hattori et al., 1981; Tsuru et al., 1971).

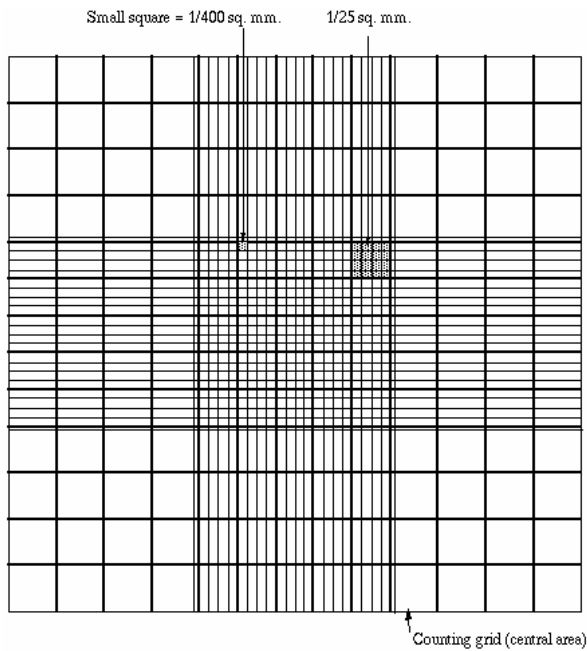
Bu besiyeri hazırlanarak pH 'sı 6.0 olarak ayarlandı ve 250 ml' lik Erlen meyerlere 50'şer ml olarak paylaştırıldı. 110°C 'de ve 1.5 Atmosfer basınç altında 25 dakika otoklavlanarak steril edildi. Sterilizasyonun ardından soğumaya bırakılan ve oda sıcaklığına gelen besiyerlerine uygun şekilde ekim yapıldı. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Funguslarda dekstranaz enziminin taranması için kullanılan besiyeri içeriği.

Dekstran	10.0 g/L
NaNO ₃	1.0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g/L
K ₂ HPO ₄	1.0 g/L
KCl	0.5 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g/L
Maya özütü	1.0 g/L

3.3. Ekim

Her bir fungusun spor süspansiyonunun hazırlanması için, funguslar öncelikle PDA besiyerlerinde tüpte yatık kültür olarak üretildi. Steril serum fizyolojik ile karıştırılan fungus kültürlerinden alınan örneklerle, Neubauer marka hemasitometre ile her bir fungusun spor sayımı yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil.3.1. Neubauer hemasitometre (Caprette, 2006)

Bu çalışmada kullanılacak tüm funguslar için ayrı bir tüpte 1 ml.sinde yaklaşık olarak 2×10^5 sayıda spor içeren stoklar hazırlandı. Dekstranaz üretimi için kullanılacak genel besiyeri olarak saptanan besiyerlerine, hazırlanmış olan steril spor süspansiyonlarından, steril pipetlerle 1' er ml spor inoküle edildi. Besiyerleri, 30°C sıcaklıkta, 7 gün boyunca 150 rpm hızına ayarlı etüvde (New Brunswick Scientific) inkübasyona bırakıldı.

3.4. Kültürlerde Üremenin Ölçümü

İnkübasyon sonunda etüvden alınan sıvı kültürlerde üreme miktarı, hücre kitlesindeki kuru ağırlığın ölçülmesi ile saptandı. Bunun için, daha önceden hazırlanmış olan filtre kağıtları 1 gece 37°C sıcaklığındaki etüvde kurutuldu ve her birinin darası alındı. Sıvı kültür ortamı bu filtre kağıtlarından süzöldükten sonra kağıt üzerinde kalan biyokitle, 1 gece 37°C sıcaklığındaki etüvde kurutuldu ve hassas terazide tartıldı.

3.5. Ayraçların Hazırlanması

3.5.1. Dinitro Salisilik Asit (DNS) ayracının hazırlanması

Renk tepkimesi için kullanılan DNS ayracı, 3,5-dinitro salisilik asit, fenol, Na_2SO_3 , NaOH ve Na-K-Tartrat kimyasal maddelerinin uygun oranda karıştırılması ile hazırlandı (Miller, 1959). Hazırlanan ayraç yaklaşık olarak 24 saat boyunca, karanlık ve çevresi alüminyum folyo ile sarılı bir Erlen Meyer içinde, manyetik karıştırıcı üzerinde berrak hale gelene kadar manyetik balık yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra yine ışık görmeyecek şekilde +4°C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

3.5.2. Lowry ayracının hazırlanması

Kültür süzöntülerinde bulunan çözünür protein miktarı, Lowry (1951) yöntemi ile tayin edildi. Bunun için Lowry A, Lowry B₁ ve Lowry B₂ çözeltileri hazırlandı, bunların 100:1:1 oranlardaki karışımı ile Lowry C ayracı elde edildi. Lowry C ayracı, +4°C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

3.6. Glukoz Standardı Çizilmesi

Enzim aktivitesi ve redükte şeker ölçümlerinde alınan sonuçlar, glukoz ile hazırlanan standart eğriden hesaplanabileceğinden, açığa çıkan redükte şeker olan glukozu ait bir standart eğri çizildi. Bunun için hazırlanan stoktan seri sulandırım yapılarak farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren tüpler hazırlandı. Bu tüplerdeki çözeltiler DNS yöntemine göre redükte şeker olarak ölçüldü ve spektrofotometrede (JENWAY, 6105 U.V./Vis. Spektrofotometre) 550 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Elde edilen standart eğri, bundan sonra yapılacak ölçümlerde kullanıldı.

3.7. Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivitesi, DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemi ile ölçüldü (Miller, 1959). Bu yöntemle ölçüm için, öncelikle dekstranın, pH: 5.4'teki 0.1 M sodyum asetat tamponu ile % 2' lik çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti çalışmada substrat olarak kullanıldı (Kosaric et al., 1973; Pleszczynska et al., 1997). Üreme sonunda kültür süzöntüsü milipor filtreden süzülerek, pelet kısmından ayrıldı. Elde edilen süpernatant, 15 dakika 7200 rpm'de santrifüj edildi ve sonuçta elde edilen enzim süzöntüsü deneylerde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Enzim aktivitesinin tayini için bu süzöntüden 1 ml alınarak üzerine 2 ml substrat eklenip, uygun sıcaklık ve süre olarak literatürden bulunan 40°C'de 20 dakika su banyosunda inkübe edildi (Madhu and Prabhu, 1985; Shukla et al., 1989; Smiley et al., 1982). Bu örnekten süre sonunda 1ml alınarak üzerine 3 ml DNS ayracı eklendi. 15 dakika kaynar su banyosunda tutulup enzim aktivitesi sona erdirildikten sonra renk oluştu, bu renk

de spektrofotometrik olarak (JENWAY, 6105 U.V./Vis. Spektrofotometre) 550 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı okundu. Kör olarak, içinde enzim olmayan, yalnızca substrat solüsyonu ile hazırlanmış olan ve üzerine test solüsyonunda olduğu gibi 1:3 oranında DNS ayracı eklenip kaynar su banyosunda 15 dakika boyunca test solüsyonu ile birlikte inkübe edilerek hazırlanmış olan örnek kullanıldı. Sonuçlar, glukoz ile hazırlanmış olan standart eğriden hesaplanarak, açığa çıkan redükte şeker mg/ml glukoz olarak saptandı (Miller, 1959).

İnkübasyon sonunda, dekstran polimerinden 1 dakikada 1µmol redükte şeker açığa çıkaran enzimin aktivitesi 1 ünite olarak belirlendi ve bu tanımdan gidilerek bulunan redükte şeker miktarlarından enzim aktiviteleri U/ml olarak hesaplandı. Protein ölçümlerinin ardından sonuçlar U /mg protein olarak gösterildi.

3.8. Protein Standardı Çizilmesi

Protein standardı için kullanılacak protein olan sığır serum albümini (BSA) ile stok solüsyonu hazırlandı. Bu stoktan seri sulandırım yapılarak farklı konsantrasyonlarda sığır serum albümin tüpleri hazırlandı. Bu tüplerdeki çözeltiler Lowry yöntemine göre bir seri işlemlere tabi tutuldu ve spektrofotometrede (JENWAY, 6105 U.V./Vis. Spektrofotometre) 550 nm' de köre karşı okundu (Lowry et al.,1951). Elde edilen standart eğri, bundan sonra yapılacak protein ölçümlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

3.9. Protein Ölçümü

Milipor filtreden süzöldükten sonra santrifüj aşamasından geçirilmiş enzim süpernatantının Lowry C ayracı ile karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmesinin ardından, sulandırılmış folin çözeltisi ilave edildi ve 30 dakika beklendi. Süre sonunda enzim örneği spektrofotometrede (JENWAY, 6105 U.V./Vis. Spektrofotometre) 550 nm dalga boyunda köre karşı okundu (Lowry et al.,1951).

3.10. *Paecilomyces lilacinus*' ta Enzim Üretim Ortamı İçin Uygun Besiyerinin Seçilmesi ve Hazırlanması

Literatür taramaları sonucunda saptanmış ve bazı modifikasyonlar (Besiyeri B' ye maya özütü sonradan eklendi) yapılmış olan 3 besiyeri, en iyi enzim aktivitesini vermesi açısından denenmek üzere seçildi (Abdel-Naby et al., 1999; Fukumoto et al., 1971; Hattori et al., 1981; Pleszczynska et al., 1997; Shukla et al., 1989; Tsuru et al., 1971). Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te besiyeri içerikleri verilmiştir.

Çizelge 3.2. Besiyeri A' nın içeriği

Dekstran	10.0 g/L
NaNO ₃	2.0 g/L
K ₂ HPO ₄	2.0 g/L
Maya özütü	2.0 g/L

Çizelge 3.3. Besiyeri B' nin içeriği

Dekstran	15.0 g/L
NaH ₂ PO ₄	3.0 g/l
Sukroz	1.0 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g/L
Pepton	0.01 g/L
KCl	0.1 g/L
K ₂ HPO ₄	2.5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g/L
Maya özütü	2.0 g/L

Çizelge 3.4. Besiyeri C'nin içeriği

Dekstran	10.0 g/L
NaNO ₃	1.0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g/L
K ₂ HPO ₄	1.0 g/L
KCl	0.5 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g/L
Maya özütü	1.0 g/L

Hazırlanmış olan 3 farklı besiyerinin pH değerleri 0.1 M HCl ile pH 6.0 olarak ayarlandı ve 250 ml' lik Erlen Meyer' lere 50 ml olarak paylaştırıldı. Besiyerleri 110°C' de 25 dakika süreyle otoklavda tutulmak suretiyle steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyerleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Soğuduktan sonra bu besiyerlerine, daha önceden belirlenen miktarda ve şekilde inokülasyon gerçekleştirildi.

3.11. *Paecilomyces lilacinus*' un Dekstranaz Üretimini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşulların Saptanması

3.11.1. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin saptanması

Bu deneyde *Paecilomyces lilacinus*' un kullanılan besiyerindeki üremesinin zamana göre değişiminin saptanması ve bu fungusun dekstranaz üretimi açısından en uygun inkübasyon süresinin bulunması amaçlandı. Bunun için, bütün çalışmalarda kullanılması uygun bulunan ve temel dekstranaz üretim besiyeri olarak belirlenen Besiyeri A' ya ekim yapılarak 30°C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda, *Paecilomyces lilacinus*' un günden güne değişen üreme değerleri, redükte şeker değerleri, protein miktarları ve enzim üretimi, 9 gün boyunca ölçülerek tayin edildi. Buna

göre enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri hesaplanıp, enzim üretimi için en uygun inkübasyon süresi bulundu.

3.11.2. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığının saptanması

Paecilomyces lilacinus' un üreme sürecinde inkübasyon sıcaklığının, dekstranaz sentezine olan etkisini saptamak amacıyla, kullanılan temel besiyerine (Besiyeri A) ekim yapıldı. İnoküle edilmiş örnekler, değişik inkübatörlerde 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C derecelerde 7 gün boyunca 150 rpm' de çalkalanarak inkübe edildi. Üreme sonunda alınan örneklerden dekstranaz, protein ve redükte şeker değerleri ölçülerek enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi değerleri bulundu. Buna göre dekstranaz üretimi açısından en uygun inkübasyon sıcaklığı tayin edildi.

3.11.3. Dekstranaz üretimi için optimum başlangıç pH değerinin saptanması

Bu deneyde, besiyerinin başlangıçtaki pH değerinin *Paecilomyces lilacinus*' un üremesine ve dekstranaz üretimine etkisinin bulunması amaçlandı. Bunun için, kullanılan temel besiyerinin pH değerleri, pH:4, pH:4.5, pH:5, pH:5.5, pH:6, pH:6.5, pH:7, pH:7.5, pH:8 olacak şekilde 0.1 M' lık HCl ile ayarlandı. Bu besiyerlerine uygun şartlarda ekim yapıldıktan sonra, Erlen Meyer' ler 30°C' de 7 gün 150 rpm hızındaki etüvde üremeye bırakıldı. Kültürasyon sonunda, dekstranaz, protein ve redükte şeker değerleri ölçülerek enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Bunun sonucunda en uygun başlangıç pH değeri saptandı.

3.11.4. Dekstranaz üretimi için optimum çalkalama hızının saptanması

İnkübasyon esnasındaki çalkalama hızının dekstranaz sentezine etkisini saptayabilmek için, pH:6' ya ayarlanmış temel besiyeri kullanılıp ekim yapılan Erlen Meyer' ler, inkübasyon için etüvde statik koşulda ve değişik çalkalama

hızlarında (50 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm) olmak üzere 5 farklı ortama yerleştirildi. 30°C' deki 7 günlük inkübasyon süresi sonunda dekstranaz, protein ve redükte şeker değerleri ölçülerek enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı. *Paecilomyces lilacinus*' tan dekstranaz üretimi için en uygun çalkalama hızı, ölçümler sonucunda tespit edildi.

3.11.5. Dekstranaz üretimi için optimum inokülasyon miktarının saptanması

Besiyerine inoküle edilen fungus spor sayısının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması için yapılan bu deneyde, temel besiyeri olarak saptanmış olan Besiyeri A' ya $2 \cdot 10^1$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^{10}$, ve $2 \cdot 10^{20}$ spor içerecek şekilde hazırlanmış spor süspansiyonlarından ekim yapıldı. İnkübasyon için 30°C' deki etüvde 7 gün 150 rpm.de tutulan kültürlerden, bu süre sonunda dekstranaz, protein ve redükte şeker değerleri ölçüldü. Sonuçta elde edilen değerlerden enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi değerleri hesaplanarak *Paecilomyces lilacinus* için en uygun inokülasyon miktarı tespit edildi.

3.11.6. Değişik karbon kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Paecilomyces lilacinus' un dekstranaz üretiminde, en verimli karbon kaynağının saptanması amacıyla, 9 ayrı karbon kaynağı kullanıldı. Bunun için Dekstran T70, glukoz, laktoz, nişasta, fruktoz, sukroz, maltoz ile *Leuconostoc mesenteroides* ve *Streptococcus mutans*'tan elde edilip tam olarak saflaştırılmamış haldeki 2 tip dekstran, içinde karbon kaynağı olmayan temel besiyerine % 2 oranında olacak şekilde ilave edildi. Bu şekilde hazırlanmış ve steril edilmiş besiyerlerine inoküle edilen ve 30°C' de, 150 rpm' de, 7 gün üretilen *Paecilomyces lilacinus* kültürleri için inkübasyon sonrasında üreme, dekstranaz, redükte şeker ve protein ölçümleri yapıldı. Bunun sonucunda hesaplanan enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi değerlerinden, dekstranaz üretimi için kullanılabilecek en uygun karbon kaynağı saptandı.

3.11.7. Karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Kullanılan temel besiyerindeki karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstran sentezine etkisinin saptanması amacıyla, temel besiyerindeki karbon kaynağı konsantrasyonu modifiye edildi. % 0, % 0.5, % 1, % 2, % 4 konsantrasyonlarında karbon kaynağı içeren besiyerleri hazırlandı. İnokülasyonun ardından 30°C' de, 150 rpm' de, 7 gün inkübasyon gerçekleştirildi, *Paecilomyces lilacinus* için en uygun karbon kaynağı konsantrasyonu, dekstranaz, redükte şeker ve protein ölçümleri sonuçlarından hesaplanan enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktiviteleri ile saptandı.

3.11.8. Değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Paecilomyces lilacinus' tan dekstranaz sentezi için, kullanılan temel besiyeri, azot kaynağı olarak NaNO₃, NH₄NO₃ ve (NH₄)₂SO₄ ile ayrı ayrı hazırlandı. % 0.2 oranında eklenen azot kaynaklarının üzerine besiyerinin kalan içeriği değiştirilmeden eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüm besiyerlerine sterilizasyondan sonra ekim yapıldı. 30°C' de, 150 rpm' de, 7 günlük inkübasyon sonucunda dekstranaz, redükte şeker ve protein miktarları ölçüldü ve enzim aktivitesi ile spesifik enzim aktiviteleri saptanarak, dekstranaz üretimi için en uygun azot kaynağı bulundu.

3.11.9. Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Bu aşamada, en uygun azot kaynağı olarak saptanan NaNO₃ kullanıldı. Azot kaynağı dışındaki besiyeri içeriği konsantrasyonu sabit tutularak, temel besi yerlerine konsantrasyonları 0.1 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L, 2.0 g/L, 4.0 g/L olacak şekilde değişik miktarlarda NaNO₃ tartılarak eklendi ve üretim 30°C' de, 150 rpm' de, 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Inkübasyonun ardından tayin edilen

dekstranaz, redükte şeker ve protein miktarları ile enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktiviteleri hesaplandı ve *Paecilomyces lilacinus*' tan dekstranaz sentezi için en uygun azot kaynağı konsantrasyonu bulundu.

3.12. Reaksiyon Ortamında *Paecilomyces lilacinus*' tan Üretilen Dekstranaz Aktivitesini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşulların Saptanması

Paecilomyces lilacinus' un 1 haftalık yatık PDA besiyerinde üretilmesiyle elde edilen kültürle spor süspansiyonu hazırlandı. Yapılan çalışmalar sonunda modifiye edilen temel besiyerlerine bu süspansiyondan uygun miktarda ekim yapıldı ve 30°C' de, 150 rpm' de, 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen kültür ortamlarının süpernatantları enzim süzüntüsü olarak kullanıldı. Enzim süzüntüsü ve pH: 5.4'teki 0.1 M sodyum asetat tamponu ile % 2 dekstran içeren substrat solüsyonu bir araya getirilerek, enzim-substrat reaksiyon ortamı hazırlandı. Bu karışım, ilerideki çalışmalarda anlatıldığı gibi, fizyolojik koşulların saptanması için deney amacına göre modifiye edilerek kullanıldı.

3.12.1. Inkübasyon süresinin dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması

Bu çalışmada, enzim substrat karışımının reaksiyon ortamında inkübe edilme süresinin enzim aktivitesine etkisinin bulunması amaçlandı. Bunun için inkübasyon, 0. dakikadan başlayarak 1., 2., 3., 4., 5., 10., 15., 20., 25., 30., 40., 50., 60., 70. ve 80. dakikalarda sonlandırılacak şekilde, 40°C'de pH:5.4' te gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış olan örneklerden her biri su banyosuna aynı anda konarak, reaksiyonun gerektirdiği süre sonunda inkübasyon ortamından alındı ve enzim aktiviteleri saptandı. Bunun sonucunda *Paecilomyces lilacinus*' tan elde edilmiş dekstranaz için, reaksiyon ortamının tutulması gereken en uygun inkübasyon süresi saptandı.

3.12.2. İnkübasyon sıcaklığının dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması

Dekstranaz aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini saptayabilmek amacıyla sabit pH' da (pH:5.4) ve substrat konsantrasyonunda (%2) hazırlanan reaksiyon ortamları, sıcaklıkları 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C' a ayarlanmış olan su banyolarında sabit süre boyunca inkübe edildi. Daha sonra her bir reaksiyon ortamı inkübasyon ortamlarından alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı. Çalışma sonunda dekstranaz enzimi için reaksiyon ortamındaki en uygun inkübasyon sıcaklığı tayin edildi.

3.12.3. İnkübasyon pH'sının dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması

Enzim-substrat ortamının, inkübasyon sırasında içinde bulunduğu pH değerinin dekstranaz enziminin aktivitesine olan etkisinin tayin edilmesi amacıyla, pH' ları, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 ve 7 değerlerinde olan reaksiyon ortamları hazırlandı. pH değerleri 0.1 M' lık sodyum asetat tamponu ile ayarlandı. Bu reaksiyon ortamları, sabit süre, sıcaklık ve substrat konsantrasyonunda inkübe edildi ve inkübasyon sonunda enzim değerleri saptandı. Buna göre, reaksiyon ortamındaki inkübasyon pH' sının dekstranaz enzimine olan etkisi bulundu.

3.12.4. İnkübasyon substrat konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisinin saptanması

Bu çalışmada enzim-substrat karışımındaki substrat konsantrasyonunun, enzim aktivitesine etkisinin saptanması amaçlandı. %0.5, %1, %2, %4 ve %8 konsantrasyonlarındaki dekstran ile hazırlanmış substrat ortamları, enzim ile sabit oranda karıştırıldı. Bu reaksiyon ortamları, sabit sıcaklık, pH ve sürede inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyonun ardından reaksiyon ortamları alınarak her biri için enzim aktiviteleri tayin edildi ve bunun sonucunda *Paecilomyces lilacinus'* tan elde edilen dekstranazın reaksiyon ortamında bulunması gereken en uygun substrat konsantrasyonu saptandı.

3.13. Dekstranaz Enziminin Kararlılığının Saptanması

Bu çalışmada, optimum fizyolojik koşullarla *Paecilomyces lilacinus*' ten elde edilmiş dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığı, sıcaklık kararlılık süresi ve pH kararlılığının belirlenebilmesi için deneyler yapıldı. Bunun için enzim sıvısı ilerideki çalışmalarda anlatıldığı gibi deney amacına göre çeşitli sıcaklık ve pH derecelerinde, farklı sürelerle tutularak enzim aktiviteleri hesaplandı.

3.13.1. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığının saptanması

Dekstranaz enziminin belirli sıcaklık aralığındaki kararlılığını saptamak amacıyla, enzim örnekleri 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C sabit sıcaklığa ayarlanmış ortamlarda 30 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra bu inkübasyon ortamlarından alınan enzim süzüntülerinin, standart enzim aktivitesi tayini ile enzim aktiviteleri saptandı. İnkübasyona tabi tutulmamış olan enzimin aktivitesi 100 kabul edildi ve inkübasyon sonrasındaki enzim aktivitelerinin, buna göre % kararlılık değerleri hesaplandı.

3.13.2. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresinin saptanması

Dekstranaz enziminin belirli sıcaklıklara ne kadar süre ile dayanıp stabilitesini koruyacağını saptamak amacıyla enzim süzüntüleri, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C sabit sıcaklığa ayarlanmış ortamlarda yarım saat ile 8 gün arasında inkübasyona bırakıldı. İlk 7 saate kadar her saat başı ölçülen enzim aktivitesi, 24 saatten sonra günde bir defa ölçüldü. Bunun için her bir enzim süzüntüsü, saptanan süre sonunda inkübasyon ortamından alındı ve enzim aktivitesi standart tayin yöntemi ile saptandı. İnkübasyona tabi tutulmamış olan enzimin aktivitesi 100 kabul edilerek sonuçlar değerlendirildi ve enzimin farklı sıcaklıklardaki kararlılık süreleri saptandı.

3.13.3. Dekstranaz enziminin pH kararlılığının saptanması

Dekstranaz enziminin değişen pH değerlerinde kararlılığını ne kadar koruyabileceğinin saptanması amacıyla, enzim sıvısı sodyum asetat tamponu ile pH:4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8 değerlerine ayarlandı. Değişik pH değerlerindeki enzim süzüntüleri, oda sıcaklığında 2 saat ve 24 saat süre ile inkübe edildi. Sonuçta, her bir tüpteki değişik pH değerinde inkübe edilmiş enzim süzüntüsü, standart enzim ölçüm işlemine tabi tutuldu. pH değeri değişmemiş ve inkübasyona tabi tutulmamış olan enzimin aktivitesi 100 kabul edildi ve inkübasyon sonrasındaki enzim aktivitelerinin, buna göre enzim kararlılıkları, enzim aktivitesi tayini sonucunda bulundu.

3.14. Dekstranaz Eldesi İçin Artıkların Alternatif Besiyerleri Olarak Kullanılması

3.14.1. Alternatif besiyeri olarak melas kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Bu çalışmada, alternatif bir besiyeri olarak şeker fabrikası atığı olan melas kullanıldı. *Paecilomyces lilacinus*' un temel besiyeri olarak kullanılan ve içine distile su dışında herhangi bir madde eklenmeyen melasın değişik konsantrasyonları distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Kullanılan melas besiyerinin ve değişik konsantrasyonlarının dekstranaz sentezine etkisinin saptanması amacıyla, % 5, % 10 ve % 20 konsantrasyonlarında melas içeren besiyerleri hazırlandı. Besiyerinin 0.1 M 'lık HCl ile pH değeri 6.0 olacak şekilde ayarlandı ve uygun sterilizasyon sonrasında ekim yapıldı. Daha sonra 30°C' de, 150 rpm' de, 7 gün boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonucunda elde elden kültürlerde, üreme, dekstranaz, redükte şeker ve protein miktarları ölçüldü, enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi, bu ölçümler sonucunda hesaplandı.

3.14.2. Alternatif besiyeri olarak pirina kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Zeytin alt ürünü olan pirina, bu çalışmada dekstranaz üretimi için alternatif bir üretim ortamı olarak denendi. Bunun için yalnızca pirina, besiyeri ortamına başka bir ekleme yapılmaksızın temel üretim ortamı olarak kullanıldı. % 5, % 10 ve % 20 konsantrasyonlarında olacak şekilde distile su ile karıştırılarak hazırlanan bu besiyerlerinin 0.1 M'lık HCl ile pH değerleri 6.0'ya ayarlandı. Daha önce yapılmış olan *Paecilomyces lilacinus* spor süspansiyonundan, hazırlanan ortamlara inokülasyon yapılarak 7 gün 30°C' de ve 150 rpm' deki inkübasyona bırakıldı. Bunun sonucunda elde edilen kültürlerden, üreme, dekstranaz, redükte şeker ve protein miktarları belirlendi. Enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi hesaplandı.

3.14.3. Alternatif besiyeri olarak melas ve pirinanın beraber kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Bu çalışma için şeker fabrikası atığı olan melas ile zeytin işlenmesi sırasında çıkan artık pirinanın beraber kullanılmasıyla *Paecilomyces lilacinus*'tan dekstranaz üretiminde alternatif bir besiyeri kullanımı amaçlandı. Bunun için % 5 melas ile % 5 pirina; % 10 melas ile % 10 pirina; % 20 melas ile % 20 pirina karıştırılarak değişik konsantrasyonlarda karışık artık besiyerleri hazırlandı. Sadece distile su ile karıştırılarak konsantrasyonları ayarlanan besiyerlerinin pH değerleri 0.1 M'lık HCl 6.0'ya getirildi. Uygun sterilizasyon sonrasında ekim yapıp 30°C' de ve 150 rpm' de inkübasyona bırakıldı. 7 gün sonunda kültürler inkübasyon ortamından alınarak üreme, dekstranaz, redükte şeker ve protein miktarları belirlendi. Bunun sonucunda da enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi hesaplandı.

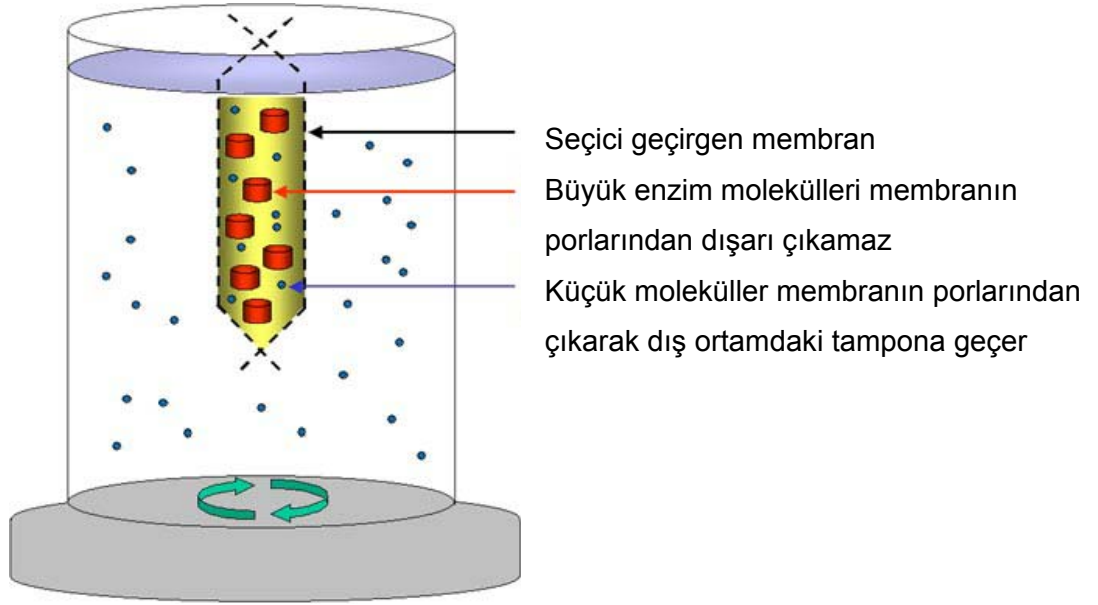
3.14.4. Alternatif besiyeri olarak artıklar ve dekstranın beraber kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Bu çalışmada, farklı ortamlardaki melas ve pirina besiyerlerine dekstran eklenerek elde edilen besiyerlerinde dekstranaz üretimi amaçlandı. Bunun için farklı Erlen Meyer' lerde melas ve pirina besiyerleri hazırlandı. Bu ortamlara eklenecek substratın etkisini saptamak için üretim ortamlarına % 1 dekstran eklendi. 0.1 M' lik HCl ile pH değerleri ayarlandı. Sterilizasyon ve inokülasyon sonrasında 30°C' de ve 150 rpm' de 7 günlük üretim gerçekleştirildi. Elde edilen kültürlerden üreme, dekstranaz, redükte şeker ve protein miktarları belirlendikten sonra enzim aktiviteleri ve spesifik enzim aktiviteleri hesaplandı.

3.15. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Dekstranaz Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi

Bu yöntemin uygulanması için öncelikle enzim örneği diyaliz edildi. Bunun için *Paecilomyces lilacinus*, 1 hafta temel besiyerinde 150 rpm hızında 30°C'de üretildi. Etüvden alınan kültür süzüldü, süpernatant 7200 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve berrak enzim çözeltisi diyaliz işlemlerinde kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılacak olan diyaliz tüpü, öncelikle uygun ölçüde kesildi ve distile suda yaklaşık olarak 10 dakika kaynatılarak yumuşatıldı. Diyaliz tüpünün bir ucu, zedelenmeyecek şekilde sıkıca bağlandı. Açık kalan diğer uçtan enzim süzüntüsü bir pipet yardımıyla tüp içine dikkatlice kondu ve diyaliz tüpünün bu ucu da sıkıca bağlandı. Enzimle doldurulmuş diyaliz tüpü, 0.01 M sodyum asetat tamponu içeren uygun boyutlardaki bir beher içinde manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi (Şekil 3.2). Etrafındaki tamponu birkaç sefer yenilenerek 1 gece boyunca +4°C'deki buzdolabı içinde sürekli karıştırılarak diyaliz edildi. Süre sonunda diyaliz tüpü içindeki enzim süzüntüsü dikkatlice alındı. Bu süzüntüden enzim, redükte şeker, protein tayinleri yapıldı.



Şekil 3.2. Diyaliz işleminin şematik görünümü. (<http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzpur/images/dialysis.jpg>).

Bazı kimyasal maddelerin ortamda bulunması durumunda enzim aktivitesindeki değişimlerin saptanabilmesi için, öncelikle çeşitli kaynaklarda enzim aktivasyonu ve inaktivasyonu çalışmalarında kullanılmış olan kimyasal maddeler ile konsantrasyonları araştırıldı. Bulunan literatürden yola çıkılarak deney planı yapıldı (Fukumoto et al., 1971; Hattori et al., 1981; Hiraoka et al., 1972; Koenig and Day, 1988; Kosaric et al., 1973) . Bunun için 5 mM konsantrasyonda hazırlanan kimyasallar (CaCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, AgNO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NiSO_4 , HgCl_2 , CoCl_2 , CdCl_2 , FeCl_2), 1 ml diyaliz edilmiş enzim süzüntüsüne 0.5 ml olarak eklendi. Kör olarak 1 ml diyaliz edilmiş enzim süzüntüsüne 0.5 ml distile su eklendi ve standart enzim aktivitesi tayini yapıldı. Buna göre yüzde aktivite değerleri belirlendi.

3.16. *Paecilomyces lilacinus* Hücrelerinin Tutuklanması ve Tutuklanmış Mikroorganizmadan Dekstranaz Enziminin Üretimi

Bu çalışmada, *Paecilomyces lilacinus* hücrelerinin değişik materyallere immobilize edilmesi ve bu immobilize haldeki hücrelerden dekstranaz enzimi üretilmesi amaçlandı. Bunun için, yapılan literatür taraması sonunda değişik immobilizasyon materyalleri saptandı ve bu materyallerle immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

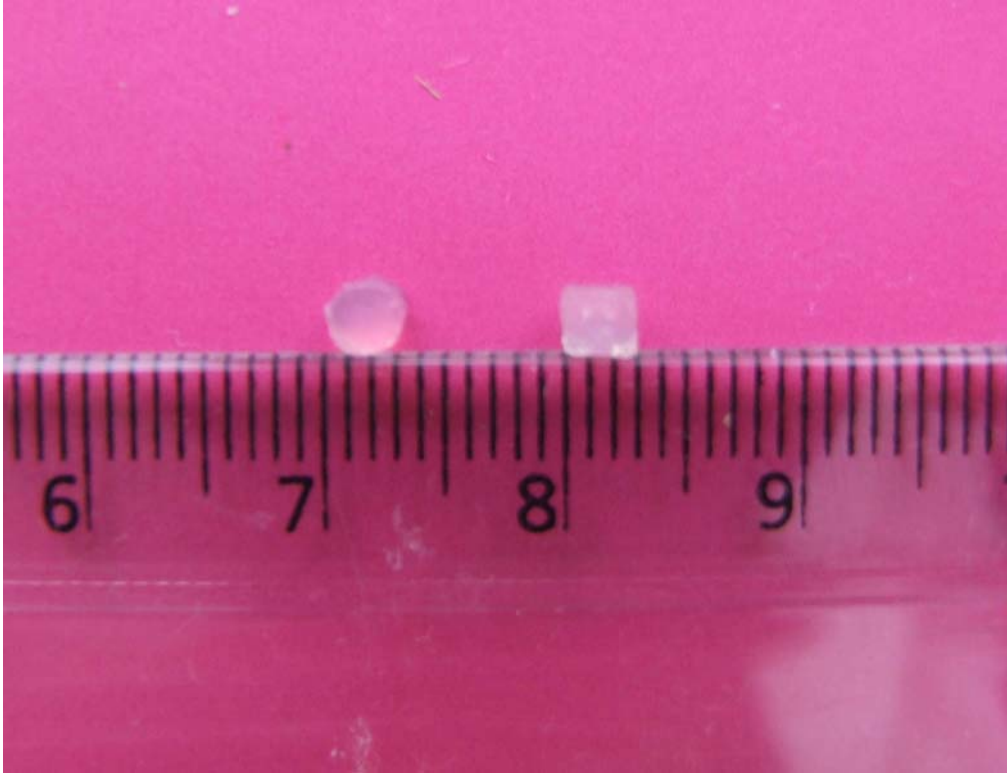
3.16.1. Agara tutuklama çalışmaları

Yapılan literatür taraması sonucunda agarın, porlu matriks içine tutuklamada kullanıldığı bulundu ve bu makalelerden yola çıkılarak (Haddar et al., 2007, Ramakrishna and Prakasham, 1999) deney planı yapıldı. Yaklaşık olarak $2 \cdot 10^5$ sayıda spor içeren 10 ml spor süspansiyonu, 40 ml % 3 konsantrasyonda hazırlanmış ve otoklavda steril edilmiş agar ile karıştırıldı.



Şekil 3.3. Petri kabındaki spor süspansiyonu- agar karışımı.

Karıştırma işlemi yapılmadan önce agarın 40°C sıcaklığa düşmesi bekledi. Daha sonra agar-spor süspansiyonu karışımı, önceden steril edilmiş petri kabına 3 mm kalınlıkta olacak şekilde steril şartlarda döküldü ve soğumaya bırakıldı. Soğumanın ardından, daha önceden steril edilmiş 3 mm çapındaki pipet yardımıyla parçalar kesildi (Şekil 3.3). 3 mm çap ve boydaki agar boncukları, steril öze ile petriden çıkartıldı (Şekil 3.4) ve steril distile su ile yıkandı. Bu boncuklar besiyerine steril şartlarda ekildi ve inkübasyon gerçekleştirildi.



Şekil 3.4. *P.lilacinus* hücrelerinin tutuklandığı agar boncukları.

3.16.2. Kalsiyum alginata tutuklama çalışmaları

Kalsiyum alginatın hücre immobilizasyonunda kullanılmakta olduğu literatürde yer almaktadır. (Ellaiah et al., 2004; Nighojkar et al., 2006; Smidsrod and Skjak-Braek, 1990; Zhang et al., 2007). Bundan yola çıkılarak, kalsiyum alginat ile hücre immobilizasyonu çalışması planlandı.

Yaklaşık olarak 2.10^5 sayıda spor içeren 10 ml spor süspansiyonu, 40 ml % 5 konsantrasyonda hazırlanmış ve otoklavda steril edilmiş ılık kalsiyum alginat ile karıştırıldı. Daha sonra kalsiyum alginat - spor süspansiyonu karışımı, önceden steril edilmiş bürete steril şartlarda boşaltıldı (Şekil 3.5). Büretin musluğu, 3 mm çapında yuvarlak boncuklar oluşacak şekilde ayarlanarak açıldı. Oluşan boncukların bozulmaması için daha önceden hazırlanıp steril edilmiş % 2' lik $CaCl_2$ çözeltisi, steril bir behere boşaltılarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi ve steril manyetik balıklar yardımıyla damlayan boncukların devamlı olarak çözeltide karışması sağlandı. Hazırlanmış olan bu düzenek içinde 2 saat boyunca aynı çözeltide karıştırılan boncuklar, daha sonra steril distile su ile yıkanarak besiyerine steril şartlarda ekildi ve inkübasyon gerçekleştirildi (Şekil 3.6).

3.16.3. Poliüretan süngere tutuklama çalışmaları

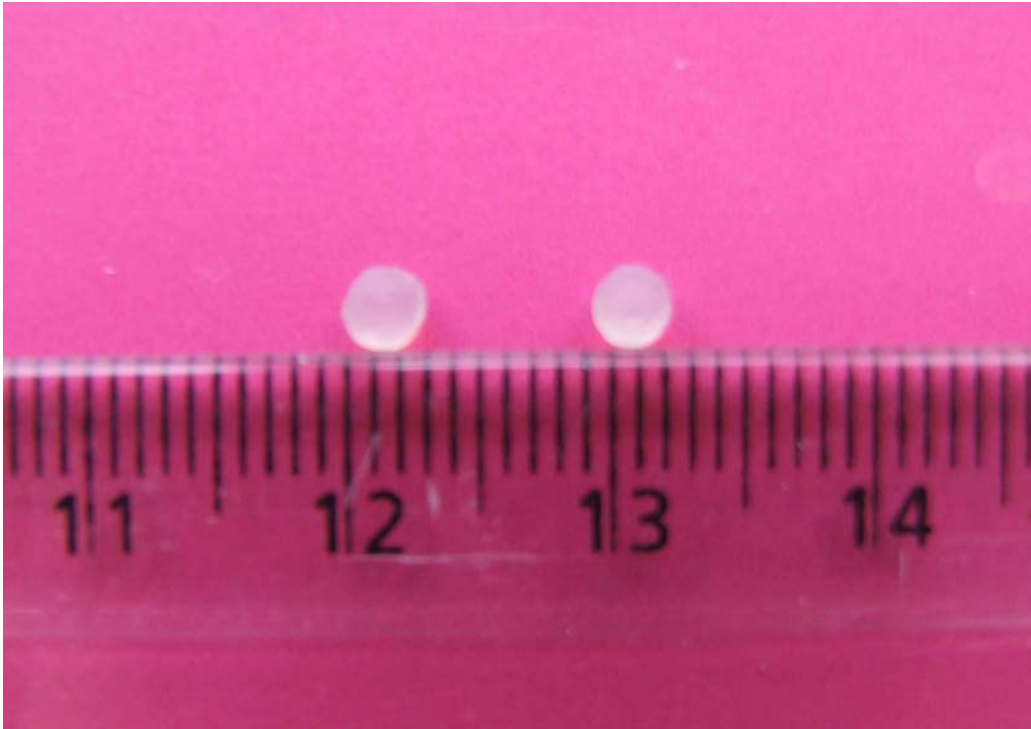
Çeşitli kaynaklarda yer alan hücre immobilizasyonu çalışmalarında sünger materyalinin kullanıldığı görüldü (Aleksieva et al., 2003; Aleksieva and Tchobanov, 1990; Karakoç, 2004; Skowronek and Fiedurek 2006). Bulunan literatürden yola çıkılarak süngere tutuklama çalışmaları planlandı.

Sünger parçalarından, her yüzü 1 cm boyutunda olacak şekilde küpler kesilerek hazırlandı (Şekil 3.7). Bu küpler yıkandı ve otoklavda steril edildi. Yaklaşık olarak 2.10^5 sayıda spor içeren 10 ml spor süspansiyonuna 5 adet sünger küp atıldı, 2-3 dakika çalkalanarak sporların sünger yüzeylerine tutunması sağlandı. Daha sonra tutunmayan sporlardan arındırmak için steril distile su ile yıkandı ve besi ortamına ekim yapıldı.

Bu çalışmada, İşbir Termoset Plastik Sanayi A.Ş 'den alınan sünger ile deneyler gerçekleştirildi. Bu poliüretan süngere ait fiziksel özellikler, Çizelge 3.5'de verilmektedir.



Şekil 3.5. Ca-alginat boncuklarının oluşturulduğu düzenekler.



Şekil 3.6. *P.lilacinus* hücrelerinin tutuklandığı Ca-alginat boncukları.

Çizelge 3.5. Süngerin fiziksel özellikleri (Karakoç, 2004)

Özellikler	Birim / Unit / Standart
Yoğunluk	$14.5 \pm 2 \text{ kg/m}^3$ (ISO 845)
Sertlik	$95 \pm \% 15 \text{ N}$ (ISO 2439)
Deformasyon oranı	$< \%12$ (ISO 1856)
Elastikiyet oranı	$\% 40 \pm 5$ (ASTM D 3574)
Kopma direnci	$0.08 \pm 0.02 \text{ N / mm}^2$ (ISO 1796)
Kopma anındaki uzama	$\% 250 \pm 50$ (ISO 1798)
Yırtılma direnci	$3.7 \pm 0.5 \text{ N /cm}$ (ASTM D 3574)



Şekil 3.7. *P.lilacinus* hücrelerinin tutuklandığı sünger küp.

3.16.4. Tutuklanmış ve serbest *P. lilacinus* hücreleri ile dekstranaz üretiminin karşılaştırılması

İmmobilizasyonda taşıyıcı materyal olarak kullanılan agar, kalsiyum alginat ve süngere tutuklanmış hücrelerle, uygun besiyerinde ve inkübasyon şartlarında dekstranaz üretimi gerçekleştirildi. Bu immobilize hücrelerle birlikte, aynı şartlarda kontrol olarak kullanılan serbest hücrelerden de enzim üretimi gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerden arındırılan kültür süpernatantları santrifüj edildi ve bu berrak süzüntülerden enzim aktiviteleri hesaplandı. İmmobilize hücrelerin gösterdiği enzim aktiviteleri, kontrol olarak kullanılan serbest hücrelerden elde edilen enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer hücrelerin aktivite değişimleri buna göre % değerlerle ifade edildi.

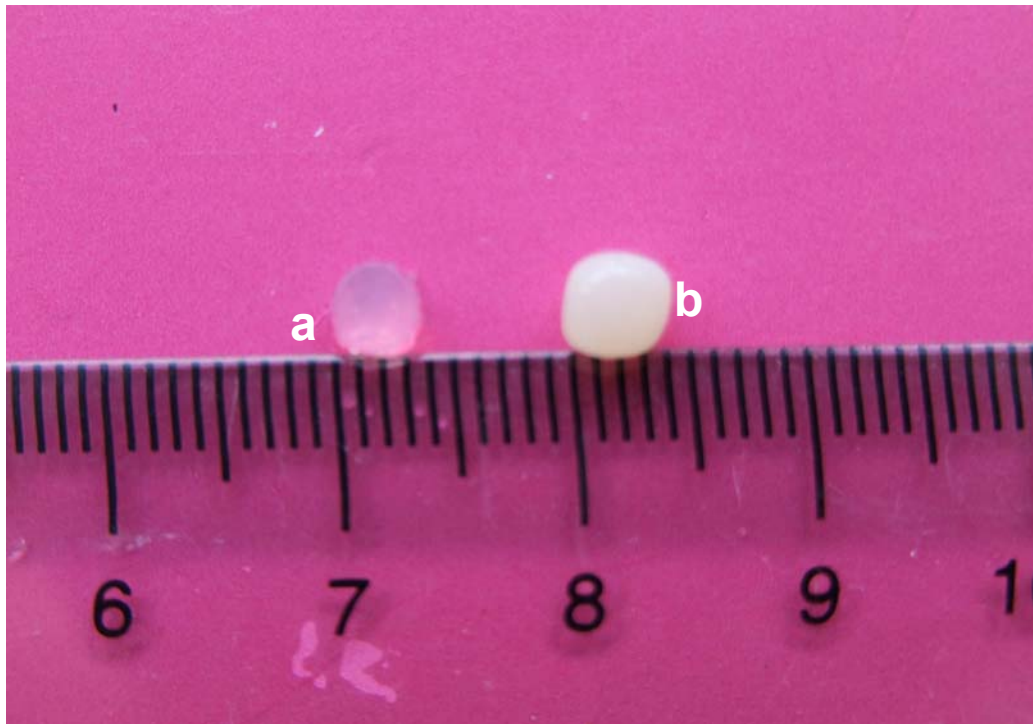
3.16.5. Tutuklanmış *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitelerindeki değişimin saptanması

İnkübasyon sonrasında etüvden alınan kültürlerin içindeki tutuklanmış hücreleri taşıyan boncuklar ve sünger parçaları, steril distile suyla yıkandıktan sonra steril şartlarda yaş ağırlıkları tartıldı ve yeni steril besiyerlerine geri ekildi. Yaş ağırlıklar hesaplanırken tartılan toplam boncuk veya sünger parçası değerleri, toplam sayıya bölünerek 1 tanesine ait yaş ağırlık saptandı. İnkübasyon sonunda kalan süpernatandan aynı yöntemle enzim aktivitesi hesaplandı. İmmobilize haldeki hücrelerin ilk kullanımlarında gösterdikleri aktivite ile sonraki kullanımlarında gösterdikleri aktivite değişimleri saptandı. Böylelikle bu hücrelerin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Aynı immobilize hücrelerin, 6 kez yeni besiyerine ekilmesiyle süreklilik çalışması tamamlandı.

3.16.5.1. Agara tutuklanmış *P. lilacinus* hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması

Agar ile yapılan immobilizasyon çalışması sonunda elde edilen *P. lilacinus* hücrelerini içeren agar boncukları, besiyerine ekildi ve uygun koşullarda inkübasyonu gerçekleştirildi. 1 haftalık süre sonunda inkübasyonu tamamlanan kültürlerden boncuklar steril olarak toplandı ve yaş ağırlıkları steril olarak hesaplandıktan sonra, steril distile su ile yıkanıp taze besiyerlerine tekrar ekildi ve inkübasyona bırakıldı. Bu süreç, bu tutuklanmış hücrelerin ikinci döngüsü olarak ifade edildi.

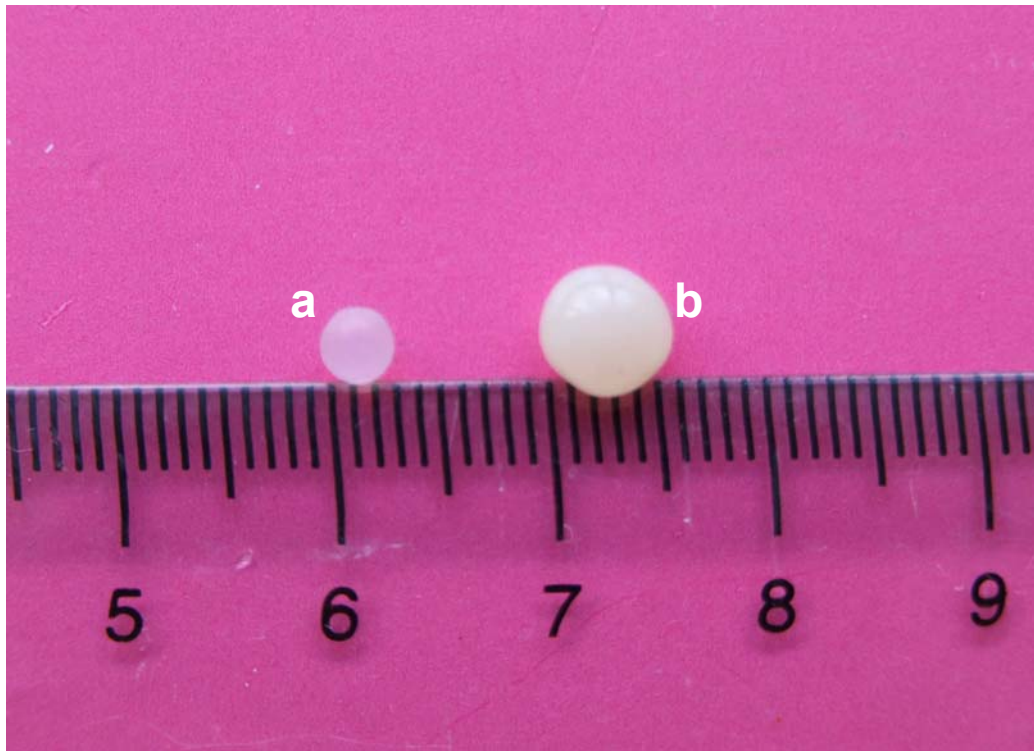
Aynı şekilde 6 sefer tekrarlanan bu döngülerin sonunda, hücreleri içeren boncukların kullanım süreklilikleri bulundu. 6. döngü sonunda boncuklar tekrar fotoğraflandı (Şekil 3.8) ve ilk immobilize edildikleri şekillerine ile bu 6 döngü sonunda aldıkları şekil karşılaştırıldı.



Şekil 3.8. Agara tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren boncukların inkübasyon öncesinde (a) ve 6 döngü sonundaki (b) şekil değişikliği.

3.16.5.2. Kalsiyum alginata tutuklanmış *P. lilacinus* hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması

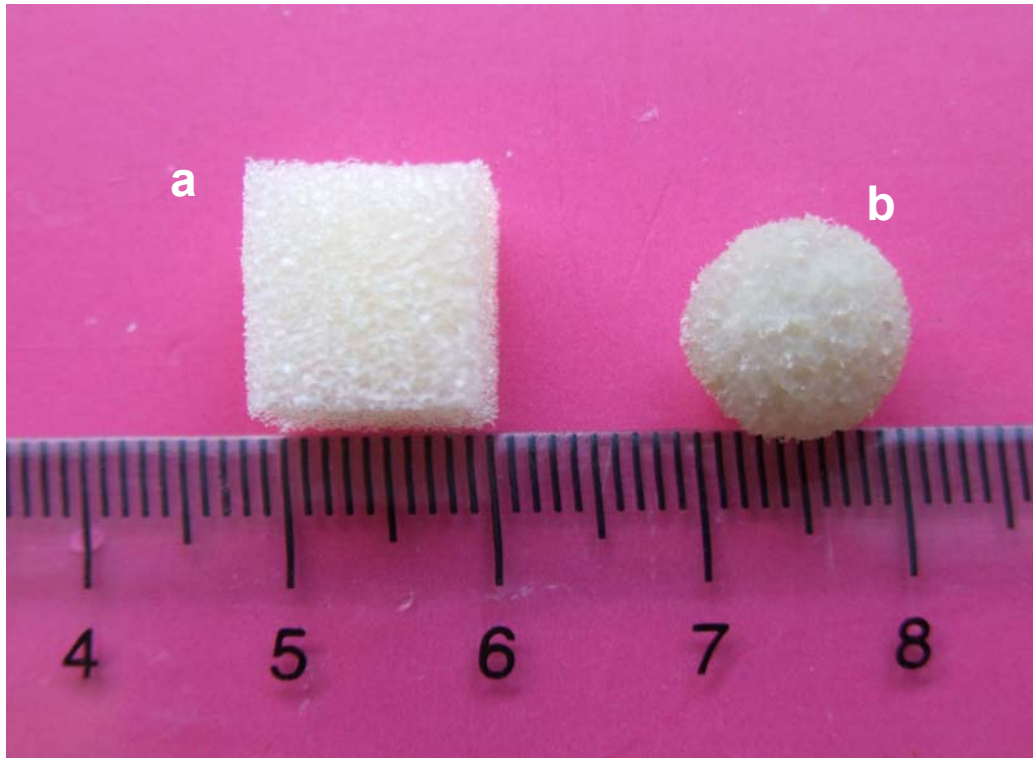
Bu çalışma için kalsiyum alginata tutuklanmış hücreleri içeren boncuklar, ilk kültürasyon sonrasında steril şartlarda kültürden uzaklaştırıldı ve yine steril olarak boncukların yaş ağırlık ölçümleri yapıldı. Bunun ardından steril distile suda yıkanan boncuklar, ikinci döngü için yeni bir besiyerine tekrar ekildi. Eski kültürlerden alınarak yeni besiyerlerine inoküle edilme işlemi, birbiri ardına altı sefer tekrarlandı. Son döngünün ardından boncukların fotoğrafı çekildi (Şekil 3.9). Her kültürasyon sonunda elde edilen süpernatantlardan enzim aktiviteleri hesaplandı.



Şekil 3.9. Kalsiyum alginata tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren boncukların inkübasyon öncesi (a) ve 6 döngü sonundaki (b) şekil değişikliği.

3.16.5.3. Süngere tutuklanmış *P. lilacinus* hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması

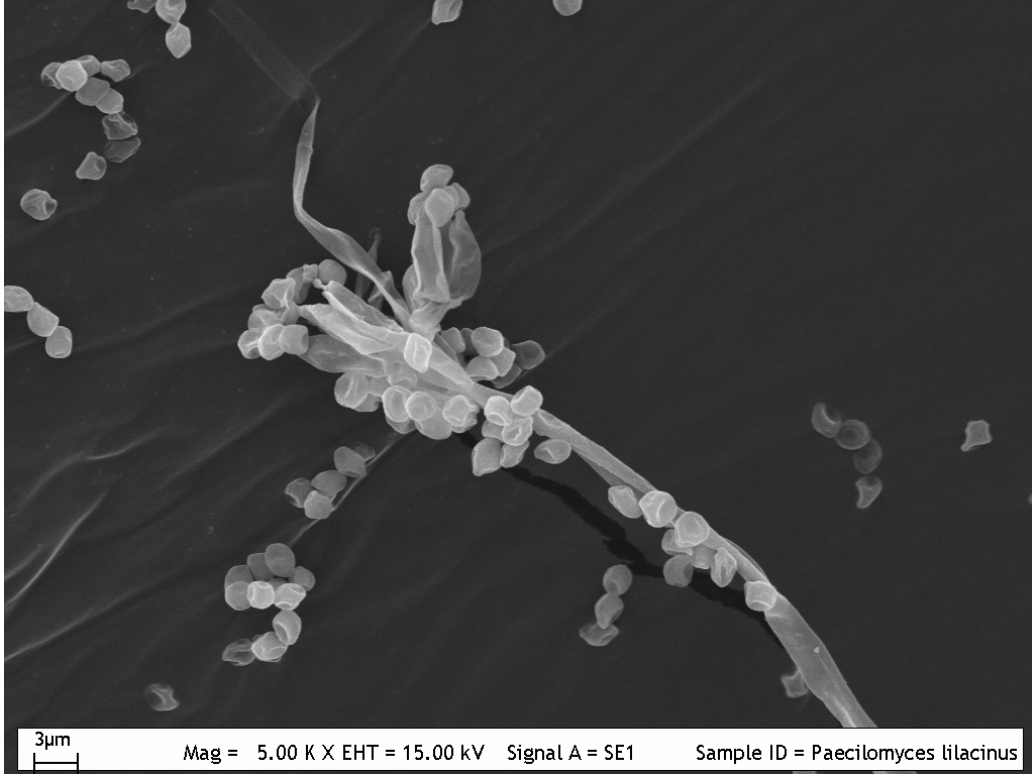
Sünger küplere immobilize edilen *P. lilacinus* hücrelerinden dekstranaz üretiminin sürekliliğinin araştırılması için, bu küpler ilk besiyerindeki inkübasyondan sonra steril olarak alınarak steril distile su içinde yıkandı ve steril besiyerine geri inoküle edildi. Daha sonra ikinci kültürden aynı şekilde alınan aynı sünger küpler 3., 4., 5. ve 6. kez aynı işlemlerden geçerek yeni besiyerlerine ekildi. Her inkübasyondan sonra sünger küplerin steril petriler içinde yaş ağırlıkları tayin edildi. son inkübasyondan sonra alınan küplerin fotoğrafları çekildi ve ilk baştaki şekilleri ile karşılaştırıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Süngere tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren küplerin inkübasyon öncesi (a) ve 6 döngü sonundaki (b) şekil değişikliği.

3.16.6. Süngere tutuklanmış *P. lilacinus* hücrelerinin elektron mikroskobu görüntüleri

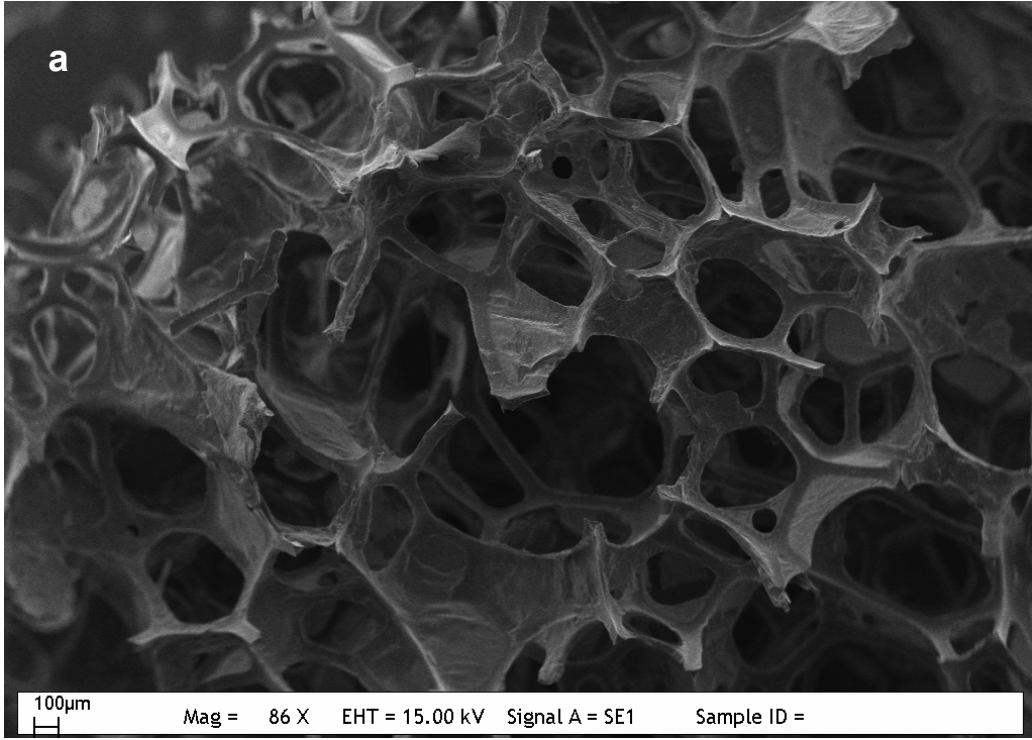
Poliüretan süngere tutuklanmış *P. lilacinus* hücreleri inkübasyon sonrasında steril olarak kurutuldu. Kurutulmuş bu immobilize hücrelerin bulunduğu poliüretan sünger, kuru haldeki boş sünger ve PDA' da üremiş serbest hücrenin elektron mikroskobu ile fotoğrafları çekildi (Şekil 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15).



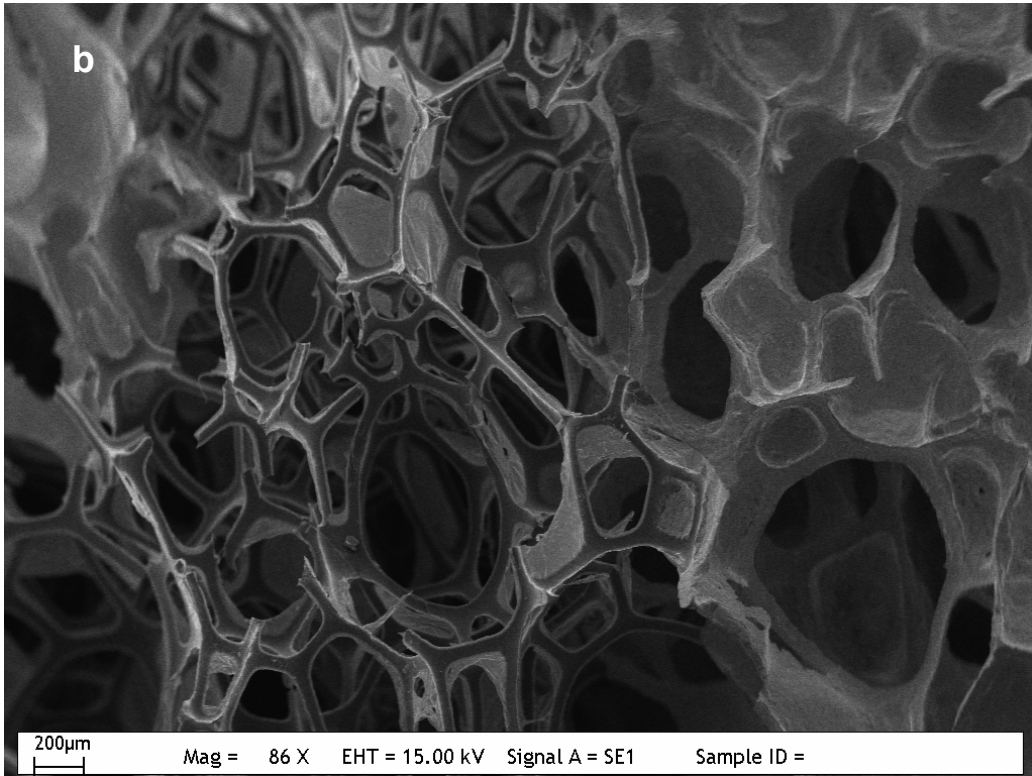
Şekil 3.11. Serbest haldeki *P.lilacinus* hücreleri

Büyütme: 5000x

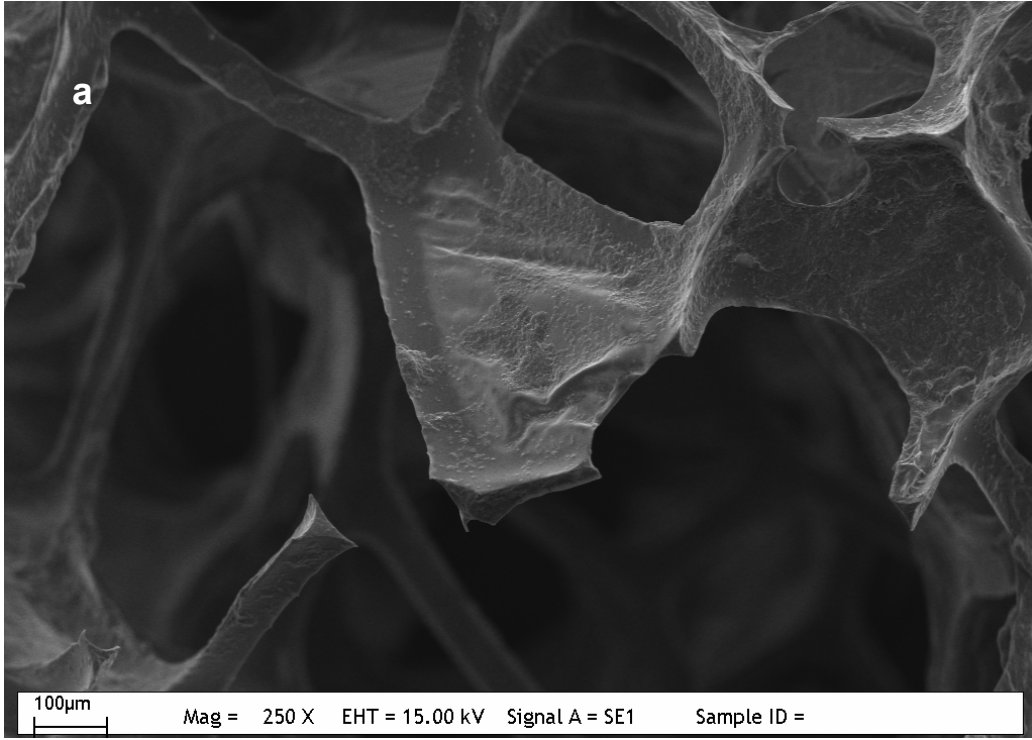
Boş ve hücrelerin tutuklanmış olduğu poliüretan sünger örnekleri, çeşitli büyütmelerde (85x, 250x, 1000x, 2000x) fotoğraflandı. İmmobilize hücreleri içeren poliüretan sünger, boş poliüretan sünger ve serbest haldeki hücre fotoğrafları birbiri ile karşılaştırıldı.



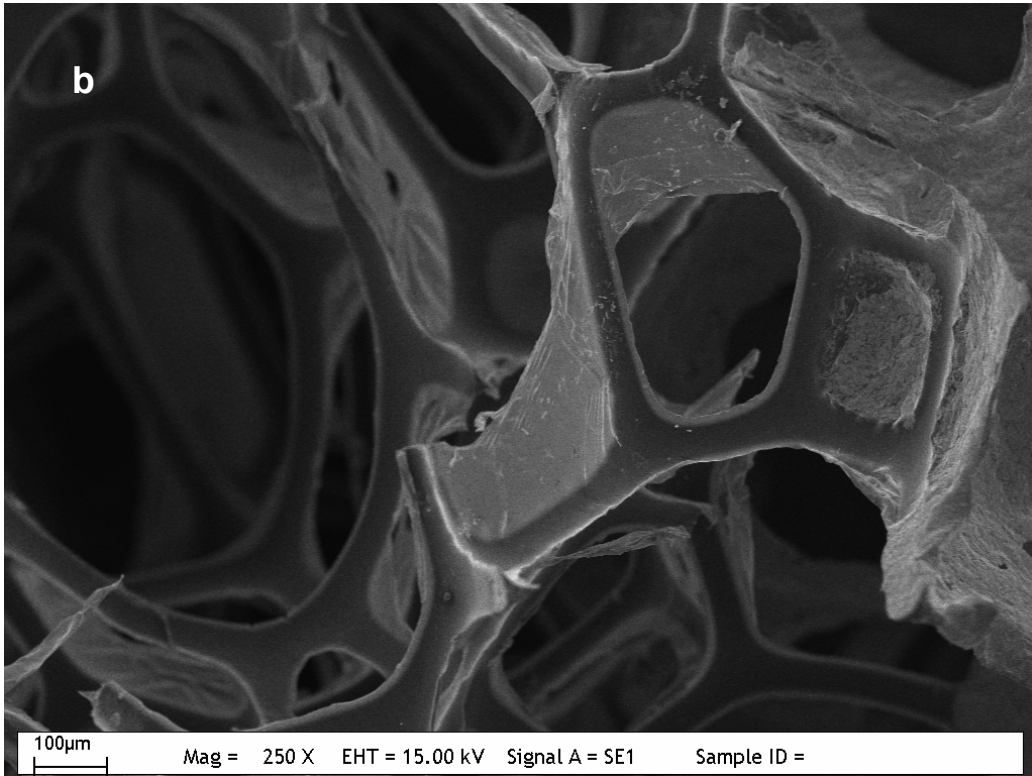
Şekil 3.12.a) Tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren poliüretan sünger (86x büyütme)



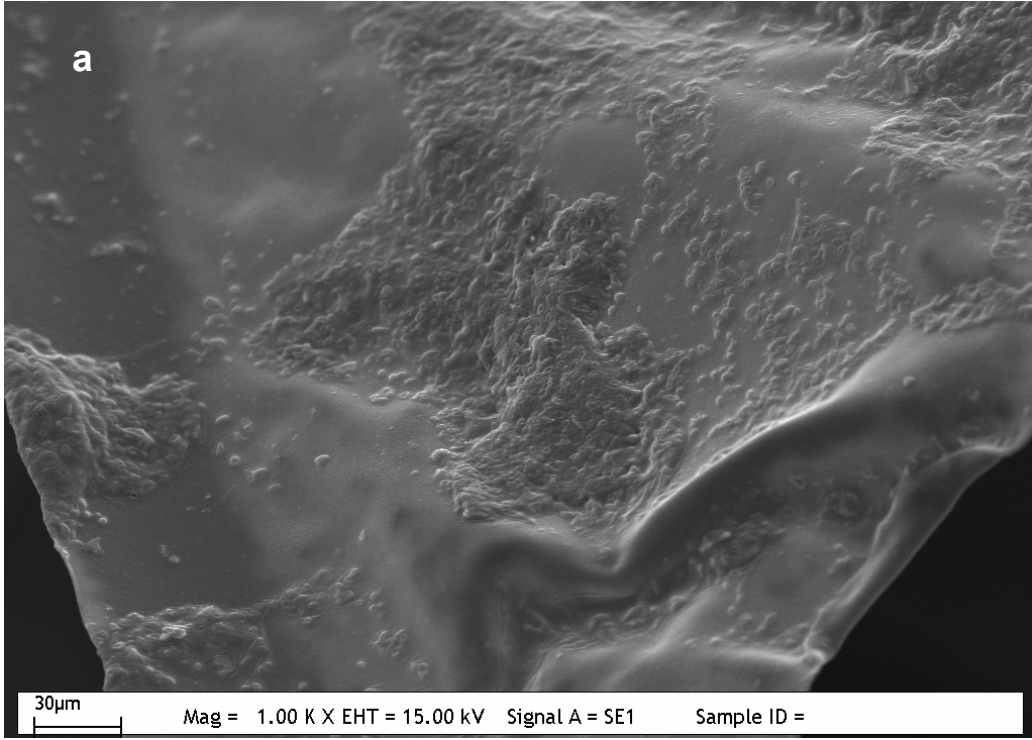
Şekil 3.12.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (86x büyütme)



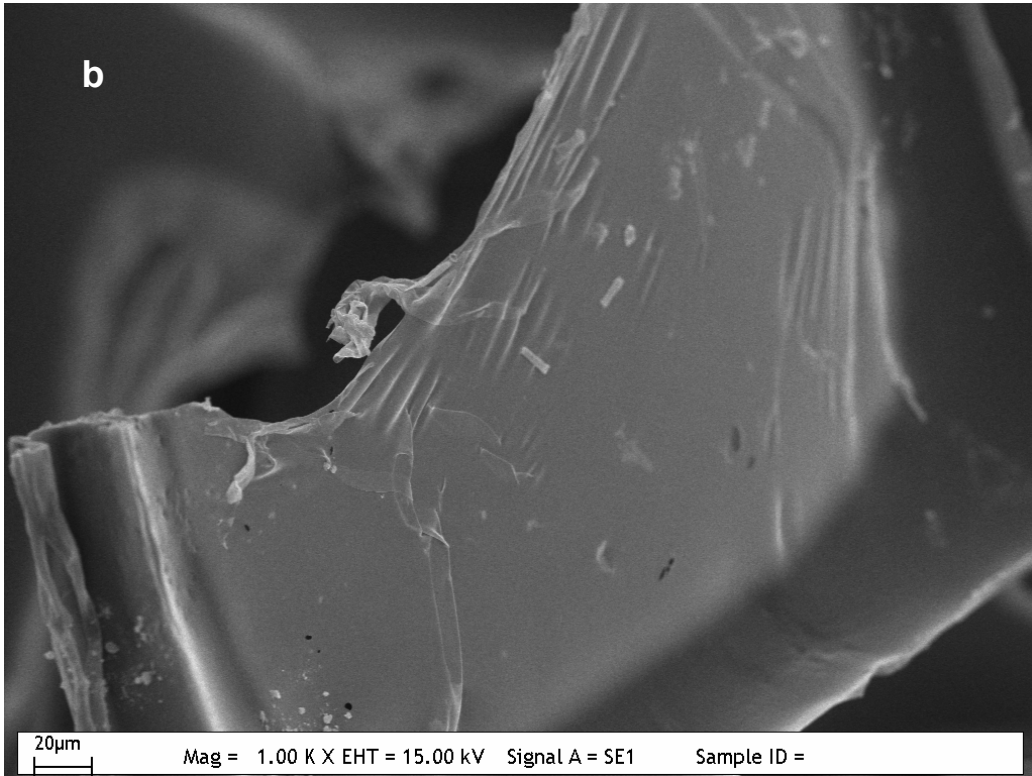
Şekil 3.13.a) Tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren poliüretan sünger (250x büyütme)



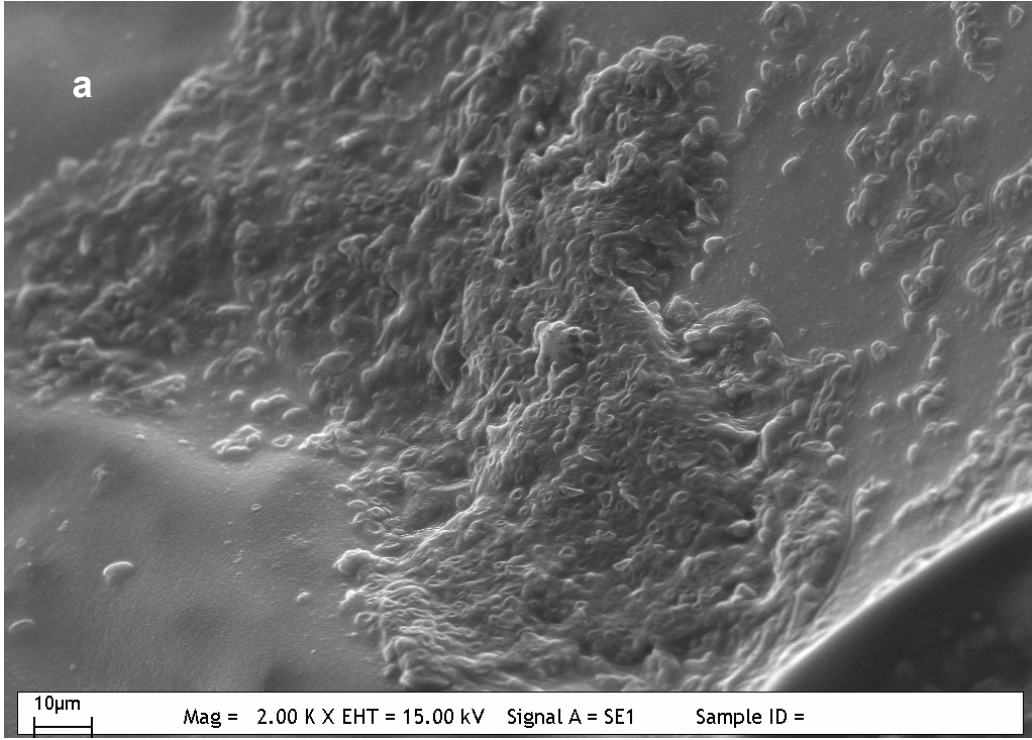
Şekil 3.13.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (250x büyütme)



Şekil 3.14.a) Tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren poliüretan sünger (1000x büyütme)



Şekil 3.14.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger 1000x büyütme



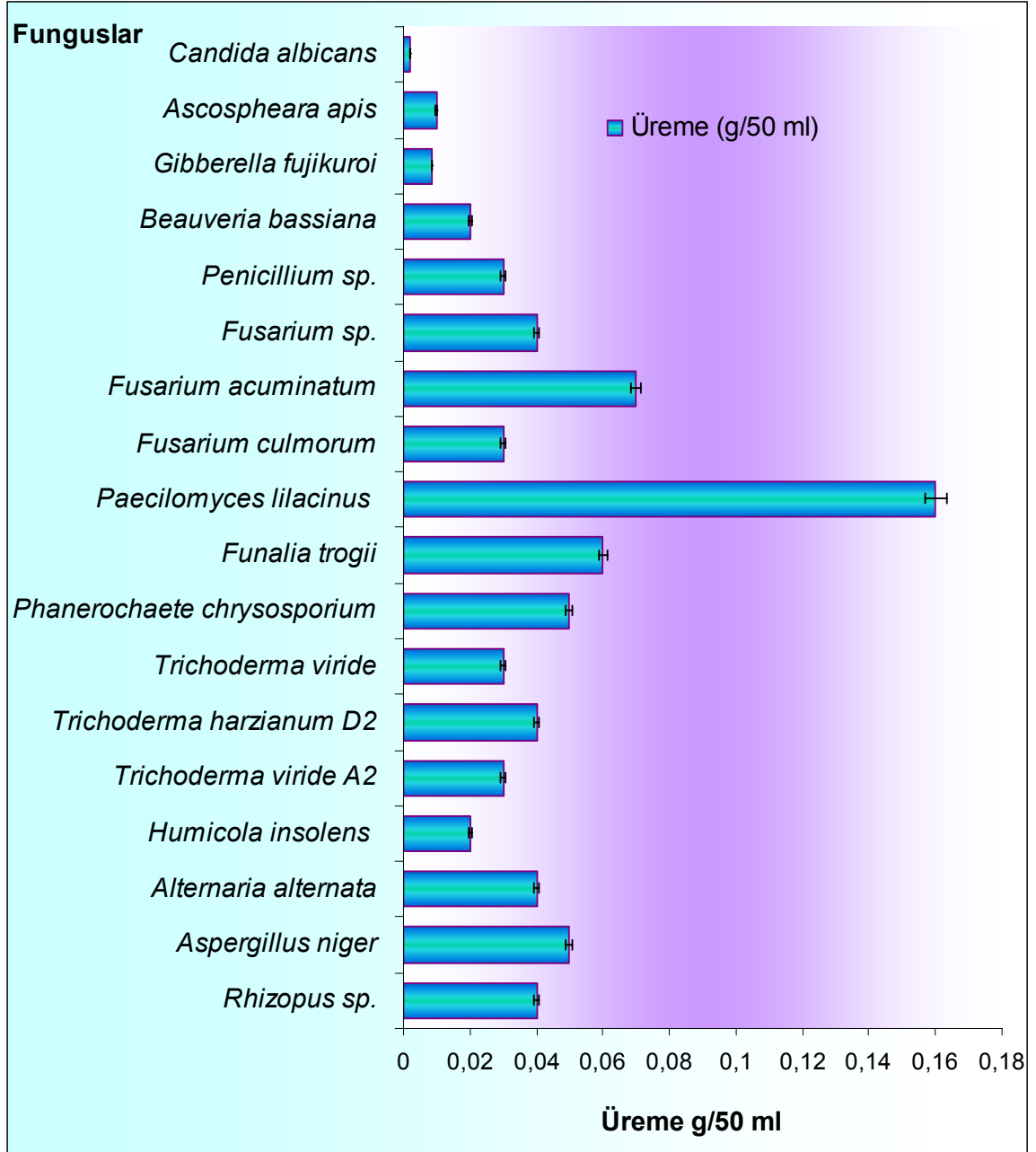
Şekil 3.15.a) Tutuklanmış *P.lilacinus* hücrelerini içeren poliüretan sünger (2000x büyütme)



Şekil 3.15.b) Hücre içermeyen poliüretan sünger (2000x büyütme)

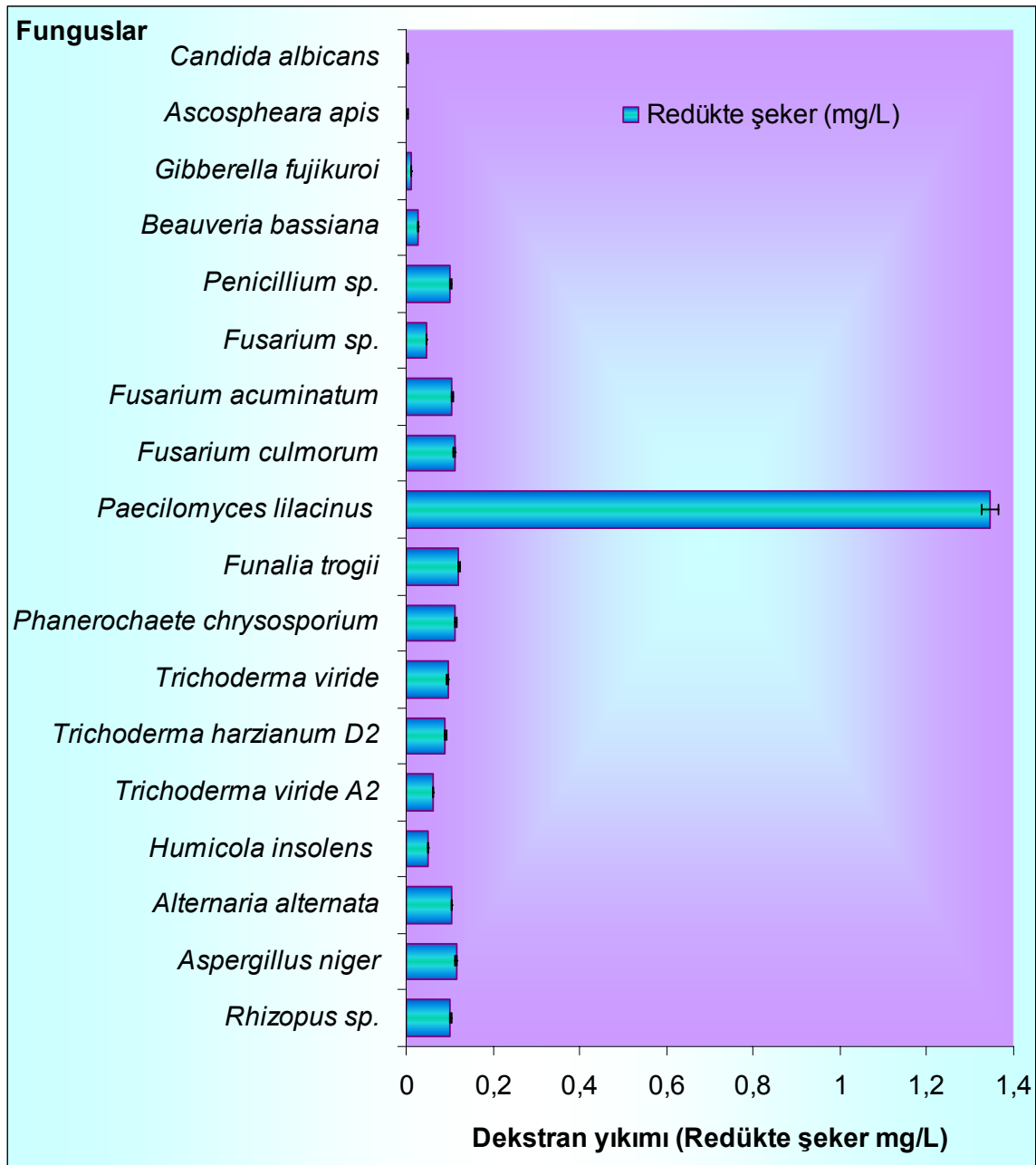
4. BULGULAR

4.1. Fungusların Dekstranaz Aktivitesi Bakımından Taranması



Şekil 4.1. Funguslarda dekstranaz üretimi ile bağlantılı üreme değerleri.

*Üretimler, 30°C derecede, 150 rpm hızında ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.



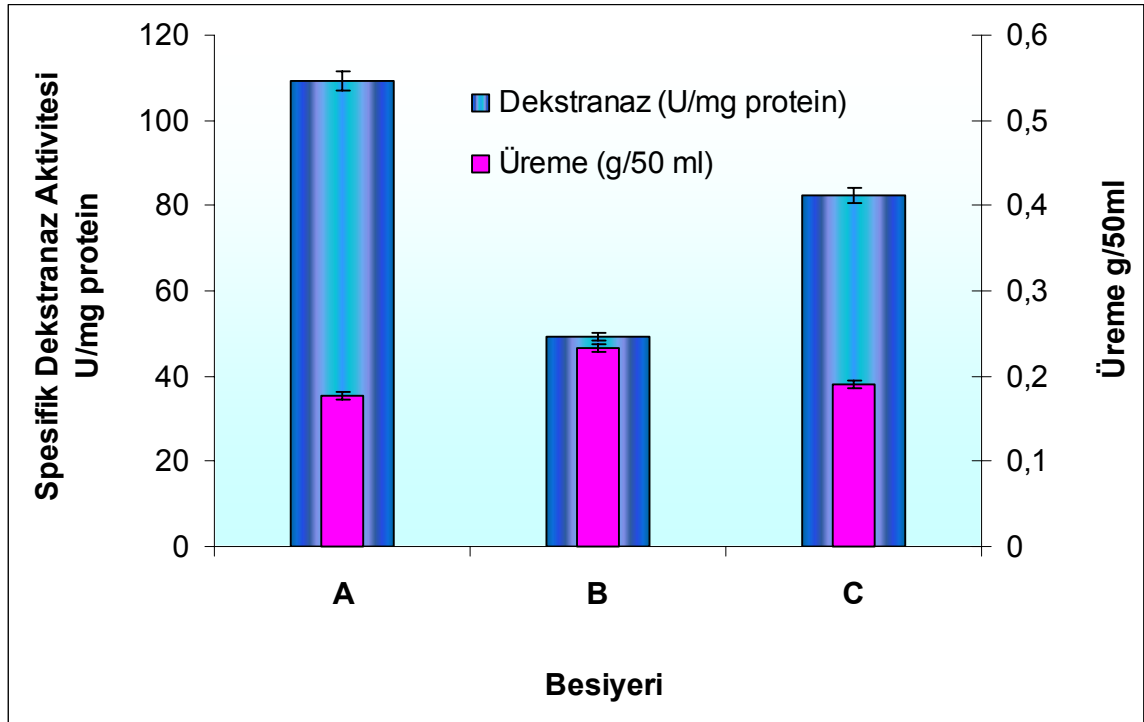
Şekil.4.2. Funguslarda dekstranaz üretimi.

*Üretimler, 30°C derecede, 150 rpm hızında ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

19 adet fungusun dekstran yıkımları, redükte şeker olarak gösterildi (Şekil 4.2). Şekil 4.1' de ise bu fungusların kuru ağırlıkları ile ölçülen üreme değerleri gösterildi. Buna göre en iyi dekstranaz aktivitesine sahip olan fungus, *Paecilomyces lilacinus* olarak belirlendi.

4.2. *Paecilomyces lilacinus*' ta Enzim Üretim Ortamı İçin Uygun Besiyerinin Seçilmesi ve Hazırlanması

Paecilomyces lilacinus' ta maksimum dekstranaz aktivitesi eldesi için kullanılan 3 farklı besiyeri arasında (Besiyeri içerikleri Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4' te gösterilmektedir), A besiyeri en yüksek spesifik enzim aktivitesi için uygun besiyeri olarak saptandı. Üreme değerleri denenen 3 besiyerinde de birbirine yakın olmakla birlikte, B besiyerinde daha yüksek bir değer gösterdi. Bununla birlikte en yüksek spesifik enzim aktivitesinin elde edildiği A besiyeri, dekstranaz üretimi için temel besiyeri olarak kabul edilip, bundan sonraki çalışmalarda kullanıldı (Şekil 4.3).



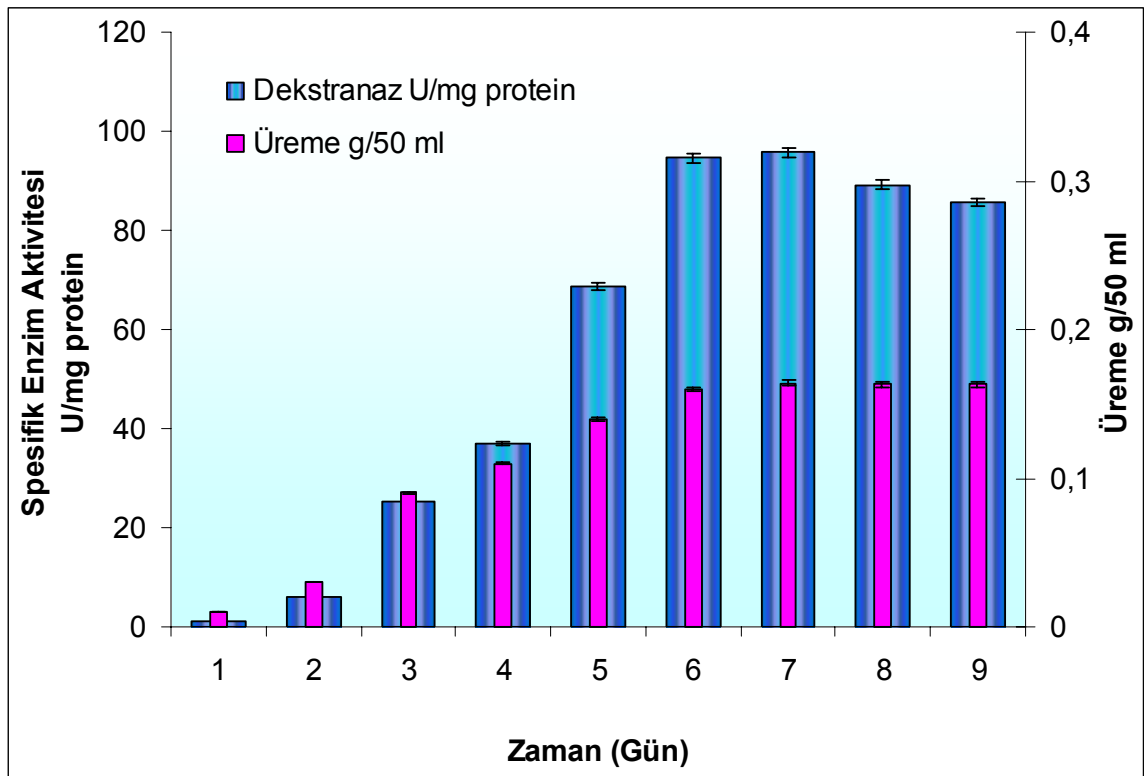
Şekil 4.3. *Paecilomyces lilacinus*' un değişik besiyerlerindeki dekstranaz aktivitesi ve üreme grafiği.

*Üretimler, 30°C derecede, 150 rpm hızında ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.3. *Paecilomyces lilacinus*' un Dekstranaz Üretimini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşullar

4.3.1. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon süresi

Paecilomyces lilacinus' tan dekstranaz üretimi için temel besiyeri olarak seçilen Besiyeri A ortamında 9 gün boyunca üretilen fungusun, enzim, redükte şeker ve protein değerleri takip edilerek sonuçlar kaydedildi. Bunun sonucunda dekstranaz üretimi için gerekli sürenin, en yüksek spesifik enzim aktivitesinin elde edildiği 7. gün olduğu saptandı (Şekil 4.4). Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında inkübasyon süresi olarak 7 gün kullanıldı.

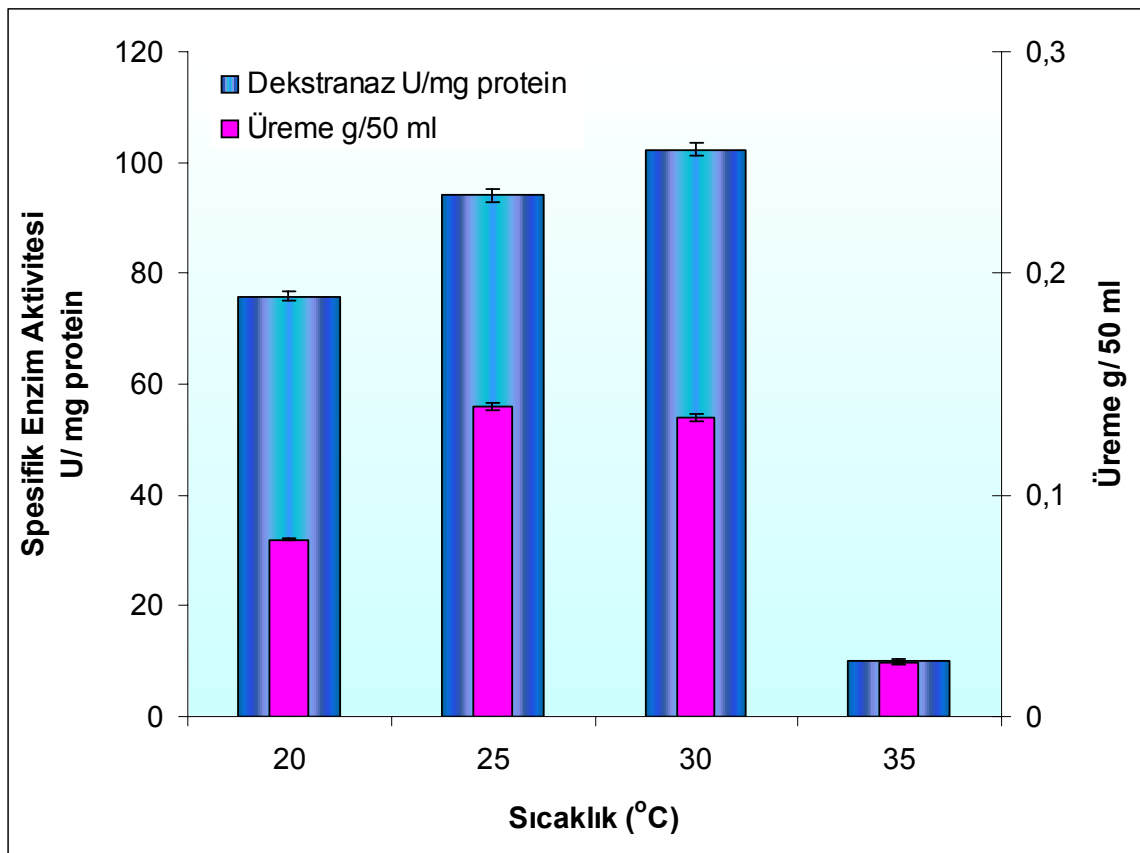


Şekil 4.4. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon süresi

*Üretimler, 30°C derecede, 150 rpm hızında ayarlı inkübatörde 9 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.3.2. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığı

Farklı inkübatörlerde 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C derecelerde yapılan inkübasyon sonucunda, 30°C, optimum dekstranaz üretiminin elde edildiği nokta olarak saptandı (Şekil 4.5). Bu değerin altındaki sıcaklıklarda dekstranaz üretiminin hafif bir düşüş gösterdiği ve üstündeki inkübasyon şartlarında üremenin azaldığı, dolayısıyla dekstranaz sentezinin de minimum düzeye indiği gözlemlendi. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında inkübasyon sıcaklığı olarak 30°C' nin kullanılması uygun görüldü.

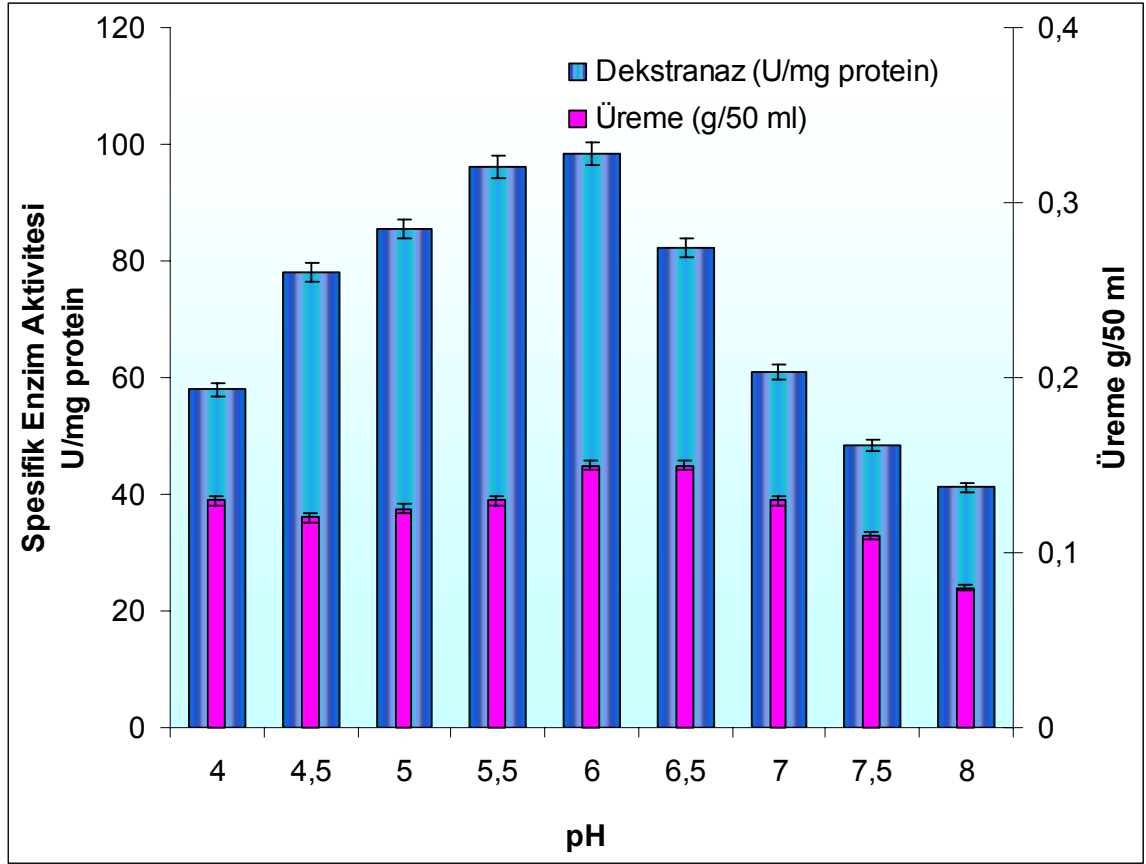


Şekil 4.5. Dekstranaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığı

**Üretimler verilen sıcaklık derecelerinde, 150 rpm hızında ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.*

4.3.3. Dekstranaz üretimi için optimum başlangıç pH değeri

Besiyerinin başlangıçtaki pH değerine bağlı dekstranaz üretimi, temel besiyerinde değişik pH' larda üretilen *Paecilomyces lilacinus*' un inkübasyonu sonunda yapılan ölçümlerle saptandı. En uygun pH değerinin, pH 6 olduğu bulundu. Bu değerlerin daha aşağısında ve daha yukarısında ise dekstranaz üretiminin azaldığı görüldü (Şekil 4.6). Bundan sonraki besiyeri pH değerleri, pH 6 olarak ayarlandı.

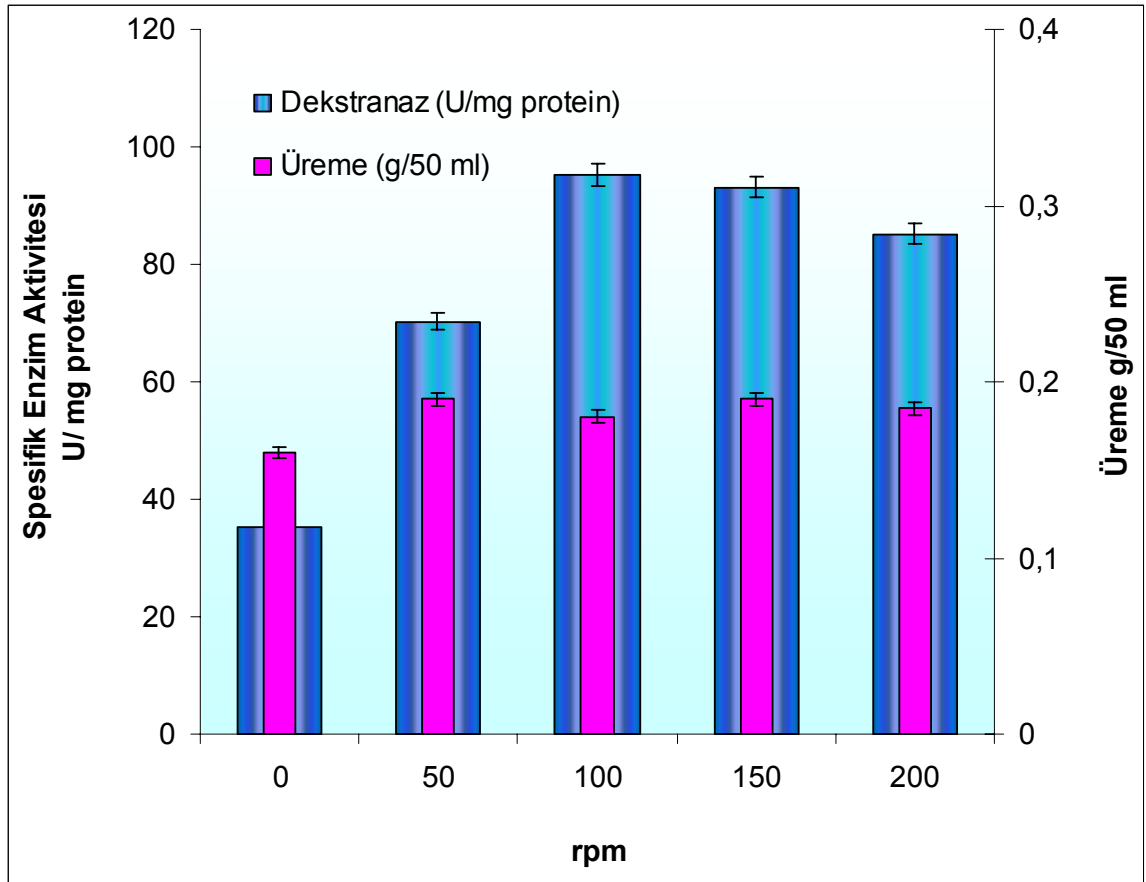


Şekil 4.6. Dekstranaz üretimi için optimum başlangıç pH değeri

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızında ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.3.4. Dekstranaz üretimi için optimum çalkalama hızı

Paecilomyces lilacinus sporları temel besiyerine ekildikten sonra bu besiyerlerinin bir kısmı etüvde statik koşullarda inkübe edilirken diğer bir kısmı da değişik çalkalama hızındaki koşullarda inkübe edildi. 7 günün sonunda kültür süzüntülerinin enzim, redükte şeker, protein ve üreme değerleri ölçüldü ve Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, statik koşulların dekstranaz sentezi için uygun olmadığı saptandı. 100 rpm ve 150 rpm çalkalama hızları, inkübasyon için uygun bulunmakla beraber, laboratuvar şartları açısından bundan sonraki çalışmalar 150 rpm hızında gerçekleştirildi.

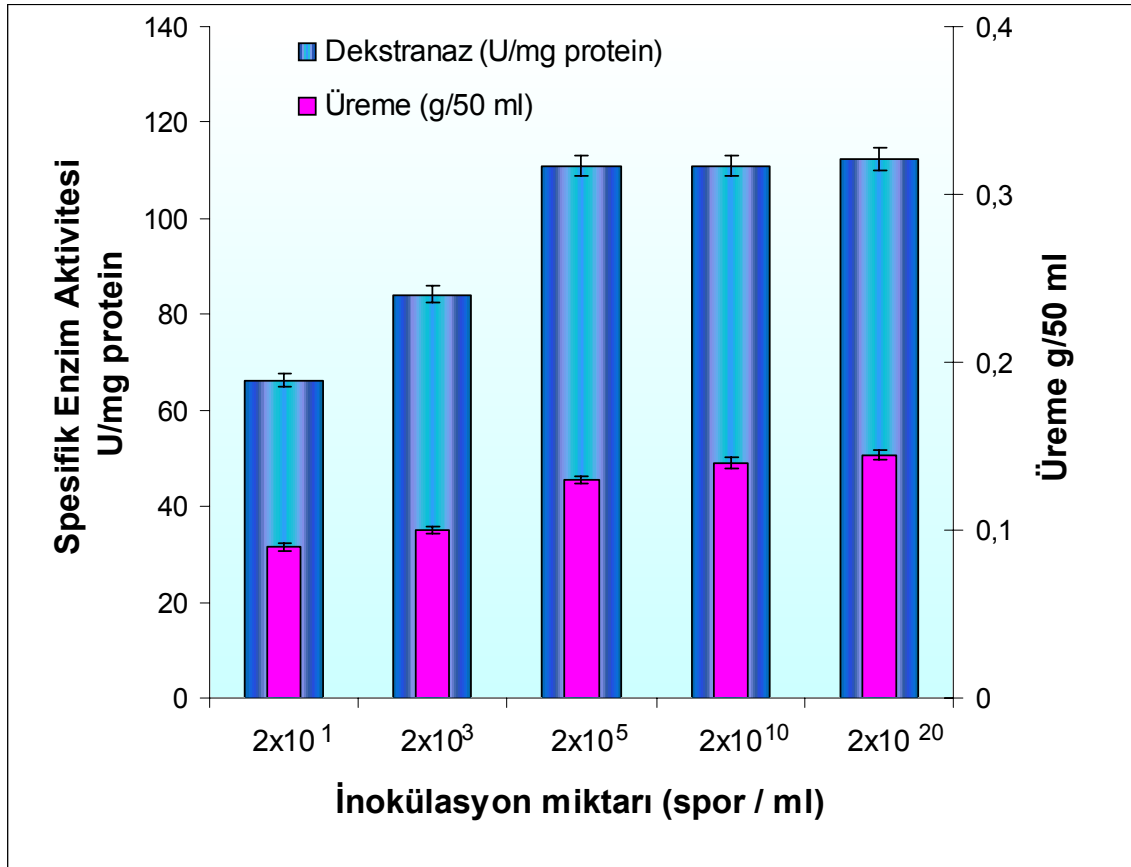


Şekil 4.7. Dekstranaz üretimi için optimum çalkalama hızı

**Üretimler 30°C’de, belirtilen hızlara ayarlı inkübatörlerde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.*

4.3.5. Dekstranaz üretimi için optimum inokülasyon miktarı

Dekstranaz üretimine, inokülasyon miktarının etkisinin saptanması amacıyla, hazırlanan spor süspansiyonundaki sporlar, Neubauer lamında sayılarak 5 ayrı konsantrasyona getirildi. 5 ayrı paralel çalışmaya, 2×10^1 , 2×10^3 , 2×10^5 , 2×10^{10} ve 2×10^{20} konsantrasyonlarındaki spor süspansiyonlarından 1'er ml ekim yapıldı. İnkübasyon sonunda enzim süzüntülerinden ölçüm yapıldı ve 2×10^5 ile bunun üzerindeki inokülasyon miktarının dekstranaz enziminin sentezi için yeterli miktar olduğu saptandı. Sonuçlar Şekil 4.8' de gösterilmektedir.

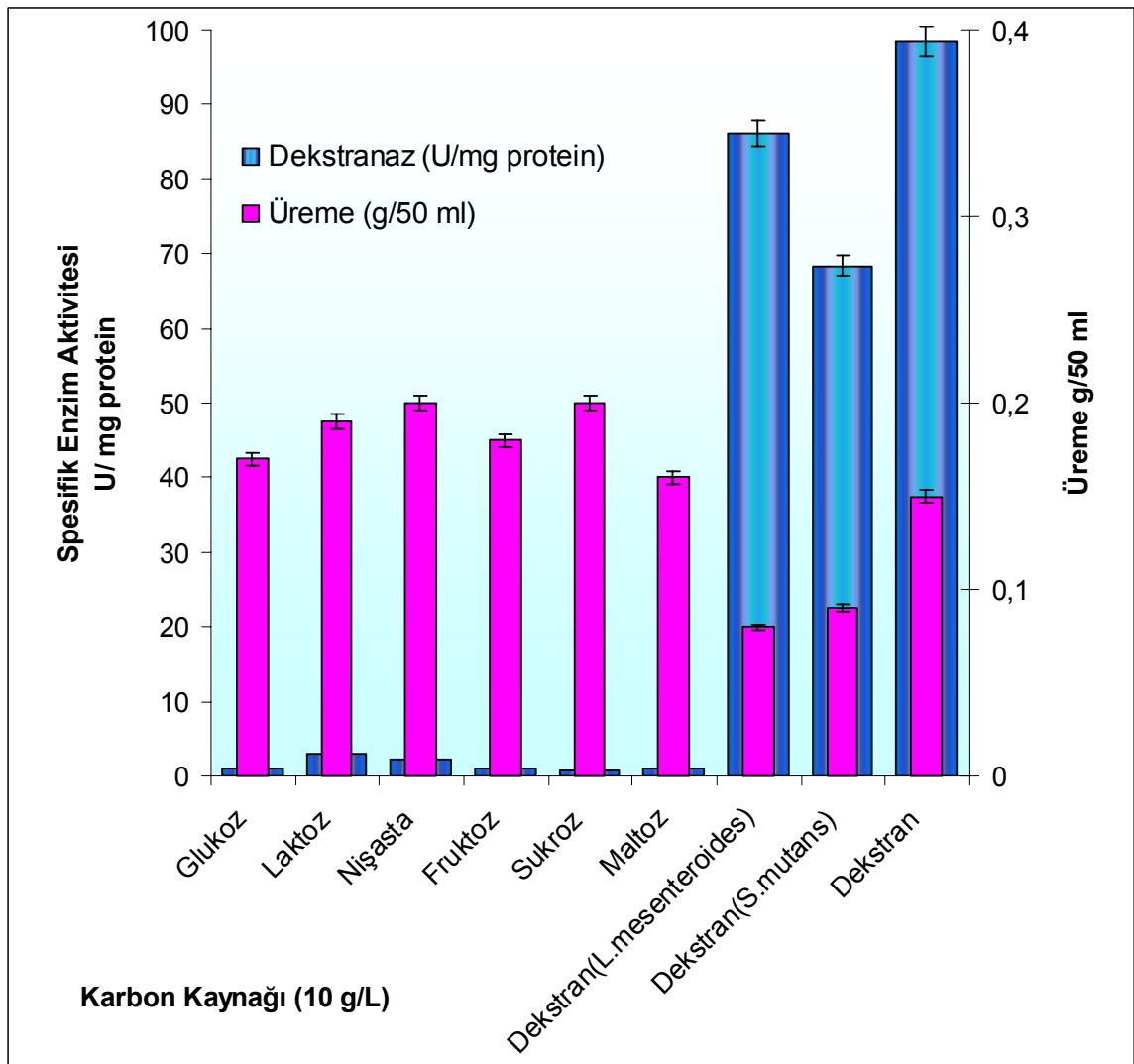


Şekil 4.8. Dekstranaz üretimi için optimum inokülasyon miktarı.

**Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.*

4.3.6. Değişik karbon kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi

Glukoz, laktoz, nişasta, fruktoz, sukroz, maltoz, dekstran ve iki ayrı mikroorganizma *Streptococcus mutans* ile *Leuconostoc mesenteroides*' ten elde edilmiş ve tam olarak saflaştırılmamış 2 farklı dekstran, temel besiyerine % 1 oranında, karbon kaynağı olarak eklendi, *Paecilomyces lilacinus* ortama ekildi ve inkübasyon sonundaki ölçümlerde, en iyi dekstranaz üretimi sağlayan karbon kaynağının dekstran olduğu bulundu (Şekil 4.9).

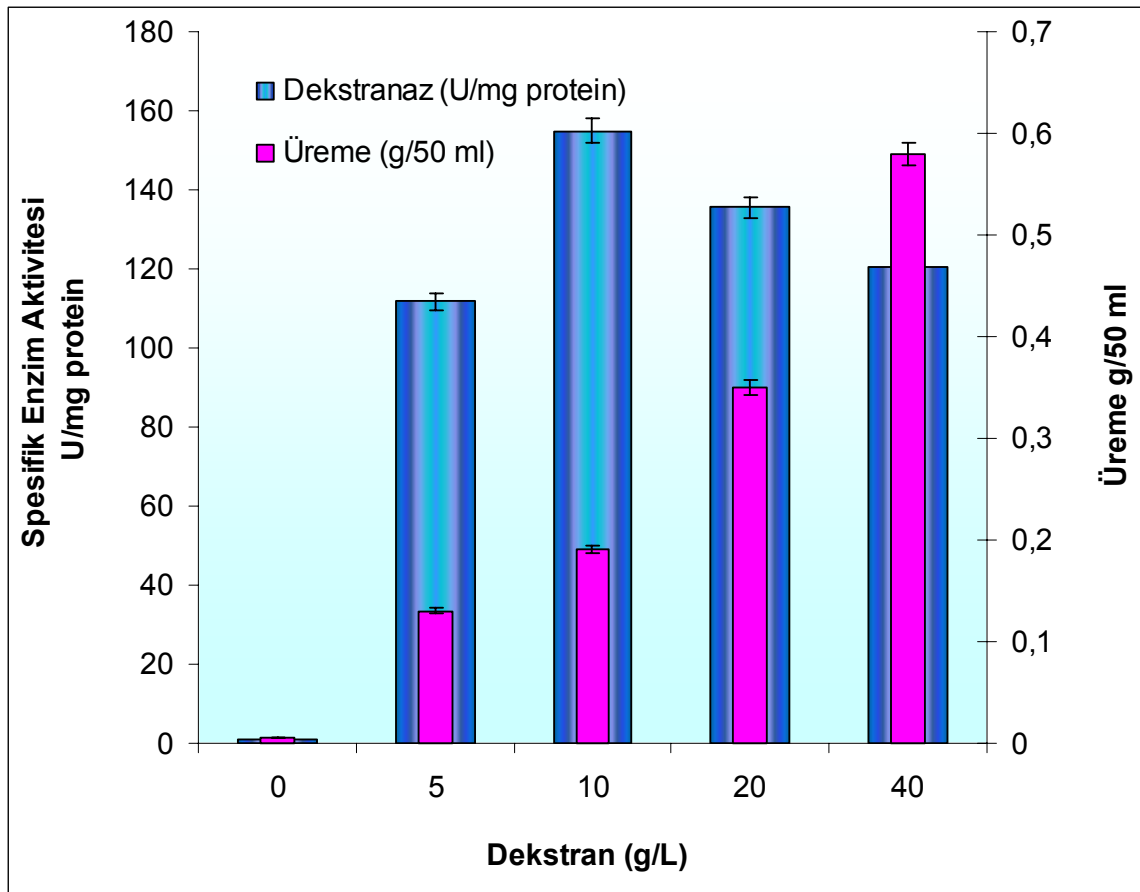


Şekil 4.9. Değişik karbon kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.3.7. Karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi

Bu deney için, *Paecilomyces lilacinus*' ta en yüksek dekstranaz üretimini elde ettiğimiz karbon kaynağı olan dekstran, temel besiyerinde kullanıldı. Ölçümler sonucunda % 1 konsantrasyonda ortama eklenen dekstranın, dekstranaz üretimini en yüksek seviyeye çıkardığı belirlendi (Şekil 4.10). Daha yüksek dekstran konsantrasyonunun, besiyerinde *Paecilomyces lilacinus*' un üremesini arttırdığı, ancak dekstranaz sentezine bir katkısı olmadığı gözlemlendi. Bundan sonraki çalışmalarda temel besiyeri, % 1 konsantrasyonundaki dekstran ile kullanıldı.

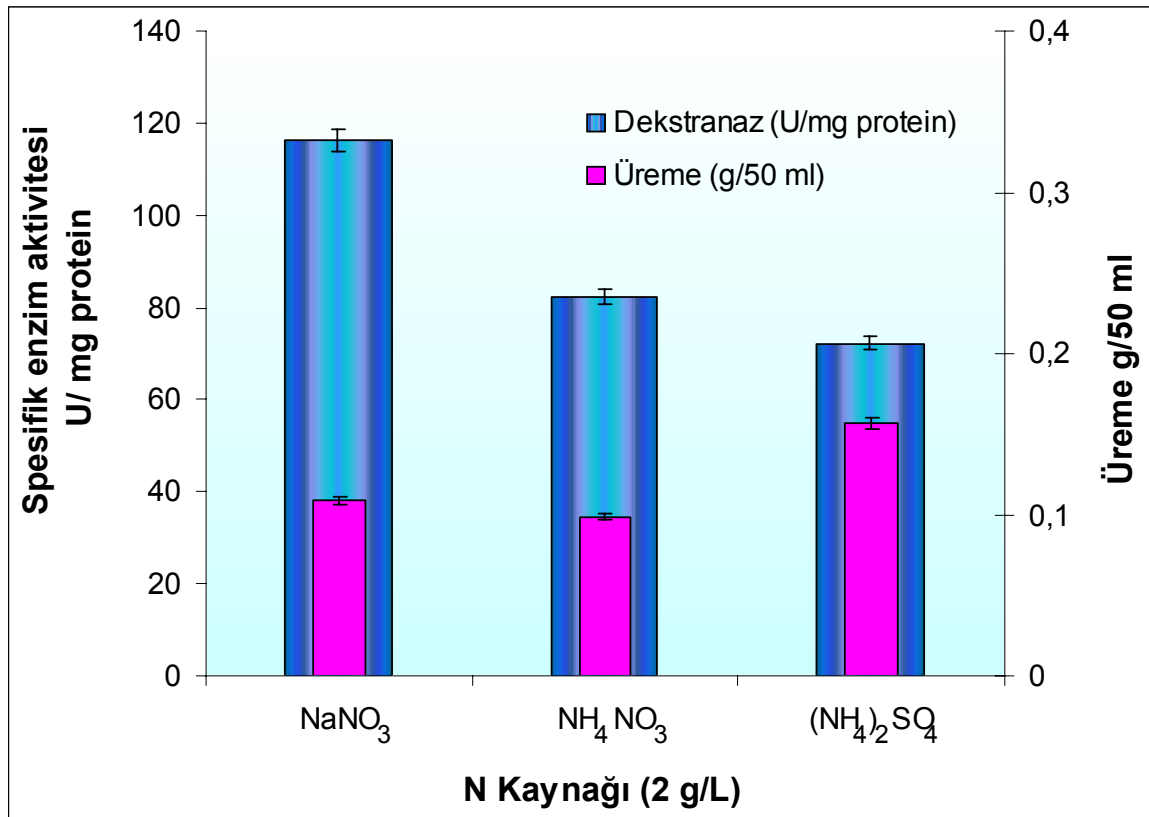


Şekil 4.10. Karbon kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.3.8. Değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi

En yüksek dekstranaz üretimini sağlayabilmek için, çeşitli azot kaynaklarından, NaNO_3 , NH_4NO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seçildi. Bu 3 azot kaynağı ile değişik azot içerikli temel besiyerleri hazırlandı. Ekim ve inkübasyon sonunda sonuçlar ölçülerek Şekil 4.11’ de verildi. Bulunan en yüksek spesifik dekstranaz aktivitesi değerinin, azot kaynağı olarak NaNO_3 varlığında gerçekleşen üreme sonucunda olduğu tespit edildi. Temel besiyeri olarak seçilmiş olan Besiyeri A’ nın orijinal içeriğinde azot kaynağı olarak mevcut olan NaNO_3 değiştirilmeden kullanılmaya devam edildi.

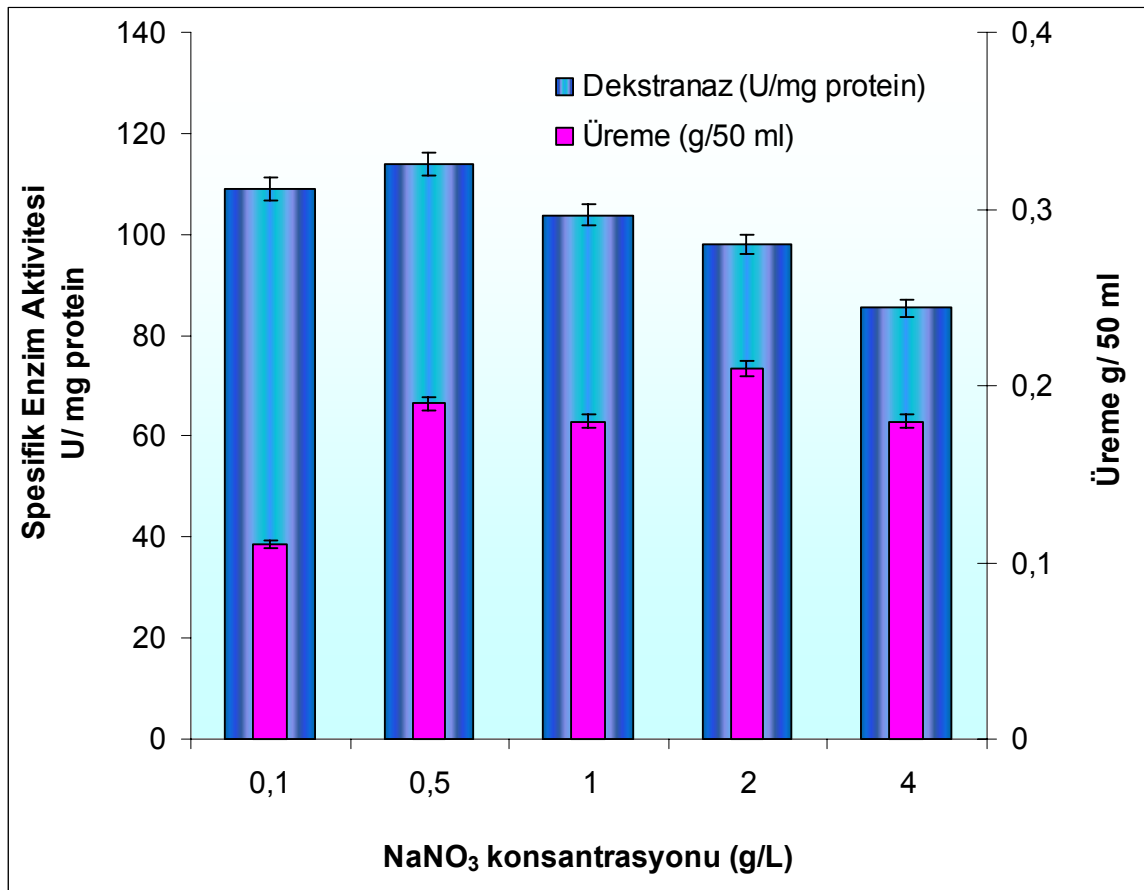


Şekil 4.11. Değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisi

**Üretimler 30°C’de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.*

4.3.9. Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi

Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisinin saptanması için, temel besiyerinde en verimli azot kaynağı olarak saptanmış olan NaNO_3 kullanıldı. *Paecilomyces lilacinus*' ta en yüksek dekstranaz üretimini sağlayan konsantrasyonun 2 g/L olduğu bulundu. Sonuçlar spesifik dekstranaz aktivitesi hesaplanarak verildiğinden dolayı, 0.5 g/L konsantrasyondaki azot kaynağı değerinin, daha yüksek spesifik enzim aktivitesine sahip olduğu görüldü ve Şekil 4.12' de spesifik enzim aktivitesi değerleri verildi. Buna göre 0.5 g/L NaNO_3 , optimum konsantrasyon olarak saptandı.



Şekil 4.12. Azot kaynağı konsantrasyonunun dekstranaz üretimine etkisi

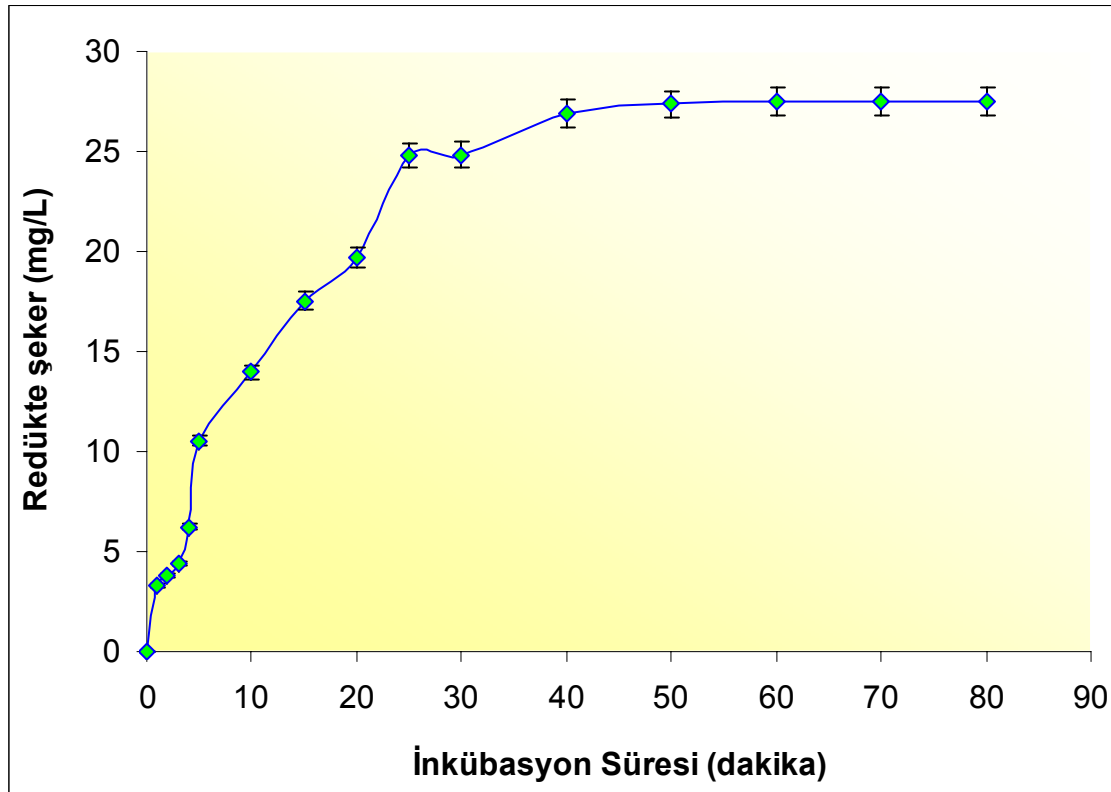
*Üretimler 30°C 'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.4. Reaksiyon Ortamında *Paecilomyces lilacinus*' tan Üretilen Dekstranaz Aktivitesini Etkileyen Optimum Fizyolojik Koşullar

Reaksiyon ortamında enzim ve substrat ilişkisini etkileyen fizyolojik faktörlerden inkübasyon süresi, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu incelendi. Bunun için kültür süzüntüleri, enzim kaynağı olarak kullanıldı.

4.4.1. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon süresinin dekstranaz aktivitesine etkisi

Reaksiyon ortamında enzim substrat etkileşimine inkübasyon süresinin etkisini hesaplamak amacıyla bu ortamlar 0 ve 80 dakika arasında değişen sürelerde inkübe edildi. Her süre sonunda ölçümler yapıldı ve en uygun inkübasyon süresi 25 dakika olarak saptandı (Şekil 4.13).

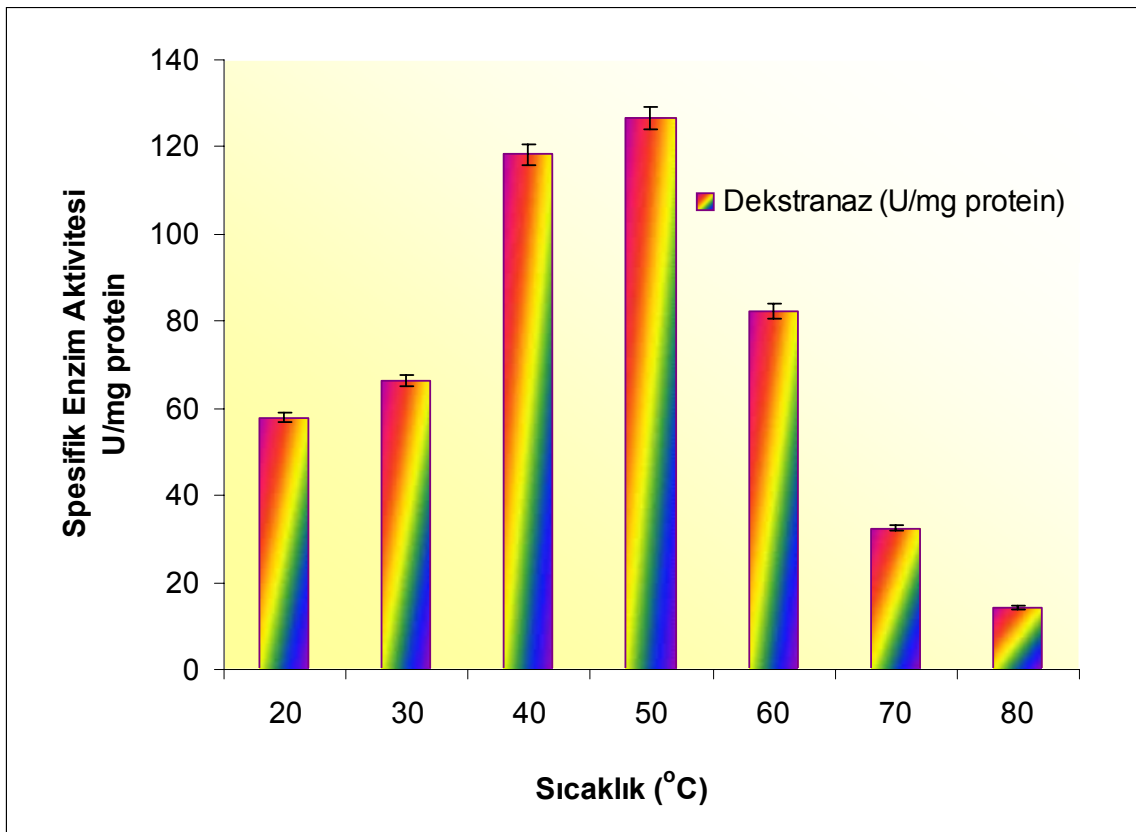


Şekil 4.13. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon süresinin dekstranaz aktivitesine etkisi

* Reaksiyon ortamı %2 substratla pH:5.4' te ve 40°C 'de inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.4.2. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon sıcaklığının dekstranaz aktivitesine etkisi

Paecilomyces lilacinus' tan üretilen dekstranaz aktivitesine inkübasyon sıcaklığının etkisini saptayabilmek amacıyla hazırlanan reaksiyon ortamı, 20°C' den itibaren 10°C artan sıcaklıklarla 80°C' ye kadar çeşitli sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.14' te görüldüğü gibi, 60°C' nin üzerinde ve 40°C' nin altındaki sıcaklıklarda enzim aktivitesi düştü. Dolayısıyla *Paecilomyces lilacinus* dekstranazı için optimum reaksiyon ortamı sıcaklığı, 50°C olarak saptandı.

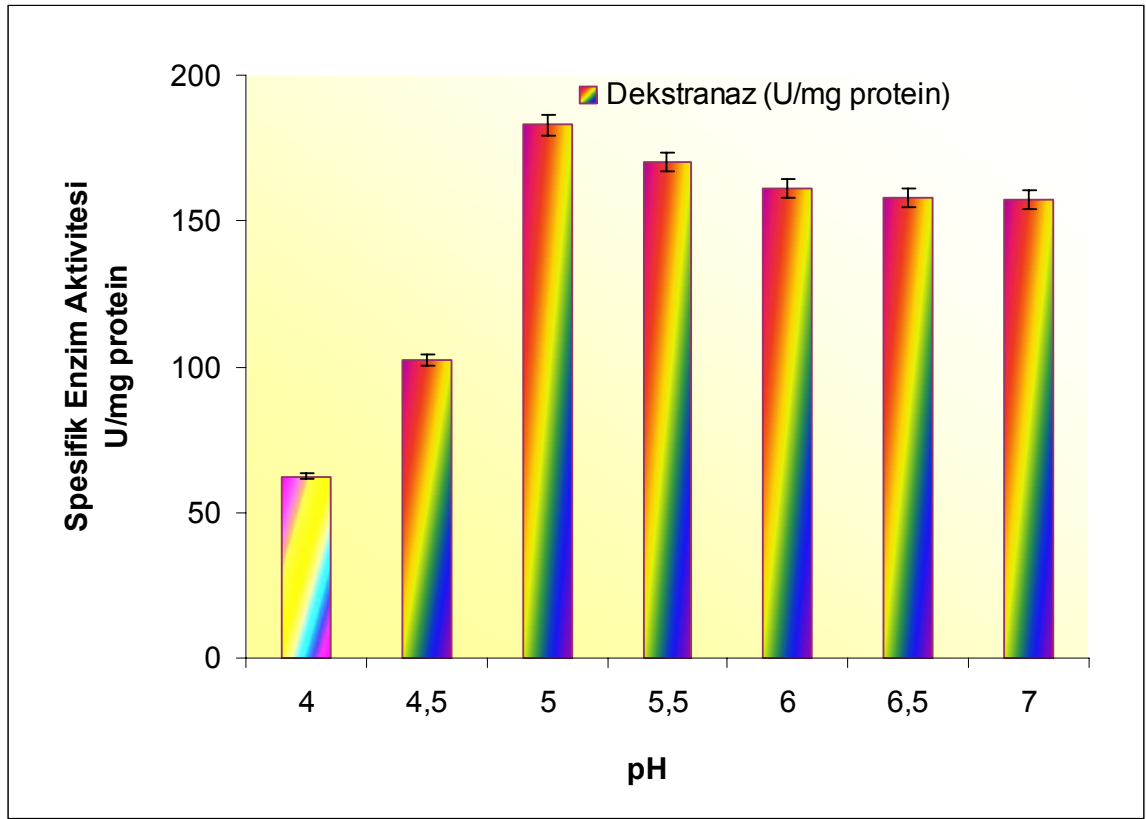


Şekil 4.14. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon sıcaklığının dekstranaz aktivitesine etkisi

* Reaksiyon ortamı %2 substratla pH:5.4' te ve 25 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.4.3. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon pH'sının dekstranaz aktivitesine etkisi

Reaksiyon ortamının inkübasyonu sırasında değişik pH derecelerinin dekstranaz aktivitesine etkisini belirleyebilmek amacıyla, pH: 4 ile 7 arasında yarım derecelik farkla belirlenen değerler, 0.1 M sodyum asetat tamponu ile hazırlandı ve enzim substrat kompleksi bu değişik pH' larda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spesifik enzim aktiviteleri belirlendi ve Şekil 4.15' te gösterildi. Buna göre *Paecilomyces lilacinus* dekstranazı için en uygun pH değerinin pH:5 olduğu saptandı.

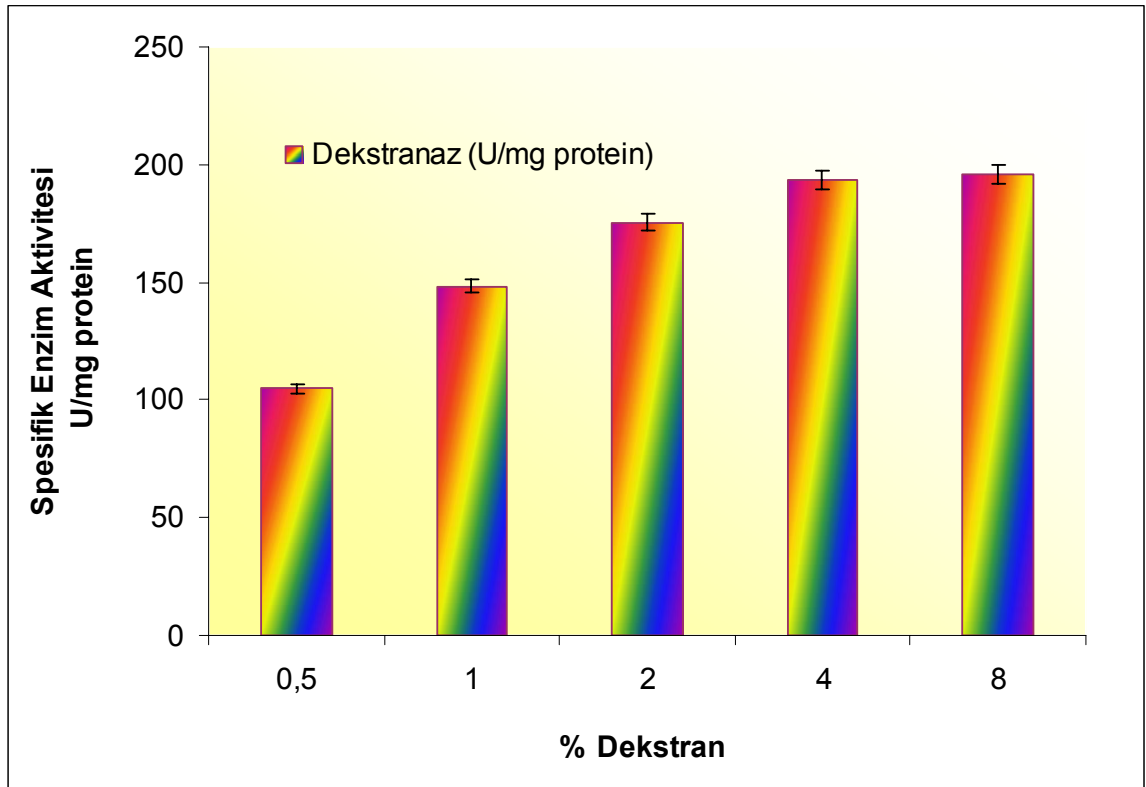


Şekil 4.15. Reaksiyon ortamındaki inkübasyon pH'sının dekstranaz aktivitesine etkisi.

* Reaksiyon ortamı %2 substratla 50°C'de ve 25 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.4.4. Reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisi

Substrat konsantrasyonunun *Paecilomyces lilacinus*' tan üretilen dekstranaz aktivitesine etkisini saptamak amacıyla % 0.5 ile % 8 arasında değişen konsantrasyonlarda substratlarla enzim substrat kompleksi hazırlandı. Bu reaksiyon ortamları inkübasyona bırakıldı ve sonuçta hesaplanan spesifik enzim aktiviteleri Şekil 4.16' da gösterildi. Buna göre en uygun substrat konsantrasyonu, % 4 veya % 8 gibi görünmekle birlikte, bu değerlerde ortam viskozitesi çok fazla arttığından ve aktivite değerleri açısından % 2 ile büyük bir fark olmadığından, ekonomik olarak da daha uygun olan % 2' lik substrat konsantrasyonu, bu çalışma için optimum kabul edildi.



Şekil 4.16. Reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisi

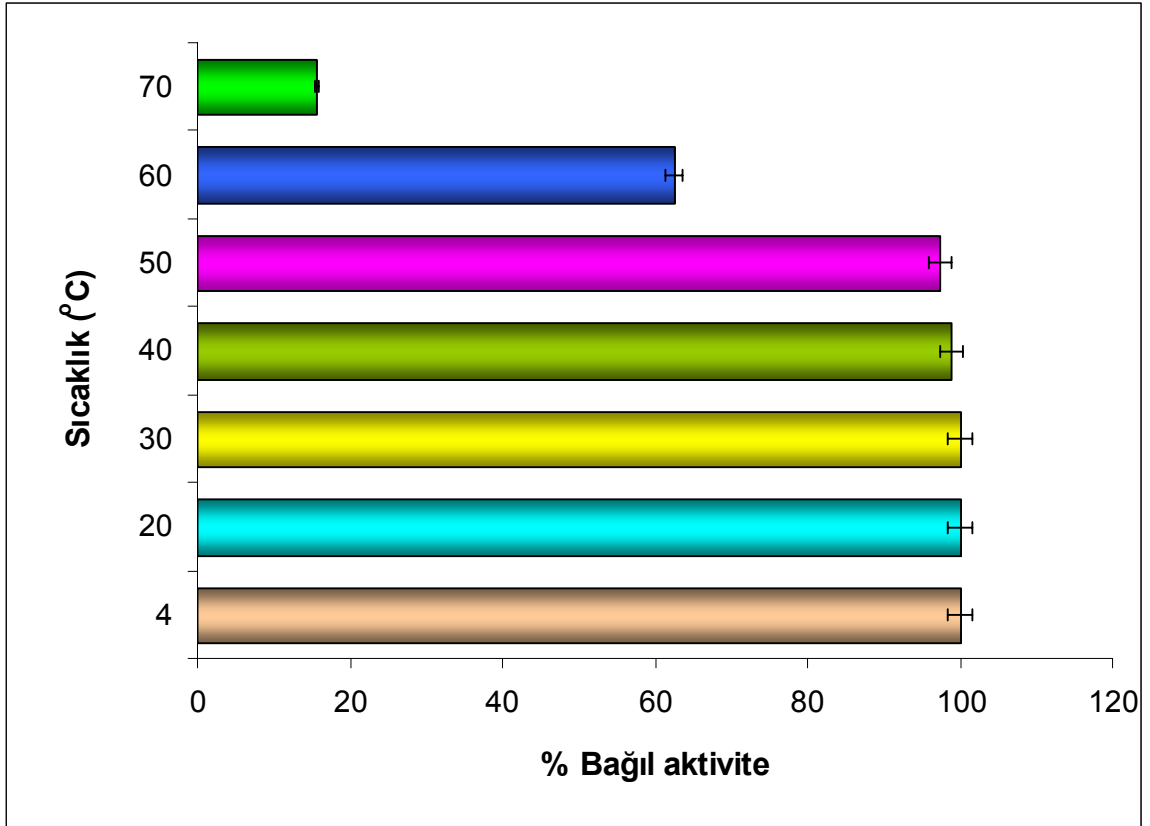
* Reaksiyon ortamı 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.5. Dekstranaz Enziminin Kararlılığı

Paecilomyces lilacinus' tan üretilen dekstranaz enziminin belirli sıcaklık ve pH değerlerindeki stabilitesini saptamak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada kültür süzüntüleri, enzim kaynağı olarak kullanıldı. Enzim kararlılıkları, enzim aktivitesi tayini sonucunda bulundu.

4.5.1. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığı

Dekstranaz enziminin 4°C ile 70°C arasındaki sıcaklıklarda stabilitesini saptamak amacıyla enzim süzüntüsü bu sıcaklık aralığındaki değerlerde yarım saat süre ile inkübasyona tabi tutuldu ve daha sonra bu enzim süzüntüsü ile enzim substrat kompleksi hazırlanarak aktivite tayini yapıldı. Enzim aktivitesi tayini yapıldıktan sonra sonuçlar % bağıl aktivite olarak Şekil 4.17' de ifade edildi.



Şekil 4.17. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığı

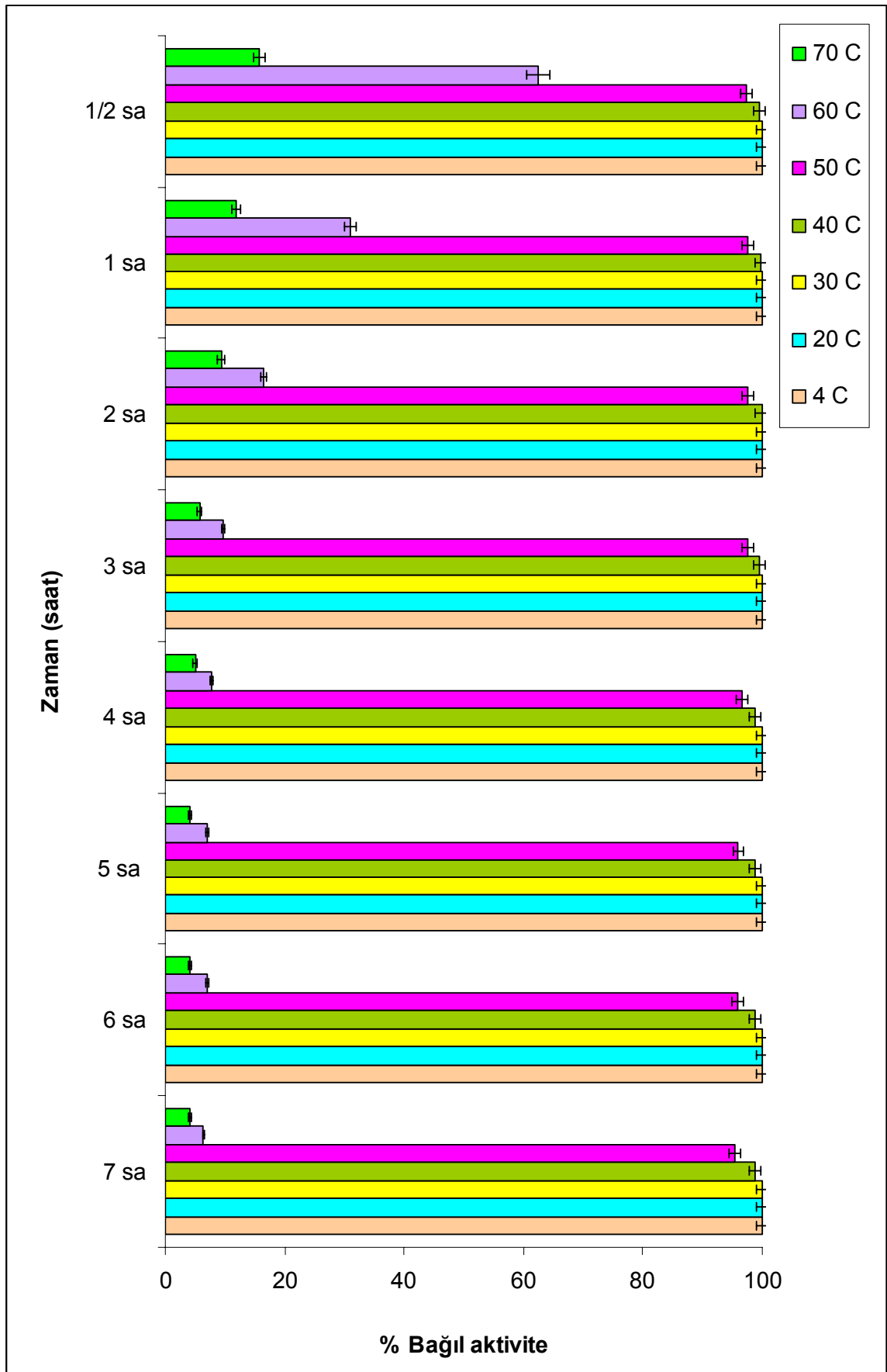
* Reaksiyon ortamı 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

Ölçümler sonucunda 30°C, 40°C ve 50°C' de yarım saat boyunca enzim aktivitesinde en fazla % 2.5 kayıp olduğu gözlenirken, 60°C' de bu kaybın % 37 olduğu saptandı. 70°C' de ise % 74'lük bir enzim aktivitesi kaybı görüldü.

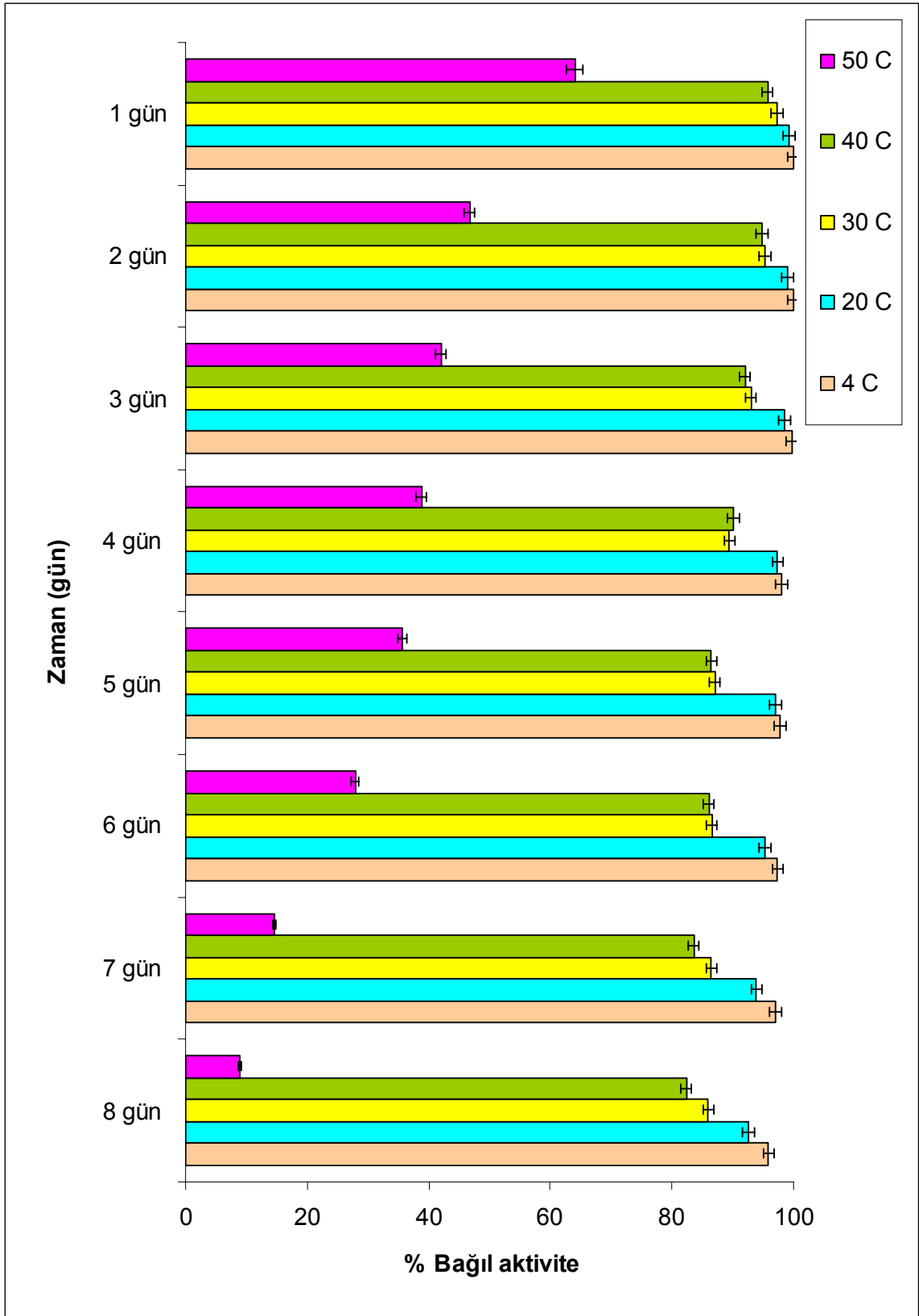
4.5.2. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresi

Paecilomyces lilacinus' tan üretilen dekstranaz enziminin 4°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C derecelerde koruyabildiği kararlılık derecelerini belirlemek üzere, enzim süzüntüsü bu sıcaklıklarda öncelikle ½, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 saat aralıklarında inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda enzim süzüntüleri 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilerek enzim aktiviteleri saptandı ve sonuçlar Şekil 4.18' de verildi. Buna göre ilk 7 saate 4°C, 20°C, 30°C, 40°C' lerde inkübe edilen enzim kaynakları aktivite kaybına uğramazken, 50°C' de ise 7 saatin sonunda ancak % 85' e düşüş oldu. 60°C' de yarım saat inkübe olan enzimin aktivitesi % 63' e düşerken, 1 saat sonunda % 31 oldu. 70°C' de ise enzim aktivitesinin korunamadığı görüldü.

Bunun yanı sıra enzim kaynağı 4°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C sıcaklıklarda 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enzim süzüntüleri 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilerek enzim aktiviteleri saptandı. Sıcakla muamele edilmeyen enzimin aktivitesi 100 kabul edilerek, değişik sıcaklık ve sürelerde inkübe edilen enzim süzüntülerinin % bağıl aktivite değerleri hesaplandı ve Şekil 4.19' da gösterildi. Sonuçta, 4°C' de ve 20°C' de 8 gün sonunda % 2-4'lük stabilite kaybı olurken, 30°C ve 40°C'lerde 8 gün sonunda aktivitenin % 85' e düştüğü gözlemlendi. 50°C sıcaklıkta ise enzim aktivitesi 3. gün sonunda % 50' nin altına düştü.



Şekil 4.18. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresi(1/2 – 7 saat)

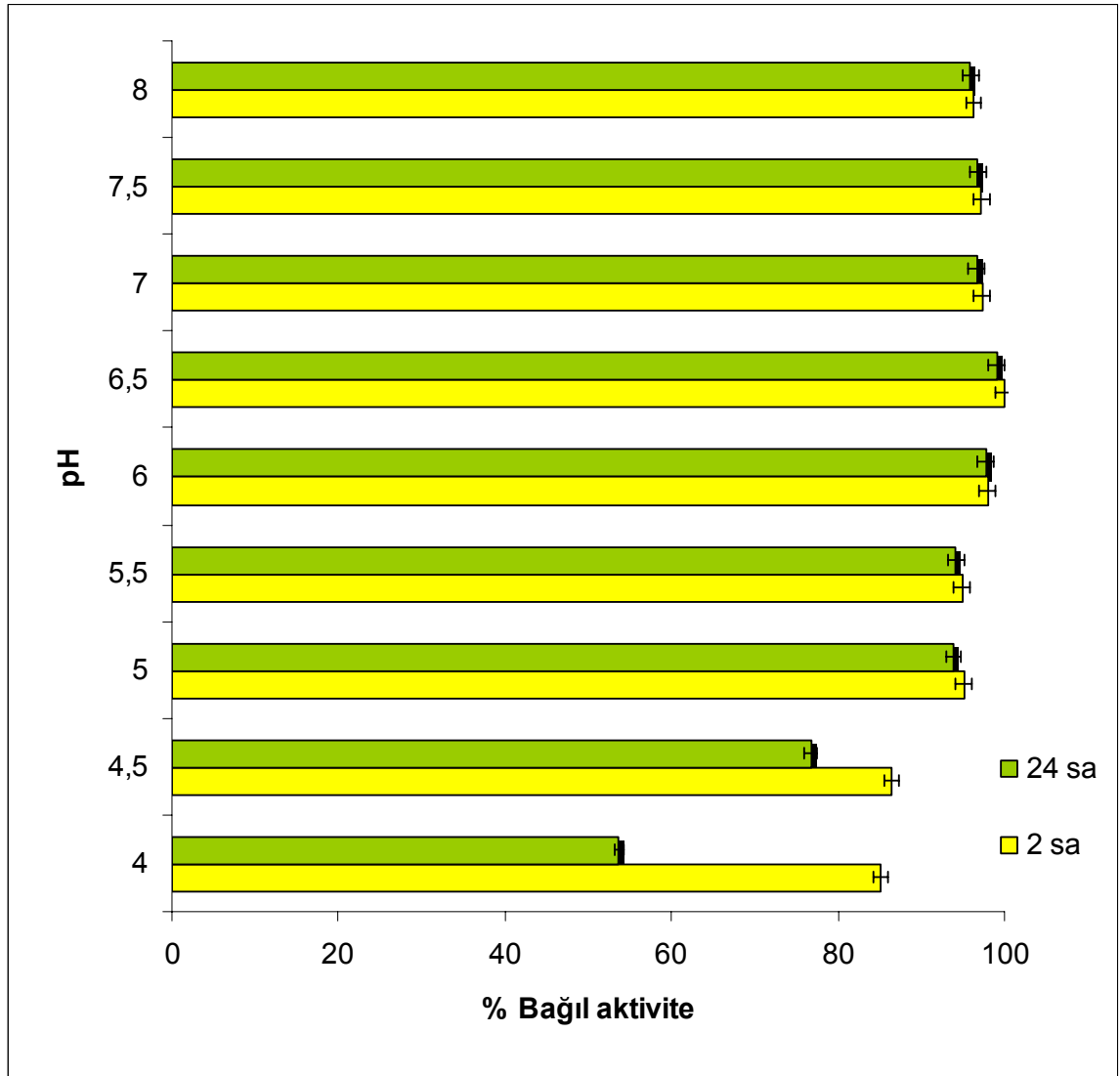


Şekil 4.19. Dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılık süresi (1-8 gün)

* Reaksiyon ortamı 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.5.3. Dekstranaz enziminin pH kararlılığı

Dekstranaz enziminin pH kararlılığının saptanması amacıyla, enzim süzöntüsü sodyum asetat tamponu ile pH:4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8 değerlerine ayarlandı. 2 saat ve 24 saat sürelerinde oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enzim süzöntüleri 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilerek enzim aktiviteleri saptandı. Şekil 4.20' de verilen sonuçlara göre enzimin pH 4' te 24 saat kalmasıyla % 50' ye yakın aktivite kaybı olduğu görüldü



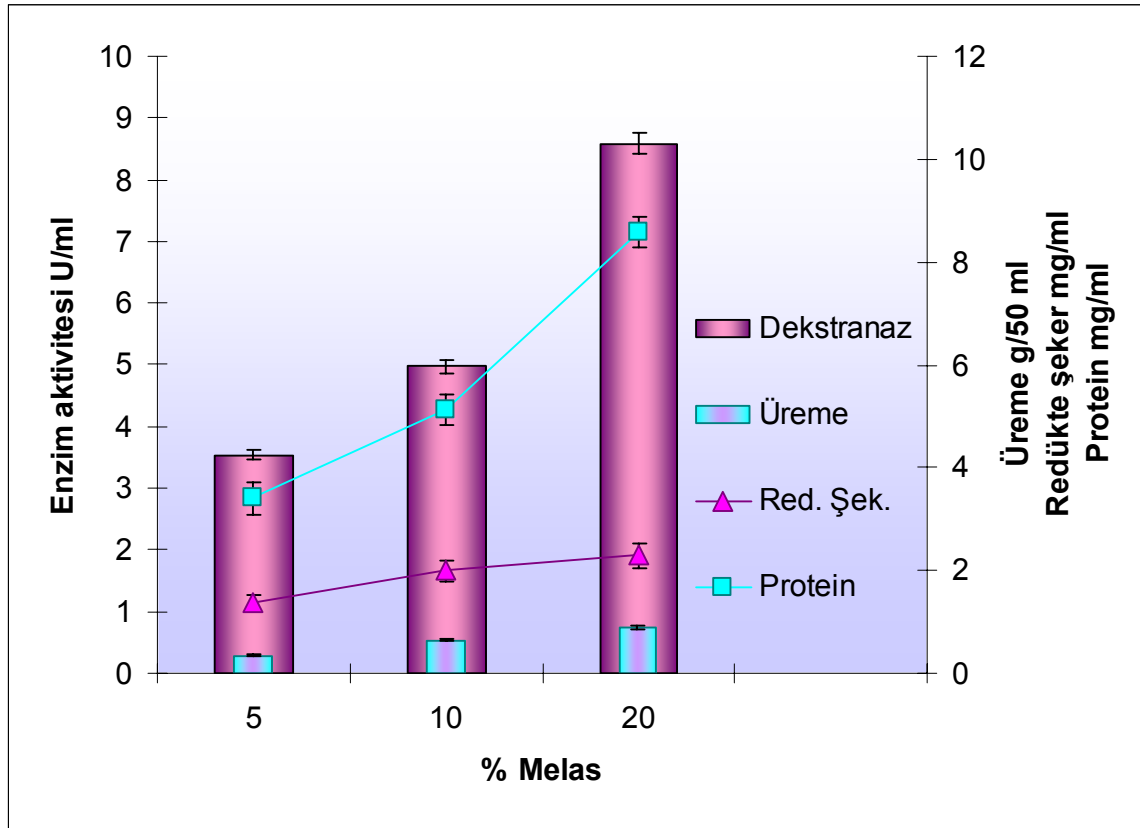
Şekil 4.20. Dekstranaz enziminin pH kararlılığı

* Reaksiyon ortamı 50°C'de pH.5'te ve 25 dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.6. *Paecilomyces lilacinus*' tan Dekstranaz Eldesi İçin Alternatif Besiyeri Ortamları Denenmesi

4.6.1. Alternatif besiyeri ortamı olarak melas kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Paecilomyces lilacinus, temel besiyeri olarak melas ve distile su ortamında 7 gün boyunca üretildi, üreme, enzim, redükte şeker ve protein değerleri takip edilerek sonuçlar kaydedildi ve dekstranaz üretimi için melasın % 20 oranında ortama eklenmesiyle 8.58 U/ml enzim üretimi gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.21).

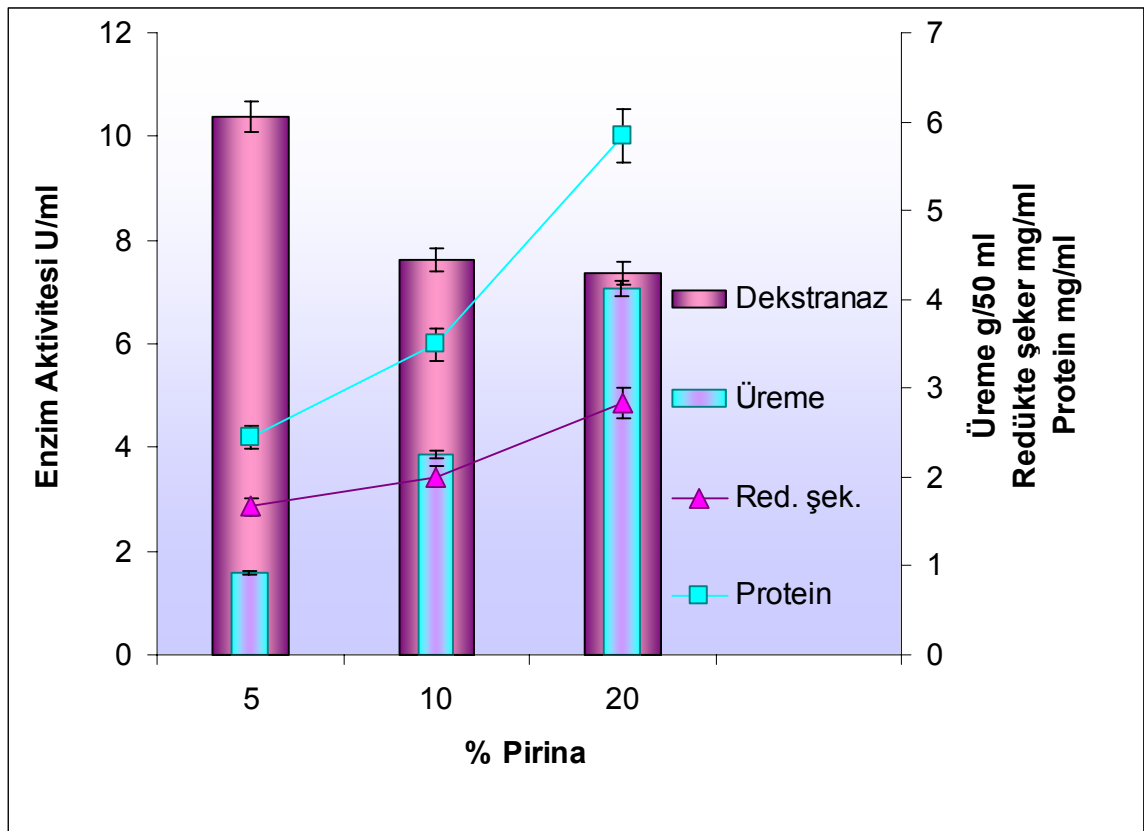


Şekil 4.21. Besiyeri olarak değişik oranlarda melas kullanımının dekstranaz üretimine etkisi.

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.6.2. Alternatif besiyeri ortamı olarak pirina kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Bir artık olarak değerlendirilmesi için besiyeri ortamı olarak kullanılan pirinanın dekstranaz üretimine etkisinin saptanması için, değişik pirina konsantrasyonları distile su ile karıştırılarak kullanıldı ve en yüksek dekstranaz üretimini sağlayan konsantrasyonun % 5 olduğu bulundu. Bu besiyerinde 10.38 U/ml dekstranaz aktivitesi tayin edildi (Şekil 4.22).

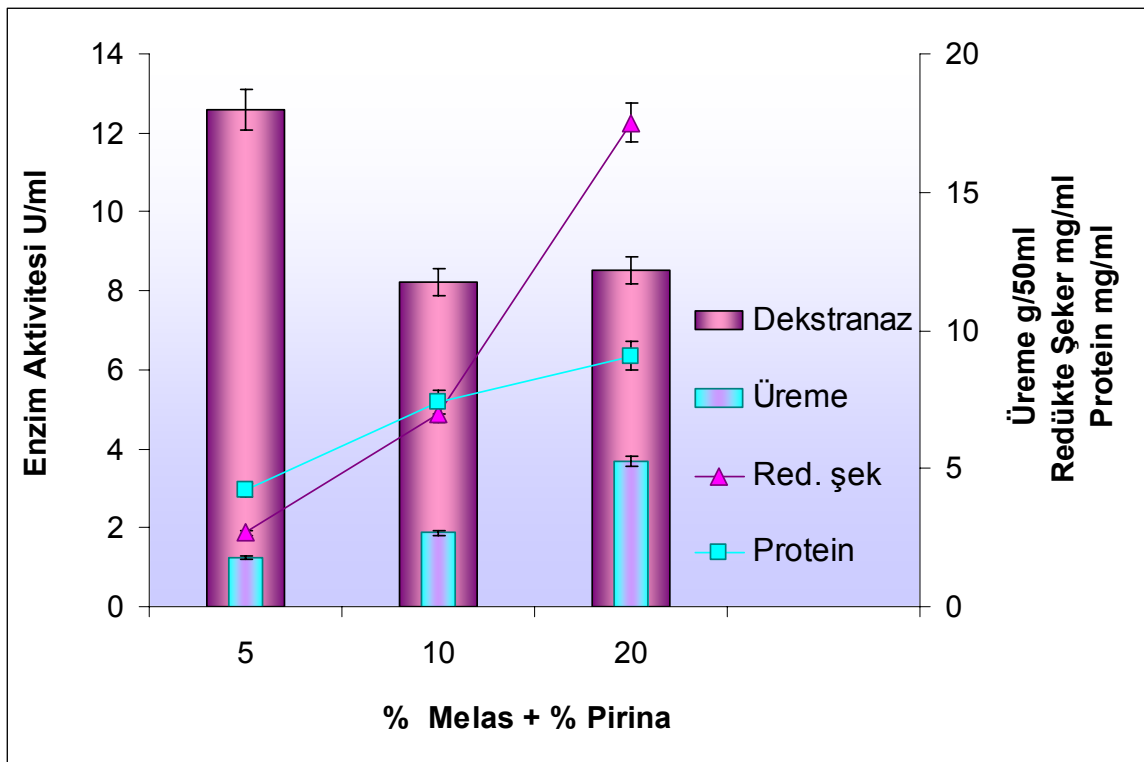


Şekil 4.22. Besiyeri olarak değişik oranlarda pirina kullanımının dekstranaz üretimine etkisi.

**Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.*

4.6.3. Alternatif besiyeri ortamı olarak melas ve pirinanın beraber kullanımının dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Paecilomyces lilacinus' un besiyeri ortamı olarak melas ve pirinanın, ayrı ayrı kullanılmasının ardından, ikisi karıştırılarak hazırlanan besi ortamlarında da enzim üretimi gerçekleştirildi. Üremenin ardından sonuçlar tayin edildi ve Şekil 4.23' te gösterildi. Buna göre, en fazla üremeyi % 20 melas ve % 20 pirinanın olduğu ortamda gösteren *Paecilomyces lilacinus*, bu artıkların % 5' er oranda bulunduğu besiyerinde ürettiğinde 12.58 U/ml ile en yüksek dekstranaz aktivitesini gösterdi (Şekil 4.23).

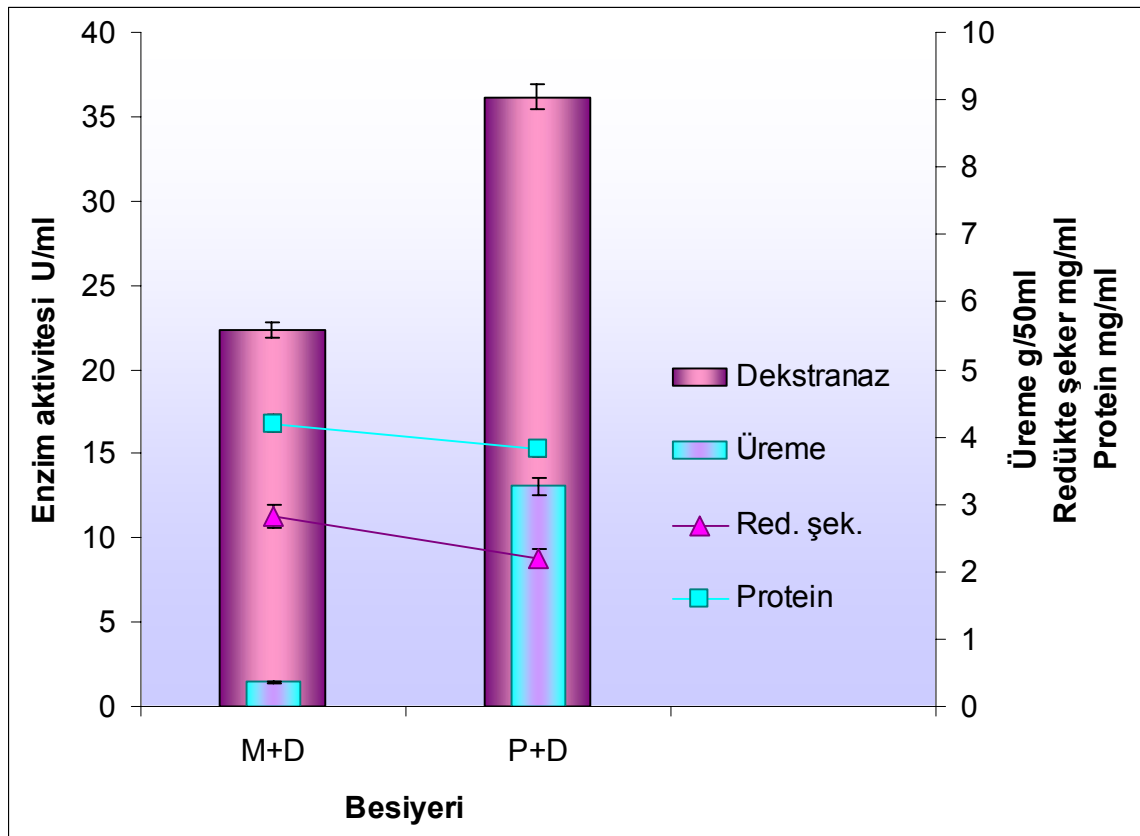


Şekil 4.23. Besiyeri olarak değişik oranlarda melas ve pirinanın birlikte kullanımının dekstranaz üretimine etkisi.

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.6.4. Alternatif besiyeri ortamı olarak kullanılan artıklara dekstran eklenmesiyle oluşturulan besiyerinin dekstranaz üretimine etkisinin saptanması

Artıklardan hazırlanmış besiyerlerine dekstran eklenmesinin *Paecilomyces lilacinus*'un dekstranaz üretimine etkisinin saptanması için yapılan bu çalışma sonucunda, % 10 pirina ile hazırlanmış olan ve içerisine % 1 dekstran eklenen besiyerinde üreyen fungusun, daha fazla ürediği görüldü. Ayrıca bu besiyerinde dekstranaz aktivitesinin daha yüksek olduğu tayin edildi ve sonuçlar Şekil 4.24' te verildi.



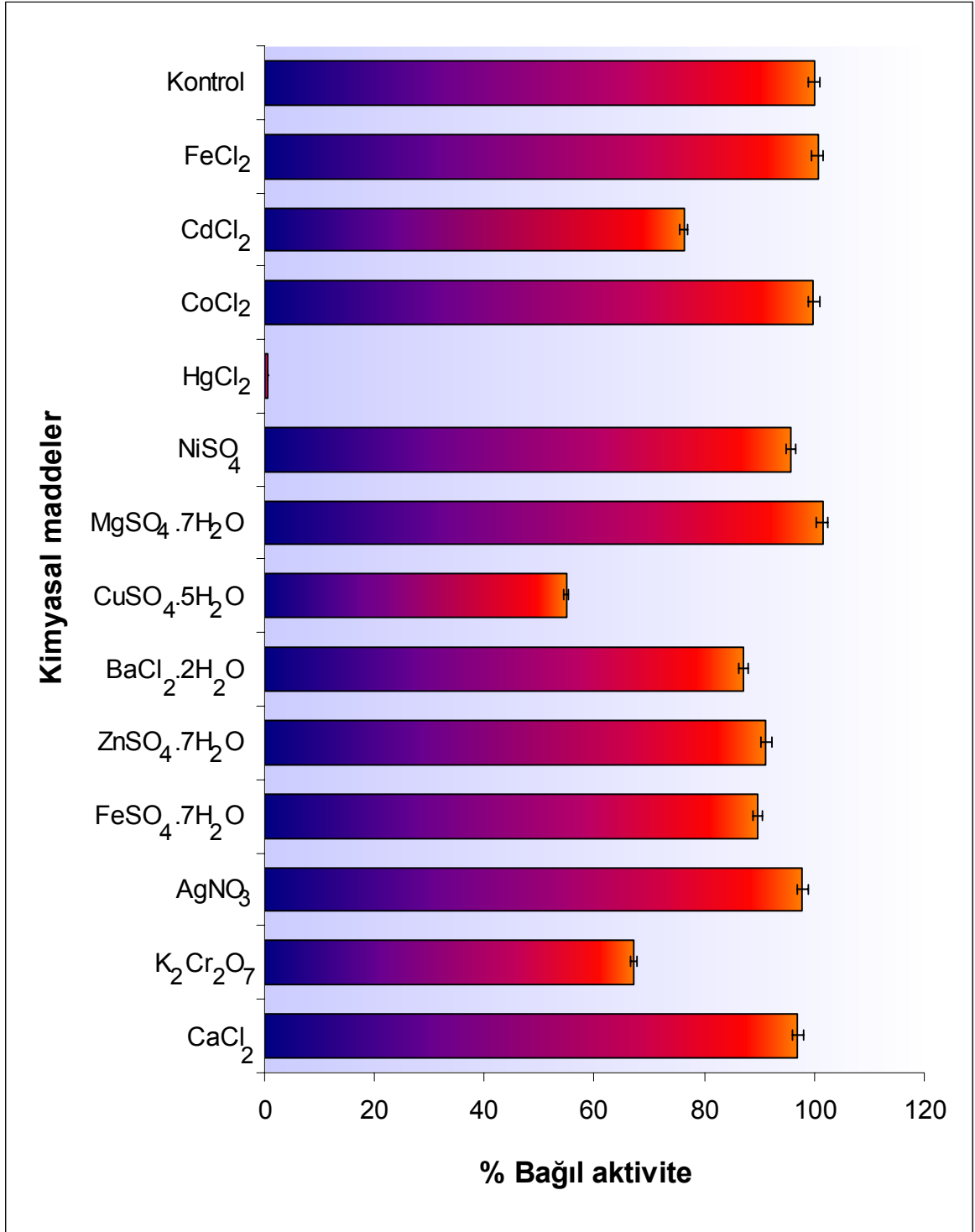
Şekil 4.24. Besiyeri olarak kullanılan melas ve pirina ortamlarına dekstran eklenmesinin dekstranaz üretimine etkisi.

M: melas, P: pirina, D: dekstran

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.7. Çeşitli Maddelerin Dekstranaz Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışma için 5mM konsantrasyonda hazırlanan kimyasallar ile karıştırılan enzimin aktivasyonu / inaktivasyonu incelendi. Şekil 4.26'ya göre HgCl_2 , enzimi tam olarak inhibe ederken, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ' nun aktiviteyi yaklaşık olarak % 54' e düşürdüğü, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ' nin % 67'ye ve CdCl_2 'nin de % 76' ya düşürdüğü gözlemlendi. Bunun yanı sıra $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'nun enzim aktivitesine az da olsa etki ettiği saptandı. CaCl_2 , AgNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NiSO_4 , CoCl_2 ve FeCl_2 ' nin ise enzim aktivitesine çok fazla bir etkide bulunmadığı görüldü.



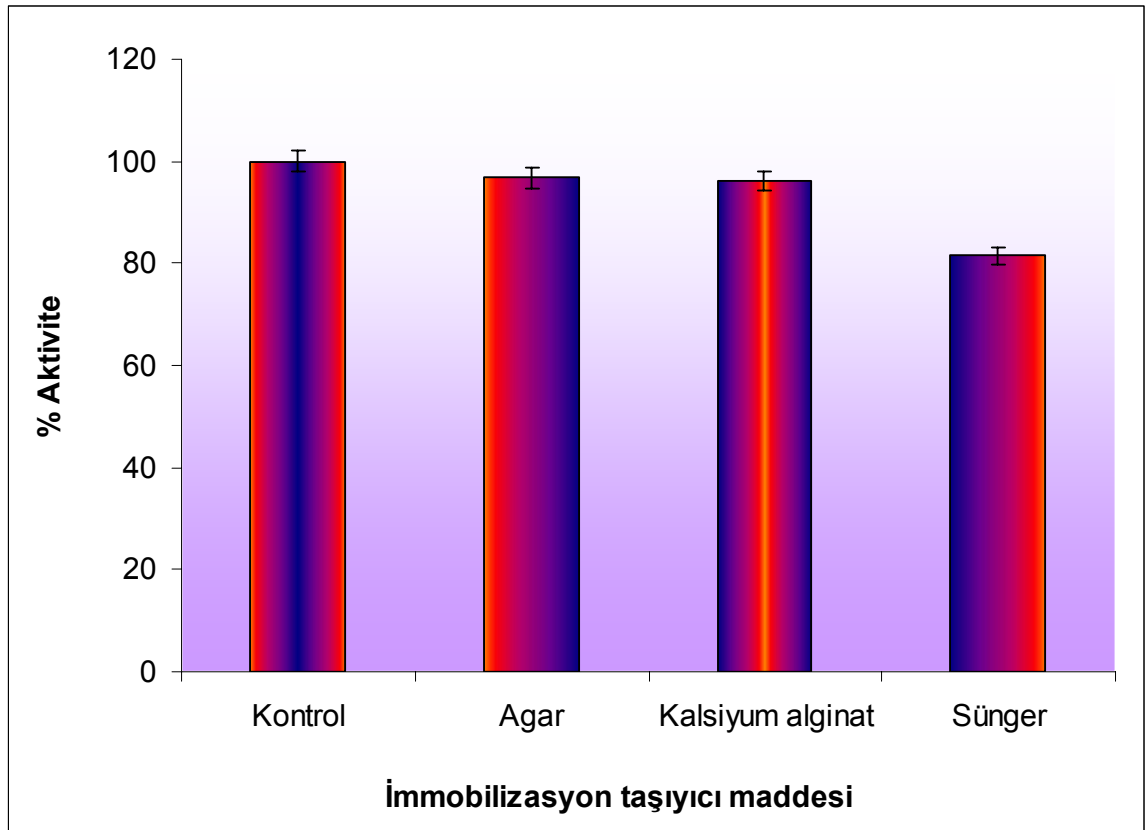
Şekil 4.25. Çeşitli maddelerin dekstranaz enzim aktivitesine etkileri

**Enzim eldesi için üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.*

4.8. *Paecilomyces lilacinus* Hücrelerinin İmmobilizasyonu ve İmmobilize Mikroorganizmadan Dekstranaz Enziminin Üretimi

4.8.1. İmmobilize ve serbest *P. lilacinus* hücreleri ile dekstranaz üretiminin karşılaştırılması

Taşıyıcı olarak kullanılan 3 değişik materyal, agar, kalsiyum alginat ve sünger ile immobilizasyon gerçekleştirildi. Kontrol olarak immobilize edilmeyen hücre ekilmiş kültür kullanılarak aktiviteler karşılaştırıldı. Buna göre, agar ve sodyum alginatın, süngere oranla daha iyi enzim aktivitesi verdiği saptandı. Sonuçlar Şekil 4.27' de gösterilmektedir.

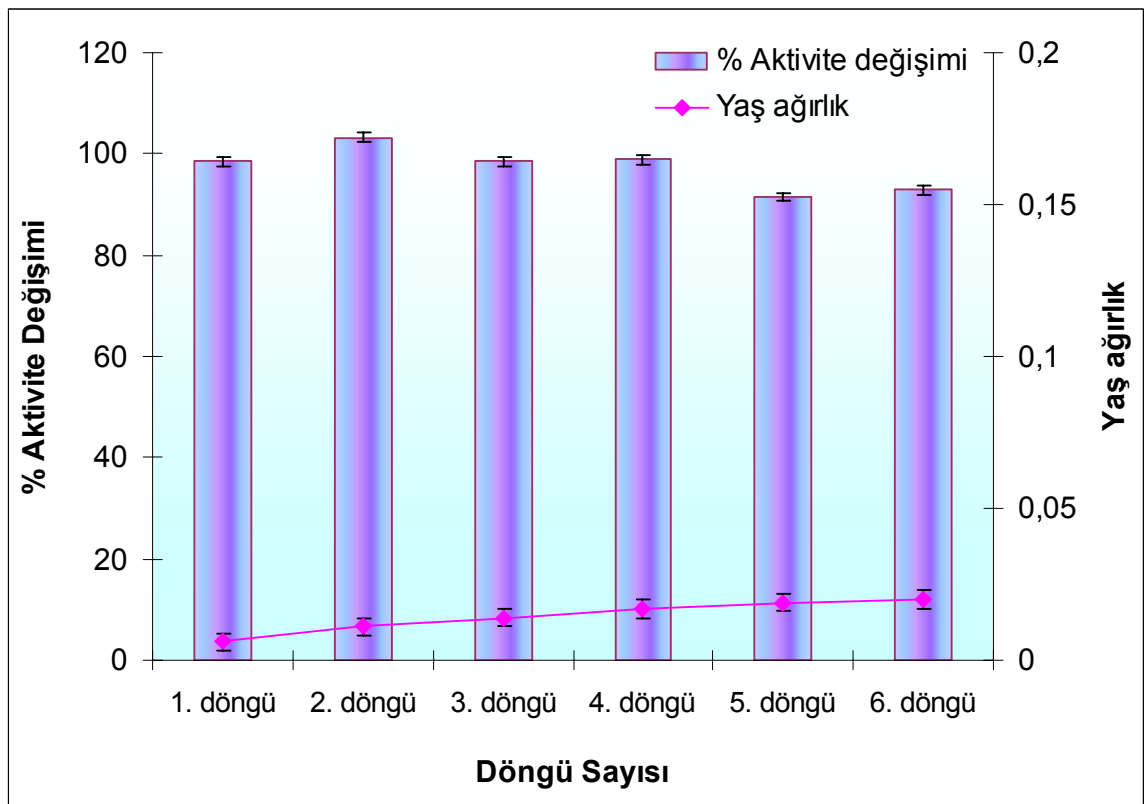


Şekil 4. 26. Agara, kalsiyum alginata ve süngere immobilize edilen hücreler ile serbest hücrelerin dekstranaz üretiminin karşılaştırılması.

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.8.2. Agara immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması

Bu çalışma için agara immobilize edilmiş hücreler, 1 haftalık eski kültürlerden alınarak birbiri ardına 6 kez yeni besiyerinde üretildi ve birinciye göre aktivite değişimleri saptandı, % aktivite değişimi olarak hesaplandı. Şekilde görüldüğü üzere, hücreler ikinci döngüde, diğer döngülere oranla daha yüksek enzim aktivitesi gösterdi. Beşinci ve altıncı döngülerde ise aktivite düşerek, ilk döngünün % 92'si kadar gözlemlendi (Şekil.4.28).

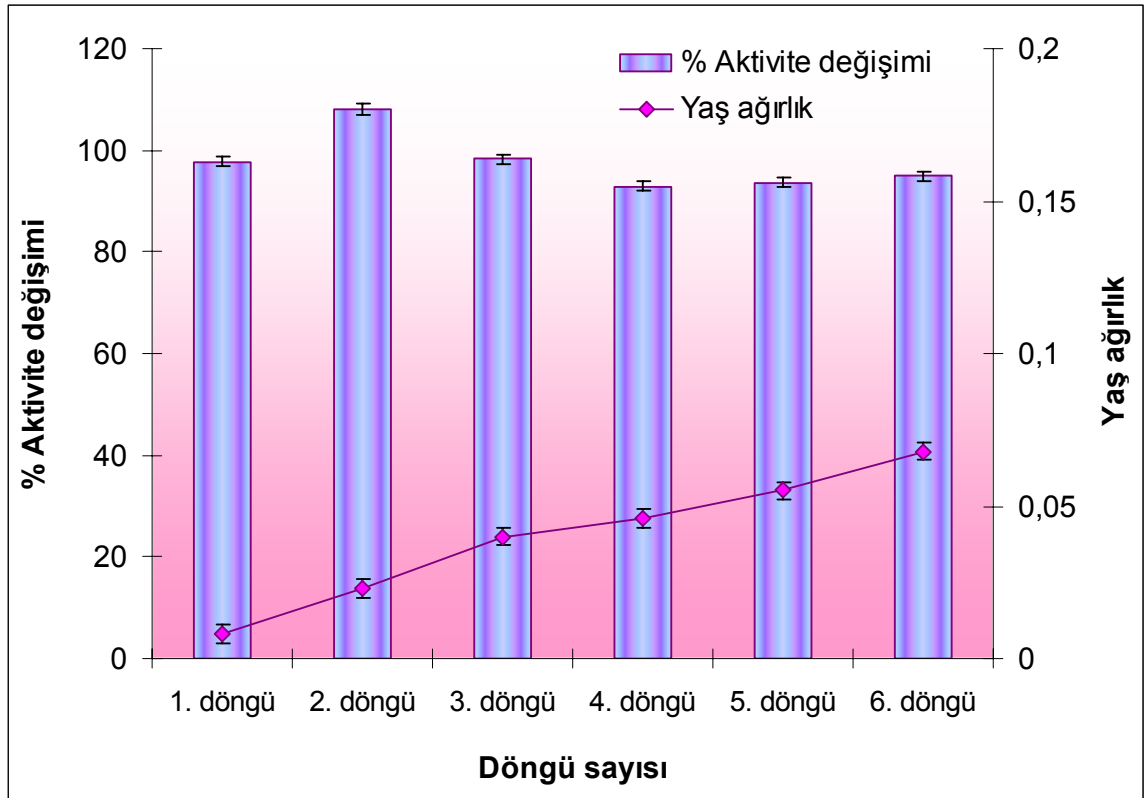


Şekil.4.27. Agara immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücrelerinin altı döngü boyunca kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması

*Üretimler 30°C' de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.8.3. Kalsiyum alginata immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması

İmmobilizasyonu kalsiyum alginat ile gerçekleştirilmiş hücrelerin kaç döngü boyunca kullanılabileceğini saptamak amacıyla, aynı hücreler 6 döngü boyunca dekstranaz aktivitesi açısından incelendi. Hücreler her döngü sonunda taze besiyerine ekildi ve ilk besiyerindeki değerlere göre aktivite değişimleri saptandı, sonuçlar % bağıl aktivite olarak Şekil 4.29' da gösterildi.

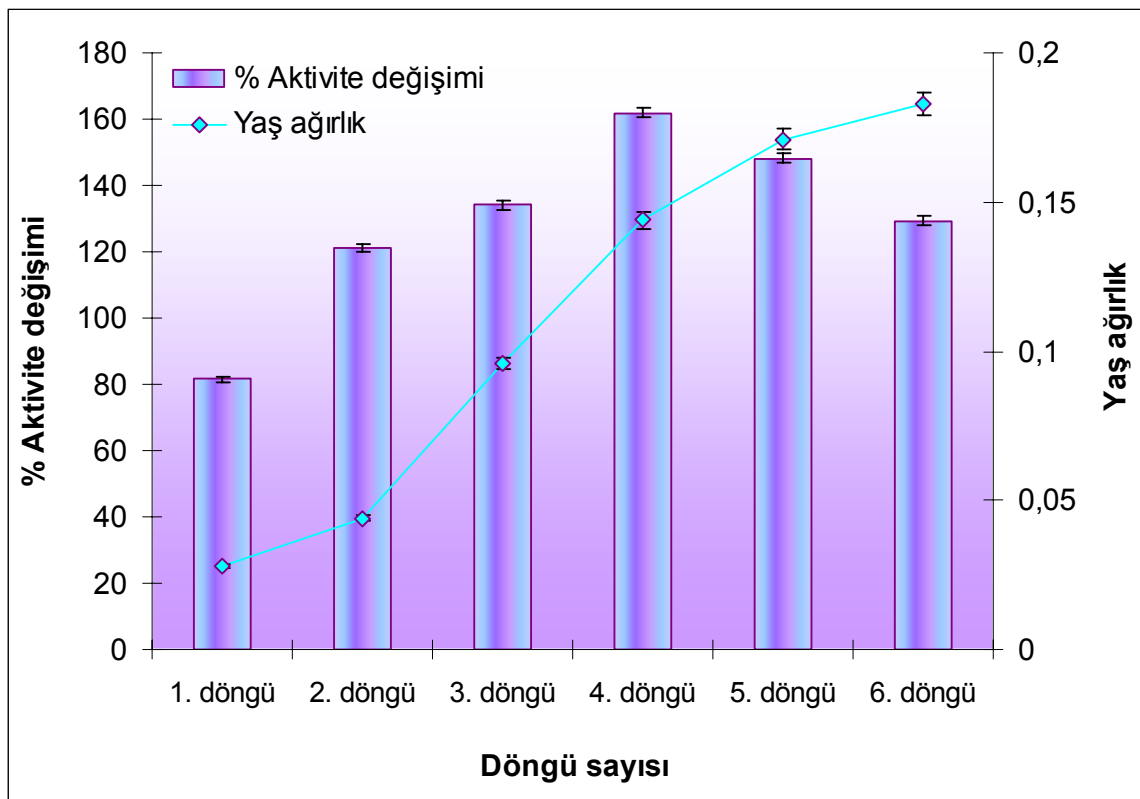


Şekil 4.28. Kalsiyum alginata immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücrelerinin altı döngü boyunca kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması

*Üretimler 30°C' de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.8.4. Poliüretan süngere immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması

P. lilacinus hücreleri poliüretan süngere immobilize edildi ve ilk besiyerinde üremeleri sonucu alınan dekstranaz aktivitesine göre 6 döngü boyunca aktivite değişimleri kaydedildi. Aynı hücreler, her defasında 1 haftalık inkübasyon sonunda alınıp taze besiyerlerine ekildi ve bu şekilde gerçekleştirilen çalışma sonuçları, Şekil 4.30' da gösterildi. Sünger parçalarına immobilize olmuş hücrelerin, 4. döngülerinde maksimum aktiviteyi gösterdikleri saptandı.

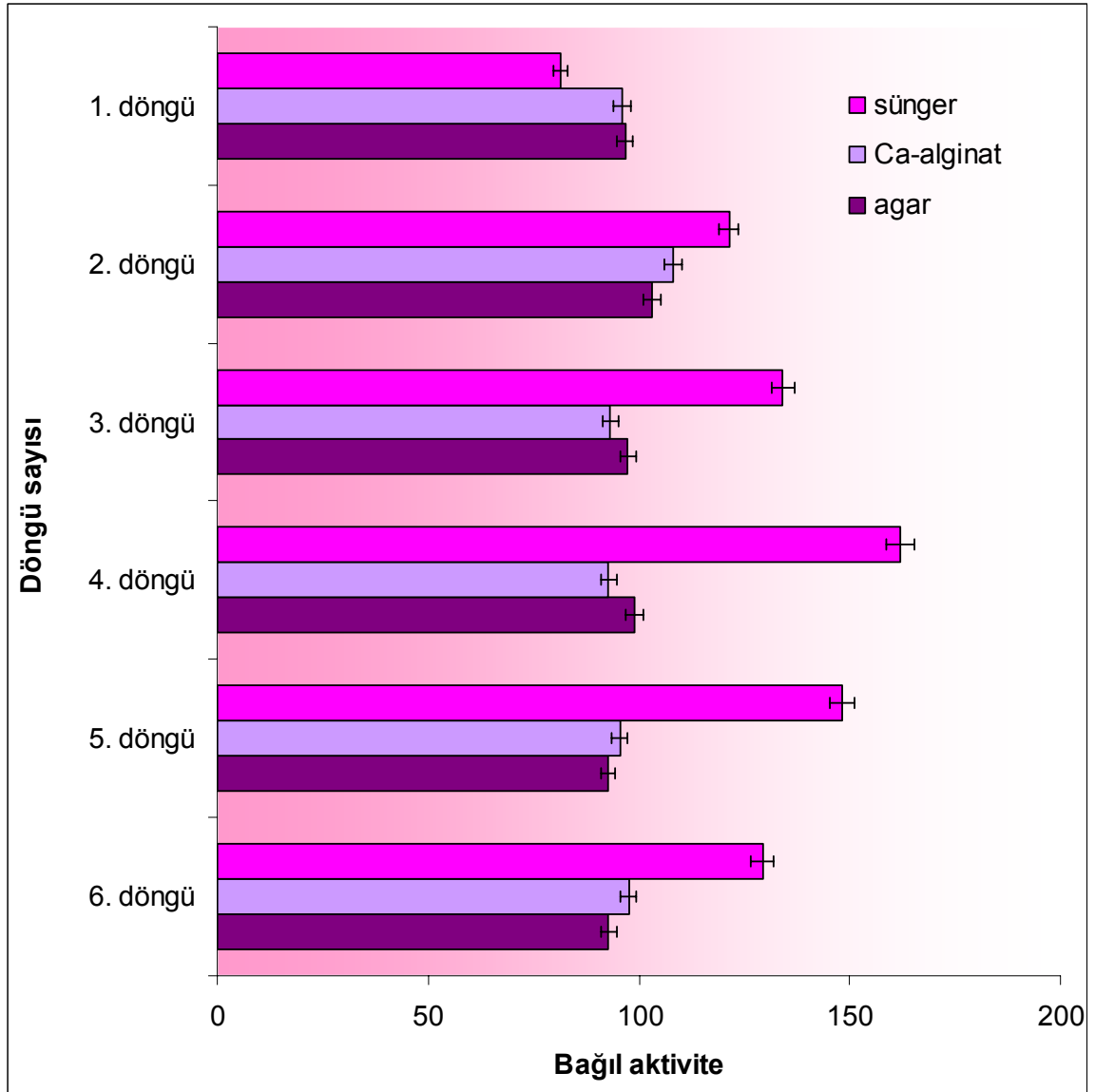


Şekil 4.29. Poliüretan süngere immobilize edilmiş *P. lilacinus* hücrelerinin altı döngü boyunca kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin araştırılması

*Üretimler 30°C' de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4.8.5. İmmobilize *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin farklı matrislerdeki karşılaştırılması

Agar, kalsiyum alginat ve poliüretan süngere tutuklanmış *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak gösterdikleri dekstranaz aktivitelerindeki değişimlerin birbiri ile karşılaştırılması Şekil 4.31' de görülmektedir.



Şekil 4.30. İmmobilize *P. lilacinus* hücrelerinin sürekli kullanımına bağlı olarak dekstranaz aktivitesindeki değişimin farklı matrislerde birbiri ile karşılaştırılması

*Üretimler 30°C'de, 150 rpm hızına ayarlı inkübatörde 7 gün boyunca gerçekleştirildi. Sonuçlar 3 çalışmanın ortalamasıdır.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Dekstranaz enzimi, endüstriyel açıdan oldukça önemli bir enzim olup, dekstran polisakkaritini hidrolize eder. Yüksek bitkilerde, memeli dokularında, funguslar ve bakterilerde bulunduğu gösterilmiştir (Khalikova et al., 2005). Dekstranaz enziminin kullanımı, birkaç alanda yaygındır. Dental plak, bakteriler tarafından oluşturulan, tükürük glikoproteinleri ile yapışkan glukoz polimerlerinden form alan ve diş yüzeyine yapışan bir çeşit biyofilmdir. Bu glukoz polimerlerini azaltabilmek veya üstesinden gelmek ise, ticari olarak hazırlanmış enzimlerin kullanılması ile mümkün olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, diş sağlığı, ağız bakımı ve plaklarla ilgili periodontal hastalıkların tedavisinde, dekstranaz enziminin önemli bir yer teşkil ettiği gösterilmektedir. Enzim uygulamalarının diş macunu veya gargaralarda kullanımının yanı sıra, sakız içeriğinde kullanılmasının da, glukoz polimerlerinin birikiminin önlenmesinde etkisi olabileceği belirtilmiştir (Marotta et al., 2002).

Şeker üretim endüstrisine bakıldığında, işlemler esnasında ortamda bulunan ve çeşitli etkileri olan polisakkaritler üzerine çok sayıda araştırmalar yapıldığı bilinmektedir (Cuddihy et al., 2000). Bu polisakkaritler ortamdaki mevcut bitki materyalinden dolayı var olan veya işlemler sırasında sonradan oluşmuş şekerler olabilirler. Dekstran, şeker işlemlerinde olumsuz taşıma, hava veya depolama şartları gibi nedenlerle bozunma olarak adlandırılabilir. Dekstran oluşumu, şeker fabrikalarında bazı önemli problemlere yol açmaktadır. İşlemler sırasında saflık derecesi kontrolünde karışıklığa sebep olmakta, polarizasyon okumalarında hatalara yol açmaktadır. Ayrıca şurup viskozitesi artışı ve sukroz kristalizasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Bunların sonucunda da en önemli ekonomik etmenlerden biri olan fabrika kapasitesinin düşmesine sebep olmaktadır. Bunların yanı sıra ısı transferini azaltarak sukroz kaybı yaratmakta ve bozuk şekilli kristal oluşumuna neden olmaktadır. Dekstran oluşumu sebebiyle final melası da daha yüksek saflıkta, daha yapışkan formda ve daha fazla miktarda olmaktadır. Bu da tonlarca şeker kaybı anlamına gelmektedir. Dekstranaz enziminin bu işlemler sırasında uygulanması ile sorunların üstesinden gelinebilmekte ve bu uygulama

günümüzde kolaylıkla yapılabilir. Tüm bu etkileri göz önüne alındığında, şeker işlemlerinde dekstranaz enziminin kullanılması kaçınılmaz hale gelmektedir (Cuddihy et al., 2000).

Dekstran polimerinin kullanıldığı bazı polimer sistemlerinde, tıp ve biyokimya alanlarında da dekstranaz enzime ihtiyaç duyulmaktadır (Kosmala et al., 2000; Sumner et al., 2001). Ayrıca endokardit tedavisinde, mikroorganizmalarca oluşturulan polisakkaritlerin yıkılabilmesi için, antibiyotiklerle karıştırılan dekstranaz enzim içerikleri kullanılmaktadır (Mghir et al., 1994). Tüm bu endüstriyel ve tıbbi kullanım alanları göz önüne alınarak, bu çalışmada dekstranaz enziminin fungal kaynaklardan eldesi, bazı üretim koşullarının optimize edilmesi ve enzim özelliklerinin araştırılması uygun bulundu.

Dekstranaz enzimi üretiminin amaçlandığı bu çalışmada, öncelikle Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji ve Uygulamalı Biyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan 18 adet fungus (*Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Alternaria alternata*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma viride* A2, *Trichoderma harzianum* D2, *Humicola insolens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Beauveria bassiana*, *Ascosphaera apis*, *Gibberella fujikuroi* ve *Candida albicans*), dekstranaz sentezleyebilme yetenekleri açısından karşılaştırıldı. Bu tarama çalışmasında, *Beauveria bassiana*, *Ascosphaera apis*, *Gibberella fujikuroi* ve *Candida albicans* türlerinin dekstranaz enzimini sentezleyemedikleri veya çok az miktarda sentezledikleri görüldü. Bunların dışındaki diğer funguslarda az da olsa dekstranaz enzim aktivitesi bulundu, ancak *Paecilomyces lilacinus*' un gözle görülür bir oranda diğer funguslardan farklı olarak çok iyi bir dekstranaz üreticisi olduğu saptanarak Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de gösterildi.

Konu ile ilgili Hattori ve Ishibashi' nin yaptığı bir çalışmada, dekstranaz aktivitesi açısından taranan 556 fungus suşu arasından, *Gibberella fujikuroi*' nin ve *Humicola* sp' nin çok düşük miktarda aktivite verdikleri bildirilmiştir (Hattori and Ishibashi, 1981). Sun ve arkadaşları ise, 241 fungus suşu ile çalışmış, bunlar arasında 66 *Aspergillus niger* suşundan yalnızca 12' sinde, 50 değişik

Penicillium türünden yalnızca 11' inde, 11 adet *Trichoderma viride* suşundan sadece 2' sinde dekstranaz aktivitesi tespit etmişlerdir (Sun et al., 1988). Yine bu çalışmada, dekstranaz aktivitesi açısından taranan 12 adet *Rhizopus oryzae* arasında, dekstranaz üretebilen herhangi bir suşa rastlanamamıştır (Sun et al., 1988). Bu konuda yapılan bir çalışmada bildirilen sonuçlara göre, 6 adet *Penicillium* türünden 3' ü dekstranaz üretebilirken, *Trichoderma*, *Fusarium* ve 5 adet *Aspergillus* türünden hiçbirinde dekstranaz aktivitesine rastlanmamıştır (Shukla et al., 1989). Bizim çalışmamızda, elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak dekstranaz enziminin optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarına en verimli fungus olarak saptanan *Paecilomyces lilacinus* ile devam edildi. Bu fungus, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Uygulamalı Biyoloji Anabilim Dalı' nda Prof. Dr. Nevin Keskin tarafından yürütülen projeler kapsamında, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan toprak örnekleri arasından izole edildi ve Prof. Dr. Nevin Keskin' in izniyle bu çalışmada kullanıldı. Fungusun identifikasyonu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Araştırma Laboratuvarı' nda Yrd. Doç. Dr. Alev Haliki tarafından gerçekleştirildi.

Dekstranaz enzimi eldesinin ilk basamağında, çeşitli kaynaklardan elde edilen ve bazı değişiklikler yapılmış olan 3 besiyeri içeriği, maksimum enzim üretimi açısından denendi. Spesifik enzim aktivitesinin baz alındığı bu çalışmada, *Paecilomyces lilacinus*' dan dekstranaz üretimi için en uygun besiyerinin Pleszczyńska ve arkadaşları tarafından önerilen besiyeri A (Çizelge 3.2) olduğu saptandı (Pleszczyńska et al., 1997). Besiyeri C' de üreyen fungus daha az spesifik aktivite gösterirken, besiyeri B' de en düşük değer elde edildi (Şekil 4.3). Kuru ağırlık cinsinden hesaplanan üreme değerlerine bakıldığında ise besiyeri B, en çok üremenin görüldüğü ortam oldu. Bu sonuç, besiyeri B' nin en zengin içerikli ortam olmasından ve fungusların genel olarak sevdiği bir besin kaynağı olan pepton içermesinden kaynaklanmaktadır. Bu bulgular sonucunda, bundan sonraki çalışmalarda, aksi bildirilmediği sürece temel besiyeri olarak besiyeri A kullanıldı.

Dekstranaz üretimi için en uygun fungus ve en elverişli besiyeri saptandıktan sonra, bu verilerle enzim üretimindeki fizyolojik koşulların optimizasyonu yapıldı.

Paecilomyces lilacinus' un dekstranaz üretimini etkileyen optimum fizyolojik koşulların araştırılmasında, ilk olarak inkübasyon süresinin etkisi incelendi. Bu çalışma için temel besiyerine ekilmiş olan fungus kültürleri, 30°C'de ve 150 rpm'deki inkübasyon süresince 9 gün boyunca takip edildi ve her örnekten uygun süre sonunda alınan sonuçlar, en uygun inkübasyon süresinin 7 gün olduğunu gösterdi (Şekil 4.4). Tsuchiya ve arkadaşlarına göre, dekstranaz üretimi boyunca, aktivite 9. güne kadar yükselmektedir (Tsuchiya et al., 1952). Çeşitli *Penicillium* türleri ile yapılan çalışmalarda ise 5. günde aktivite ölçümleri yapılmıştır (Fukumoto et al., 1971; Kosaric et al., 1973; Shukla et al., 1989). Das ve Dutta'nın yaptığı çalışmada ise karbon kaynağı çeşidine göre inkübasyon süresi 3 veya 5. günler olarak bildirilmiştir (Das and Dutta, 1996). Çalışmada aynı zamanda 7. günden sonra fungus biyokütlesinde daha fazla artış olmadığı, hatta çok az da olsa bir düşüş olduğu saptandı. Kosaric ve arkadaşlarının daha önce yaptığı çalışmalar sonucunda, en iyi dekstranaz aktivitesinin, hücre biyokütlesinde düşüş olmaya başladığı, yani hücre otolizi gerçekleşmeye başladığı andan itibaren elde edildiği bildirilmiştir (Kosaric et al., 1973). Bunun yanı sıra Galvez-Mariscal ve Lopez-Munguia'nın yaptığı bir başka çalışmada da maksimum biyokitleye ulaşıldıktan 4 gün sonra maksimum dekstranaz aktivitesi görüldüğü ifade edilmiştir (Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991). Bunlar da çalışmamızla benzerlik gösteren verilerdir. Dolayısıyla dekstranaz eldesi için optimum inkübasyon süresi, çalışılan fungusa ve kullanılan besi ortamına göre çeşitlilik gösterebilmekle beraber, maksimum hücre yoğunluğuna ulaşılmasının, enzim üretimi için önemli bir unsur olduğu söylenebilir.

Paecilomyces lilacinus' un dekstranaz üretimini etkileyen fizyolojik şartlar arasında, inkübasyon sıcaklığı önemli bir çevresel koşuldur. Optimum inkübasyon sıcaklığının saptanması için diğer koşullar sabit tutularak 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C derecelerdeki farklı sıcaklıklarda yapılan inkübasyon sonucunda, optimum dekstranaz üretiminin olduğu değerin 30°C olduğu görüldü (Şekil 4.5). Fungusların genel üretim sıcaklığı da olan bu değer, birçok araştırmacı tarafından optimum enzim eldesi için kullanılmıştır (Fukumoto et al., 1971; Hattori et al., 1981; Madhu and Prabhu, 1984; Shukla et al., 1989). Bu çalışmada, 20°C, 25°C ve 30°C sıcaklıklar arasında enzim üretimi açısından çok büyük bir fark olmazken, 35°C sıcaklıktaki inkübasyon sonunda hem üreme değerinin, hem de

enzim aktivitesinin diğer sıcaklıklara göre çok düşük miktarda olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla, Şekil 4.5’ te de gösterildiği gibi, fungusun, yüksek sıcaklık derecelerine karşı toleransının, düşük sıcaklık derecelerinden daha az olduğu saptandı.

Konu ile ilgili *Penicillium* türleri ile yapılan bir çalışma sonucunda da, enzim üretim sıcaklığı için 25°C ile 28°C arası sıcaklığın kullanıldığı bildirilmiştir (Kosaric et al., 1973). *Fusarium* sp. kullanılarak dekstranaz eldesi amaçlanan bir başka çalışmada, inkübasyon için 25°C’ nin kullanıldığı bildirilmiştir (Shimizu et al., 1998). Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, 35°C ve üzerindeki sıcaklıklarda yapılan inkübasyonda, dekstranaz aktivitesi neredeyse sıfır olarak gösterilmiştir (Cheng et al., 1992). 30°C’ den yüksek sıcaklık değerleri, termofilik funguslarla yapılan enzim üretim çalışmaları için tercih edilmektedir (Wynter et al., 1997). Mikroorganizmalar için uygun olmayan düşük veya yüksek inkübasyon sıcaklıkları, düşük ürün eldesi olarak mikrobiyal metabolizmanın etkilenmesine sebep olur, bundan dolayı çalışmalarımıza 30°C inkübasyon koşulları sağlanarak devam edildi.

Bu çalışmada araştırılan parametrelerden biri olan besiyeri pH değerinin de *Paecilomyces lilacinus* üzerinde dekstranaz üretimine etkisi olduğu bulundu. pH değerine bağlı dekstranaz üretimi çalışmalarının sonucunda en uygun aralık, pH:5.5 ile pH:6.0 olarak saptandı. Bu aralığın daha üzerine çıkıldığında veya daha altına inildiğinde, dekstranaz üretiminin azaldığı görüldü (Şekil 4.6). pH 4’ te ve pH 7.0’ nin üzerindeki değerlerde, enzim sentezinde yaklaşık olarak yarı yarıya bir düşüş olduğu bulundu. Fungusun üreme değerleri ise besiyerinin başlangıç pH’ ı sıyla çok değişiklik göstermemekle beraber, pH: 7.0 ve üzerinde hafif bir düşüş gözlemlendi. Bu tip sistemlerde fungusun, önemli bir çevresel koşul olan pH şartlarından etkilenmesi beklenen bir durumdur. pH değeri, hem fungusun üremesinde, hem de enzim üretiminde etkilidir. *Paecilomyces lilacinus*’ un dekstranaz üretim mekanizması da, ortamın bazik pH’ ından etkilenmekte olup, hafif asidik ve nötre yakın pH derecelerinde üretimin arttığı söylenebilir. Besiyerinin başlangıçtaki pH değeri, mikroorganizmaya bağlı bir parametre olup, *Paecilomyces lilacinus* ile yapılan bir başka çalışmada, benzer şekilde başlangıç pH’ ı 6.0 olduğunda maksimum dekstranaz üretimi gözlenirken (Cheng et al.,

1992), *Aspergillus carneus* ile yapılan bir çalışmada ise başlangıç pH değeri 8.5 olarak belirtilmiştir (Hiraoka et al., 1972). *Penicillium lilacinum* 'dan dekstranaz elde edilen bir çalışmada, bizim çalışmamıza benzer olarak pH 5.6-6.0, en uygun başlangıç pH değeri olarak bulunmuştur (Das and Dutta, 1996). *Fusarium* sp.' den dekstranaz elde eden Shimizu ve arkadaşlarının kullandığı besiyeri başlangıç pH' sı ise 5.5 olarak bildirilmiştir (Shimizu et al., 1998).

Mikrobiyal hücrelerden enzim üretiminde, çevresel şartlar önemli bir etkindir. pH ve sıcaklık gibi, çalkalama hızı da etkili bir çevresel koşuldur. Bu sebeple bir sonraki optimizasyon çalışması, inkübasyon sırasındaki çalkalama hızının optimize edilebilmesi için yapıldı. İnkübatörde statik koşullarda ve farklı döngüsel çalkalama hızlarına ayarlanmış koşullarda gerçekleştirilen bu çalışmada, üreme değerlerinin çok büyük değişiklik göstermediği saptandı. Ancak bunun yanında enzim aktivitelerinde önemli farklar olduğu saptandı (Şekil 4.7). Etüvdeki statik koşullarda üreyen kültür, 100 rpm ve üzeri hızlara ayarlanmış etüvlerde üreyen kültürlerin yaklaşık 1/3' ü kadar (35.26 U/mg protein) enzim aktivitesi gösterdi. 50 rpm hızına ayarlı etüvde üreyen kültürün ise statik koşuldaki kültürün 2 katı kadar (70.21 U/mg protein) aktivite gösterdiği hesaplandı. Bunun yanı sıra statik inkübasyon koşullarında üreyen *Paecilomyces lilacinus*, çalkalamalı inkübasyondan farklı olarak, sıvı kültür ortamının yüzeyinde bir tabaka şeklinde üreme gösterdi. Yapılan bu çalışma sonucunda, çalkalama hızının, besiyerindeki oksijen transferini artırdığından dolayı, dekstranaz enzimi üretimini de artırdığı, yani bu iki parametrenin birbiri ile doğru orantılı olduğu düşünüldü. En iyi sonuç 100 rpm hızında elde edilirken (95.36 U/mg protein), 150 rpm hızında inkübe edilen kültürle çok fazla farkı olmadığı görüldü. İnkübasyon esnasındaki çalkalama hızları olan 100 ve 150 rpm değerlerinde enzim üretiminin çok büyük fark göstermemesi sebebiyle, laboratuvar koşullarına daha uygun olduğundan, bundan sonraki çalışmalar 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış etüv koşullarında devam etti.

İnkübasyon sırasındaki çalkalama hızı açısından literatürde yer alan değerler, genel olarak 100, 120, 125, 150, 180 ve 200 rpm olarak bildirilmiştir (Abdel-Naby et al., 1999; Das and Dutta, 1996; Hattori and Ishibashi, 1981; Kosaric et al., 1973; Lee and Fox, 1985). *Penicillium aculeatum* ile yapılan bir çalışmada ise,

statik olarak üretilen kültürden dekstranaz üretimi için, inkübasyonun çok daha uzun süreli olması gerektiği bulunmuştur (Shukla et al., 1989).

Besiyerindeki karbon kaynağı, çoğu mikroorganizmanın metabolizması için, bir maddenin üretiminde veya herhangi bir mikrobiyal çalışmada oldukça önem taşıyan bir parametredir. Çalışmalarımızda, temel karbon kaynağı olarak dekstran kullanıldı, ancak bundan farklı olarak çeşitli karbon kaynaklarının *Paecilomyces lilacinus*' un dekstranaz üretimine olan etkisi araştırıldı. Fungus için belirlenmiş olan temel besiyeri içeriğinde karbon kaynağı olarak %1' lik dekstran bulunmaktaydı. Bunun yerine ortama koyulmuş değişik karbon kaynaklarından glukoz, laktoz, nişasta, fruktoz, sukroz ve maltoz içeren besiyerlerinde *Paecilomyces lilacinus* üretildi ve dekstranlı besiyerinde ürettiğinden daha iyi üreme gösterdi. Buna rağmen, Şekil 4.9' da görüldüğü gibi üretim ortamında karbon kaynağı olarak bulunmaları durumunda, fungusun ancak eser miktarda dekstranaz sentezi yapabildiği gözlemlendi. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz, laktoz, dekstrin ve nişastanın kullanımıyla elde edilen aktivitenin, aynı miktarda kullanılan dekstran ile alınan aktivitenin onda birinden daha az olduğu belirtilmiştir (Abdel-Naby et al., 1999). Yine benzer bir sonucu Cheng ve arkadaşları bildirmiştir, bu çalışmaya göre karbon kaynaklarından dekstranın dışında glukoz, fruktoz, sukroz, maltoz, laktoz içeren besiyerlerinde üreyen funguslar, çok az enzim aktivitesi göstermişlerdir (Cheng et al., 1992). Garcia ve Rodriguez ise, yaptıkları çalışma sonucunda, besiyerinde denenilen karbon kaynakları arasında, sadece dekstran kullanıldığında enzim üretimi saptandığını bildirmişlerdir (Garcia and Rodriguez, 2000). Walker ve arkadaşlarının araştırmaları sonucunda da, karbon kaynaklarından dekstranın dışında glukoz, sukroz, maltoz, laktoz, nişasta denenmiş ve dekstranaz üretiminin ancak dekstranlı ortamda gerçekleştiği bildirilmiştir (Walker et al., 1980). Bu bulgular sonucunda, dekstran polimerinin, enzim üretimi için etkili ve gerekli olduğu, hatta indükleyici olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda, bu karbon kaynaklarının yanı sıra, *Streptococcus mutans* ile *Leuconostoc mesenteroides*' ten elde edilmiş ve tam olarak saflaştırılmamış 2 farklı dekstran da, temel besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanıldı. Fungusun bu dekstranlarla hazırlanmış besiyeri üzerinde, ticari dekstranazla hazırlanmış

olana yakın üreme değerleri ve enzim sentezi gerçekleştirdiği görüldü (Şekil 4.9). Bu konuda yayınlanmış olan bazı makalelere göre, karbon kaynağı olarak değişik dekstranlar kullanıldığında da enzim aktivitesinde farklılıklar olmaktadır (Tsuru et al., 1971), hatta dekstranın molekül ağırlığı arttıkça enzim aktivitesinde de artış olduğu gösterilmiştir (Cheng et al., 1992; Shukla et al., 1989). 1000 kD molekül ağırlığında olan dekstran, 17.2 kD molekül ağırlığında olan dekstrana oranla % 40 daha fazla enzim üretimi sağlamaktadır (Cheng et al., 1992). Çeşitli kaynaklarda, $200.000-40 \times 10^6$ molekül ağırlığındaki dekstran tipi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda kullanılan dekstran, 70.000 molekül ağırlığındadır. Daha sonraki çalışmalarda *Paecilomyces lilacinus*' un daha yüksek molekül ağırlığındaki dekstran ortamında üretilerek dekstranaz üretimindeki farklılık bulunup, daha yüksek enzim aktivitesi elde edilebileceği düşünülmektedir.

Maksimum dekstranaz üretimini sağlayan karbon kaynağının dekstran olduğunun saptanmasından sonra, dekstranın farklı konsantrasyonları, enzim üretimi için araştırıldı. Şekil 4.10' da görüldüğü gibi, artan dekstran konsantrasyonlarında, kuru ağırlık miktarlarının da artmakta olduğu bulundu. Ancak bu artan üreme değerlerine rağmen, fungusun enzim üretiminde eş zamanlı bir artış gözlenmedi. Hatta ortamda % 1' den daha fazla dekstran olduğunda enzim aktivitesinde az da olsa bir düşüş kaydedildi. Artan dekstran konsantrasyonlarında, sıvı besiyerinin viskozitesinin arttığı göz önüne alınacak olursa, enzim sentezinin buna bağlı bir düşüş gösterdiği düşünülebilir. Çünkü ortam yoğunluğu yükseldikçe, oksijeninin ortama difüzyonu zorlaşır. Ayrıca üreme yoğunluğundan kaynaklanan metabolik artıkların ortamdaki konsantrasyonlarının artması, enzim sentezi açısından negatif bir durum yaratmış olabilir. Bunun yanı sıra substratın fazla oluşunun, inhibitör etki yaratmış olabileceği de düşünülebilir.

Bununla ilgili olarak literatürde, birçok araştırmacının yaptıkları çalışmalarda, bizim çalışmamızla eşdeğer olarak, besiyerinde % 1 oranında dekstran kullandıkları görülmüştür (Arnold et al., 1998; Bourne et al., 1962; Garcia and Rodriguez, 2000; Koenig and Day, 1988; Lee and Fox, 1985; Shimizu et al., 1998; Simonson et al., 1975). Buna benzer olarak Pleszczynska ve arkadaşları % 1.5 oranında dekstran kullandıklarını belirtirken, bazı araştırmacıların da özellikle katı besiyerleri içeriklerinde % 0.5 oranında dekstran kullanarak dekstranaz

üretimi gerçekleştirdikleri gösterilmiştir (Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991; Khalikova et al., 2003; Pleszczynska et al., 1997; Wynter et al., 1997). Tsuru ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, en iyi dekstranaz aktivitesinin elde edildiği besiyeri ortamı, % 1.5 dekstran ile sağlanmış, ancak enzim üretimi için uzun bir süreç gerektiğinden ortamın viskozlaşmaması açısından % 1 dekstran konsantrasyonu kullanılmıştır (Tsuru et al., 1971). Bu sonuçlardan farklı olarak, Abdel-Naby ve arkadaşları, karbon kaynağı konsantrasyonu ile yaptıkları çalışma sonucunda % 3.5 dekstran kullanılması ile en yüksek aktiviteyi elde ettiklerini belirtmişlerdir (Abdel-Naby et al., 1999). Çalışmamızda ayrıca, ortamda dekstran polimeri bulunmadığında, dekstranaz enzimini sentezinin gerçekleşmediği gözlemlendi. Bu durumda fungusun, ortamdaki diğer besin maddelerini kullanarak ancak çok az miktarda üreyebildiği görüldü (Şekil 4.10).

Besiyerindeki azot kaynağının dekstranaz üretimine etkisinin araştırılması için yapılan çalışmada, NaNO_3 , NH_4NO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, daha önce yapılmış olan literatür taramasında en iyi sonuçları veren azot kaynakları olarak belirlenmişti. Bu 3 değişik azot kaynağının % 0.2 oranında eklenmesiyle hazırlanmış temel besiyerlerinde üreyen fungus, en iyi üreme değerini $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ' lü besiyerindeki inkübasyon sonucunda verdi. Buna karşılık, NaNO_3 ve NH_4NO_3 içeren besiyerlerindeki üremenin birbirine yakın, ancak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ' lü besiyerine göre daha az olduğu görüldü. Enzim üretimin ise NaNO_3 kullanıldığında diğer azot kaynaklarına göre farklı bir şekilde arttığı ve 116.32 U/mg protein değerine ulaştığı görüldü. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ' ün azot kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde ise en yüksek üreme değerinin görülmesine karşılık en düşük enzim aktivitesi elde edildi (72.14 U/mg protein).

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Abdel-Naby ve arkadaşlarının da değişik azot kaynaklarının dekstranaz üretimine etkisini incelemiş ve bizim çalışmamıza paralel olarak NaNO_3 ile maya ekstresinin beraber kullanıldığı ortamda en iyi dekstranaz aktivitesini elde etmiş oldukları görülmüştür (Abdel-Naby et al., 1999). Yine çalışmamıza paralel olarak dekstranaz üretimi için kullanılan besiyerlerinde sıklıkla kullanılan azot kaynağının NaNO_3 olduğu saptanmıştır (Fukumoto et al., 1971; Garcia and Rodriguez, 2000; Pleszczynska et al., 1997; Tsuru et al., 1971). Galvez-Mariscal ve Lopez-Munguia ise bizim en

düşük dekstranaz aktivitesini elde ettiğimiz azot kaynağı olan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerini deneylerinde kullanmışlardır (Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991). Bir maya olan *Lipomyces starkeyi* ile dekstranaz üretimi çalışmaları yapan Koenig ve Day' in de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyeri kullandığı bildirilmiştir (Koenig and Day, 1988). Bunların yanı sıra Simonson ve arkadaşları da besiyeri içeriğinde $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ kullanmışlardır (Simonson et al., 1975). Bazı diğer çalışmalarda ise dekstranaz üretimi için organik azot kaynaklarının da verimli olarak kullanılabileceği belirtilip, et pepton, mısır maserasyon sıvısı, polipepton ile yüksek aktivite elde edildiği gösterilmiştir (Cheng et al., 1992; Hattori et al., 1981; Tsuru et al., 1971). Besiyerindeki azot kaynağı, mikroorganizmanın metabolizması ile doğrudan ilgili olup, farklı cins ve türlere göre, elde edilecek ürün tipine göre farklılıklar gösterebilmektedir.

Azot kaynağı ve konsantrasyonu, hücresel metabolizma için çok önemli bir parametredir. Bu konuda da en uygun azot kaynağının saptanması ve buna bağlı olarak dekstranaz üretiminde gerekli olan optimum azot konsantrasyonunun bulunması amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de sunuldu. Bu sonuçlara göre, azot kaynağı olarak 0.5 g/L konsantrasyondaki NaNO_3 (sodyum nitrat) varlığında, dekstranaz spesifik aktivitesinin en yüksek değere ulaştığı görüldü (113.97 U/mg protein). Temel besiyerine eklenen azot kaynaklarından en yüksek dekstranaz üretimini sağlayan konsantrasyonun 2 g/L olduğu bulunmasına rağmen, spesifik dekstranaz aktivitesi hesaplandığında, protein değeri daha az olduğundan 0.5 g/L konsantrasyondaki azot değerinin, daha yüksek spesifik enzim aktivitesine sahip olduğu görüldü. Bununla birlikte çalışmamızda en fazla üreme (0.21 g/50ml) 2 g/L konsantrasyonundaki NaNO_3 varlığında gözlemlendi.

Shukla ve arkadaşları da dekstranaz üretimi için besiyerinde yaptıkları azot kaynağı optimizasyonu sonucunda NaNO_3 konsantrasyonunu 2 g/L olarak saptamışlardır (Shukla et al., 1989). Abdel-Naby ve arkadaşları tarafından dekstranaz üretimi için yapılan çalışmada da azot kaynağı olarak kullanılan NaNO_3 , 1 g/L konsantrasyonda kullanılmıştır (Abdel-Naby et al., 1999). Bunun yanı sıra çeşitli araştırmacıların, 2.0, 5.0 ve 7.0 g/L gibi değişik konsantrasyonlardaki azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde dekstranaz

çalışmaları yaptıkları görülmüştür (Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991; Garcia and Rodriguez, 2000; Koenig and Day 1988; Pleszczynska et al., 1997; Tsuru et al., 1971). Dolayısıyla, dekstranaz üretimi için besiyerinde kullanılan azot kaynağı konsantrasyonu, çeşitli çalışmalarda değişik mikroorganizmalar arasında farklılık göstermektedir.

Paecilomyces lilacinus' un dekstranaz üretimini etkileyen optimum fizyolojik koşullar üzerine yapılan bu incelemelerin ardından alınan sonuçlar ışığında, enzim üretiminin yalnızca *Paecilomyces lilacinus*' un üremesine bağlı olmayıp, besi ortamı ve inkübasyon koşullarının değişmesi ile de bağlantılı olarak gerçekleştiği görüldü. *Paecilomyces lilacinus*' dan dekstranaz üretiminde kültür şartlarının optimizasyonu için yapılan çalışmalardan sonra, reaksiyon ortamında enzim aktivitesini etkileyen uygun fizyolojik koşulların incelenmesi için de çalışmalar yapıldı. Çalışmamızda bu faktörlerden inkübasyon süresi, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonunun etkileri incelendi.

Bir enzim reaksiyonu söz konusu olduğunda, reaksiyonun hızı, belirli bir zamanda oluşturulan ürünün miktarı ile belirlenir. Reaksiyon ortamının optimum inkübasyon süresini saptamak için enzim ve substrattan oluşan ortam, sıfırıncı dakikadan itibaren değişen sürelerde, sabit sıcaklıkta inkübe edildi ve Şekil 4.13' te görüldüğü gibi 60. dakikaya kadar ortaya çıkan redükte şeker miktarında artış oldu. Dekstranaz enzimi ile yapılan benzer çalışmalarda kullanılan inkübasyon süreleri, 10 dakika (Abdel-Naby et al., 1999; Beldarrain et al., 2003; Fukumoto et al., 1971), 20 dakika (Kosaric et al., 1973; Shukla et al., 1989), 30 dakika (Pleszczynska et al., 1997; Rogalski et al., 1997), 35 dakika (Walker et al., 1980) ve 2 saat (Tsuchiya et al., 1952) gibi değerlerle gerçekleştirilmiş olup, farklılık göstermektedir.

Reaksiyon ortamının inkübe edildiği sıcaklık derecesi, enzim aktivitesini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. *Paecilomyces lilacinus* dekstranazının optimum inkübasyon sıcaklığını saptayabilmek için yapılan bu çalışmada, 126.78 U/mg protein değeriyle 50°C' nin maksimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık derecesi olduğu, ancak 40°C' de de aktivitenin önemli bir kayba uğramadığı, 118.27 U/mg protein değerine düştüğü bulundu. Şekil 4.14' te de görüldüğü gibi,

40°C' nin altında enzim aktivitesinin yaklaşık olarak yarıya düştüğü (66.23 U/mg protein), 60°C' nin üzerinde ise çok azalarak 82.31 U/mg protein değerine indiği saptandı. Kinetik kurallarına göre, bir reaksiyonun hızı, artan sıcaklıkla birlikte artar. Ancak enzimler, protein yapısında olduklarından, bu kurala belirli bir ölçüde uyarlar, çünkü belirli bir sıcaklığın üzerinde yapıları bozulmaktadır. Belirli bir derecenin üzerinde, enzimlerin ısıya bağlı olarak denatüre olma hızı, enzimin reaksiyon hızı artışından daha süratli olduğundan, enzimin aktivitesi azalır. Bir başka deyişle, protein yapısının bozulacağı sıcaklık derecelerinde enzim de denatüre olacağından, aktivite gözlenemez.

Çeşitli kaynaklardan elde edilen dekstranazların optimum inkübasyon sıcaklıkları çoğu araştırmacı tarafından 40°C olarak belirlenmiştir (Abdel-Naby et al., 1999; Beldarrain et al., 2003; Das and Dutta, 1996; Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991; Kosaric et al., 1973; Tsuchiya et al., 1952). Bunun yanı sıra Walker ve arkadaşlarının 35°C, Bourne ve arkadaşlarının 45-50°C, Sun ve arkadaşlarının 50-55°C, Lee ve Fox' un 55°C, termostabil mikroorganizmalarla çalışan Wynter ve arkadaşlarının ise 70°C sıcaklıkları, optimum inkübasyon değeri olarak kullandıkları bildirilmiştir (Bourne et al., 1962; Lee and Fox, 1985; Walker et al., 1980; Wynter et al., 1997). Bu sonuçlarla beraber, bizim çalışmamıza paralel olarak optimum inkübasyon sıcaklığını 50°C olarak bildirmiş olan araştırmacıların sonuçları, bizim verilerimizi desteklemektedir (Fukumoto et al., 1971; Koenig and Day 1988; Koenig and Day, 1989; Pleszczynska et al., 1997; Rogalski et al., 1997; Sun et al., 1988). Elde ettiğimiz sonuçlar, ürettiğimiz dekstranaz enziminin endüstriyel kullanımının mümkün olduğunu, hatta yüksek sıcaklık derecelerinde rahatlıkla uygulanabileceğini göstermektedir. Enzimin en önemli kullanım sahalarından biri olan şeker fabrikalarında 50°C sıcaklıkta uygulama yapıldığı göz önünde bulundurulacak olursa, düşük sıcaklıkta işlev gören dekstranazlara kıyasla çok daha geniş kullanımı olacağı şüphesizdir. Bulunan sonuçlardan yola çıkılarak çalışmanın bundan sonraki kısımlarında, inkübasyon sıcaklığı olarak 50°C kullanıldı.

Enzimlerin gösterdiği reaksiyon hızları, farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna göre değişmektedir. Dolayısıyla enzimler, farklı pH değerlerinde farklı aktiviteler gösterebilmektedirler. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH değeri, o enzimin

optimum pH' ısı olarak bilinir. Dekstranaz enzimi için optimum pH değerini saptamak amacıyla pH 4.0 ile pH 7.0 arasında yarım derecelik artışıla değişen pH değerlerinde enzim aktivitesi ölçüldü. Şekil 4.15' te verildiği gibi, pH 5.0' in altına inildiğinde enzim aktivitesinin sert bir düşüş gösterdiği gözlemlendi. pH 5.0, en fazla aktivitenin gözlemlendiği optimum pH değeri olarak saptanırken spesifik enzim aktivitesi 183,2 U/mg protein olarak ölçüldü. Bunun üzerindeki pH değerlerinde ise çok sert olmamakla birlikte, enzim aktivitesi çizgisinde bir azalma görüldü. Goldstein-Lifschitz ve Bauer, elde ettikleri dekstranazın, optimum pH' ısının 5.5 olduğunu belirtmişler, ayrıca asidik pH' larda hızlı aktivite düşüşü olduğunu kaydetmişlerdir (Goldstein-Lifschitz and Bauer, 1976). Buna benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalara göre, çeşitli kaynaklardan elde edilmiş dekstranaz enziminin optimum pH değeri, 4.5 ile 5.5 değer aralığında değişmektedir (Abdel-Naby et al., 1999; Arnold et al., 1998; Bourne et al., 1962; Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991; Sun et al., 1988; Tsuchiya et al., 1952; Wynter et al., 1997). Bu veriler de bizim çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Paecilomyces lilacinus dekstranazının pH 4.5 ve altındaki değerlerde aktivite kaybına uğramasının nedeni, stabilitesini kaybetmesi olabilir. Şekil 4.15' te verilmiş olan sonuçlar değerlendirildiğinde, pH 4.5' in altında düşen aktivitenin, aktif merkezdeki bir değişimden kaynaklandığı düşünölebilir. Lee ve Fox, bu konudaki çalışmalarında, pH kaynaklı aktivite kaybının, bazı aktif bölgelerin birleşmesinden veya ayrılmasından dolayı oluşan katalitik aktivitedeki azalma ile sonuçlanıyor olabileceğini belirtmişlerdir (Lee and Fox, 1985). Optimum pH değerinden uzaklaştıkça aktivitenin düşmesinin sebebi, enzim yapısının bozulması veya enzimin inaktif forma gelmesidir. Alınan sonuçlar dahilinde, çalışmamızda elde ettiğimiz *Paecilomyces lilacinus* dekstranazının en fazla aktiviteyi gösterdiği pH değerinin, yani bu enzimin optimum pH' ısının 5 olduğu saptandı ve bundan sonraki aşamalarda reaksiyon ortamında bu pH değeri kullanıldı (Şekil 4.15).

Enzim aktivitesini etkileyen fizyolojik koşullardan biri de substrat konsantrasyonudur. Bu çalışmada reaksiyon ortamındaki substrat olan dekstran konsantrasyonunun dekstranaz aktivitesine etkisini inceleyebilmek için kurulan

deneyde artan değerlerde % 0.5 ile % 8 arasında değişen konsantrasyonlar kullanıldı ve % 4 konsantrasyonun uygun substrat miktarı olduğu görüldü. Ancak % 2 ile % 4 substrat konsantrasyonunda elde edilen enzim spesifik aktiviteleri arasında çok fark olmaması (sırasıyla 175.304 U/mg protein ve 193.23 U/mg protein), daha ekonomik ve endüstriyel anlamda daha kullanılabilir bir miktar olmasından dolayı deneylere % 2' lik dekstran konsantrasyonu ile devam edildi (şekil 4.16). Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, Pleszczyńska ve arkadaşlarının da bizim çalışmamızla aynı konsantrasyonda % 2 substrat kullandığı görüldü (Pleszczyńska et al., 1997). Bundan farklı olarak bazı bilim adamları da çalışmalarında % 2.5 konsantrasyondaki dekstranı substrat olarak kullandıklarını bildirmişlerdir (Beldarrain et al., 2003; Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991; Kosaric et al., 1973).

Substrat konsantrasyonu ile enzimatik tepkime hızı, belirli bir noktaya kadar doğru orantılı olarak artmaktadır. Normal şartlarda reaksiyon ortamında substrat konsantrasyonu belirli bir noktaya ulaştığında reaksiyon yavaşlar veya sabit kalır. Yavaşlama, substratın reaksiyonu inhibe edici etkisinden dolayıdır. Dekstranın substrat olarak kullanıldığı ortamlarda bu etkinin viskozite artışıdan da kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir (Pleszczyńska et al., 1997). Bu çalışmada, substratın inhibe edici bir etkisine rastlanmadı, ancak % 4 substrat konsantrasyonunun üstünde, reaksiyon hızının sabit bir noktaya ulaşmaya başladığı görüldü. Bunun sebebi, ortamda bulunan belirli miktardaki enzimin, belirli bir miktardaki substratla birleşebilme kapasitesi olmasıdır. Bir reaksiyon ortamında belirli miktarda bulunan enzim, enzim-substrat kompleksi oluşturmak üzere, sürekli olarak çalışır. Enzim serbest kaldıkça, yeni bir substrat molekülü ile karşılaşır, ancak ortamda belli bir düzeyin üzerinde substrat olursa, enzimin serbest kalma süresi kısılanır, hatta enzim hiç boř durmadan sürekli çalışır. Bu durumda substratın daha fazla artırılması, enzimin aktivitesinde bir artış sağlamaz. şekil 4.16' da görüldüğü gibi, bu çalışmamızda % 4' ten sonra enzim dekstrana doygun hale gelir.

Enzimlerin ticari olarak kullanımlarının mümkün olabilmesi için, kullanım amacına ve yerine uygun olarak belirli sıcaklık ve pH derecelerinde kararlılıklarını koruyabilmeleri önemlidir. Endüstriyel süreçlerde, kararlılığın önemi büyük olup,

kullanılacak enzimin işlem süresince özelliklerini kaybetmemesi gerekmektedir. *Paecilomyces lilacinus* dekstranazının belirli sıcaklık ve pH değerlerindeki kararlılığını saptamak, çalışmamızın diğer bir amacı olduğundan, bu amaca yönelik olarak yaptığımız çalışmalarda, dekstranaz enziminin sıcaklık kararlılığı, sıcaklık kararlılık süresi ve pH kararlılığı araştırıldı.

Endüstriyel açıdan en önemli parametrelerden biri olan enzimin sıcaklık kararlılığını saptamak amacıyla, buzdolabı sıcaklığı olan 4°C, oda sıcaklığı kabul edilen 20°C ve bundan sonra 10°C artan değerlerdeki sıcaklıklarda hazırlanmış olan su banyolarında yarım saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. İlk yarım saatlik süre sonunda, 4°C, 20°C, 30°C, 40°C ve 50°C’ deki enzimlerde aktivite kaybının % 2’den fazla olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.17). 60°C’ deki enzim örneği % 37’lik bir aktivite kaybına uğrarken, 70°C’ deki enzim örneğinin % 74’ lük düşüşle enzim aktivitesini kaybettiği Şekil 4.17’ te gösterildi. Bunun ardından elde ettiğimiz *Paecilomyces lilacinus* dekstranazının ne kadar süre ile kararlılığını koruyabileceğini saptamak üzere, öncelikle 7 saat boyunca, her saat başında enzim aktivitesi ölçüldü. Bunun sonucunda, 4°C, 20°C, 30°C, 40°C’ lerde inkübe edilen enzim örneklerinde en fazla % 1’lik aktivite kaybı olduğu, 50°C’ deki örnekte ise 7.saat sonunda en fazla % 4 kayıp olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18). 60°C’ deki enzim örneği ise 1 saatin sonunda % 50’ den fazla aktivite kaybına uğradı (Şekil 4.18).

Çalışmanın bundan sonraki kısmında, enzim örneklerinin inkübasyonuna devam edilerek 8 gün boyunca, günlük enzim aktiviteleri ölçüldü. Buna göre Şekil 4.19’ da gösterildiği gibi, 8. gün sonunda, 4°C ‘de inkübe edilen örnekte ancak % 4 aktivite kaybı, 20°C ‘de inkübe edilen örnekte % 7 aktivite kaybı, 30°C ‘deki örnekte % 14 aktivite kaybı ve 40°C ‘deki örnekte % 17 aktivite kaybı olduğu saptandı. Yaptıkları bir çalışmada Madhu ve Prabhu, *Penicillium aculeatum*’ dan 40°C de 18 saat stabil kalabilen dekstranaz elde edebilmişlerdir (Madhu and Prabhu, 1984). Çalışmamızda, 50°C ‘de inkübe edilen örnekte 3. gün sonunda % 58 aktivite kaybı gerçekleşti (Şekil 4.19). Kosaric ve arkadaşlarının *Penicillium* kültürlerinden elde ettikleri dekstranazın 35°C’ de ancak 24 saat aktif olduğu, 50°C’ nin üzerinde inaktif hale geldiği bildirilmiştir (Kosaric et al., 1973). Madhu ve Prabhu bir başka çalışmalarında, enzimlerinin 50°C nin üzerinde 1 saat inkübe

edildiğinde ancak % 40 aktivitenin korunabildiğini göstermiştir (Madhu and Prabhu, 1985). Koenig ve Day, *Lypomyces starkeyi* dekstranazının 60°C’ de 5 dakika içinde inaktif hale geldiğini bildirmişlerdir (Koenig and Day, 1989). Bununla birlikte literatürde yer alan 3 ayrı çalışma sonunda, elde edilen dekstranaz enzimlerinin 50°C’ de 15 dakikanın üzerinde inkübasyonu sonunda inaktif hale geldikleri bildirilmiştir (Fukumoto et al., 1971; Hiraoka et al., 1972; Khalikova et al., 2003). Enzim aktiviteleri bizim çalışmamızda elde ettiğimiz dekstranaz aktivitesine (196.23 U/mg protein) göre zaten düşük olan bu çalışmalarda (38,2 – 107 U/mg protein arasında) stabilitenin de bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre daha az olduğu söylenebilir.

Bu sonuçlara göre çalışmamızda elde edilen dekstranaz enziminin, literatürdeki pek çok veriye göre daha kararlı olduğu ve endüstriyel süreçlerdeki kullanılabilirliği açısından, 50°C’ deki işlemlerde dahi, uygulanabilir olduğu düşünülebilir. Şekil 4.17, 4.18, 4.19’ da gösterildiği gibi, elde ettiğimiz dekstranaz enzimi, buzdolabında veya oda sıcaklığında saklanması halinde de aktivitesini uzun süre koruyabilmektedir. Enzimler protein yapısında olduklarından, çok yüksek termal kararlılık sağlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte, termostabil bakteriler olan *Thermoanaerobacter*’ lerden elde edilen dekstranazın 75°C’ de ancak 6.5 saat sonunda yarı aktivite kaybına uğradığı bildirilmiştir (Wynter et al., 1997). Ancak bu bakterilerden elde edilen dekstranazın da aktivitesi oldukça düşük olup maksimum aktivitesi 10 U/mg olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda, *Paecilomyces lilacinus* dekstranazının sıcaklık kararlılığının yanı sıra pH kararlılığı da incelendi ve sonuçlar Şekil 4.20’ de gösterildi. Buna göre, pH 4 ve pH 8 arasındaki değerlerde 2 saatlik inkübasyon sonunda enzimin aktivitesinde büyük bir değişiklik olmadığı, pH 4-4.5 değerlerinde % 86-87 aktivitenin korunduğu gözlemlendi. Bunun üzerindeki değerlerde en fazla % 4’ lük aktivite kaybı oldu. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, pH 4’ te % 55 aktivite korunurken, pH 4.5’ ta yaklaşık % 80 aktivite korunabildi. Bunun üzerindeki pH değerlerinde en fazla % 5 aktivite kaybı gözlemlendi. Buna göre enzim, bazik pH değerlerinde, asidik pH değerlerine göre daha karardır.

Konu ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde, Das ve Dutta' nın kararlılık aralığını pH 4.8-9.0 olarak (Das and Dutta, 1996), Koenig ve Day 'in pH 2.5-6.0 olarak saptadığı (Koenig and Day, 1989) görüldü. Bunların yanı sıra, Khalikova ve arkadaşları tarafından bildirilen kararlılık aralığı pH 6.5-7.8 olup, bu değerlerin dışında 15 dakika içinde enzim aktivitesini kaybetmektedir (Khalikova et al., 2003). Yine bir başka çalışmada pH kararlılık aralığı 5-5.5 olarak verilmiş, pH 7' de % 50 aktivitenin kaybedildiği bildirilmiştir (Kosaric et al., 1973). Lee ve Fox' un yaptıkları çalışmada dekstranaz enziminin pH kararlılığı 4.5' ta sabit kalırken pH 4' te sadece % 5 aktivitenin korunabilmiş olduğu, pH 6.5' ta ise % 50 aktivitenin kaldığı gösterilmiştir (Lee and Fox, 1985). Arnold ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sonunda, elde edilen dekstranazın pH 4.5-5.5 arasında kararlı olduğu, bunun üst ve alt değerlerinde aktivitenin kaybolduğu gösterilmiştir (Arnold et al., 1998). Enzim kararlılığı ile ilgili tüm bu veriler göz önüne alındığında, çalışmamız sonucunda bulduğumuz geniş pH aralığımız, değerlerin bazılarıyla uyum sağlamakla birlikte, bir çoğundan da daha geniştir. Dolayısıyla, elde ettiğimiz enzimin ticari uygulamalarda kullanılacağı göz önüne alınacak olursa, tercih edilebilir özellikte olduğu açıktır.

Paecilomyces lilacinus' tan dekstranaz eldesinde, besi ortamı optimize edilmiş ve uygun üretim ortamı saptanmıştı. Ancak bilindiği gibi pek çok endüstriyel hammaddenin işlenmesiyle birlikte, oldukça fazla miktarda artık madde ortaya çıkmakta, hatta artan miktarları olumsuz çevre şartlarının yaratılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu artık maddelerin bir anlamda geri dönüşümlerinin sağlanması amacıyla, çalışmamızda besi ortamları olarak kullanılabilirliği araştırıldı.

Çalışmada kullanılan artıklardan biri olan melas, şeker fabrikası artık maddesi olup, *Paecilomyces lilacinus*' un temel besiyeri ortamı olarak kullanıldı. Sadece melas ve sudan oluşan bu besiyerinde, sentetik ortamlara göre çok daha az enzim aktivitesi gözlemlendi. Artan melas konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinde bir miktar artış olduğu görüldü (Şekil 4.21). Ancak % 20 konsantrasyondaki melastan oluşmuş besi ortamında viskozite arttığından, kültürasyonda zorluk yaşandı. Literatüre bakıldığında melasın besi ortamı olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalara rastlandı. Bunlardan bazıları, bizim çalışmamıza

benzer olarak, ürikaz (Lotfy, 2008), glukoamilaz (Kumar and Satyanarayana, 2007), alfa amilaz (Eggleston et al., 2008) gibi çeşitli alanlarda kullanılan endüstriyel enzimlerin üretim çalışmalarıdır.

Zeytin fabrikası atığı olan pirina, bu çalışma kapsamında kullanılan diğer besi ortamıydı. Sadece pirina ve sudan oluşan besiyerinde üretilen fungusun, yine sentetik ortamlara göre çok az miktarda dekstranaz sentezleyebildiği görüldü (Şekil 4.22). Zeytin küspesi olarak da bilinen pirina; su, zeytin kabuğu, etsi kısımlar ve zeytinyağı gibi zengin içeriğinden dolayı, şekerler, proteinler, yağ asitleri, polialkoller, polifenoller ve diğer pigmentleri de yapısında bulundurması sebebiyle (Tsantila et al., 2007), bazı çalışmalarda besi ortamı olarak kullanılmıştır ve literatürde bu bakımdan yer aldığı görülmektedir (Fadiloglu et al., 2003; Haddadin et al., 2002).

Bu çalışmaların yanı sıra, bu iki endüstri atığının birleştirilmesi ile alternatif bir besi ortamı daha hazırlandı, ancak bu karışık ortamda üreyen fungusun dekstranaz sentezinde gözle görülür bir artış saptanmadı (Şekil 4.23). Bu sonuç, dekstranaz sentezi için ortamda olması gereken ve enzim üretimini indüklediği düşünülen dekstran polimerinin eksikliği ile ilişkilendirildi. Bundan yola çıkılarak melas ve pirina ortamlarına dekstran eklenerek kültürasyon gerçekleştirildi. Şekil 4.23' te enzim üretiminin pirina ve dekstran içerikli besiyerinde daha yüksek olduğu görülürken (36.18 U/ml), dekstransız pirina besiyerine göre enzim üretimi 5 kat arttı. Ancak dekstran eklenmesiyle artan enzim miktarının, yine de sentetik besiyeriyle elde edilen miktara göre düşük kaldığı saptandı. Dolayısıyla, oldukça zengin besin içeriklerine rağmen pirina ve melas artık maddelerinin dekstranaz üretimi için besi ortamı olarak kullanımlarının çok elverişli olmadığına karar verildi.

Enzimler, içinde bulundukları ortamın şartlarına göre değişik şekilde aktivite gösterebilirler. Bu durum da enzimin aktivasyonu veya inaktivasyonu şeklinde gözlenmektedir. Bu çalışmada, enzim aktivasyonu veya inhibisyonuna yol açtıkları bilinen bazı metal iyonlarının, *Paecilomyces lilacinus* dekstranazına olan etkileri incelendi. Bunun için elde edilen dekstranaz enzimine öncelikle protein çözeltilerinin konsantre edilmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan diyaliz

uygulandı. Literatüre bakıldığında, bazı araştırmacıların da dekstranaz enziminin üretildiği kültür süpernatantına diyaliz uygulayarak çalışmalarına bu şekilde devam ettikleri görüldü (Walker et al., 1980; Wynter et al., 1997). Şekil 4.25' te görüldüğü gibi, diyaliz sonunda enzimin aktivitesinin 1.7 kat arttığı saptandı. Her biri 5 mM konsantrasyondaki metal iyonlarının elde edilen bu diyalize dekstranaza etkileri araştırıldığında, CaCl_2 , AgNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NiSO_4 , CoCl_2 ve FeCl_2 ' nin enzim aktivitesine dikkate alınacak bir etki yapmadıkları görüldü. Bu maddeler aktivitenin en fazla % 4 artmasına veya azalmasına sebep oldular (Şekil 4.26). Bu konuda yapılmış aktivasyon ve inaktivasyon çalışmaları incelendiğinde, AgNO_3 ' ün çeşitli konsantrasyonlarda dekstranaz aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür (Das and Dutta, 1996; Kosaric et al., 1973; Shimizu et al., 1998; Sun et al., 1988). Bizim elde ettiğimiz enzimin AgNO_3 varlığında inaktive olmaması, enzim özellikleri açısından olumludur. CaCl_2 ' nin diğer çalışmalardaki etkisi incelendi, 1mM konsantrasyonda fazla etkisi olmadığı, ancak 13.9 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini % 48' e düşürdüğü görüldü (Hattori et al., 1981; Koenig and Day, 1989). Yapılan çalışmalarda, 6mM, 10mM, 15mM konsantrasyonlardaki $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ' nun dekstranaz aktivitelerini sırasıyla % 93.5, % 80.6, % 66' ya düşürdüğü bildirilmiştir (Koenig and Day, 1989; Kosaric et al., 1973; Madhu and Prabhu, 1984). NiSO_4 ' ün ise 6 mM konsantrasyonda % 100' lük enzim aktivitesini % 77.8' e düşürdüğü gösterilmiştir (Madhu and Prabhu, 1984). Aynı araştırmacıların dekstranaz aktivitesi, 6mM 'lık CoCl_2 ' muamelesi ile % 100' den % 61' e düşmüştür (Madhu and Prabhu, 1984). Yapılan bir başka çalışmada CoCl_2 ' nin 1.1mM konsantrasyonda bile dekstranaz aktivitesini %100' den % 60'a düşürdüğü bildirilmiştir (Koenig and Day, 1989). Ancak bunların yanı sıra bir başka kaynaktan elde edilen dekstranazın, 1mM konsantrasyondaki CoCl_2 ' den enzim aktivitesi etkilenmeden kaldığı yapılan çalışmada gösterilmiştir (Hattori et al., 1981). FeCl_2 , dekstranaz inaktivasyonu için kullanıldığında 1mM konsantrasyonda etki etmezken, 10mM konsantrasyonda enzim aktivitesini %72.6 değerine indirmiştir (Hattori et al., 1981; Kosaric et al., 1973).

Literatür sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, elde etmiş olduğumuz dekstranazın, diğer bulgularda saptanan sonuçlarla benzer düzeyde inaktive olduğu veya bu metal iyonlarına karşı daha dayanıklı olduğu görüldü. Çalışmamızda elde ettiğimiz enzime az da olsa etki eden diğer maddeler, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

ve $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ olarak saptandı ve bunların enzim aktivitesini düşük bir miktar da olsa inaktive ettiği görüldü (Şekil 4.26). Bu iyonların varlığında, diyalize enzimimizin aktivitesinde % 9-13 arasında değişen değerlerde azalma olduğu gözlemlendi. Literatüre bakıldığında, 1-6 mM'lık konsantrasyonlardaki FeSO_4 'ün 6mM ve 20mM konsantrasyonlarda ,dekstranaz aktivitesini sırasıyla % 85 ile % 42.3'e düşürerek inaktive edebildiği görüldü (Fukumoto et al., 1971; Madhu and Prabhu, 1984). BaCl_2 'nin ise 5mM, 11mM ve 20mM'lık konsantrasyonlarda, enzim aktivitesini sırasıyla % 80, % 51 ve 73'e düşürdüğü bildirilmiştir (Das and Dutta, 1996; Koenig and Day, 1989; Shimizu et al., 1998). ZnSO_4 'ün dekstranaz inaktivasyonu ile ilgili sonuçlarda da, 0.12mM, 1.24mM, 6mM, 7mM'lık konsantrasyonlarda sırasıyla % 52, % 8, % 19.4 ve % 50 enzim aktivitesi kaldığı bildirilmiştir (Arnold et al., 1998; Koenig and Day, 1989; Madhu and Prabhu, 1984). Sonuçlara göre bu 3 metal iyonunun bizim enzimimize yaptığı etki, diğer bulgularla aynı veya daha azdır.

Çalışmamızda bunlardan başka $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'nun enzim aktivitesini yaklaşık olarak % 54'e düşürdüğü, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'nin % 67'ye ve CdCl_2 'nin de % 76'ya düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.26). İncelenen bazı yayınlarda, 0.1 ve 6mM arasında değişen konsantrasyonlarda CuSO_4 'ün aktiviteyi tamamen yok ettiği bildirilirken (Hattori et al., 1981; Koenig and Day, 1989; Madhu and Prabhu, 1984; Madhu and Prabhu, 1985), Shimizu ve arkadaşları, 5mM konsantrasyonda % 30 aktivite kaldığını bildirmişlerdir (Shimizu et al., 1998). Das ve Dutta'nın yayınladığı sonuçlara göre ise 20mM konsantrasyonda dahi % 77'ye düştüğü bildirilmiştir (Das and Dutta, 1996). Bundan başka, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'nin 1 mM'lık düşük konsantrasyonunun enzime etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Hattori et al., 1981). CdCl_2 de bizim çalışmamızda enzim aktivitesini inhibe eden maddelerden biridir. Bununla ilgi olarak Koenig ve Day, yaptıkları çalışmada CdCl_2 'nin 1.39mM konsantrasyonunda dahi enzim aktivitesinin % 20'ye düştüğünü göstermişlerdir (Koenig and Day, 1989). Bu bulgularla birlikte, enzime en fazla etkiyi yapan metal iyonunun, enzim aktivitesini neredeyse 0'a indiren HgCl_2 olduğu bulundu. Literatür araştırması sonucunda, bulunan bütün yayınlarda aktiviteyi neredeyse tamamen yok eden benzer sonuçların alındığı görüldü (Das and Dutta, 1996; Fukumoto et al., 1971; Hattori et al., 1981; Hiraoka et al., 1972; Koenig and Day,

1989; Kosaric et al., 1973; Madhu and Prabhu, 1984; Madhu and Prabhu, 1985; Shimizu et al., 1998; Sun et al., 1988).

Bu sonuçların ışığında, *Paecilomyces lilacinus*' tan elde ettiğimiz diyaliz edilmiş dekstranazın, sadece HgCl₂ ile muamele edildiğinde aktivitesini tamamen kaybettiği söylenebilir. Bunun yanı sıra aktivitenin, CuSO₄ varlığında aktivite yitimi olarak kabul edilen % 50' ye tam olarak inmemiş olsa da, % 54' indiği, bunun dışındaki hiçbir madde ile aktivitesini kaybetmediği gösterildi (Şekil 4.26). Dolayısıyla enzim aktivitesinin çeşitli durumlarda kimyasallar ve metal iyonlarıyla muameleleri sonucu kolayca yitirilmemesi önemli bir özellik olup, elde etmiş olduğumuz dekstranaz enziminin diğer enzimlere kıyasla daha tercih edilebilir bir formda olduğu açıktır.

Çeşitli biyoteknolojik işlemlerde, mikrobiyal ürünlerin değişik matrikslere immobilize edilen mikrobiyal hücrelerden eldesi, yıllardır bilinmekte ve uygulanmaktadır. Endüstriyel enzimler söz konusu olduğunda, enzimlerin immobilize edilmesi mümkün olduğu gibi, mikroorganizmal hücrelerin immobilizasyonu ile enzim elde edilmesi de, uygulanmakta olan biyoteknolojik işlemler arasında yer almaktadır. Hücre immobilizasyonu ile sağlanabilen kitle transferi, ürünün hücreden kolayca ayrılabilmesi, ürün veriminin artırılması ve hücrelerin tekrar kullanımının sağlanması, maliyetin düşürülebilmesi ve işlemin tercih edilmesini sağlamaktadır. Özellikle son yıllarda, enzim üretimiyle ilgili immobilize mikrobiyal hücrelerin kullanıldığı çok sayıda çalışma yapıldığı bildirilmiştir (Akacha et al., 2007; Anisha and Prema, 2008; Burhan et al., 2007; Kapoor et al., 2008; Krastanov et al., 2006; Tamalampudi et al., 2008). Biz de çalışmamızın bu kısmında, *Paecilomyces lilacinus*' tan dekstranaz elde etmek üzere fungus hücrelerini çeşitli matrikslere immobilize etme yollarını araştırdık. Bu çalışmada taşıyıcı matriks olarak agar, kalsiyum alginat ve poliüretan sünger kullanıldı. Literatüre baktığımızda, bu materyallerin sıklıkla kullanılan immobilizasyon matriksleri olduğu görüldü (Akhtar et al., 2008; Aleksieva et al., 2003; Anisha and Prema, 2008; Dobрева et al., 1996; Karakoç, 2004; Kumar and Satyanarayana, 2006; Parameswarappa et al., 2008; Zhang et al., 2007).

Çalışmanın bu aşamasında öncelikle serbest hücre ile immobilize haldeki hücrelerin enzim aktiviteleri karşılaştırıldı ve Şekil 4.27' de gösterildi. Buna göre, kontrol olarak kullanılan serbest hücreler ile agar ve kalsiyum alginata immobilize haldeki hücreler arasında çok önemli bir aktivite farkı gözlenmedi. Buna karşılık, poliüretan süngere immobilize edilen hücrelerle gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında alınan sonuçta, serbest hücreye göre yaklaşık % 20 daha düşük enzim üretimi olduğu saptandı. Hemachander ve arkadaşları, agar ve alginata immobilize hücrelerle gerçekleştirdikleri lipaz üretimi çalışmasında, agara immobilize hücrelerle üretimin oldukça düşük gözlendiğini belirtmişlerdir (Hemachander et al., 2001). Bizim çalışmamızda kalsiyum alginata immobilize hücrelerin 6 döngü sonunda yaklaşık % 100' lük aktivitesini korurken, agara immobilize hücrelerle üretimde az da olsa bir aktivite kaybı gözlendi (Şekil 4.27). Parameswarappa ve arkadaşları, kalsiyum alginatın, agara göre daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir (Parameswarappa et al., 2008). Bu çalışmaya göre, kalsiyum alginata tutuklanmış hücrelerin boncuk stabilitesi, agara kıyaslandığında daha iyidir. Kalsiyum alginata immobilize haldeki hücrelerin stabilite ve işlevi, agara immobilize hücrelere kıyasla yaklaşık 1.2 kat daha fazladır. Dolayısıyla bu bulgular, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Nighojkar ve arkadaşları, poligalakturonaz üretiminde kalsiyum alginatı immobilizasyon matriksi olarak kullanmışlar ve serbest hücreye göre daha yüksek enzim aktivitesi elde etmişlerdir. Ancak bu çalışmada 6 döngü boyunca kullanılan kalsiyum alginat boncukları, giderek azalan bir aktivite eğrisi göstermiştir (Nighojkar et al., 2006). *Aspergillus niger* ile lipaz eldesinde alginatı immobilizasyon matriksi olarak kullanan Ellaiah ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* hücrelerini karragenan, poliakrilamid ve alginata immobilize ederek lipaz enziminin üretimini hedeflemişler ve en iyi aktiviteyi alginata tutuklanan hücreler ile elde etmişlerdir. Bununla birlikte, alginat boncuklarının 4 döngüde kullanımlarında azalan bir aktivite eğrisi gözlemişlerdir (Ellaiah et al., 2004). Buna karşın bizim kalsiyum alginata tutuklu hücrelerimiz, 6. döngüde aktivitelerini korumuşlardır (Şekil 4.29). Sonuçlarımızın bu çalışmalara göre daha başarılı olduğu açıktır.

Çalışmamızda poliüretan sünger parçalarının 6 döngü boyunca kullanılması sonucunda, immobilize hücrelerin aktivitesi, artan hücre kitlesi ve yaş ağırlık ile birlikte 4. döngüye kadar artarak % 162' lik bir değere ulaştı. Bunun ardından 6. döngü sonunda % 130' luk değere geriledi (Şekil 4.30). Poliüretan süngerde dördüncü döngüden sonra aktivitenin azalması, immobilize edilen sünger parçasında oluşmaya başlayan yoğunluktan kaynaklanıyor olabilir. Bu yoğunlaşma, süngerin küp şeklinden, daha küçük bir küre formuna dönüşmesi ile de gözlemlendi (Şekil 3.10). Ayrıca elektron mikroskobu ile yapılan görüntüleme sonrasında da, boş poliüretan sünger ile hücrelerin tutuklandığı ve 6 döngü gerçekleştirilen poliüretan sünger arasındaki görüntü ve dolayısıyla oluşan yoğunluk farkı, çeşitli açılarda ve büyütme ölçeklerinde gösterilmektedir (Şekil 3.12-a,b; Şekil 3.13-a,b; Şekil 3.14-a,b; Şekil 3.15-a,b). Bu yoğunluk, oksijen ve besin transferini azaltmış olabileceğinden, enzim aktivitesinde düşüş olmuştur. Fumarik asit eldesi için yapılmış olan bir immobilizasyon çalışmasında, poliüretan süngere tutuklanmış *Rhizopus arrhizus* hücreleri ile en yüksek verim 2. döngüde alınmakla birlikte, 8 döngü boyunca ürün eldesi sağlanmıştır (Petrucchioli et al., 1996). Bizim çalışmamıza benzer şekilde *Humicola lutea* ile asit proteinaz eldesi çalışan Aleksieva ve Tchobanov, poliüretan süngere immobilize ettikleri hücreler ile en iyi enzim aktivitesini 2 ve 4. döngüler arasında aldıklarını, 6 ile 9 döngüden sonra aktivitenin çok azaldığını göstermişlerdir (Aleksieva and Tchobanov, 1990). Yine aynı araştırmacılar, poliüretan süngere immobilize hücrelerle ilk döngüde elde ettikleri aktivitenin, serbest hücrelerle elde edilenin ancak % 80' i olduğu belirtmişlerdir.

Kapoor ve arkadaşlarının çalışmasında, ksilanaz üretimi için *Bacillus pumilus* hücreleri süngere tutuklanmış ve bu hücrelerle yapılan üretimde % 38 lik enzim artışı görülmüştür (Kapoor et al., 2008). Ancak bunun yanında 8 döngüde üretim sonunda aktivite % 62.5 düşmüştür. Poliüretan süngerin immobilizasyon materyali olarak kullanıldığı ve tutuklanmış *Humicola lutea* hücrelerinden asit fosfataz üretiminin optimizasyonu yapılan bir çalışmada, sünger parçalarına immobilize hücrelerin 3. döngüdeki kullanımlarında, serbest hücrelere kıyasla % 200 fazla enzim aktivitesi elde edildiği bildirilmiştir (Aleksieva et al., 2003). Bu da bizim çalışmamızda elde ettiğimiz % 162' lik aktivite artışına benzer bir durum olarak değerlendirilebilir (Şekil 4.30). Bu çalışmadaki sonuçların optimize edilmiş

koşullar altında elde edildiği göz önüne alınacak olursa, bizim sonuçlarımızın da çeşitli optimizasyonlar sonucunda bu değerlere, hatta daha üzerine çıkabilmesi mümkün olabilir.

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında bizim kullandığımız taşıyıcı matriksler dışında değişik materyaller de kullanılmıştır. *Aspergillus oryzae* ile yapılan bir çalışmada, üretilen B-galaktosidaz immobilize edilmiş ve immobilizasyon matriksleri arasından seçilen kitosan ile gerçekleştirilen immobilizasyon sonrasında serbest enzimin ancak % 18.4' ü kadar enzim aktivitesi elde edilebilmiştir. Immobilize enzimin tekrar kullanımına bakıldığında ise 4. döngüde enzim aktivitesinin %20' lik kayba uğradığı görülmüştür (Gaur et al., 2006). Bu sonuç, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz aktivite değerlerinin çok altındadır.

Hücre tutuklanması ve bununla birlikte gelişen yüzey kolonizasyonu, doğal ve endüstriyel habitatlarda meydana gelen önemli bir olaydır. Immobilize hücre sistemi, devamlı olabilmesi açısından ve uzun süre canlılığını koruyabildiği için, çeşitli endüstriyel uygulamalarda serbest hücrelere alternatif olarak kullanılabilir. Serbest hücrelerle yapılan inkübasyonla kıyaslandığında, poliüretan süngere immobilize hücrelerin daha uzun sürede maksimum enzim aktivitesini göstermeleri, immobilize hücrelere oksijen ve besin girişinin daha kısıtlı olması ile açıklanabilir.

İmmobilize hücrelerle dekstranaz eldesinin endüstriyel olarak üretiminin yapılabilmesi için maliyet araştırmaları, bazı mühendislik konuların çözülmesi, hücrelerin fizyolojik ve metabolik değişikliklerinin saptanması, taşıyıcı matriksin maliyet hesabının yapılması gerekmektedir. Taşıyıcı matriks, uygulamaların genel olarak maliyet hesabının çıkarılmasında en önemli faktördür. Dolayısıyla çalışmamızda kullandığımız uygun fiyatlı matrikslerin endüstriyel kullanımları mümkün olabilir. Immobilize hücrelerin fizyolojisinin ve immobilizasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasıyla, ucuz matrikslerin endüstriyel kullanıma taşınmasıyla, bu teknolojinin çok daha iyi gelişmesi mümkün olabilir.

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar incelendiğinde, dekstranaz enziminin immobilize edilmiş fungus hücreleri ile üretimine rastlanmadı. Ancak bunun

yanında dekstranaz enziminin çeşitli matrikslere immobilize edildiği çalışmalar bulundu (Abdel-Naby et al., 1999; Aslan and Tanrıseven, 2007; Madhu and Prabhu, 1985; Rogalski et al., 1998). Madhu ve Prabhu, yaptıkları çalışmada, *Penicillium aculeatum* dekstranazını bentonit materyaline immobilize etmişler ve serbest enzimle yaklaşık olarak aynı aktiviteyi elde etmişlerdir (Madhu and Prabhu, 1985). Bu çalışmalardan *Penicillium lilacinum*' dan üretilmiş dekstranazın Eupergit C materyaline immobilize edilmesi, %90 enzim aktivitesi ile sonuçlanmıştır ve immobilize enzim aktivitesini 20 gün koruyabilmektedir (Aslan and Tanrıseven, 2007). Abdel-Naby ve arkadaşları ise, değişik immobilizasyon yöntemleri ile farklı materyallere immobilize ettikleri *Penicillium funiculosum* dekstranazı ile yaptıkları çalışmada en iyi sonucu elde ettikleri kitosan materyali ve kovalent bağlama yöntemi ile, immobilize dekstranazın serbest enzime göre % 37 daha düşük enzim aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir (Abdel-Naby et al., 1999). Bu sonuçlar dahilinde, dekstranaz enziminin immobilize edilmesinin, az veya çok da olsa değişen oranlarda aktivite kaybına uğradığını söyleyebiliriz. Dolayısıyla enzimin immobilizasyonundan ziyade, enzimi üretecek mikroorganizma hücrelerinin immobilizasyonu daha avantajlı görünmektedir. Bizim sonuçlarımız değerlendirildiğinde, poliüretan süngere tutuklanmış *Paecilomyces lilacinus* hücreleri ile elde edilen aktivitenin 4. döngüde %180 değere ulaşması, agar ve kalsiyum alginata tutuklanmış hücrelerin ise ilk döngülerinden itibaren serbest hücre ile yaklaşık aynı hatta daha yüksek aktiviteye sahip olması, hücrelerin tutuklanarak enzim üretimi yapılmasının, enzim tutuklamasına bir alternatif olabileceği görüşünü desteklemektedir. Mikroorganizma hücrelerinin tutuklanması ile yapılan dekstranaz üretimine dair başka bir çalışma literatürde yer almadığından, çalışmamızın bu konuda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulguların ışığı altında, topraktan izole edilmiş ve identifikasyonu yapılmış olan *Paecilomyces lilacinus*' un literatür verileri ile karşılaştırıldığında iyi bir dekstranaz kaynağı olduğu saptandı. Bu fungustan dekstranaz üretiminde, üretim ortamında çeşitli unsurların ne kadar etkili olduğu belirlendi. Bunlar; başlangıçtaki pH derecesi, besiyerine inoküle edilen fungus sporu konsantrasyonu, inkübasyon süresi ile üretim esnasında fungusun maruz kaldığı sıcaklık ile çalkalama koşullarıdır. Kullanılan besiyerinin içeriğine göre de

Üretilen enzim miktarı değişmekte olup, farklı karbon, azot kaynakları ile bunların konsantrasyonları üretimi etkilemektedir. Dekstran, enzimin retilibilmesi için kullanılması gerekli tek karbon kaynağı olmakla birlikte, azot kaynağında böyle bir kısıtlama yoktur. Bunun yanı sıra enzim elde edildikten sonra yapılan çalışmalarda da enzim aktivitesini belirleyen parametreler olarak, inkübasyon süresi, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonunun etkileri incelendi ve bulgular kısmında gösterildi. Enzimin kararlılık koşulları da araştırıldı, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde oldukça dayanıklı olduğu bulundu. Bazı iyonların enzim aktivitesine olan etkileri incelendi, enzimi inaktive eden az sayıdaki ajan saptandı. Bunların yanı sıra enzim eldesi, tutuklanmış mikroorganizma ile gerçekleştirildi, bazı tutuklama matrikslerinin kullanılabilirliği araştırıldı. Enzim eldesi basit ve ekonomik bir yöntemle gerçekleştirildi. Konu ile ilgili sürdürülecek olan çalışmalar bu doğrultuda yoğunlaştırılacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.S., Abdel-Fattah, A.M., Abdel-Fattah, A.M., 1999, Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase, *Process Biochemistry*, 34, 391-398.
- Adamczak, M., Bednarski, W., 2000, Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*, *Biotechnology Letters*, 22, 313-316.
- Akacha, N.B., Zehlila, A., Mejri, S., Jerbi, T., Gargouri, M., in press, Effect of gamma-ray on activity and stability of alcohol-dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical Engineering Journal*, Corrected Proof, Available online 23 December 2007.(www.elsevier.com/locate/bej).
- Akhtar, N., Iqbal, M., Zafar, S.I., Iqbal, J., 2008, Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr(III), *Journal of Environmental Sciences*, 20 :2, 231-239.
- Aleksieva, P., Tchorbanov, B., 1990, Production of acid proteinases by *Humicola lutea* mycelium immobilized in polyurethane sponge, *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 994- 996.
- Aleksieva, P., Tchorbanov, B., Michailova, L., Nacheva, L., 2003, Improvement of acid phosphatase production by immobilization of *Humicola lutea* mycelium in polyurethane sponge, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 247, 247-253.
- Anisha, G.S., Prema, P., 2008, Cell immobilization technique for the enhanced production of α -galactosidase by *Streptomyces griseolalbus*, *Bioresource Technology*, 99: 9, 3325-3330.

- Arino, S., Marchal, R., Vandecasteele, J.P., 1996, Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 162-168.
- Arnold, W.N., Nguyen, T.B.P., Mann, L.C., 1998, Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenkii*, *Archives of Microbiology*, 170, 91-98.
- Aslan, Y., Tanrıseven, A., 2007, Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran, *Biochemical Engineering Journal*, 34, 8-12.
- Beilen, J.B., Li, Z., 2002, Enzyme technology: an overview, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 338–344.
- Beldarrain, A, Acosta, N., Betancourt, L., Gonzales, L.J., Pons, T., 2003, Enzymic, spectroscopic and colorimetric studies of a recombinant dextranase expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38, 211-221.
- Bourne, E.J., Hutson, D.H., Weigel, H., 1962, Studies on dextrans and dextranases: The action of mould dextranases on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis, *Biochemical Journal*, 85, 158-163.
- Burhan, N., Sapundzhiev, T., Beschkov, V., 2007, Mathematical modelling of cyclodextrin-glucano-transferase production by immobilised cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 at batch cultivation, *Biochemical Engineering Journal*, 35: 2, 114-119.
- Cansunar, E., 1979, Diş plaklarının yapısına giren dekstran ve α -1,3 glukanın mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerle hidrolizi, Hacettepe Üniversitesi Doktora Tezi, Ankara.

- Caprette, D., 2006, <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cell counting.html>
- Chaplin, M.F., Bucke, C., 1990, Enzyme technology, Cambridge University Press, Cambridge, p. 156-157.
- Cheng, X, Sun, J., Yang, J., Chen, J., Zhang, S, 1992, Conditions for dextranase formation by *Paecilomyces lilacinus*, Wei Sheng Wu Xue Bao, 32: 5, 334-339.
- Cherry, J.R., Fidantsef, A.L., 2003, Directed evolution of industrial enzymes: an update, Current Opinion in Biotechnology, 14, 438-443.
- Clarke, M.A., Edye, L., Cole, F., Kitchar, 1997, Sugarcane factory trials with dextranase enzyme, Sugar Journal, 60, 20-22.
- Colby, S. M., Russell, R.R.B., 1997, Sugar metabolism by mutants streptococci, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 83, 80-88.
- Cuddihy, J.A., Rauh, J.S., Mendez, F., Bernhard, C., 1999, Dextranase in sugar production: factory experience, <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf>.
- Cuddihy, J.A., Porro, M.E., Rauh, J.S., 2000, The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects, <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf>.
- Dahiya, J., Singh, D., Nigam, P., 2001, Decolourisation of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilized on porous cellulose carrier, Bioresource Technology, 78, Issue 1, 111-114.

- Das, D.A., Dutta, S.K., 1996, Purification, biochemical characterization and mode of action of an extracellular endo - dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 28, 107-113.
- Dextran fractions, 2001, Amersham Biosciences, 18-1153-41 AA, 1-6.
- Dobreva, E., Ivanova, V., Tonkova, A., Radulova, E., 1996, Influence of the immobilization conditions on the efficiency of α -amylase production by *Bacillus licheniformis*, Process Biochemistry, 31:3, 229-234.
- Dragan-Bularda, M., Kiss, S., 1972, Dextranase activity in soil, Soil Biology and Biochemistry, 4, 413-416.
- Eggleston, G., Monge, A., 2004, Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases, Process Biochemistry, 40(5):1881-1894.
- Eggleston, G., Montes, B., Monge, A., Guidry, D., 2008, Optimization of α -amylase application in raw sugar manufacture Part 1: Characterization of commercial α -amylases, International Sugar Journal, 110: 1310, 97-104.
- Eifuku, H., Yoshimitsu-Narita, A., Sato, S., Yakushiji, T., Inoue, M., 1989, Production and partial characterization of the extracellular polysaccharides from oral *Streptococcus salivarius*, Carbohydrate Research, 194:247-260.
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Thaer Taleb, A., Adinarayana, K., 2004, Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*, Process Biochemistry, 39: 5, 525-528.
- Fadiloglu, S., Ciftci, O.N., Gogus, F., 2003, Reduction of free fatty acid content of olive-pomace oil by enzymatic glycerolysis, Food Science and Technology International, 9: 1, 11-15.

- Finnegan, P.M., Brumbley, S.M., O'Shea, M.G., Nevalainen, K.M.H., Bergquist, P.L., 2004, *Paenibacillus* isolates possess diverse dextran-degrading enzymes, *Journal of Applied Microbiology*, 97: 3, 477-485.
- Fukumoto, J, Tsuji, h., Tsuru, D., 1971, Studies on mold dextranases 1. *Penicillium luteum* dextranase: Its production and some enzymatic properties, *Journal of Biochemistry*, 69, 1113-1121.
- Galvez-Mariscal, A., Lopez-Munguia, A., 1991, Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 327-331.
- Garcia, B., Rodriguez, E., 2000, Carbon source regulation of a dextranase gene from the filamentous *Penicillium minioluteum*. *Current Genetics*, 37: 396-402.
- Gaur, H., Pant, H., Jain, R., Khare, S.K., 2006, Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase, *Food Chemistry*, 97: 3, 426-430.
- Goldstein-Lifschitz, B., Bauer, S., 1976, Comparison of dextranases for their possible use in eliminating dental plaque, *Journal of Dental Research*, 55, 886-892.
- Gözükara, M., 1994, *Enzimler, Biyokimya, Evin Matbaası, Malatya*.
- Haddadin, M. S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S., Robinson, R. K., 2002, Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete, *Bioresource Technology*, 82: 2, 131-137.
- Haddar, H.O., Aziz, G.M., Al-Gelawi, M.H., 2007, Optimization of bacitracin production by *Bacillus licheniformis* B5, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 6, 972-976.

- Hamada, S., Slade, H.D., 1980, Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, Microbiological Reviews, 44, 331-384.
- Harboe, E., Larsen, C., Johansen, M., Olesen, H.P., 1989, Macromolecular prodrugs 14. Absorption characteristics of naproxen after oral administration of a dextran T-70- naproxen ester prodrugs in pigs, International Journal of Pharmaceutics, 53, 157-165.
- Hattori, A., Ishibashi, K., 1981, Screening of dextranase producing microorganisms, Agricultural Biology and Chemistry, 45, 2347-2349.
- Hattori, A., Ishibashi, K., Sadamasa, M., 1981, The purification of dextranase of *Chaetomium gracile*. Agricultural Biology and Chemistry, 45, 2409-2416.
- Hemachander, C., Bose, N., Puvanakrishnan, R., 2001, Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production, Process Biochemistry, 36: 7, 629-633.
- Henrissat, B., Davies, G.J., 2000, Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics, Plant Physiology, 124, 1515-1519.
- Henrissat, B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochemical Journal, 280, 309-316.
- Heyn, A.N.J., 1970, Dextranase activity and auxin-induced cell elongation in coleoptiles of *Avena*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 38, 831-837.
- Hiraoka, N., Fukumoto, J., Tsuru, D., 1972, Studies on mold dextranases: 3. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase, Journal of Biochemistry, 71:1, 57-64.

<http://www.dex.co.uk>.

http://www.dextran.dk/deae_index.htm.

<http://www.herseyinbasisaglik.com/tr/mayoclinic/hastalik.asp?sid=198&tid=1787>.

<http://www.rcub.bg.ac.yu/~todorom/tutorials/rad15.html>.

<http://www.sanayi.gov.tr/webedit/gozlem.aspx?sayfano=1215>.

<http://www.scientificpsychic.com>.

<http://www.zae.gov.tr/zeytinyagi/7.asp>.

Hutson, D.H., Weigel, H., 1963, Studies on dextrans and dextranases. Mechanism of the actions of intra- and extracellular mould dextranases, Biochemical Journal, 88, 588-591.

Igarashi, T., Morisaki, H., Yamamoto, A., Goto, N., 2002, An essential amino acid residue for catalytic activity of the dextranase of *Streptococcus mutans*, Oral Microbiology and Immunology, 17, 193-196.

Ingelman, B., 1948, Enzymatic breakdown of dextran, Acta Chemica Scandinavica, 2, 803-812.

Kahyaoğlu, M., Konar, V., 2006, Şeker fabrikası atık maddeleri kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*' dan rhamnolipid biyosüpfektanı elde edilmesi, Science and Engineering Journal of Fırat University, 18, 493-498.

Kapoor, M., Nair, L.M., Kuhad, R.C., 2008, Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*, Biochemical Engineering Journal, 38: 1, 88-97.

- Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R., 1985, The immobilization of whole cells: Engineering principles, *Chemical Engineering Science*, 40: 8, 1321-1354.
- Karakoç, Ş.B., 2004, Bazı matrikslere tutuklanmış *Aspergillus niger*' den gibberelik asit üretimi, Hacettepe Üniversitesi Doktora Tezi, Ankara.
- Khalikova, E., Susi, P., Usanov, N., Korpela, T., 2003, Purification and properties of extracellular dextranase from a *Bacillus* sp., *Journal of Chromatography B*, 796, 315-326.
- Khalikova, E., Susi, P., Korpela, T., 2005, Microbial dextran hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69: 2, 306-325.
- Kim, D., Robyt, J.F., 1995, Dextranase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B -1299, *Enzyme and Microbial Technology*. 17, 1050-1056.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002, Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.
- Koenig, D.W., Day, F., 1988, Production of dextranase by a *Lipomyces starkeyi*. *Biotechnology Letters*, 10, 117-122.
- Koenig, D.W., Day, F., 1989, The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*, *European Journal of Biochemistry*, 183, 161-167.
- Kosaric, N., Yu, K., Zajic, J.E., 1973, Dextranase production from *Penicillium funiculosum*, *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 729-741.

- Kosmala, J.D., Henthorn, D.B, Brannon-Peppas, L., 2000, Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials, *Biomaterials*, 21, 2019-2023.
- Krastanov, A., Blazheva, D., Yanakieva, I., Kratchanova, M., 2006, Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 6, 1306-1312.
- Kumar, P., Satyanarayana, T., 2006, Production of thermostable and neutral glucoamylase using immobilized *Thermomucor indicae-seudaticae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 4, 509-517.
- Kumar, P., Satyanarayana, T., 2007, Economical glucoamylase production by alginate-immobilized *Thermomucor indicae-seudaticae* in cane molasses medium, *Letters in Applied Microbiology*, 45, 392–397.
- Leblebici, F., 1999, Türkiye’ de şeker pancarı fabrikasyonunda dekstranaz kullanımı için optimum koşulların saptanması ve dekstranazın immobilizasyon olanaklarının araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Doktora Tezi, Ankara.
- Lee, J.M., Fox, P.F., 1985, Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase, *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 573-577.
- Lotfy, W. A., 2008, Production of a thermostable uricase by a novel *Bacillus thermocatenulatus* strain, *Bioresource Technology*, 99: 4, 699-702.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J., 1951, Protein measurement with the folin reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 19, 265-275.
- Madhu, Prabhu, K.A., 1984, Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 217-220.

- Madhu, G.L., Shukla, Prabhu, K.A., 1984, Application of dextranase in the removal of dextran from cane juice, *International Sugar Journal*, 86: 1025, 136-138.
- Madhu, Prabhu, K.A., 1985, Immobilization of dextranase on bentonite, *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 279-282.
- Marotta, M., Martino, A., De Rosa, A., Farina, E., Carteni, M., De Rosa, M., 2002, Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes, *Process Biochemistry*, 38, 101-108.
- Marsh, P.D., Bradshaw, D.J., 1995, Dental plaque as a biofilm, *Journal of Industrial Microbiology*, 15:3,169- 175.
- McLeod, A.D., Tolentino, L., Tozer, T.N., 1994, Glucocorticoid-dextran conjugates as potential prodrugs for colon specific delivery:steady state pharmacokinetics in the rat, *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 15, 151-161.
- Mehvar, R., 2000, Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents, *Journal of Controlled Release*, 69, 1-25.
- Meyvis, T., De Smedt, S., Stubbe, B., Hennink, W., Demeester, J., 2001, On the release of proteins from degrading dextran methacrylate hydrogels and the correlation with the rheologic properties of the hydrogels, *Pharmaceutical Research*, 18: 11, 1593-1599.
- Mghir, A.S., Cremieux, A.C., Jambou, R., Muffat-Jolly, M., Pocidalo, J.J., Carbon, C., 1994, Dextranase enhances antibiotic efficacy in experimental viridans streptococcal endocarditis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 953- 958.
- Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

- Misaki, A., Torii, M., Sawai, T., Goldstein, I.J., 1980, Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides*, Carbohydrate Research, 84, 273-285.
- Mitsuishi, Y., Kobayashi, M., Matsuda, K., 1979, Dextran α -1,2 debranching enzyme from *Flavobacterium* sp. M-73: its production and purification, Agricultural Biology and Chemistry, 43, 2283-2290.
- Najafpour, G.D., Shan, C.P., 2003, Enzymatic hydrolysis of molasses, Bioresource Technology, 86, Issue 1, 91-94.
- Nighojkar, S., Phanse, Y., Sinha, D., Nighojkar, A., Kumar, A., 2006, Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer, Process Biochemistry, 41: 5, 1136-1140.
- Parameswarappa, S., Karigar, C., Nagenahalli, M., 2008, Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2, Biodegradation, 19: 1, 137-144.
- Pelenc, V., Lopez-Munguia, C.A., Remaud, M., Biton, J., Michel, J.M., Paul, F., Monsan, P., 1991, Enzymatic synthesis of oligoalternans. Sciences Des Aliments, 11, 465-476.
- Petrucchioli, M., Angiani, E., Federici, F., 1996, Semi-continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polyurethane sponge, Process Biochemistry, 31: 5, 463-469.
- Pleszczynska, M., Szczodrak, J., Rogalski, J., Fiedurek, J., 1997, Hydrolysis of dextran by *Penicillium notatum* dextranase and identification of final digestion products, Mycological Research, 101: 1, 69-72.
- Preobrazhenskaya, M. E., Minakova, A.L., Rozenfel'd, E.L., 1974, Studies on the dextranase activity of pig-spleen acid α -d-glucosidase, Carbohydrate Research, 38, 267-277.

- Pulliam, L., Dall, L., Inokuchi, S., Wilson, W., Hadley, K., Mills, J., 1985, Effects of exopolysaccharide production by viridans streptococci on penicillin therapy of experimental endocarditis, *Journal of Infectious Diseases*, 151, 153-156.
- Ramakrishna, S.V., Prakasham, R.S., 1999, Microbial fermentations with immobilized cells, *Current Science*, 77, 87-100.
- Rogalski, J., Szczodrak, J., Pleszczynska, M., Fiedurek, J., 1997, Immobilization and kinetics of *Penicillium notatum* dextranase on controlled porous glass, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3, 271-283.
- Safarik, I., 1990, Rapid detection of dextranases in liquid samples, *Biomedica Biochimica Acta*, 49 :7, 625-628.
- Santos, M., Teixeira, J., Rodrigues, A., 2000, Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512, *Biochemical Engineering Journal*, 4, 177-188.
- Sawai, T., Toriyama, K., Yano, K., 1974, A Bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans, *Journal of Biochemistry*, 75, 105-112.
- Scientific committee on food, 2000, Opinion of the scientific committee on food on a dextran preparation, produced using *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp., as a novel food ingredient in bakery products, <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out75en.pdf>.
- Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M., Okada, G., 1998, Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endodextranase from a *Fusarium* sp., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62: 1, 117-122.
- Shukla, G.L., Madhu, Prabhu, K.A., 1989, Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 533-536.

- Sidebotham, R. L. 1974. Dextran, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 30:371-444.
- Simonson, L.G., Liberta, A.E., Richardson, A., 1975, Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*, *Applied Microbiology*, 30: 5, 855-861.
- Sims, I.M., Thomson, A., Hubl, U., Larasen, N.G., Furneaux, R.H., 2001, Characterization of polysaccharides synthesized by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943, *Carbohydrate Polymers*, 45, 285-292.
- Sinha, V.R., Kumria, R., 2001, Polysaccharides in colon-specific drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 19-38.
- Skowronek, M., Fiedurek, J., 2006, Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*, *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 1-2, 162-167.
- Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., 1990, Alginate as immobilization matrix for cells, *Trends in Biotechnology*, 8 (3), 71-78.
- Smiley, K.L., Boundy, J.A., Hensley, D.E., 1982, Action patterns of immobilized dextranase, *Carbohydrate Research*, 104, 319-324.
- Sumner, C., Krause, S., Sabot, A., Turner, K., McNeil, C.J., 2001, Biosensor based on enzyme-catalysed degradation of thin polymer films, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 709-714.
- Sun, J., Cheng, X., Zhang, Y., Yan, Z., Zhang, S., 1988, A strain of *Paecilomyces lilacinus* producing high quality dextranase, *Annals New York Academy of Sciences*, 542, 192-194.

- Takayanagi, T., Kimura, A., Matsui, H., Okada, G., Chiba, S., 2001, Evidence for a single active site on isomalto-dextranase with hydrolysis activities of α -exodextran-and α -1,4-glucosidic linkages, *Journal of Applied Glycoscience*, 48, 55-61.
- Tamalampudi, S., Talukder, M.R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., Fukuda, H., 2008, Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst, *Biochemical Engineering Journal*, 39: 1, 185-189.
- Topal, A., 2007, www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/ders_notlari/a_topal.
- Tsantila, N., Karantonis, H.C., Perrea, D.N., Theocharis, S.E., Iliopoulos, D.G., Antonopoulou, S., Demopoulos, C.A., 2007, Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits, *Mediators of Inflammation*, Article Number: 36204.
- Tsuchiya, H.M., Jeanes, A., Bricker, H.M., Wilham, C.A., 1952, Dextran degrading enzymes from molds, *Journal of Bacteriology*, 64, 513-519.
- Tsuru, D., Hiraoka, N., Hirose, T., Fukumoto, J., 1971, Studies on mold dextranases 3. Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*, *Agricultural Biology and Chemistry*, 35. 11, 1727-1732.
- Vyavahare, N., Kohn, J., 1994, Photocrosslinked hydrogels based on copolymers of polyethylene glykol and lysine, *Journal of Polymer Science*, 32, 1271-1281.
- Walker, G.J., 1978, Dextran, *International Review of Biochemistry*, 16, 75-126.
- Walker, G.J., Murray, V.L., Morrey-Jones, J.G., 1980, Regulation of dextranase synthesis by *Streptococcus mutans*, *Febs Letters*, 115: 2, 206-208.

- Walker, G.J., Pulkownik, A., Morrey-Jones, J.G., 1981, Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*, Journal of General Microbiology, 127, 201-208.
- Walter, H., Brooks, D.E., Fischer, D., 1985, Partitioning in aqueous two-phase systems- Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology, Academic Press, New York.
- Webb, C., Dervakos, G.A., 1996, Viable cell immobilization. Studies in Viable cell immobilization. Webb, C., Dervakos, G.A. (eds.), Academic Press, Texas, USA.
- Wynter, C.V.A., Chang, M., De Jersey, J., Patel, B., Inkerman, P.A., Hamilton, S., 1997, Isolation and characterization of a thermostable dextranase, Enzyme and Microbial Technology, 20, 242-247.
- Zhang, Z.Y., Jin, B., Kelly, J.M., 2007, Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi, Biochemical Engineering Journal, 35 :3, 251-263.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Tuğba SUBAŞIOĞLU

DOĞUM YERİ: Ankara

DOĞUM YILI: 1978

MEDENİ HALİ: Evli

EĞİTİM VE AKADEMİK DURUMU

LİSE

1991-1994 Ankara Ayrancı Lisesi

LİSANS

1994-1998 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

YÜKSEK LİSANS

2000-2003 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji

A.B.D.

İŞ TECRÜBESİ

2000- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji

A.B.D.