



**AMİLAZ ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Zeynep ÖRTÜCÜ

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**AMİLAZ ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

(Isolation and Molecular Characterization of Amylase Producing Fungi)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep ÖRTÜCÜ

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Erzurum
Temmuz, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Zeynep ÖRTÜCÜ tarafından hazırlanan “AMİLAZ ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” başlıklı çalışması 24/ 07 / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Genel Biyoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Murat ÖZDAL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Özlem BARIŞ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğrt. Üyesi Ayşenur YAZICI <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2022-10860

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında sunulan “AMİLAZ ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	24	30
Kuramsal Temeller	13	30
Materyal ve Metot	32	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	6	20
Sonuçlar	0	20
Tezin Geneli	16	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Zeynep ÖRTÜCÜ	Prof. Dr. Özlem BARIŞ
12.7.2023	12.7.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Özlem BARIŞ’a, aileme ve FYL-2022-10860 nolu proje ile tezimi destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi’ne teşekkür ederim.

Zeynep ÖRTÜCÜ



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMİLAZ ÜRETİCİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeynep ÖRTÜCÜ

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Amaç: Amilaz enzimine olan endüstriyel talebin sürekli artışı nedeniyle rekombinant organizmaların kullanılmasını içeren uygulamalarda şablon olarak çoğunlukla yabancı türler kullanılmaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında amilaz enziminin üretim kapasitesini iyileştirmek ve kalitesini arttırmak için yeni üretici fungus türlerin keşfi amaçlanmıştır.

Yöntem: Amilaz üretici fungusların karbon kaynağı olarak nişasta içeren besiyerinde seçici izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından saflaştırılan isolatlar oluşturdıkları zon çaplarına göre sınıflandırılmış, enzim aktiviteleri belirlenmiş ve en iyi zon veren isolatlar ITS bölgelerine göre moleküler düzeyde tanımlanmıştır. En yüksek aktivite gösteren izolata ait enzim TCA yöntemi ile saflaştırılmış ve enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık ve pH belirlenmiştir.

Bulgular: Sonuçta *Rhizopus arrhizus* OZ7, *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 ve *Actinomucor elegans* OZ9 olmak üzere 3 filantöz fungus; *Debaryomyces hansenii* OZ1 ve *Trichosporon* sp. OZ2 olmak üzere 2 maya izolatu, toplam 5 fungus izole edilmiştir. Kültür filtratlarından yapılan enzim aktivite ölçümlerinde yalnızca *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 ve *Debaryomyces hansenii* OZ1 isolatları pozitif sonuç vermiş olup; çalışmaya en yüksek aktivite gösteren izolat olan *P. cucumerina* OZ8 ile devam edilmiştir.

Sonuç: OZ8 izolata ait enzimin kısmi saflaştırması sonrasında yapılan SDS-PAGE, sıcaklık ve pH denemelerinde; enzimin yaklaşık 70 kDa boyutlarında olduğu, aktivitesinin 45 °C’de (201,84 U/ml) ve pH 5’te (227,03 U/ml) optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amilaz, Moleküler Karakterizasyon, *Plectosphaerella cucumerina*

Temmuz 2023, 48 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AMYLASE PRODUCING FUNGI

Zeynep ÖRTÜCÜ

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem BARIS

Purpose: Wild species are often used as templates in applications involving the use of recombinant organisms for the continued increase in industrial demand for the enzyme amylase. For this reason, in the thesis study, it was aimed to discover new producer fungi species in order to improve the production capacity of the enzyme and increase its quality.

Method: Selective isolation of amylase producing fungi was carried out on a medium containing starch as a carbon source. Then, the purified isolates were classified according to the zone diameters they formed, their enzyme activities were determined, and the best zoning isolates were identified at the molecular level according to their ITS regions. The enzyme belonging to the isolate with the highest activity was partially purified by TCA method and the optimum temperature and pH of enzyme activity were determined.

Findings: As a result, a total of 5 fungi, *Rhizopus arrhizus* OZ7, *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 and *Actinomucor elegans* OZ9; *Debaryomyces hansenii* OZ1 and *Trichosporon* sp. OZ2, were isolated. In enzyme activity measurements made from culture filtrates, only *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 and *Debaryomyces hansenii* OZ1 isolates gave positive results; The study was continued with *P. cucumerina* OZ8, the isolate with the highest enzyme activity.

Results: In the SDS-PAGE, temperature and pH tests performed after partial purification of the enzyme of the OZ8 isolate; It was determined that the enzyme was approximately 70 kDa size and its showed optimum activity at 45 °C (201.84 U/ml) and pH 5 (227.03 U/ml).

Keywords: Amylase, Molecular Characterization, *Plectosphaerella cucumerina*

July 2023, 48 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
Amilazlar.....	1
Mikrobiyal amilazlar	1
Amilaz Kaynakları	2
Amilaz Üretimi için Substratlar	3
α -Amilazların Üretimi.....	4
α -Amilazların Üretiminin Optimizasyonu	5
pH.....	5
Sıcaklık.....	6
İnkübasyon süresi.....	6
Substrat kullanımı	6
Genetik mühendisliği yaklaşımları	7
α -Amilazların Endüstriyel Uygulamaları.....	7
Biyoeetanol üretimi.....	7
Deterjan endüstrisi	8
Tekstil endüstrisi	8
Kağıt endüstrisi	8
Fırıncılık endüstrisi	9
Amilazların küresel pazar payı.....	9
KURAMSAL TEMELLER.....	10
MATERYAL VE METOT	13
Materyal	13
Kullanılan cihazlar	13
İzolasyon besiyeri.....	13

Enzim üretim ortamı	14
Aktivite ölçümü için tampon çözelti	14
Substrat çözeltisi	14
DNSA çözeltisi	14
İyodin çözeltisi	14
Agaroz jel	14
SDS-PAGE	15
Metot	15
İzolasyonda kullanılacak örneklerin toplanması	15
Amilolitik izolatların izolasyonu ve seleksiyonu	16
Amilolitik aktiviteye sahip fungusların moleküler karakterizasyonu	16
Enzim aktivitesinin belirlenmesi	18
En yüksek aktiviteyi gösteren izolata ait enzimin kısmi saflaştırılması	18
SDS-PAGE	19
En yüksek aktiviteye sahip izolatın amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	19
En yüksek aktiviteye sahip izolatın amilaz aktivitesi üzerine PH'nın etkisi	20
İstatistiki analizler	20
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	21
Fungusların İzolasyonu, Seleksiyonu ve Moleküler Karakterizasyonu	21
Seçilen İzolatların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	25
Kültür Filtratından Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Enzim Konsantrasyonunun	
Ölçümü	26
SDS-PAGE	27
İzolat OZ8'e Ait Kısmi Saflaştırılmış Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık ve Ph'nın	
Etkisi	28
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar, Marka ve Modelleri	13
Tablo 2. SDS-PAGE Jeli İçin Gereken Kimyasallar ve Kullanılan Miktarlar	15
Tablo 3. PCR Reaksiyon Karışımı.....	17
Tablo 4. PZR Koşulları	17
Tablo 5. Standart Hazırlamak İçin Gerekli BSA Solüsyonları	19
Tablo 6. Seçilen izolatlara ait Nanodrop ölçüm sonuçları	22
Tablo 7. İzolatların Tür İsimleri ve Erişim Numaraları	23
Tablo 8. Kültür Filtratından Ölçülen Enzim Aktiviteleri.....	26



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. α -amilaz üretiminin çeşitli adımları	5
Şekil 2. Tek karbon kaynağı olarak nişasta içeren besiyerinde üreyen koloniler	21
Şekil 3. Tek karbon kaynağı olarak nişasta içeren ve indikatör olarak tripan mavisi içeren petri görüntüsü (A: pozitif kontrol- saf amilaz 5mg/ml).....	22
Şekil 4. ITS PZR sonuçları (sırasıyla; OZ1, OZ2, OZ7, OZ8 ve OZ9)	23
Şekil 5. İzolatlara ait filogenetik ağaç	24
Şekil 6. Maltoz standart eğrisi (250-5000 μ M)	25
Şekil 7. BSA ile hazırlanan standart grafik	26
Şekil 8. SDS-PAGE görüntüsü (1. kuyucuk marker, 2. kuyucuk kültür filtratı, 3. kuyucuk kısmi saflaştırılmış enzime ait bant).....	27
Şekil 9. Kısmi saflaştırılmış enzime ait farklı sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri	28
Şekil 10. Kısmi saflaştırılmış enzime ait farklı pH'lar daki enzim aktiviteleri	29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CFU	: Koloni Oluşturma Birimi
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ml	: Mililitre
OD	: Okuma Değeri
PZR	: Polimerize Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
sn	: Saniye
UV	: Ultraviyole
U	: Enzim Ünitesi
μM	: Mikro Molar
μl	: Mikrolitre

GİRİŞ

α -amilazlar, endüstride yaygın bir şekilde kullanılan nişasta hidrolize edici enzimlerdir ve α -(1,4)-D-glukozidik bağını parçalayarak glikoz ve maltoz gibi basit şekerleri oluştururlar. Bu enzim grubu nişasta işleme, deterjan üretimi, tekstil, kâğıt ve ilaç üretimleri gibi çeşitli biyoteknolojik uygulama özelliklerine sahiptir. Bunların dışında, ilaç dağıtımı, biyoremediasyon ajanı ve biyofilm inhibitörü gibi bazı yeni uygulamalara da sahiptir. α -amilazlar global enzim pazarının yaklaşık %25-30'unu kapsar. Bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlar gibi çok çeşitli canlılar α -amilaz üretebilmektedir. Ancak mikroorganizmalar yüksek hacimde α -amilaz üretiminde miktar olarak öne çıkmıştır. Ayrıca, genetik olarak manipülasyonun kolay olması ile mikroorganizmalardan yeni özelliklere sahip α -amilazlar üretilebilir ve üretimleri kolayca optimize edilebilir. α -amilazın endüstride yaygın olarak uygulanması nedeniyle, enzimin üretimini geliştirmek ve daha yüksek stabiliteye sahip enzimler üretmek için bir çok optimizasyon yöntemi ve genetik mühendisliği yöntemleri kullanılmaktadır.

Amilazlar

Amilazlar, etki şekillerine göre maltodekstrinleri üretmek için nişastanın parçalanmasını (sıvılaştırma işlemi) başlatan endoamilazlar (α -amilaz); maltodekstrinleri glikoz ve maltoza (sakkarifikasyon işlemi) parçalayan ekzoamilazlar (β -amilaz) ve glukozamilazlar (γ -amilaz) olarak 3 gruba ayrılabilir (Gupta *et al.* 2003; Anitha and Muralikrishna, 2009; Chai *et al.* 2012; Paul *et al.* 2021).

Mikrobiyal amilazlar

Mikrobiyal kaynaklı α -amilazlar; endüstriyel ölçekte daha ucuza üretilmeleri, kararlı yapıları, genetik düzeyde ve protein düzeyinde manipülasyonlarının kolay olması gibi nedenlerle ön plana çıkmaktadırlar (Gupta *et al.* 2003; El-Kady *et al.* 2017). Mikrobiyal amilazların, bitki ve hayvan α -amilazlarına kıyasla daha kararlı olmaları onların endüstriyel uygulamalarda geniş bir yer tutmasını sağlamıştır. Bu nedenle günümüzde nişastanın kimyasal hidrolizinin yerine mikrobiyal kaynaklı amilazlar kullanılarak nişasta hidroliz basamakları daha uygun maliyetli olarak yapılmaktadır. (Rana *et al.* 2013).

α -amilaz (EC 3.2.1.1)

α -Amilaz, endo-etkili kalsiyum içeren bir metaloenzim olup; glikozit hidrolaz ailesinin (GH13) en yaygın kullanılan üyesidir. α -amilazın temel hidrolitik ürünleri maltotrioz, maltoz,

glukoz ve dekstrindir (Paul *et al.* 2021). α -amilazlar endoamilazlar olarak iyi bilinirler ve çoğunluğu hücre dışı olmakla birlikte, birkaç tanesinin hücre içi olduğu bildirilmiştir (Sivaramakrishnan *et al.* 2006).

Niştasta iki polimerden oluşur, yani dallanmamış amiloz (α -1,4-D-glukozidik bağlardan oluşur) ve dallı amilopektin (α -1,4-D-glukozidik bağlar ve α -1,6-D-glukozidik bağlar) içerir. α -amilazlar (EC 3.2.1.1), niştasta moleküllerinin yalnızca α -1,4-D-glukozidik bağlarını parçalayabilirler (Paul *et al.* 2021). α -amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroskobik canlılardan elde edilebilirler (Kathiresan and Manivannana 2006).

β -Amilaz (EC 3.2.1.2)

Exoamilaz olan β -amilaz, α -1,4-glikozidik bağları; parçalayarak glikoz ve maltoz gibi düşük molekül ağırlıklı ürünler üretirler (Sivaramakrishnan *et al.* 2006).

Glukoamilazlar (EC 3.2.1.3)

Bu enzim, polisakkaritlerin hem α ,1-6 hem de α ,1-4 glikozidik bağlarının hidrolizini katalize ederek glikoz veren ekso-etkili bir glukoamilazdır. γ -amilaz asidik pH 3.0'da bile kararlıdır. Esas olarak *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *R. niveus* ve *R. delemar* gibi ipliksi mantarlarda görülürler (Paul *et al.* 2021).

Amilaz Kaynakları

Canlıların 3 domaininde bulunan organizmaların çoğu α -amilaz üretir, ancak endüstrilerdeki uygulamaların çoğu mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir (El-Kady *et al.* 2017). En sık kullanılan α -amilaz, çeşitli *Bacillus* türlerinden elde edilir ancak endüstriyel sınıf α -amilaz, ısıya ve alkaline pH'a dayanıklı α -amilazları gerektirdiği için bu durumlarda arkealardan üretilen α -amilazlar tercih edilmektedir (Kathiresan and Manivannana 2006).

Amilazlar gıda, fermentasyon, tekstil ve kağıt sanayisine kadar birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır. Endüstride kullanılan amilazların çoğu mikrobiyal kaynaklardan gelir ve aşırı pH, sıcaklık, ozmolarite ve basınç gibi çok çeşitli koşullarda yüksek enzimatik aktiviteye ve uygun üretim maliyetlerine sahip olduklarından dolayı mikrobiyal amilazlar, farklı endüstrilerdeki kimyasal hidroliz işlemlerini geride bırakmıştır. Çünkü niştasta işleme endüstrisinde kimyasal hidroliz olarak kullanılan asit hidrolizinin üretilen ürünlerde stabilite sorunları, yüksek enerji gereksinimleri ve nötralizasyon adımlarının fazlalığı gibi birtakım dezavantajları vardır (Rana *et al.* 2013).

Artan α -amilaz üretimini karşılamak için daha verimli suşlara ihtiyaç vardır. Araştırmacılar, verimli α -amilaz üreten suşu seçerken, suşun α -amilazı daha fazla üretmesine, substrat kullanım

kapasitesine, olumsuz çevre şartlarında bile enzim üretimi yapabilmesine ve en düşük maliyet ile gereksinimlerini karşılayabilmesi gibi çeşitli faktörleri göz önünde bulundurmaktadır. Geçmiş yıllarda, değişen sıcaklık, pH ve ozmolarite aralığı gibi aşırı ortamlarda hayatta kalma konusundaki muazzam potansiyelleri nedeniyle alan arkealarına dikkat çekilmektedir. Arkea'dan sonra, rekombinant suşlar da bazı araştırmacılar tarafından yabancı çeşitlere kıyasla gelişmiş nitelikleri nedeniyle kullanılmaktadır. α -amilazın seri üretimi için rekombinant DNA teknolojisine de önem verilmelidir. Yabancı mikroorganizmaların enzim üretimi oldukça düşüktür. Bu nedenle enzim üretimini arttırmak için, α -amilaz kodlayan yabancı gen klonlanabilir ve tekrar ifade edilebilir (Paul *et al.* 2021).

α -amilazların çoğunluğu mikroorganizmalar tarafından üretildiği için bunların teşhisi, moleküler karakterizasyonu ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması çok önemlidir. Metagenomik tabanlı yaklaşımlar zorlu çevre koşullarında dikkat çekici özelliklere sahip α -amilaz gibi endüstriyel enzimleri keşfetmek için hayati bir araçtır, toleranslı suşların üretilmesinde kullanılabilir ve endüstrilerde muazzam uygulamalara hizmet edebilir. Buna rağmen α -amilaz elde etmek için metagenomik yaklaşımların uygulanabilirliğini belirten yalnızca birkaç çalışma mevcuttur (Bilal *et al.* 2018; Ngara and Zhang 2018).

Amilaz Üretimi için Substratlar

Bir mikroorganizma çoğalma ve metabolizma için çeşitli besinlere ihtiyaç duyar. Besiyeri ortamın bileşimi, mikroorganizmaların büyümesini ve metabolizmasını doğrudan etkilediği için enzim üretimini ve enzim aktivitesini de önemli ölçüde etkiler. Her mikroorganizmanın kendine ait bir besin ihtiyacı vardır. Enzim üretimini arttırmak için geliştirme ortamının çeşitli olası konsantrasyonlarda inorganik ve organik karbon ve nitrojen kaynakları ile desteklenmesi gerekmektedir (Paul *et al.* 2021). Endüstride artan talepleri karşılamak için üretim maliyetini artırmadan verimi artırmak gerekmektedir (Walia *et al.* 2012). Doğal kaynaklar ve endüstriyel atıklar, enzimlerin üretimi için ekonomik ve ulaşılabilir hammaddeler olarak biyoteknolojide çokça kullanılmaktadır (Kaur and Vyas, 2012).

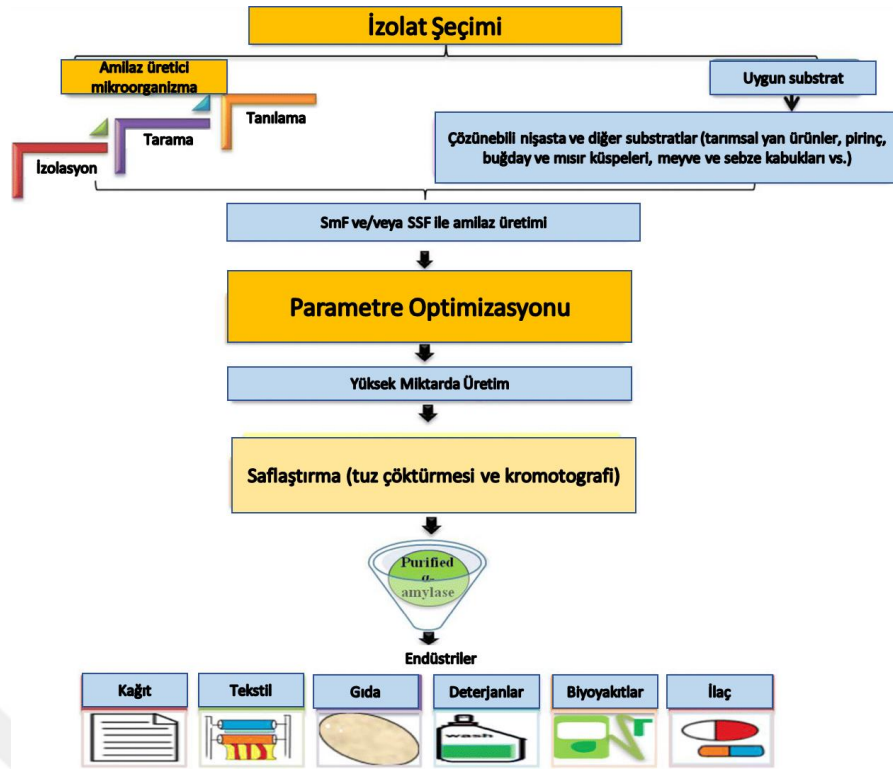
Enzimler, birçok endüstriyel alanda uygulamaları olan ürünlerdir. Endüstriyel enzim üretim prosesinin uygulanabilir olduğu kadar ekonomik olması da gerekir. α -amilaz üretimi için birçok inorganik ve organik substrat çeşitleri vardır. Enzim üretimi için genellikle maliyeti daha fazla olan çözünebilir nişasta kullanılmaktadır. Endüstriyel üretimde bu maliyeti düşürmek için yeni, verimli ve uygun substratlar gerekmektedir. Son yıllarda araştırmacılar, üretim maliyetini azaltmak için çeşitli zirai yan ürün substratlarını tercih etmişlerdir. Bu yeni substratlar nişasta bakımından daha zengin, ucuz ve aynı zamanda katı atık sorununu çözen kaynaklardır. Bunun yanında bazı substratlar tek başlarına mikroorganizmanın beslenme gereksinimlerini

karşılayamazlar ve sonuç olarak dışarıdan besin takviyesine ihtiyaç duyarlar. Mikroorganizmaların bu tür substratları kullanarak enzim üretmelerine izin verilirse, verimli bir üretim olmaz çünkü özellikle lignoselülozik biyokütleler, mikroorganizmalar tarafından kolayca sindirilemez veya sindirilmeyen kompleks karbonhidrat içerir (Pranay *et al.* 2019).

Amilaz üretimi için ucuz ve verimli karbon kaynağı olarak buğday kepeği ve pirinç gevreği (Kaur and Vyas, 2012), atık patates nişastası (Asgher *et al.* 2007), soya fasulyesi küspesi (Yang *et al.* 2011), mısır proteini, fındık küspesi ve peynir altı suyu (Yaras *et al.* 21011) kullanılan substratlar arasındadır. Ayrıca mısır koçanı, sebze ve meyve kabukları, şeker kamışı küspesi ve hindistan cevizinde kullanılan diğer tarımsal yan ürünler arasındadır (Paul *et al.* 2021).

α -Amilaz Enziminin Üretimi

α -amilaz enzimi katı hal fermantasyonu (SSF) ve batık fermantasyon (SmF) olarak iki fermantasyon tekniği ile üretilmektedir (Şekil 1). SmF, enzim üretimi için kullanılan en eski yöntemdir ve ticari olarak α -amilaz üretiminin çoğu SmF'de gerçekleştirilir (Rana *et al.* 2013). SSF ise günümüzde SmF'nin belirli sınırlamalarının üstesinden gelmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SmF'de mikroorganizmaların büyümesi, sıvı besiyeri içinde olur ve büyük ölçekli mikroorganizma inkübasyonuna ilişkin tüm fizikokimyasal parametreler optimize edilir. SmF için en yaygın kullanılan substratlar, çözünebilir nişasta, melas, meyve ve sebze sularıdır. SmF kullanımının dezavantajları, kullanılan besiyeri ortamının yüksek maliyetli olması, enzim veriminin azlığı ve atık su miktarının fazla olmasıdır (Allala *et al.* 2019; Paul *et al.* 2021). Diğer taraftan SSF'de substrat, yalnızca destek veya hem destek hem de besin sağlayabilir. SSF'de üretilen metabolitlerin konsantrasyonu olması ve saflaştırma prosedürlerinin daha az maliyetli olması nedeniyle iyi bir alternatif oluşturmaktadır (Dharania and Kumaran 2012).



Şekil 1. α -amilaz üretiminin çeşitli adımları, Paul *et al.* (2021)'den çevrilerek.

Mantarlarda α -amilaz üretimi, kültürün hem fiziksel hem de biyolojik durumuna bağlıdır. Özellikle, α -amilaz gibi hücre dışı enzimler için funguslarda miselyum gelişiminin miktarı önemlidir (Carlsen *et al.* 1996). Sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, sürfektanlar, karbon, azot ve fosfat kaynakları, metal iyonları, nem ve çalkalama hızı gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel faktörlerin α -amilaz üretimini etkilediği bilinmektedir (Rana *et al.* 2013).

α -Amilazların Üretimine Optimizasyonu

Ekonomik substrat ve verimli α -amilaz üreten suş seçiminden sonra, enzim üretimini arttırmak için optimum koşulu belirlemek üzere çeşitli fizikokimyasal parametrelerin optimizasyonuna ihtiyaç vardır. Optimizasyon işlemleri tek seferde bir faktör değişimi (OFAT) ile çeşitli parametrelerin optimizasyonu veya yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) gibi istatistiksel araçlar uygulanarak üstesinden gelinebilecek zaman alan bir yaklaşımdır (Paul *et al.* 2021). Ayrıca enzimin kararlılığı, verimli çalışıp çalışmayacağını belirleyen faktörlerden biridir. Çeşitli enzim uygulamalarının yapılması için enzimin kararlı olması gerekir. Bu nedenle enzimlerin değişik sıcaklık ve pH aralıklarında ve güçlü kimyasalların varlığında bile optimum çalışması gerekmektedir (Gupta *et al.* 2003).

pH

pH, mikroorganizmanın metabolizmasını etkileyerek enzim üretim seviyesinde, enzim aktivitesinde ve organizmanın büyümesinde önemli rol oynar. Bu nedenle pH enzim verimini

arttırmak için değerlendirilmesi gereken önemli bir faktördür. (Paul *et al.* 2021). Nişastaya uygulanan ön işlem, yaklaşık 4-5 gibi düşük bir pH'ta gerçekleştirilir. Böyle bir ön işlem için ihtiyaç duyulan ekstrem koşullar, yüksek sıcaklık ve düşük pH'ya dayanıklı enzimlerin kullanımını gerektirir (Rana *et al.* 2013). Amilazlar, 2 ila 12 arasında değişen bir optimum pH'da izole edilmiş olup; çoğu bakteri ve mantardan elde edilen α -amilazlar pH 7 ve altında optimum pH'a sahiptir (Pandey *et al.* 2000).

Sıcaklık

Sıcaklık; enzim hidroliz hızını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Mikroorganizmanın üremesini ve hayatsal faaliyetlerini etkileyerek enzim üretimini önemli ölçüde değiştirebilir. Her mikrobiyal suş, belli bir sıcaklık aralığında gelişir ve enzim üretebilir. Yüksek sıcaklık, hücre canlılığını ve enzim üretimini engellerken, düşük sıcaklık ise mikroorganizmanın metabolizmasını baskılayarak enzim verimini azaltır (Amoozegar *et al.* 2003).

Nişastanın işlenmesi sırasında jelatinizasyon ve sıvılaştırma gibi ön işlemlerin 90-110 °C aralığında sıcaklıklarda yapılmasından dolayı α -amilazların bu sıcaklıklarda aktif olması arzu edilir; bu nedenle, daha termofilik ve termostabil α -amilazlara yönelik bir ihtiyaç vardır (Burhan vd 2003). *Fusarium oxysporum* un ürettiği amilazın optimum sıcaklık aralığı 25–30 °C iken arkebakteriler için optimum sıcaklık aralığı 100 ve 130 °C olduğu bildirilmiştir (Rana *et al.* 2013).

İnkübasyon süresi

Mikroorganizmaların inkübasyon süresi enzim üretim verimini etkiler. İnkübasyon süresi az ya da fazla yapılırsa maksimum verime ulaşamaz. Optimum süreye ulaşana kadar inkübasyon süresinin artmasıyla enzim üretimi de artar. İnkübasyon süresinin artması durumunda besiyerindeki kaynakların tükenmesi veya zehirli maddelerin artması nedeniyle enzim üretimi azalır (Paul *et al.* 2021).

Substrat kullanımı

α -amilaz nişasta veya maltoz varlığında indüklenebilir bir enzimdir. Yapılan çalışmalar amilazların çözünür nişasta, amiloz, amilopektin, glikojen ve maltodekstrinler tarafından indüklendiğini göstermiştir. Nişasta, glikoz, maltoz, laktoz, fruktoz, yağlı tohum küspesi, şeker kamışı küspesi, hurma atığı ve bazı geleneksel olmayan substratlar α -amilaz üretimi için kullanılmıştır (Suganthi *et al.* 2011; Bhattacharya *et al.* 2011; Acourene and Ammouche 2012).

Genetik mühendisliği yaklaşımları

Bu enzimlerin uygulamalarındaki artışla birlikte, talep belirli yönlerden özgülüğü olan enzimlere kaymıştır. Araştırmalar, mikroorganizmalardan yüksek ısıya dayanıklı ve farklı pH aralıklarında çalışabilen α -amilaz üretmeye, onları genetik olarak manipüle etmeye veya bölgeye yönelik mutajenez uygulamaları yapmaya odaklanmıştır. Bölgeye yönelik mutajenez, katalitik bölgeye özel amino asitlerin eklenmesi, modifikasyonu veya çıkarılması yoluyla bir enzimin katalitik ve yapısal yönlerinin değiştirilmesinde önemli rol oynar. Son yıllarda, yönlendirilmiş evrim ve rasyonel veya yarı rasyonel tasarım gibi enzim mühendisliği yaklaşımları, arttırılmış termostabilite, aşırı pH stabilitesi, substrat özgülüğü ve çeşitli kimyasalları tolere edilebilirlik gibi istenen özellikleri elde etmek mümkün olmaktadır (Dubey *et al.* 2019).

α -Amilazların Endüstriyel Uygulamaları

Nişastanın işlenmesi, nişasta granüllerinin çözünmesini içeren jelatinleştirme, nişastanın kısmi hidrolizinin gerçekleştirildiği sıvılaştırma ve daha fazla hidroliz yoluyla glikoz ve maltoz üretimini içeren sakkarifikasyonu içerir (Prakash and Jaiswal 2010). α -amilazlar nişastanın sakkarifikasyonu veya sıvılaştırılmasındaki kullanımlarının yanı sıra, tekstil liflerinin haşılmasında, bira veya meyve sularında oluşan bulanıklığın giderilmesinde, hayvansal ürünlerin ön terbiyesinde, sindirilebilirliği artırmak için yem sanayinde, düşük sıcaklıklarda yıkama için deterjanlarda kullanılmaktadır (van der Marc Maarel *et al.* 2002).

α -amilazlar gibi amilolitik enzimlerin sürekli olarak artan endüstriyel uygulama alanı bu enzimlerin keşfedilmesi talebini de artırmıştır. Bu bağlamda α -amilazların modern veya yeni uygulamaları arasında atık su arıtma (Suribabu *et al.* 2014), hidrojel oluşumu, kontrollü ilaç dağıtımı (Dumoulin *et al.* 1999) farmasötikler ve ilaç, biyofilm inhibitörü olarak kullanımı sayılabilir. Ayrıca nişastanın şekere dönüştürülmesi ve sıvılaştırılması, peynir olgunlaştırma ve tatlandırma, hayvan yemi, etanol üretimi, deterjanlar ve çamaşırhane ile tekstil ve kağıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Xie *et al.* 2014; Song *et al.* 2016).

Biyoetanol üretimi

Yenilenebilir enerji kaynaklarına olan talep arttıkça nişastadan biyoetanol üretimi hızla artmıştır. Endüstride biyoetanol, başta *Saccharomyces cerevisiae* olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından gerçekleştirilen fermantasyon işlemleri yoluyla şekerlerden üretilir. *S. cerevisiae* fermantasyon için nişastayı doğrudan kullanamaz. Bu nedenle nişastanın glikoz moleküllerine parçalanması gerekmektedir. Nişastanın hidrolizi için de çeşitli ön işlemlere tabi tutulmasını gerekir. Geleneksel olarak endüstriyel işlemlerde nişastayı parçalamak için yüksek

sıcaklıklarda pişirilmesi ve ardından parçalama için enzimlerin eklenmesi gerekir. Bu nedenle, ham nişastayı hidrolize eden bir enzimi ifade eden, genetiği değiştirilmiş bir maya türü, oda sıcaklığında nişastanın hidroliz işlemini gerçekleştirerek biyoetanol üretiminin maliyetini büyük ölçüde azaltabilir (Liao *et al.* 2012).

Deterjan sanayisi

Deterjanların daha iyi leke çıkarması ve kimyasal olarak çevre kirliliğine sebep olmaması için enzimlerin kullanımı daha da yaygınlaşmıştır. Amilazlar, patates, muhallebi, çikolata vb. gibi nişastalı gıdaların kalıntılarını daha küçük moleküllere ayırtmak için çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmaktadır. Bu nedenle deterjan endüstrisi amilazların birincil tüketicileri arasındadır. Amilazlar yaklaşık olarak sıvı deterjanların %90'ında bulunmaktadır. Özellikle daha düşük sıcaklıklarda ve yüksek pH'da aktiviteye sahip olan amilazlar, temizleme şartlarında kararlılıklarını korumaktadırlar. Nişastanın varlığı diğer kirleticiler için tutunma yeri oluşturduğu için onun yüzeylerden uzaklaştırılması temizliğin sağlanması için ekstra önem taşımaktadır. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilazlar genellikle *Bacillus* cinsinden elde edilmektedir (Olsen and Falholt 1998; Gupta *et al.* 2003, Mitidieri *et al.* 2006).

Tekstil endüstrisi

Nişasta; ekonomik, erişilebilir ve oldukça kolay uzaklaştırılabilmesi nedenleriyle tekstil endüstrisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Amilazlar tekstil endüstrisinde dokuma işlemi sırasında ipliğinin kopmasını önlemek için güçlendirme maddesi olarak kullanılır. Böylece daha hızlı ve güvenli bir dokuma sağlanır. Dokuma işlemi bitikten sonra kumaştaki haşıl maddesi olan nişastanın sökme işlemi için amilazlar kullanılmaktadır. α -amilazlar sadece nişastayı parçalar ve iplik liflerine zarar vermez. Özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilen amilazlar oldukça uzun bir süredir tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (Gupta *et al.* 2003; Ahlawat *et al.* 2009, Rana *et al.* 2013).

Kağıt endüstrisi

Kağıt endüstrisinde, kağıdın yazma kalitesini iyileştirmek, kağıdın yüzeyinin yeterince pürüzsüz ve sağlam olmasını sağlamak için nişasta ile kaplama işlemi gerçekleştirilir. Amilazlar ise bu kaplanmış kağıt nişastasının modifikasyonu için kullanılmaktadır (van der Marc Maarel *et al.* 2002).

Fırıncılık endüstrisi

α -amilazlar fırıncılık endüstrisinde; hamurun mayalanması, sindirime yardımcı maddelerin hazırlanması, kek ve nişasta şurupları gibi ürünlerin üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hamura α -amilaz ilavesi, mayaların unun içindeki nişastayı fermente edebileceği daha küçük şeker moleküllerine parçalayarak fermantasyon hızının arttırır. Böylece hamurun hacminde ve dokusunda iyileşmeler sağlar. Ayrıca hamurda fermente şeker oluşumunu arttırarak ekmeğin tadını ve kabuk rengini iyileştirir. Fermente olabilen bileşikler üretmenin yanı sıra, α -amilazlar ayrıca ekmek pişirmede bayatlama önleyici bir etkiye sahiptir ve fırınlanmış ürünlerin yumuşaklığını koruyarak bu ürünlerin raf ömrünü uzatırlar (Ghorai *et al.* 2009).

Amilazların küresel pazar payı

2020 yılında, α -amilaz içeren endüstriyel enzimlerin pazar payı, 5 yıllık %8,2'lik bileşik yıllık büyüme oranı ile toplam 7,5 milyar doları bulmuştur ve yakın gelecekte de bu artışın hızla süreceği ön görülmektedir. Dünya enzim ihtiyacı 12 büyük üretici firma tarafından karşılanmaktadır. α -amilazın en önemli ve büyük ölçekli üreticileri arasında Danimarka'da bulunan Novozymes, ABD'de DuPont ve İsviçre'de Roche şirketleri gelmektedir (Paul *et al.* 2021).

KURAMSAL TEMELLER

Bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlar olmak üzere çok çeşitli organizmalar α -amilaz üretebilir. Mikroorganizmalar yüksek üreme ve büyüme oranı ile yüksek hacimde α -amilaz üretiminin birincil kaynağını oluştururlar. Ayrıca, genetik olarak manipülasyonun kolay olması ile mikroorganizmalardan yeni özelliklere sahip α -amilazlar üretilir ve üretimleri kolayca optimize edilebilir.

Örneğin *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus*'un endüstriyel uygulamalar için muazzam miktarda α -amilaz üretebildiği gösterilmiştir (Far *et al.* 2020; Farooq *et al.* 2021).

Yang ve arkadaşları *Bacillus alcalophilus* ve *B. subtilis*'ten üretilen rekombinant alkalın α -amilazın pH 7 ila 11 arasında optimum 9,5'da kararlı olduğunu bildirmişlerdir (Yang *et al.* 2011).

Elumalai ve arkadaşları tarafından SmF altında *B. subtilis* B2 türünün enzim üretme kapasitesi üzerindeki mavi, yeşil, kırmızı ve beyaz LED ışıkların ve beyaz floresan ışığın etkisini analiz ettikleri bir çalışmada mavi LED ışığının α -amilaz üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Elumalai *et al.* 2019).

Amilazlar özellikle termofilik ve halofilik özellikteki organizmalar başta olmak üzere aralarında *Bacillus* ve *Aspergillus* cinslerinin bulunduğu birçok prokaryotik ve ökaryotik birçok konukçudan izole edilmiştir (Hema *et al.* 2006; Asgher *et al.* 2007, Joel and Bhimba 2012, Pandey and Singh 2012).

Nişasta işleme adımlarının çoğu (sakkarifikasyon, jelatinleştirme ve sıvılaştırma gibi), yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyduğu için, termostabil olan α -amilazlar, bu zorlu koşullarda faydalıdır. *Geobacillus* cinsi bakteri kaplıcalardan izole edilmiştir ve termostabil α -amilazın en yaygın kaynakları arasındadır. Termofilik amilazların mezofilik α -amilazlardan daha fazla yapısal esnekliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. Halofilik α -amilazlar ise, tuzlu su ve yüksek sıcaklık koşullarını tolere eder. α -amilazın halofilik bakteriyel kaynaklarından biri *Nesterenkonia* sp. kloroform, benzen ve toluen gibi organik çözücülerde bile katalitik aktivitesini koruyan bir enzim üretir (Ouédraogo *et al.* 2012). Haloalkalofilik amilazlar ise, nişasta hidroliz işlem basamaklarında, kağıt ve deterjan üretim endüstrilerinde büyük bir öneme sahiptir (Rana *et al.* 2013).

Endüstride enerji kaynaklarındaha verimli kullanılması için soğuk aktif α -amilaz yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin marin bakterileri düşük sıcaklıklarda canlı kalabilir ve soğuk aktif enzimler üretebilir. Bu tip enzimler özellikle deterjan endüstrisinde tercih edilmekte olup; soğuk su ortamının kıyafetlerin renginin korunmasına yardımcı olması ve ısıtma için enerji harcanmaması yönünden avantajlı kabul edilir (Paul *et al.* 2021).

Fırıncılık sektöründe soğuğa adapte olmuş amilazlar, hamur fermentasyon süresini azaltır ve ekmek kalitesini iyileştirir. *Pseudoalteromonas* sp. M175 Antarktika buzullarından izole edilmiştir ve soğuk stabil alfa-amilaz kaynağı olarak kullanılmaktadır (Carrasco *et al.* 2017).

Bununla birlikte mantar orijinli amilazların ticari ölçekte bakteriyel enzimlere göre daha stabil olduğu bulunmuştur (Abu *et al.* 2005). Funguslar enzimi hücre dışına salgılaması nedeniyle endüstride α -amilaz üretimi için iyi bir kaynaktır. Funguslardan *Aspergillus niger*, *A. awamori* ve *A. oryzae* ticari α -amilaz kaynakları arasında bulunur (Fossi *et al.* 2005).

Xian ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Talaromyces pinophilus* sentetik besiyerinde geliştirilmiş ve elde edilen amilazın pH 4-5 aralığında aktif olduğu ve 55 °C optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Xian *et al.* 2015). *Trichoderma pseudokoningii* ile yapılan başka bir çalışmada ise SSF’da portakal kabuğu kullanılmış elde edilen enzimin 50 °C optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Abdulaal 2018).

Tanaka ve arkadaşları *Mortierella alliacea* türünden saflaştırmış oldukları amilaz ile yaptıkları çalışmalarda 61 ve 31 kDa boyutlarında iki altbirimden oluşan ve SDS PAGE de 92 kDa boyutlarında görüntülenen enzimin pH 5-6 aralığında ve 55 °C’de maksimum aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır (Tanaka *et al.* 2002).

Carrasco ve arkadaşlarının Antartik bir maya türü olan *Dioszegia fristingensis* ile yapmış oldukları çalışmada ise izole edilen α -glukozidaz’ın 30 kDa boyutunda monomerik bir yapıda olduğu pH 5.5-6.5 aralığında ve 37-40 °C’de maksimum aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir (Carrasco *et al.* 2017).

Ouédraogo ve arkadaşları patates atıklarından 25 maya izole etmiş ve bunlardan 10 tanesini nişasta hidroliz etme yeteneğine göre sonraki çalışmalar için seçmiştir. En iyi hidroliz zonunu veren organizmanın 24 mm hidroliz zonu ile *Candida utilis* olduğu bildirilmiştir. Bu izolatu 19 mm hidroliz zonu ile *C. guilliermondii*, 15 mm hidroliz zonu ile *Trichosporon mucoides* izlemiştir (Ouédraogo *et al.* 2012).

Ayrıca son zamanlarda, *Schwanniomyces castelli*, *S. fibuligera*, *Candida antarctica*, *C. lusitaniae*, *C. famata* ve *Cryptococcus* sp. gibi mayaların nişastayı hidrolize etme kabiliyetine sahip olduğu bulunmuş olup; bu türlerden elde edilen bazı amilazların endüstriyel amilazların en popüler ve önemli formlarından biri olduğu vurgulanmaktadır. Ticarileşme açısından ümit vadeden maya kaynaklı amilazlar hakkında daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır (Djekrif *et al.* 2016). Yabani tip α -amilazların, uygun olmayan çevre şartlarında verimli çalışabilmesi için bazı modifikasyonların yapılması gerekir. Önemli olan sadece α -amilaz üretimi değil, aynı zamanda aşırı çevre şartlarında çalışabilmesi için yabani tip α -amilazların yapısal alanlarını değiştirmek ve en uygun izolatların ortaya çıkarılmasını sağlamaktır (Paul *et al.* 2021).

Yeni üretici türlerin izolasyonunda, izolasyon bölgesi ve kaynağı seçiminin oldukça önem taşıdığı bilinmektedir. Özel niteliklere sahip izolasyon bölgelerinden elde edilen isolatlar, var olanlara kıyasla farklı karakterlerde olabilmekte ve bu lokal isolatların farklı yetenekleri ise çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymasına yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada izolasyon bölgesi olarak Doğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Erzurum; izolasyon kaynağı olarak ise patates tarımı yapılan topraklar ve un fabrikası seçilmiştir. Erzurum, Doğu Anadolu Bölgesinin en yüksek patates üretiminin gerçekleştirildiği alanlar olup; uzun yıllardır aynı topraklarda üretim yapılmaktadır. Aynı zamanda tez çalışmasının yürütüleceği bölgeye yakın olması tercih sebebi olmuştur. Bahsi geçen izolasyon bölgeleri yüksek miktarda nişasta içeren kalıntılar içermekte olup, bu alanlarda nişasta parçalama kabiliyetinde olan amilaz üretici mikroorganizmaların adapte olarak baskın türler haline gelmeleri oldukça yüksek bir olasılıktır. Bu nedenlerle seçilen izolasyon bölgesi ve izolasyon kaynakları yeni üretici türlerin izolasyonu için ümit vadetmektedir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler Sigma Aldrich (USA) ve Merck A.S. (USA) firmalarından alınmıştır. Besiyerleri, Oxoid (UK) firmasından alınmıştır.

Kullanılan cihaz modelleri

Bu tez çalışması deneyleri Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cihazların listesi marka ve modelleri ile birlikte Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Tez Çalışması İçin Kullanılan Cihazların Marka ve Modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
Buzdolabı	Arçelik
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng, 2102C
Elektroforez Sistemi	BioRad
Spektrofotometre	MultiskanGo, Thermo SCIENTIFIC
Hassas Terazı	Radwag
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad
Magnetik Karıştırıcı	WiseTherm HB-96
Steril Kabin	Microtest
Otoklav	Hirayama, HV110
pH Metre	Hanna
PZR Cihazı	Thermo
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA
İnkübatör	Philip-Harris
Saf Su Cihazı	GFL, 2004
Vorteks	JEIO TECH

İzolasyon besiyeri

900 ml saf su içerisinde 10 gr çözünür nişasta, 5 gr tripton, 3 gr K_2HPO_4 , 2,5 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,2g $MgSO_4$, 0.13gr $CaCl_2$, 0.02g $FeSO_4$, 0.06gr Trypan Blue ve 30 gr agar eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlanmıştır. Ardından pH 5'e ayarlanarak, 1 litreye

tamamlanarak otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra Petri plaklarına eklenerek soğumaya bırakılmıştır (Xian *et al.* 2015).

Enzim üretim ortamı

900 ml saf su içerisine 10 gr çözümlü nişasta, 5 gr tripton, 3 gr K₂HPO₄, 2,5 g (NH₄)₂SO₄, 0,2g MgSO₄, 0.13gr CaCl₂, ve 0.02g FeSO₄ eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlanmıştır. Ardından pH 5'e ayarlanarak, 1 litreye tamamlanarak otoklavlanmıştır (Xian *et al.* 2015).

Aktivite ölçümü için tampon çözelti

0,1 M sitrik asit çözeltisinden 6,5 ml ve 0,2 M sodyum fosfat çözeltisinden 43,6 ml alınarak karıştırılmış ve son hacim 100 ml olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır (Fossi *et al.* 2005).

Substrat çözeltisi

Bir önceki basamakta hazırlanan 100ml sitrat-fosfat tamponu içerisine 1 g çözülebilir nişasta eklenmiş ve çözelti 15 dakika kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakılarak hazırlanmıştır (Fossi *et al.* 2005).

DNSA çözeltisi

Öncelikle 12 g sodyum potasyum tartarat 8ml 2N NaOH çözeltisi içerisinde yavaşça karıştırılarak çözülmüştür. Ardından 20 ml saf su ve 0.438g 3,5-dinitrosalisilik (DNSA) eklenmiş ve son hacim 40 ml'ye tamamlanmıştır (Carrasco *et al.* 2017).

İyodin çözeltisi

90 ml saf su içerisine 0,3 gr I₂ ve 0,6 gr KI eklenerek 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Ouédraogo *et al.* 2012).

Agaroz jel

%1'lik agaroz jeli hazırlamak için 100 ml'lik erlene önceden tartılmış 1gr agaroz ve üzerine 100 ml 1X TAE tamponu ilave ederek kaynatılmıştır. Çözelti yaklaşık 50°C'ye düştükten sonra 5 µl Safe DNA (EcoTech) ilave edilerek jel elektroforez kaseti içerisine dökülmüştür.

SDS-PAGE

SDS-PAGE Jel Tablo 2’de belirtilen kimyasallar kullanılarak hazırlanmış ve Tablo 2’de verilen sıraya göre eklenmiştir. Karışım donması için sisteme yüklenmiştir.

Tablo 2. SDS-PAGE Jeli Hazırlamak İçin Gereken Kimyasallar maddeler ve Miktarlar

Ayırma Jeli	
Kimyasallar	Miktar
dd H ₂ O	2.85 ml
Tris (pH:8.8, 2M)	1.95 ml
Akrilamid (%30)	5 ml
SDS (%10)	100 µl
APS (%10)	100 µl
TEMED	10 µl
Yükleme Jeli	
Kimyasallar	Miktar
dd H ₂ O	3.6 ml
Tris (pH:6.8, 1M)	625 µl
Akrilamid (%30)	670 µl
SDS (%10)	50 µl
APS (%10)	50 µl
TEMED	5µl

Yürütme tamponu (running buffer)

3 g Tris, 14,4 g Glisin ve 1 g SDS 1L saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

Boyama tamponu

1 g Coomassie Brilliant Blue R boyası 100 ml asetik asit ve 300 ml etanolde çözülerek son hacim 1 L’ye tamamlanmıştır.

Yıkama tamponu

100 ml asetik asit, 300 ml etanol ve 600 ml saf su ile hazırlanmıştır.

Metot

İzolasyonda kullanılacak örneklerin toplanması

Örneklem bölgesi olarak karasal iklimin hakim olduğu, hem yükselti hem de soğuk bakımından ülkemizin diğer kısımlarından ayrılan Erzurum seçilmiştir. Bu seçimde özellikle

yoğun şekilde patates üretiminin yapıldığı ilçelerin bulunması da etkili olmuştur. Bu amaçla patates ekiminin yapıldığı tarlalardan Nisan 2022- Haziran 2022 tarihleri arasında toprak (Oudraogo *et al.* 2012), çürümüş patates yumruları ve un fabrikasından (Fossi *et al.* 2005) tortular alınarak steril torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Örneklerden 1 gr tartılarak 10ml steril fizyolojik su içerisinde süspanse edilmiş ve hazırlanan seri dilüsyonlardan 0.1ml inokülasyon için kullanılmıştır. Patates yumruları ise steril bistüri ile 1 gr kadar kesildikten sonra 10 ml steril fizyolojik su içerisinde homojenize edilmiş ve hazırlanan seri dilüsyonlardan 0,1ml inokülasyon için kullanılmıştır.

Amilolitik izolatların izolasyonu ve seleksiyonu

Bu amaçla tek karbon kaynağı olarak içerisinde çözünür nişasta bulunan besiyerlerinde selektif izolasyon yapılmıştır. İzole edilen organizmalar materyal nişasta içeren sıvı besiyerine alınarak 30°C'de 150 rpm de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sıvı kültürden 5 ml alınarak falkon tüpünde 4°C de 9000 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantın 80 µl'si tripan mavisi içeren nişastalı agarda açılan deliklere yüklenmiş ve 2 saat boyunca 37°C de inkübe edilmiştir. Ardından bu besi yerleri tripan mavisindeki renk açılma zonlarının veya iyodin çözeltisine tabi tutularak kolonilerin etrafında bulunan hidroliz zonlarının büyüklüğüne göre izolatlar seçilmiş ve seçilen koloniler arka arkaya yapılan pasajlar sonucunda saflaştırılmıştır. Elde edilen kültür filtratların sonraki deneylerde enzim aktivitesi ve protein saflaştırma amacıyla -20 °C saklanmıştır (Xian *et al.* 2015).

Amilolitik aktiviteye sahip fungusların moleküler karakterizasyonu

gDNA izolasyonu

İzolatlar falkon tüplerde 5ml PDB besi yerinde 48 saat boyunca geliştirilmiştir. Inkübasyon sonucu oluşan sıvı kültürler 6000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak pelet kısmına 600µl lysis buffer eklenip 15-20 saniye vorteksenerek iyice karıştırılmıştır. Karışımı yapılan solüsyona steril bir adet metal bilye konularak 5-10 dakika yüksek hızda homojenizasyona tabi tutulduktan sonra örnekler 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Daha sonra üzerine 2 µl RNAaz eklenerek 15 dakika 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 600 µl fenol kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklenerek çökelti oluşturmak amacıyla 1 dakika vorteksenerek +4 °C de 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst faz yeni tüpe alınarak eşit hacimde soğuk etanol eklenerek -80 °C bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda +4 °C de 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj

sonunda süpernatant atılmış, elde edilen pelete 1ml %70 lik soğuk etanol eklenmiştir. Aynı koşullarda santrifüj yapılarak 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Son yıkama işleminden sonra kabin içinde yaklaşık 20 dakika pelet kurutulmuş ve elde edilen pelete 50µl steril saf su eklenerek çözülmüştür (Xian *et al.* 2015).

ITS bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Fungal sistematiğe daha çok kullanılan Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesinin çoğaltılması için genel ITS 1 primeri (5' TCC GTT GGT GAA CCA GCG G 3') ve ITS 4 primeri (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') kullanılmıştır.

Bu amaçla Tablo 3'de verilen PZR reaksiyon karışımı ve Tablo 4'de verilen PZR koşulları kullanılmıştır.

Tablo 3. PZR Reaksiyon Karışımı

2X PCR master mix	25 µl
ITS1 primer	1 µl
ITS4 primer	1 µl
Su	31 µl
gDNA	2 µl

Tablo 4. PZR Koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95°C	2 dakika	1
94 °C	30 saniye	30
55 °C	30 saniye	30
72 °C	15 saniye	30
72 °C	10 dakika	1
4 °C	Sonsuz	

Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri, 1gr agaroz ve üzerine 100 ml 1x TAE tamponu ilave ederek kaynatılmış ve donmuş jele yüklenerek, 90 V'da 50 dakika boyunca yürütme işlemi yapılmıştır.

Ekstrasyon ve dizileme

PZR ürünlerinden tuzların, primerlerin ve polimeraz enziminin uzaklaştırılması için, ticari olarak satılan PZR saflaştırma kiti (EcoTech Biyoteknoloji) ile saflaştırma işlemi

yapılmıştır. Saflaştırılan örnek, BM Labosis (Türkiye) firmasından sekans hizmeti alınarak diziletilmiştir. Dizilenen örnekler, Bioedit software programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Enzim aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların amilaz aktiviteleri kolorimetrik bir yöntem olan DNSA yöntemi (Bernfeld 1955) ile belirlenmiştir. DNSA yöntemi uygulanırken standart eğri 5mM'lık saf maltoz ile hazırlanmış ve abzorbans ölçümleri 540nm'de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 180 mg maltoz 100 ml saf su içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Ardından seri dilüsyonlar hazırlanarak 0,25mM-5mM konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir.

Enzim aktivitesi için 400µl substrat çözeltisi eşit hacimde kültür süpernatantı veya sitrat fosfat tamponunda çözülmüş kısmı saflaştırılmış enzim ile karıştırılmış ardından 50 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda karışıma 200µl DNSA çözeltisi eklenerek 95 °C'de 15 dakika kaynatılmıştır. Örnekler direk buza alınarak üzerlerine 1 ml saf su eklenmiş ve abzorbans ölçümleri 540nm'de gerçekleştirilmiştir.

Bir enzim ünitesi: 50 °C ve pH 7 koşullarında, 1 dakikada, 1 µM maltoz açığa çıkarması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmış olup; aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite(U/ml): Maltoz } (\mu\text{M}) / \text{Enzim miktarı (ml)} * \text{İnkübasyon süresi (dk)}$$

En yüksek aktiviteyi gösteren izolata ait enzimin kısmi saflaştırılması

Kısmi saflaştırma

10 ml kültür filtratı, eşit hacimde %20 TCA ile pipetaj yardımı ile karıştırılmış ve -20 °C'de 2 saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda, 13.500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek, proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. 3 kez %70'lik etanol ile yıkanarak 13.500 rpm'de tekrar 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve son olarak, aseton ile yıkama yapılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan pellet, sitrat-fosfat tamponu içerisinde çözülmüş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (Fossi *et al.* 2005).

Protein konsantrasyonu için standart grafik hazırlanması ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu amaçla 4 mg Sığır serum albümini (BSA) 2 ml saf su içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Ardından aşağıda Tablo 5'de verilen dilüsyonlar hazırlanarak 25-2000 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir.

Tablo 5. Standart Hazırlamak İçin Gerekli BSA Solüsyonları

Standart	Saf su (µl)	BSA (µl)	Son Konsantrasyon (µg/ml)
1	0	300 Stok	2000
2	150	450 Stok	1500
3	325	325 Stok	1000
4	325	325 Standart 2	750
5	325	325 Standart 3	500
6	325	325 Standart 5	250
7	325	325 Standart 6	125
8	400	100 Standart 7	25
9	400	0	Kör

Yukarıda hazırlanan her bir dilüsyondan 20 µl alınarak üzerine oda sıcaklığına getirilmiş ClearBand Bradford Reagent (EcoTech) çözeltisinden 1 ml eklenerek, karıştırılmış ve yine oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından spektrofotometre cihazı 595 nm'ye ayarlanmış ve kör ile sıfırlanarak tüm dilüsyonlar ölçülerek standart grafik hazırlanmıştır. Deneyler sırasında protein konsantrasyonu, Sığır Serum Albümin (BSA) ile hazırlanan standart grafiğin formülü kullanılarak belirlenmiştir (Bradford 1976).

SDS-PAGE

Kısmi saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığını belirleyebilmek için %15'lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bu amaçla protein örnekleri, 2X yükleme boyası ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve 95 °C'de 5 dakika boyunca kaynatılmıştır. Hazırlanan jele yüklenen örnekler, 90 V'da boya jelden çıkana kadar yürütülmüştür. Yürütme tamamlandığında jel kasetten alınarak, coommasie R-250 boyası ile boyanmış ve proteinlerin görüntülenmesi amacıyla yıkama solüsyonunda 2 saat bekletilmiştir. İzlenebilir hale getirilen jelin görüntüsü, Bio-Rad jel görüntüleme sistemi ile çekilmiştir.

Sıcaklığın en yüksek aktiviteye sahip izolataın amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla 400µl substrat çözeltisi ile enzim içeren 400µl sitrat-fosfat tamponu karıştırılarak farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) 30 dakika süresince inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda karışıma 200µl DNSA çözeltisi eklenerek 95 °C'de 15 dakika kaynatılmıştır. Örnekler direk buza alınarak üzerlerine 1 ml saf su eklenmiş ve abzorban ölçümleri 540 nm'de gerçekleştirilmiştir (Fossi *et al.* 2005).

En yüksek aktiviteye sahip izolatın amilaz aktivitesi üzerine PH'nın etkisi

Amilazın aktivitesi üzerine pH'ın etkisini belirlemek amacıyla kısmi saflaştırılmış enzime ait pelet, pH'sı 3-7 olacak şekilde ayarlanmış sitrat-fosfat tamponu içerisinde çözülerek (Xian *et al.* 2015), yine aynı pH'ya ayarlanmış içerisinde çözünebilir nişasta bulunan 400µl substrat çözeltisi ile karıştırılmış ardından 50 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda karışıma 200µl DNSA çözeltisi eklenerek 95 °C'de 15 dakika kaynatılmıştır. Örnekler direk buza alınarak üzerlerine 1 ml saf su eklenmiş ve abzorbars ölçümleri 540nm'de gerçekleştirilmiştir (Fossi *et al.* 2005).

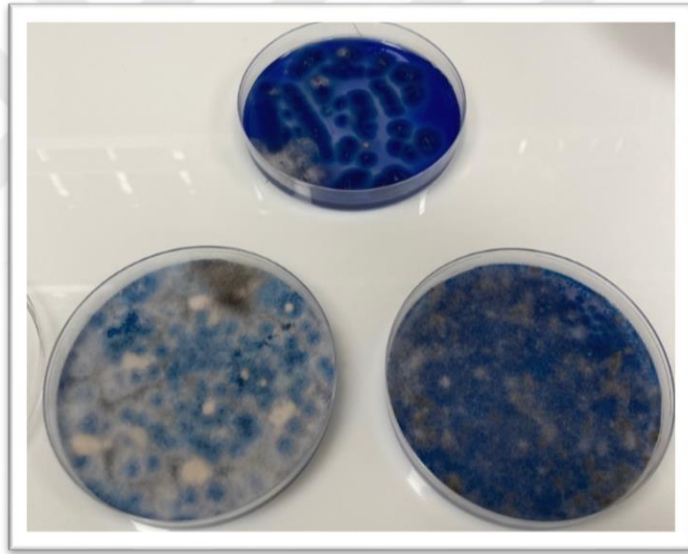
İstatistiksel analizler

Deneylerin tamamı üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Deney sonuçları arasındaki farklılıkların önemli olup olmadığı, SPSS istatistik programında tek yönlü ANOVA kullanılarak p0.05 önem seviyesinde hesaplanmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Fungusların İzolasyonu, Seleksiyonu ve Moleküler Karakterizasyonu

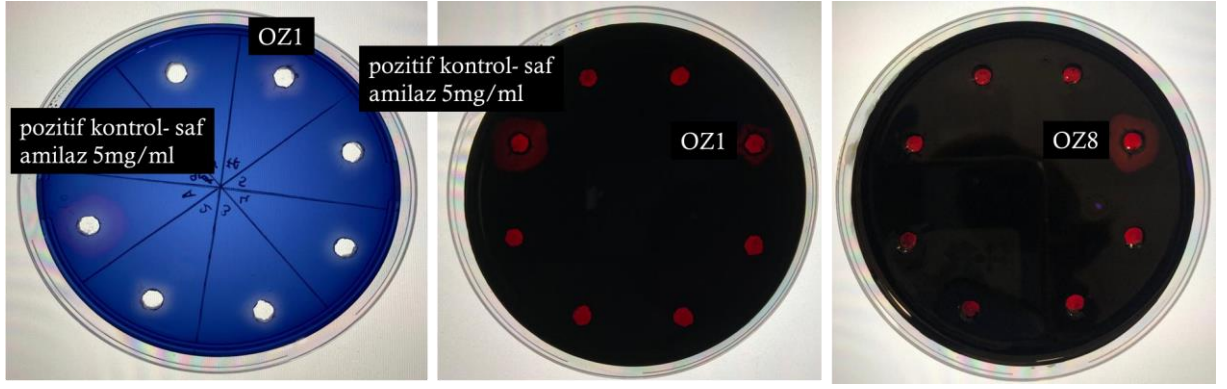
Toprak örneklerinden 1 gr tartılarak 10 ml steril fizyolojik su içerisinde süspanse edilmiş ve hazırlanan seri dilüsyonlardan 0.1ml inokülasyon için kullanılmıştır. Patates yumruları ise özellikle çürümenin gözlemlendiği bölgelerden steril bisturi ile 1 gr kadar kesildikten sonra 10ml steril fizyolojik su içerisinde homojenize edildikten sonra hazırlanan seri dilüsyonlardan 0.1ml inokülasyon için kullanılmıştır. Ayrıca bölgemizde bulunan bir un fabrikasından uzun zamandır patates artıkları ve nişasta üretim artıklarının bulunduğu alanlardan da örneklemeler yapılarak çalışmaya dahil edilmiştir. İzolasyon ve seleksiyon için hazırlanan tek karbon kaynağı olarak içerisinde çözünür nişasta bulunan besiyerlerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. İzolasyon aşamasında kullanılan Petriler Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Tek karbon kaynağı olarak nişasta içeren besiyerinde üreyen koloniler

Şekil 2’den de anlaşılacağı üzere çalışılan örneklerde filamentöz fungusların baskın olduğu anlaşılmaktadır. Saflaştırılan koloniler aseptik şartlarda steril tüpler içerisine alınarak çalışma yapılncaya kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

İzolasyonlar sırasında 2 adet maya ve 3 adet filamentöz fungus olmak üzere toplam 5 adet farklı izolat elde edilmiştir. Seleksiyon aşamasında kullanılan tripan mavisi içeren petri ve kuyucukların etrafında oluşan hidroliz zonları Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 3. Tek karbon kaynağı olarak nişasta içeren ve indikatör olarak tripan mavisi içeren petri görüntüsü (A: pozitif kontrol- saf amilaz 5mg/ml).

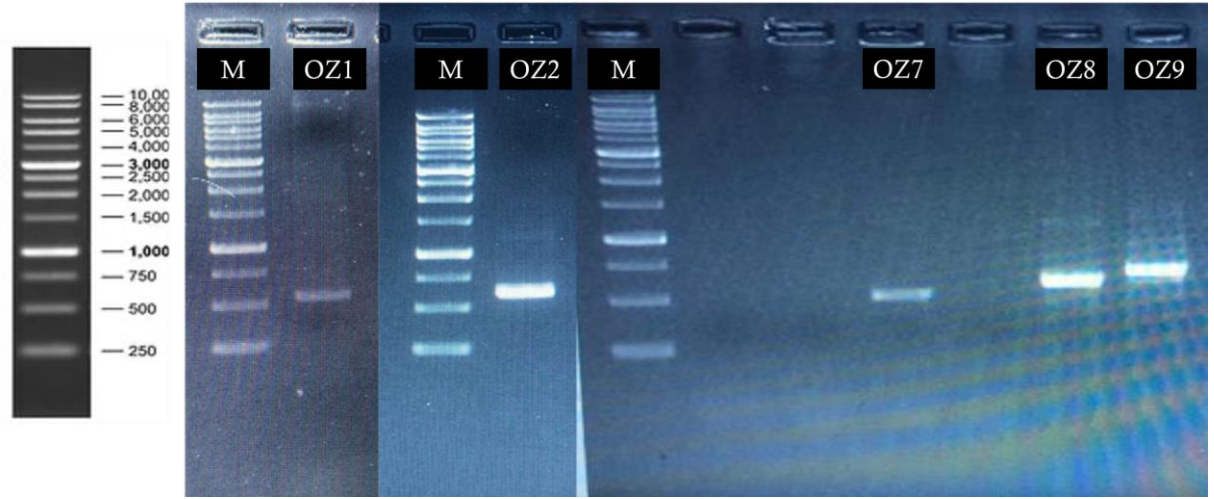
Şekil 3 incelendiğinde tüm izolatların indikatör olarak tripan mavisi içeren besiyerinde zon verdiği; ancak bu besiyerinin iyodin ile muamelesi sonucunda ise sadece OZ1 ve OZ8 izolatlarında zon görüldüğü anlaşılmaktadır. OZ8 izolatının saf amilaz ile aynı zon çapına sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar izolatların amilaz aktivitelerine göre yapılacak ön seçimlerde iyot muamelesinin daha güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Ardından bu izolatların moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmek için fenol-kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonlar sonucunda elde edilen DNA konsantrasyonları Nano Drop Cihazı ile ölçülmüş, miktar ve saflıkları ile birlikte Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Seçilen izolatlar a ait Nanodrop ölçüm sonuçları

İzolat	Konsantrasyon	Saflık
OZ1	93 ng/ µl	1.8
OZ2	112 ng/ml	1.8
OZ7	82 ng/ µl	1.8
OZ8	140 ng/ µl	1.8
OZ9	79 ng/ µl	1.8

Seçilen fungusların genomik DNA’ları PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmış ve hedef bölgenin çoğaltılması için ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılmıştır. PZR ürünleri hedef bölgenin doğrulanması için %1’lik agaroz jele yüklenerek 90V’da 50 dakika yürütülmüş ve Şekil 4’de verilen bantlar elde edilmiştir.



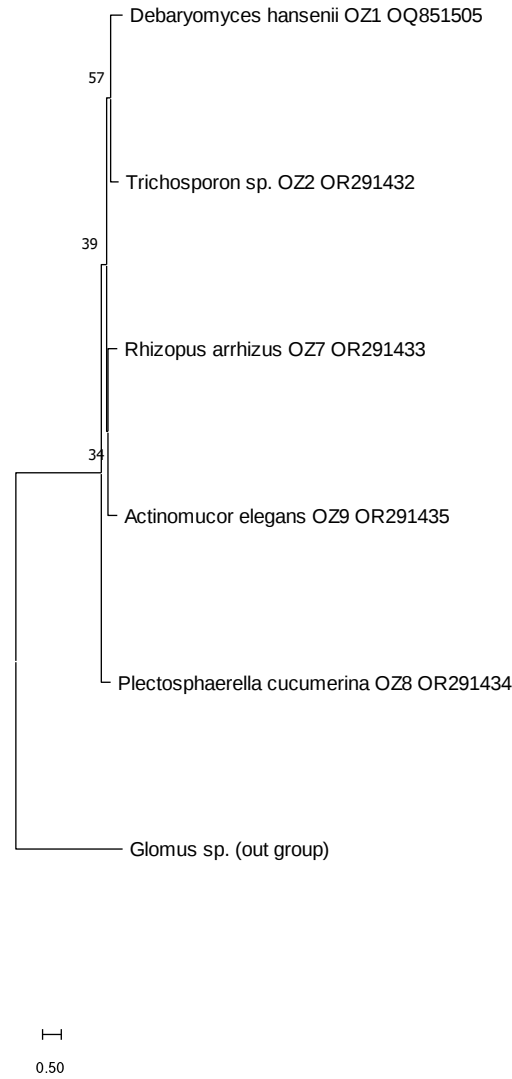
Şekil 4. ITS PZR sonuçları (sırasıyla; Marker, OZ1, Marker, OZ2, Marker, OZ7, OZ8 ve OZ9)

Şekil 4’de verilen bantlar incelendiğinde kullanılan en alttan ikinci bant olan 500bp’nın hemen üzerinde tek bantlar elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle PZR ürünlerinin sekans analizleri için jelden bant kesmek yerine PZR saflaştırma kiti kullanılarak dizilenmesine karar verilmiştir.

Dizileme reaksiyonları PZR için kullanılan ITS1 ve ITS4 primerleri ile çift yönlü olarak gerçekleştirilmiş, her izolat için dizilerden birinin ters komplementeri alınarak Bioedit programında birleştirilmiştir. Ardından elde edilen dizi NCBI Blast programı aracılığıyla programda kayıtlı diğer dizilerle karşılaştırılarak isimlendirilmiştir. Ayrıca elde edilen dizilerin GenBank’a girişleri yapılarak erişim numaraları alınmıştır (Tablo 7). İzolatlara ait filogenetik ağaç ise MEGA programı kullanılarak çizilmiş ve Şekil 5’de verilmiştir.

Tablo 7. İzolatların Tür İsimleri ve Erişim Numaraları

İzolat kodu	Tür ismi	Erişim Numarası
OZ1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	OQ851505
OZ2	<i>Trichosporon</i> sp.	OR291432
OZ7	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR291433
OZ8	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	OR291434
OZ9	<i>Actinomucor elegans</i>	OR291435



Şekil 5. İzolatlara ait filogenetik ağaç (*Glomus* sp. dış grup olarak dahil edilmiştir)

Tez çalışmasında *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon* sp., *Rhizopus arrhizus*, *Plectosphaerella cucumerina* ve *Actinomucor elegans* türleri tek karbon kaynağı olarak çözünebilir nişasta içeren besiyerinden izole edilmişlerdir. Özellikle *R. arrhizus* ve *A. elegans* türleri toprak ve çürümüş patates yumrularından hazırlanan süspansiyonlarda baskın olarak bulunmuştur. Bunun yanında *P. cucumerina* ilginç bir şekilde sadece un fabrikası sürüntüsünden izole edilmiştir. *P. cucumerina*, *Fusarium tabacinum* 'un telomorf evresi olup, genellikle bitki patojeni olarak bilinmektedir (Xu et al. 2014).

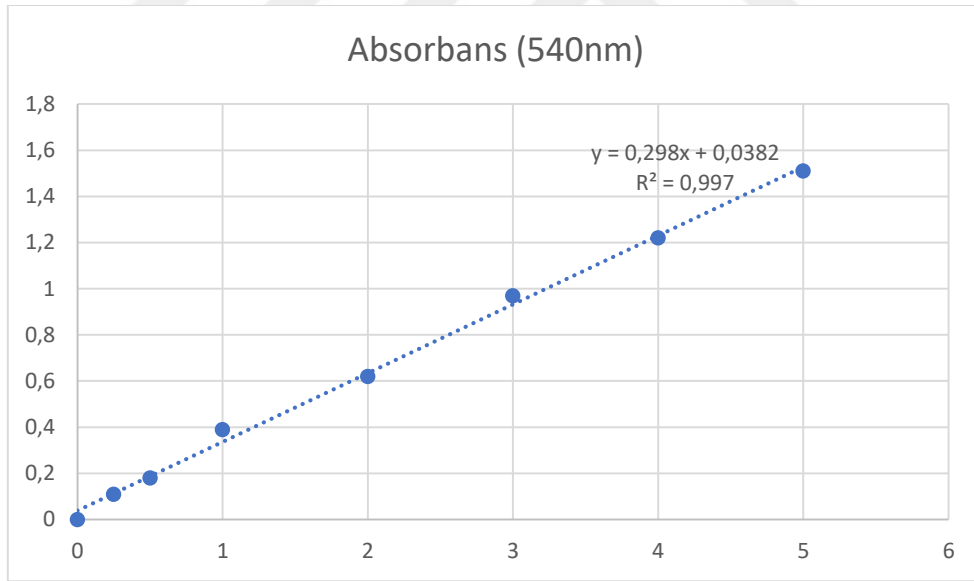
Fungus orijinli amilazların ticari ölçekte bakteriyel enzimlere göre daha stabil olduğu bilinmektedir (Abu et al. 2005). Funguslardan *Aspergillus niger*, *A. awamori* ve *A. oryzae* ticari amilaz kaynakları arasında bulunur (Fossi et al. 2005). Önceki çalışmalarda *Mortierella alliacea* (Tanaka et al. 2002), *Aspergillus* spp. (Pandey and Singh 2012), *Fusarium oxysporum* (Rana et al. 2013), *Talaromyces pinophilus* (Xian et al. 2015), *Trichoderma pseudokoningii*

(Abdulaal 2018), *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *R. niveus* ve *R. delemar* (Paul et al. 2021) gibi birçok tür bu amaçla izole edilmiş ve aktivite çalışmalarına konu olmuştur.

Diğer taraftan maya kaynaklı amilazlarda ticarileşme açısından ümit vadetmektedir (Djekrif et al. 2016). Yapılan bir çalışmada patates atıklarından *Candida utilis*, *C. guilliermondii* ve *Trichosporon mucoides* izole edilmiş ve amilaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (Ouédraogo et al. 2012). Diğer çalışmalarda ise *Dioszegia fristingensis* (Carrasco et al. 2017), *Schwanniomyces castelli*, *S. fibuligera*, *Candida antarctica*, *C. lusitaniae*, *C. famata* ve *Cryptococcus* sp. gibi mayaların nişastayı hidrolize etme kabiliyetinde oldukları gösterilmiştir (Djekrif et al. 2016).

Seçilen İzolatların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 0,25-5 mM aralığında 7 farklı konsantrasyonda saf maltozla hazırlanan standartların DNSA reaktifi ile muamelesi sonucunda 540nm’de ölçümler alınarak standart eğri hazırlanmıştır. Oluşturulan standart grafiğin denklemi $y=0,298x+0,0382$ olup; regresyon katsayısı ise $R^2=0,997$ olarak hesaplanmıştır. DNSA ile hazırlanan maltoza ait standart eğri Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 6. Maltoz standart eğrisi (250-5000µM)

Enzim aktivitesinin ölçümü için, seleksiyon aşamasında enzim üretim sıvı besiyerinde 30 °C’de 150 rpm de 5 gün boyunca inkübe edilerek elde edilen kültür filtratlarından 400µl alınarak 400µl substrat çözeltisi ile karıştırılmış ardından 50 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda karışıma 200µl DNSA çözeltisi eklenerek 95 °C’de 15 dakika kaynatılmıştır. Örnekler direk buza alınarak üzerlerine 1 ml saf su eklenmiş ve abzorband ölçümleri 540nm’de gerçekleştirilmiştir. İzolatlara ait enzim aktiviteleri U/ml cinsinden maltoza ait standart eğri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Tablo 8’de verilmiştir.

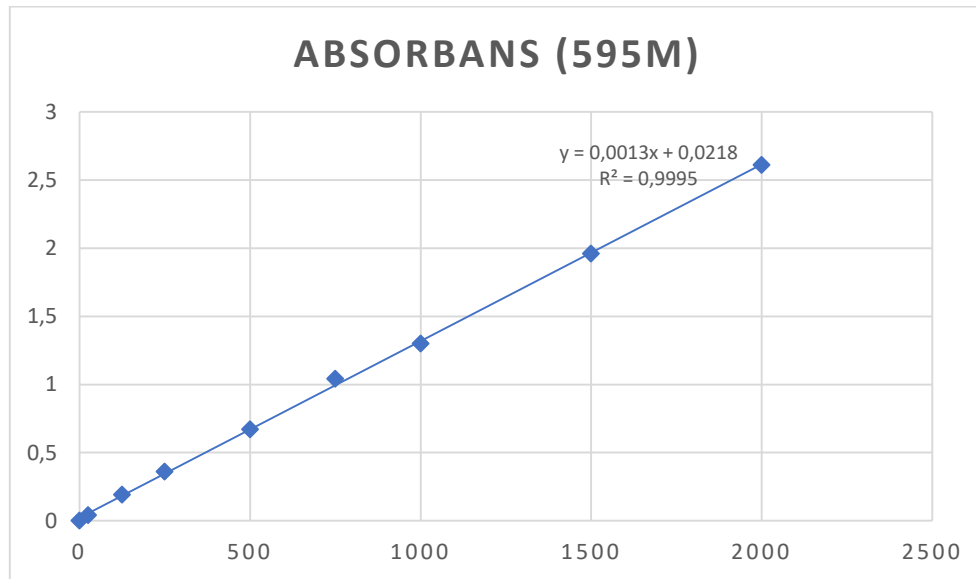
Tablo 8. Kültür Filtratından Ölçülen Enzim Aktiviteleri

İzolot kodu	Tür	Enzim Aktivitesi
OZ1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	39,93 U/ml
OZ2	<i>Trichosporon</i> sp.	ND
OZ7	<i>Rhizopus arrhizus</i>	ND
OZ8	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	187,58 U/ml
OZ9	<i>Actinomucor elegans</i>	ND

Yapılan çalışmada *Trichosporon* sp., *R. arrhizus* ve *A. elegans* tek karbon kaynağı olarak nişasta içeren besiyerinde gelişim göstermesine rağmen, aynı içerikteki sıvı besiyerinde 30 °C’de 150 rpm de 5 gün boyunca inkübasyon sonrasında DNSA ile yapılan ölçümlerde amilaz aktivitesi göstermemiştir. Bunun yanında *D. hansenii* 39,93 U/ml ve *P. cucumerina* ise 187,58 U/ml aktivite göstermiştir. Tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında en yüksek aktiviteyi gösteren izolat *P. cucumerina* OZ8 ile devam edilmiştir.

Kültür Filtratından Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Enzim Konsantrasyonunun Ölçümü

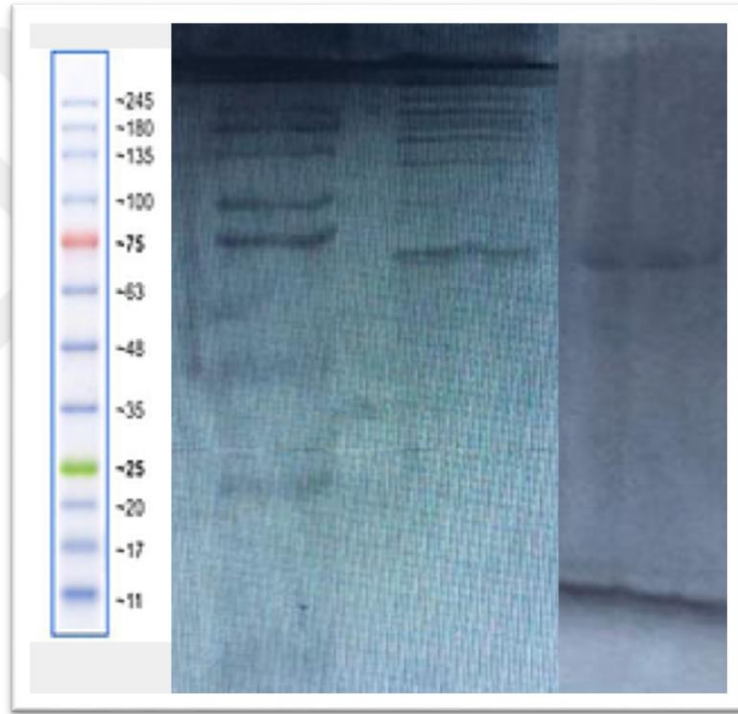
En yüksek aktiviteyi gösteren *P. cucumerina* OZ8 izolatına ait kültür filtratından TCA çöktürme yöntemi ile total protein izolasyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen protein peleti 1 ml 0.1 M sitrat-fosfat tamponunda çözülmuş ve hazırlanan standart eğriye göre konsantrasyonu belirlenmiştir. BSA ile hazırlanan standart grafik Şekil 7’de verilmiştir. Oluşturulan standart grafiğin denklemi $y=0,0013x+0,0218$ olup; regresyon katsayısı ise $R^2=0,9995$ olarak hesaplanmıştır.

**Şekil 7.** BSA ile hazırlanan standart grafik

BSA ile hazırlanan standart grafiğin formülü kullanılarak elde edilen total protein solüsyonunun konsantrasyonu 37µg/ml olarak belirlenmiştir.

SDS-PAGE

Kısmi saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığını belirleyebilmek için %15'lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Protein örneği, yükleme boyası ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve 95 °C'de 5 dakika boyunca kaynatılmıştır. Hazırlanan jele 30µl kültür filtratından ve kısmi saflaştırılmış enzim yüklenmiş, 90 V'da yürütülmüştür. Yürütme tamamlandığında jel kasetten alınarak, boyanmış ve proteinlerin görüntülenmesi amacıyla yıkama solüsyonunda 2 saat bırakılmıştır. İzlenebilir hale getirilen jelin görüntüsü, Bio-Rad jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflanarak Şekil 8'de verilmiştir.



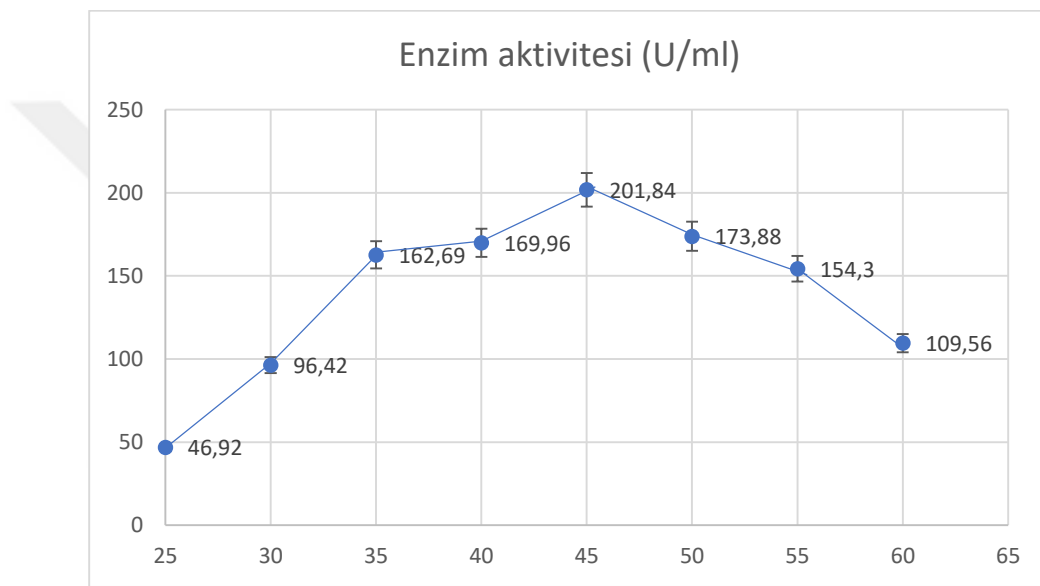
Şekil 8. SDS-PAGE görüntüsü (1. kuyucuk marker, 2. kuyucuk kültür filtratı, 3. kuyucuk kısmi saflaştırılmış enzime ait bant)

Kültür filtratına ait 2. kuyucukta bulunan yaklaşık 70 kDa boyutlarında en kalın bandın, 3. kuyucukta bulunan ve enzimin kısmi saflaştırılması sonucu elde edilen görüntüde de tek bant şeklinde bulunduğu Şekil 4.7.'de görülmektedir. Burada bantlar arasında gözlemlenen yoğunluk farkı kültür filtratının daha önceki çalışmalarda 2x laemmli sample buffer ile görüntü vermemesi bu nedenle kültür filtratının 10x laemmli sample buffer ile yüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca kısmi saflaştırılmış enzim solüsyonunun aktivite denemelerinde pozitif sonuç vermesi ve SDS-PAGE görüntüsünde ise tek bant vermesi, bu bandın aktiviteden sorumlu olduğu sonucuna varılmasına neden olmuştur. Yapılan literatür taramalarında hem *P.*

cucumerina hem de anamorfu *Fusarium tabacinum*'a ait amilaz enzimi bulunmamakla birlikte; UNIPROT protein veri bankasında 461 aa'den oluşan 50.8 kDa (A0A8K0TJL4) ve 589 aa'den oluşan 66.8 kDa (A0A8K0XA50) olmak üzere iki farklı hipotetik amilaza rastlanmıştır.

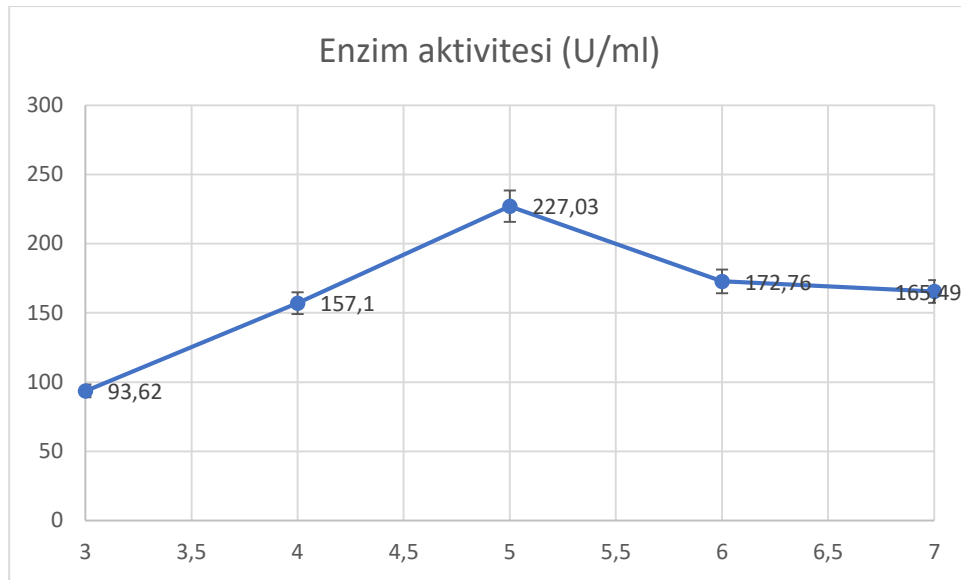
İzolat OZ8'e Ait Kısmi Saflaştırılmış Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklık ve Ph'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla kısmi saflaştırılmış enzimin 40 µl'si 360 µl sitrat-fosfat tamponu ile karıştırıldıktan sonra üzerine 400µl substrat çözeltisi eklenerek farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) kuru blok üzerinde 30 dakika süresince inkübasyona bırakılmıştır. Ardından daha önceden hazırlanan maltoz standart grafiğine göre enzim ünitesi hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Kısmi saflaştırılmış enzime ait farklı sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla kısmi saflaştırılmış enzimin 40 µl'si 360 µl pH'sı 3-7 olacak şekilde ayarlanmış sitrat-fosfat tamponu ile karıştırıldıktan sonra üzerine 400µl yine aynı pH'ya ayarlanmış içerisinde çözünebilir nişasta bulunan 400 µl substrat çözeltisi eklenerek 50 °C'de kuru blok üzerinde 30 dakika süresince inkübasyona bırakılmıştır. Ardından daha önceden hazırlanan maltoz standart grafiğine göre enzim ünitesi hesaplamaları yapılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. Kısmi saflaştırılmış enzime ait farklı pH'lar daki enzim aktiviteleri

Endüstriyel enzim üretim prosesinin uygulanabilir olduğu kadar ekonomik olması da gerekir (Paul *et al.* 2021). Mikrobiyal kaynaklı amilazlar; özellikle kararlı yapıları ile ön plana çıkmaktadırlar (Gupta *et al.* 2003; El-Kady *et al.* 2017). Enzimin kararlılığı, verimli çalışıp çalışmayacağını belirleyen faktörlerden biri olup endüstriyel uygulamaları verimli bir şekilde gerçekleştirmek için enzimin çok kararlı olması gerekir. Enzimin kararlı olması yüksek pH ve sıcaklık gibi zor şartlarda bile işlevsel olması demektir (Gupta *et al.* 2003).

Şekil 9 incelendiğinde enzim aktivitesi 25 °C'de en düşük (46,92 U/ml), 45 °C'de ise 201,84 U/ml ile en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. Bununla birlikte Şekil 4.9.'da ise enzim aktivitesinin pH 3'te en düşük (93,62 U/ml), pH 5'te ise en yüksek seviyeye (227,03 U/ml) ulaştığı pH'nın artması ile birlikte enzim aktivitesinin düştüğü anlaşılmaktadır.

Amilazlar, 2 ila 12 arasında değişen bir optimum pH'da izole edilmiş olup (Pandey *et al.* 2000); özellikle bakteriyel kaynaklardan elde edilen amilazların asidik pH'lar da aktif oldukları bilinmektedir (Yang *et al.* 2011). Diğer yandan funguslarla yapılan çalışmalar sonucunda genellikle pH 7 ve altında olan optimum aktiviteler görülmektedir. Örneğin *Mortierella alliacea* türünden saflaştırılan amilaz pH 5-6 aralığında (Tanaka *et al.* 2002); *Talaromyces pinophilus* türünden saflaştırılan amilaz pH 4-5 aralığında (Xian *et al.* 2015); bir maya türü olan *Dioszegia fristingensis* türünden saflaştırılan amilaz ise pH 5.5-6.5 aralığında optimum aktivite göstermektedir. Bununla birlikte endüstriyel proseslerde nişastaya uygulanan bazı ön işlemler, yaklaşık 4-5 gibi düşük bir pH'ta gerçekleştirilir. Nişastanın hidrolizinde ön işlemler için gereken koşullar, yüksek sıcaklık ve düşük pH'ya dayanıklı enzimlerin kullanımını gerektirir (Rana *et al.* 2013). Bu doğrultuda tez çalışmasında fungal bir kaynak olan *P. cucumerina* OZ8 izolatından elde etmiş olduğumuz amilazın pH 5'te optimum aktivite

göstermesi literatür ile uyumlu olmakla birlikte bazı endüstriyel prosesler için de avantaj sağlamaktadır.

Diğer taraftan, *Mortierella alliacea* (Tanaka *et al.* 2002) ve *Talaromyces pinophilus* (Xian *et al.* 2015) türlerinden saflaştırılan amilazlar 55 °C (Xian *et al.* 2015); bir maya türü olan *Dioszegia fristingensis* türünden saflaştırılan amilaz ise 37-40 °C aralığında optimum aktivite göstermektedir. Çeşitli *Aspergillus* türleri ile yapılan çalışmalarda ise optimum sıcaklıklar 40 ila 50 °C aralığında değişmektedir (Sharma and Satyanarayana 2013). Ayrıca *Fusarium oxysporum* un ürettiği amilazın optimumunun sıcaklık için 25–30 °C olduğu bildirilmiştir (Rana vd. 2013). Bu doğrultuda tez çalışmasında fungal bir kaynak olan *P. cucumerina* OZ8 izolatından elde etmiş olduğumuz amilazın 45 °C’de optimum aktivite göstermesi literatür ile uyumlu olmakla birlikte jelatinizasyon ve sıvılaştırma gibi ön işlemlerin 90-110 °C aralığında sıcaklıklarda (Burhan vd 2003) gerçekleştirilmesinden dolayı bu amaçla yapılacak endüstriyel prosesler için dezavantaj oluşturmaktadır. Ancak amilazları ekstrem şartlarda çalışmak için uygun hale getirmek yabancı tip α -amilazların yapısal proteinlerini değiştirmek hala iyi çözüm yollarından biridir (Paul *et al.* 2021). Bu bağlamda tez çalışmasında ortaya çıkarılan lokal olarak izole edilen yabancı OZ8 izolatına ait amilazın ileride özellikle gen mühendisliği uygulamaları veya protein mühendisliği yapılacak çalışmalarla endüstriyel uygulamalara daha uygun hale getirilebilmesi mümkündür.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son on yılda amilaz alanında çok sayıda gelişme yaşanmasına rağmen; endüstriyel talebin hem niteliğini hem de niceliğini sürekli artış göstermektedir. Bu talebin karşılanması için özellikle gen mühendisliği uygulamaları ile protein mühendisliği birleştirilerek daha verimli ve ekstrem koşullarda stabil kalabilecek enzimler ile yeni çözümler sunulmaya çalışılmaktadır. Rekombinant organizmaların oluşturulmasını içeren bu uygulamalarda şablon olarak çoğunlukla yabancı türler kullanılmaktadır. Bu nedenle enzimin üretim kapasitesini iyileştirmek ve kalitesini arttırmak için her zaman yeni üretici türlerin keşfine ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasında, amilaz üretici fungusların karbon kaynağı olarak nişasta içeren besiyerinde selektif izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından saflaştırılan izolatlar oluşturdukları zon çaplarına göre sınıflandırılmış, enzim aktiviteleri belirlenmiş ve en iyi zon veren izolatlar ITS bölgelerine göre moleküler düzeyde tanımlanmıştır.

Sonuçta *Rhizopus arrhizus* OZ7, *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 ve *Actinomucor elegans* OZ9 olmak üzere 3 filantöz fungus; *Debaryomyces hansenii* OZ1 ve *Trichosporon* sp. OZ2 olmak üzere 2 maya izolatu olmak üzere toplam 5 fungus izole edilmiştir. Kültür filtratlarından yapılan enzim aktivite ölçümlerinde yalnızca *Plectosphaerella cucumerina* OZ8 ve *Debaryomyces hansenii* OZ1 izolatları pozitif sonuç vermiş olup; çalışmaya en yüksek aktivite gösteren izolat olan *P. cucumerina* OZ8 ile devam edilmiştir. OZ8 izolatına ait enzimin kısmi saflaştırması sonrasında yapılan SDS-PAGE, sıcaklık ve pH denemelerinde; enzimin yaklaşık 70 kDa boyutlarında olduğu, aktivitesinin 45°C’de (201,84 U/ml) ve pH 5’te (227,03 U/ml) optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

İleride yapılacak çalışmalarda OZ8 izolatına ait enzimin amino asit dizisinin belirlenerek, veri bankalarında bulunan diğer amilazlarla karşılaştırılması, elde edilen diziye dayanarak üretilen primerlerle çoğaltım yapılarak kodlama bölgesinin ortaya çıkarılması önerilmektedir. Bu verilerin ortaya çıkarılması ile gelecek çalışmalarda enzimin rekombinant üretiminin yolu açılarak enzimlerin karakterizasyonlarında gerekli olan diğer kinetik parametrelerin çalışılması da mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abu, E.A., Ado, S.A. and James, D.B., 2005. Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *Afr J Biotechnol.*, 4, 785-790.
- Abdulaal, W.H., 2018. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC Biochemistry*, 19 (1), 1-6.
- Acourene, S. and Ammouche, A., 2012. Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *J India Microbiol Biotechnol.*, 39, 759-766.
- Ahlawat, S., Dhiman, S.S., Battan, B., Mandhan, R.P. and Sharma, J., 2009. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochem.*, 44, 521-526.
- Allala, F., Bouacem, K., Boucherba, N., Azzouz, Z., Mechri, S., Sahnoun, M. and Bouanane-Darenfed, A., 2019. Purification, biochemical, and molecular characterization of a novel extracellular thermostable and alkaline α -amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 558-574.
- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F. and Malik, K.A., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, 52 (3), 353-359.
- Anitha, G. and Muralikrishna, G., 2009. α -Amylase: structure and function relationship. *Trends Carbohydr Res.*, 1 (4), 1-11.
- Asgher, M., Javaid, M., Asad, S., Rahman, U. and Legg, R.L., 2007. Thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J Food Eng.*, 79, 950-955.
- Bhattacharya, S., Bhardwaj, S., Das, A. and Anand, S., 2011. Utilization of sugarcane bagasse for solid-state fermentation and characterization of α -Amylase from *Aspergillus flavus* isolated from *Muthupettai mangrove*, Tamil Nadu, India. *Aust J Basic Appl Sci.*, 5 (12), 1012-1022.
- Bilal, T., Malik, B. and Hakeem, K.R., 2018. Metagenomic analysis of uncultured microorganisms and their enzymatic attributes. *Journal of Microbiological Methods*, 155, 65-69.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A. and Osman, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38, 1397-1403.
- Carlsen, M., Spohr, A.B., Nielsen, J. and Villadsen, J., 1996. Morphology and physiology of α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol Bioeng.*, 49, 266-276.
- Carrasco, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V. and Baeza, M., 2017. Purification and characterization of a novel α -glucosidase from an Antarctic yeast *Dioszegia fristingensis* isolate. *Amylase*, 1 (1), 50-58.
- Chai, Y.Y., Rahman, R.N., Illias, R.M. and Goh, K.M., 2012. Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant α -amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 39, 731-741.

- Dharania, G. and Kumaran, N.S., 2012. Amylase Production from solid state fermentation and submerged liquid fermentation by *Aspergillus niger*. Bangladesh J Sci Ind Res., 47 (1), 99-104.
- Djekrif, D.S., Gillmann, L., Bennamoun, L., Ait-Kaki, A., Labbani, K., Nouadri, T. and Meraihi, Z., 2016. Amylolytic yeasts: Producers of α -amylase and pullulanase. Int J Life Sci Scienti Res., 2, 339-354.
- Dumoulin, Y., Cartilier, L.H. and Mateescu, M.A., 1999. Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: An enzymatically-controlled drug release system. Journal of Controlled Release, 60 (2-3), 161-167.
- El-Kady, E.M., Asker, M.S., Hassanein, M.S., Elmansy, E.A. and El-Beih, F.M., 2017. Optimization, production, and partial purification of thermostable α -amylase produced by marine bacterium *Bacillus* sp. NRC12017. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 9 (8), 558-570.
- Elumalai, P., Lim, J. M., Park, Y. J., Cho, M., Shea, P. J. and Oh, B.T., 2019. Enhanced amylase production by a *Bacillus subtilis* strain under blue light-emitting diodes. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 49 (2), 143-150.
- Far, B.E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A.Y. and Dilmaghani, A., 2020. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 10 (3), 350.
- Farooq, M.A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H.M., Mumtaz, S. and Mumtaz, S., 2021. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. Archives of Microbiology, 1, 1-12.
- Fossi, B.T., Tavea, F. and Ndouenkeu, R., 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of Biotechnology, 4 (1), 14-18.
- Ghorai, S., Banik, S.P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S. and Khowala, S., 2009. Fungal biotechnology in food and feed processing. Food Res Int., 42, 577-587.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: biotechnological perspective. Process Biochem., 38, 1599-1616.
- Hema, A., Ujjval, T. and Kamlesh, P., 2006. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. Department of Biosciences, Patel University, Vidyanagar, 1, 120-388.
- Joel, E.L. and Bhimba, B.V., 2012. Production of α -amylase by mangrove associated fungi *Pestalotiopsis microspora* strain VB5 and *Aspergillus oryzae* strain VBZ. Indian J Geo Marine Sci., 41 (3), 279-283.
- Kathiresan, K. and Manivannana, S., 2006. α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. Afr J Biotechnol., 5 (10), 829-832.
- Kaur, P. and Vyas, A., 2012. Characterization and optimal production of alkaline α -amylase from *Bacillus* sp. DLB 9. Afr J Microbiol Res., 6 (11), 2674-2681.
- Liao, B., Hill, G.A., Roesler, W.J., 2012. Stable expression of barley α -amylase in *S. cerevisiae* for conversion of starch into bioethanol. Biochem Eng J., 64, 8-16.
- Mitidieri, S., Souza Martinelli, A.H., Schrank, A. and Vainstein, M.H., 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. Bioresour Technol., 97, 1217-1224.
- Ngara, T.R. and Zhang, H., 2018. Recent advances in function-based metagenomic screening. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 16 (6), 405-415.

- Olsen, H.S.O. and Falholt, P., 1998. Role of Enzymes in Modern Detergency. *J Surfactants Deterg.*, 1, 555-567.
- Ouédraogo, N., Savadogo, A., Zongo, C., Somda, K.M. and Traoré, A.S., 2012. High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *International Food Research Journal*, 19 (4), 1463.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.*, 31, 135-152.
- Pandey, S. and Singh, S.P., 2012. Organic solvent tolerance of α -amylase from haloalkaliphilic bacteria as a function of pH, temperature, and salt concentrations. *Appl Biochem Biotechnol*, 166, 1747-1757.
- Paul, J.S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S. and Jadhav, S.K., 2021. Aspects and Recent Trends in Microbial α -Amylase: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1, 1-50.
- Prakash, O. and Jaiswal, N., 2010. Alpha-amylase: ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.*, 160 (8), 2401-2414.
- Pranay, K., Padmadeo, S.R. and Prasad, B., 2019. Production of amylase from *Bacillus subtilis* sp. strain KR1 under solid state fermentation on different agrowastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101300.
- Rana, N., Walia, A. and Gaur, A., 2013. α -Amylases from Microbial Sources and Its Potential Applications in Various Industries. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 36, 9-17.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, V., Nampoothiri, K.M, Soccol, C.R. and Pandey, A., 2006. α -Amylases from microbial sources—overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol.*, 44 (2), 173-184.
- Song, Q., Wang, Y., Yin, C. and Zhang, X.H., 2016. LaaA, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep-sea bacterium *Luteimonas abyssi* XH031T. *Enzyme and Microbial Technology*, 90, 83-92.
- Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi, R., Ramesh Kumar, V., Hari Anjana Meenakshi Nitya Nidhiya, K.A., Kavitha, G. and Lakshmi, R., 2011. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *Int J Eng Sci Technol.*, 3 (2), 1756-1763.
- Suribabu, K., Govardhan, T.L. and Hemalatha, K.P.J., 2014. Application of partially purified α -amylase produced by *Brevibacillus borostelensis* R1 on sewage and effluents of industries. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 691-697.
- van der Marc, M., van der Veen Bart J. and Dijkhuizen L., 2002. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol*, 94, 137-155.
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A. and Shirkot, C.K., 2012. Optimization of cellulase free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* strain CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. *Ann Microbiol.*, 94, 137-155.
- Xian, L., Wang, F., Luo, X., Feng, Y.L. and Feng, J.X., 2015. Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent α -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. *PLoS one*, 10 (3), e012153.
- Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F. and Chen, G., 2014. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochemistry*, 49 (1), 47-53.

- Yang, H., Liu, L., Li, J., Du, G. and Chen, J., 2011. Heterologous expression, biochemical characterization and overproduction alkaline α -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. Microb Cell Fact., 10, 77.
- Yaras, A., Veyis, S. and Dursun, O., 2011. Production of α -amylase in semi solid substrate fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*. Curr Opin Biotechnol., 10, 1016.
- Tanaka, Y., Aki, T., Hidaka, Y., Furuya, Y., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O., 2002. Purification and characterization of a novel fungal alpha-glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch-hydrolytic activity. Biosci Biotechnol Biochem., 66 (11), 2415-2423.
- Xu, J., Xu, X.D., Cao, Y.Y. and Zhang, W.M., 2014. First Report of Greenhouse Tomato Wilt Caused by *Plectosphaerella cucumerina* in China. Plant Dis., 98 (1), 158.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Zeynep ÖRTÜCÜ
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Kars Fen Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens, Biyoloji Anabilim Dalı (2023)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1.Ortucu Z., Barış O., A PRELIMINARY STUDY ON THE AMYLOLYTIC ACTIVITY OF <i>DEBARYOMYCES HANSENII</i> ISOLATE OZ-01. 10th INTERNATIONAL MARDİN ARTUKLU SCIENTIFIC RESEARCHES CONFERENCE. May 19-21, 2023 / Mardin, Türkiye	