

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİY-YL-2007-001**

Aspergillus flavus **HBF34'ÜN GLUKOAMİLAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

HAZIRLAYAN: Öznur ARAT

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN-2007

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİY-YL-2007-001**

***Aspergillus flavus* HBF34'ÜN GLUKOAMİLAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

HAZIRLAYAN: Öznur ARAT

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN-2007

ÖZ

Aspergillus flavus HBF34 suşu tarafından fermentasyon ortamında üretilen GA (Glukoamilaz) nişasta afinite kromatografi tekniği ile saflaştırıldı. Saflaştırılan GA'nın optimum pH ve sıcaklığı ile stabiliteleri saptandı. GA'nın farklı substratlar için Km ve Vmax değerleri ve substrat spesifiteleri bulundu. GA aktivitesi üzerine metal iyonları, inhibitörler, denatürantlar ve tuz tolerans testi uygulandı. GA'nın ham nişasta adsorpsiyonu saptandı. İnce tabaka kromatografisi ile amilazın tanımlanması yapıldı. Ayrıca PAGE, SDS-PAGE ve zimografi ile enzimin kaç adet olduğunu ve molekül ağırlıkları saptandı. Bulunan sonuçlar ilgili literatürlerle karşılaştırılarak GA'nın sahip olduğu birçok üstünlüklerden dolayı endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceği sonucuna varıldı.

ABSTRACT

GA starch produced by *Aspergillus flavus* HBF34 strain in fermentation medium was purified by affinity chromatography technique. Optimal pH and temperature of purified GA as well as its stability were determined. Km and Vmax values of GA for different substrates and its substrate specificity were estimated. Metal ions, inhibitors, denaturants and salt tolerance test were applied on the activity of GA. Raw starch adsorption of GA was determined. Identification of the amylase was carried out by thin layer chromatography. In addition, number of enzymes and their molecular weight were identified using PAGE, SDS-PAGE and zymography. By comparing with the related literature, the results gained have suggested that GA could be used in the industrial applications due to the features of GA.

ANAHTAR SÖZCÜKLER/KEY WORDS: *Aspergillus flavus*, amilaz, saflaştırma, karakterizasyon/ *Aspergillus flavus*, amylase, purification, characterization.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	I
TABLolar LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR VE SİMGELER	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamadaki Yeri	1
1. 2. Amilazlar	5
1. 3. Nişasta	15
1. 4. <i>Aspergillus</i>	16
2. MATERYAL VE METOD	19
2. 1. Kimyasallar	19
2. 2. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi	20
2. 3. Sporulasyon ve İnokulum Miktarının Belirlenmesi	20
2. 3. 1. Sporulasyon ortamının hazırlanışı	21
2. 4. <i>Aspergillus flavus</i> HBF34'ün fermentasyonu	22
2. 5. <i>Aspergillus flavus</i> HBF34'ün Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi	22
2. 6. Fermentasyon Ortamına Salınan Enzim Üretiminin Elektroforetik Olarak İzlenmesi	23
2. 7. Liyofilizasyon	24
2. 8. Enzimin Saflaştırılması	24
2. 9. İnkübasyon Süresinin Etkisi	25
2. 10. Enzim Aktivitesinin Ölçümü	26
2. 11. Glukoz Standardı	27
2. 12. Fermentasyon Ortamının Redüktör Şeker Tayini	28
2. 13. Protein Tayini	29
2. 13. 1. Kullanılan kimyasal maddeler	29

III

2. 14. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	29
2. 15. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	30
2. 16. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	30
2. 17. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi	31
2. 18. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	32
2. 19. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	32
2. 20. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	33
2. 21. Enzimin Tuz Toleransı	35
2. 22. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi	35
2. 23. Ham Nişasta Adsorpsiyonu	39
2. 24. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	40
2. 25. Elektroforez ve Zimografi	41
2. 25. 1. GA'nın molekül ağırlık tayini	41
2. 25. 2. Zimografi	42
2. 25. 3. SDS-PAGE, PAGE ve Zimografi İçin Gerekli Çözeltiler	43
2. 26. Verilerin Değerlendirilmesi	45
3. BULGULAR	46
3. 1. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi	46
3. 2. <i>A. flavus</i> HBF34 Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi	48
3. 3. Fermentasyon Ortamına Salınan Enzim Üretiminin Elektroforetik Olarak İzlenmesi	50
3. 4. Enzimin Saflaştırılması	51
3. 5. Glukoz Standardı	51
3. 6. Protein Tayini	52
3. 7. İnkübasyon Süresinin Etkisi	55
3. 8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	56
3. 9. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	58
3. 10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	63
3. 11. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi	65
3. 12. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	69

3. 13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	72
3. 14. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	74
3. 15. Enzimin Tuz Toleransı	79
3. 16. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi	80
3. 17. Ham Nişasta Adsorpsiyonu	84
3. 18. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	85
3. 19. Elektroforez ve Zimografi	86
4. TARTIŞMA	89
4. 1. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi	90
4. 2. <i>Aspergillus flavus</i> HBF34 Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi	90
4. 3. Fermentasyon Ortamına Salınan Enzim Üretiminin Elektroforetik Olarak İzlenmesi	92
4. 4. Enzimin Saflaştırılması	93
4. 5. İnkübasyon Süresinin Etkisi	94
4. 6. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	94
4. 7. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	95
4. 8. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	99
4. 9. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi	102
4. 10. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	103
4. 11. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	105
4. 12. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	107
4. 13. Enzimin Tuz Toleransı	111
4. 14. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi	112
4. 15. Ham Nişasta Adsorpsiyonu	115
4. 16. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	116
4. 17. Elektroforez ve Zimografi	116
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	120
ÖZET	123
SUMMARY	124
TEŞEKKÜR	125
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	143

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	<i>Aspergillus flavus</i> HBF34 amilaz fermentasyon ortamı.	22
Tablo 2.	GA aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisi.	25
Tablo 3.	Standart deney ortamı.	27
Tablo 4.	DNS çözeltisinin bileşenleri.	27
Tablo 5.	Redüktör şeker miktarının ölçümü.	28
Tablo 6.	Fermentasyon ortamının redüktör şeker miktarının tayini.	28
Tablo 7.	pH'ın etkisini incelemek için kullanılan deney ortamı.	31
Tablo 8.	1 mM metal iyonu içeren deney ortamı.	33
Tablo 9.	5 mM metal iyonu içeren deney ortamı.	34
Tablo 10.	10 mM metal iyonu içeren deney ortamı.	34
Tablo 11.	0.5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	36
Tablo 12.	1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	36
Tablo 13.	2 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	37
Tablo 14.	4 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	37
Tablo 15.	6 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	37
Tablo 16.	8 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	38
Tablo 17.	10 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.	38
Tablo 18.	İnkübasyon sonrası deney bileşenleri (Standart deney koşulları).	39
Tablo 19.	% 10'luk ayırma jelinin içeriği.	44
Tablo 20.	% 5'lik yoğunlaştırma jelinin içeriği.	44
Tablo 21.	Fungusların kalitatif amilolitik tarama sonuçları.	46
Tablo 22.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün fermentasyon ortamında zamana bağlı redüktör şeker, enzim aktivitesi, pH ve biyomas değişimi.	48
Tablo 23.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının nişasta afinite kromatografisi ile saflaştırılması.	53
Tablo 24.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün GA aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisi.	55
Tablo 25.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün GA aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	57
Tablo 26.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi.	60

Tablo 27.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı sıcaklıklardaki geride kalan aktivite %.	61
Tablo 28.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA aktivitesi üzerine pH' nın etkisi.	64
Tablo 29.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı pH'lardaki stabilitesi.	67
Tablo 30.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı pH'lardaki geride kalan aktivite %.	67
Tablo 31.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA aktivitesi üzerine substrat (çözünür patates nişastası) konsantrasyonunun (mg/mL) etkisi.	70
Tablo 32.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı substratlardaki Km ve Vmax değerleri.	71
Tablo 33.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının substrat spesifitesi.	73
Tablo 34.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi.	76
Tablo 35.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının tuz toleransı.	79
Tablo 36.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki inhibitörlerin etkisi.	82
Tablo 37.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki denatürantların etkisi	82
Tablo 38.	<i>A. flavus</i> HBF34 GA'sının farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı.	81
Tablo 39.	Standart proteinler, saflaştırılmış enzim ve direkt kültürdeki SDS-PAGE ve zimografi bantlarının Rf değerleri.	84
Tablo 40.	Fungus GA ve α -amilazlarıyla yapılan optimum sıcaklık literatür sonuçları.	96
Tablo 41.	Fungus GA ve α -amilazlarıyla yapılan optimum pH literatür sonuçları.	101
Tablo 42.	Farklı fungus GA'larının moleküler ağırlıkları.	118
Tablo 42.	Farklı fungus GA'larının moleküler ağırlıkları (devamı).	119

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Amilolitik enzimlerin sınıflandırılması	8
Şekil 2.	Glukoamilaz enziminin bölümleri	14
Şekil 3.	Amiloz ve amilopektin yapısı	16
Şekil 4.	Amilolitik aktivitenin taranması.	47
Şekil 5(a).	<i>Aspergillus flavus</i> HBF34'ün sporulasyon ortamındaki görüntüsü.	47
Şekil 5(b).	<i>A. flavus</i> HBF34'ün malt ekstrakt agar ortamındaki görüntüsü.	47
Şekil 6.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün büyüme eğrisi ve kültür ortamının pH değişimi.	49
Şekil 7.	<i>A. flavus</i> HBF34 kültür ortamındaki redüktör şeker ve enzim aktivite değişimi.	49
Şekil 8.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün fermentasyon ortamına saldıgı amilazın elektroforetik olarak izlenmesi.	50
Şekil 9.	Glukoz standart eğrisi.	54
Şekil 10.	Protein standart eğrisi.	54
Şekil 11.	İnkübasyon zamanının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	56
Şekil 12.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün GA aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	57
Şekil 13.	GA'nın farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite yüzdesi.	62
Şekil 14.	GA'nın 10 saatlik geride kalan aktivite yüzdesi.	62
Şekil 15.	GA'nın günlük geride kalan aktivite yüzdesi.	63
Şekil 16.	<i>A. flavus</i> HBF34'ün GA aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.	64
Şekil 17.	GA'ın farklı pH'lardaki (3.0-6.0) stabilitesi.	68
Şekil 18.	GA'nın farklı pH'lardaki (6.0-9.0) stabilitesi.	68
Şekil 19.	GA aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis- Menten Grafiği).	70
Şekil 20.	GA aktivitesi üzerine çözünür patates nişastası konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).	71
Şekil 21.	GA aktivitesi üzerine glikojen konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).	71

Şekil 22.	GA aktivitesi üzerine amilopektin konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).	72
Şekil 23.	GA aktivitesi üzerine amiloz konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).	72
Şekil 24.	GA aktivitesi üzerine Mn, Ca, Ba ve Co iyonlarının etkisi.	77
Şekil 25.	GA aktivitesi üzerine Ni, Mg, Li, K, NH ₄ ve Na iyonlarının etkisi.	77
Şekil 26.	GA aktivitesi üzerine Cu, Se, Fe, Hg, Zn ve Al iyonlarının etkisi.	78
Şekil 27.	GA aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.	78
Şekil 28.	GA aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisi.	80
Şekil 29.	GA aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi.	83
Şekil 30.	GA aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi.	83
Şekil 31.	GA aktivitesi üzerine denatürantların etkisi.	84
Şekil 32.	Nişastanın enzimatik hidrolizi.	85
Şekil 33.	<i>A. flavus</i> HBF34 glukoamilazının zimografi ve elektroforez görüntüleri.	87
Şekil 34.	SDS-PAGE protein standart eğrisi.	88

KISALTMALAR VE SİMGELER

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
[S]	Substrat konsantrasyonu
°C	Derece santigrad
BSA	Sığır serum albumini
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNS	Dinitro salisilik asit
g	Gram
<i>g</i>	Yer çekimi ivmesi
GA	Glukoamilaz
HBF34	Halil Bıyık Fungus 34
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kDa	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten sabitesi
L	Litre
M	Molar
mbar	Milibar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mm ³	Milimetre küp
mmol	Milimol

N	Normal
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
Ort.	Ortalama
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
pH	H ⁺ iyonu konsantrasyonu
psi	Basınç birimi (pound/inch ²)
R ²	Tamamlayıcılık katsayısı
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
SH grubu	Sülfidril grubu
TEMED	Tetrametil etilen diamin
TLC	İnce tabaka kromatografisi
U	Enzim ünitesi
V	Volüm aktivite
V _{max}	Maksimum enzim aktivitesi
APS	Amonyum persülfat
EDTA	Etilen-diamintetra-asetik asit
EGTA	Etilen-glikol-eterdiamin asetik asit
MEA	Malt ekstrakt agar

GİRİŞ

1.1. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamadaki Yeri

Günümüzde mikroorganizmalar metabolik ve enzimatik çeşitliliğiyle önemli bir endüstriyel kaynağa sahiptir. Geleneksel endüstriyel mikrobiyoloji, ekmek, bira, şarap, alkollü içecekler, sirke, peynir, süt ve sebzelerin saklanması, turşu ve damadımıza hoş gelen diğfer fermente ürünleri elde etmede binlerce yıldır mikroorganizmalardan önemli faydalar sağlamıştır. Endüstriyel mikrobiyolojinin ikinci büyük evresi 20. yüzyılın başlarında başlamıştır. Endüstriyel fermentasyonun bu altın çağında, ilk büyük ölçekli fermentasyon yöntemleri ile çözücüler, organik asitler, vitaminler, enzimler ve diğfer ürünlerin üretimi yapılmıştır. 20. yüzyılın ortasında antibiyotik fermentasyonlarıyla penisilin ve streptomisinin üretim işlemleri başlamıştır.

Mikrobiyal kaynakların kullanımına bağılı olarak, endüstriyel enzimlerin gelişimi, yavaş bir şekilde olmuştur. Endüstriyel enzim pazarı 1998'de 1.6 milyar dolara ulaşmıştır. Bu pazarın % 45'i besin (% 11'i nişastanın işlenmesini temsil etmekte), % 34'ü deterjan, % 11'i tekstil, % 3'ü deri, % 1.2'si kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde uygulama alanına sahiptir. Buna tanısal ve tedavi edici enzimler dâhil edilmemiştir. 2000 yılında, endüstriyel enzim pazarı 2 milyar dolara ulaşırken, günümüzde ise bu pazar gittikçe büyümektedir (Barredo, 2005).

Mikroorganizmalar bizim için birçok nedenden önemlidir, fakat en önemlisi üretilme değıeridir. Bitki ve hayvanlardan veya kimyacılar tarafından sentez edilebilen maddelerin üretimi yerine, mikroorganizmaların kullanımının asıl nedenleri şunlardır:

- Yüzey alanının hacme oranın büyük olması, metabolizma ve biyosentezin desteklenmesi için gerekli besinlerin hızlı girişini kolaylaştırmaktadır.
- Mikroorganizmalar çok çeşitli reaksiyonları yapabilme yeteneğindedirler.

- Farklı çevrelere adapte olma yetenekleri sayesinde, mikroorganizmaların doğadan laboratuvar erlenine veya fabrika fermentörüne nakledilmesi kolaydır.
- Ucuz karbon ve nitrojen kaynaklarında gelişebilme yetenekleri sayesinde oldukça değerli bileşiklerin üretimi yapılabilmektedir.
- Tarama işlemlerinin çok basit olması binlerce mikroorganizmanın oldukça kısa zamanda incelenmesine izin vermektedir.
- Geniş bir çeşitliliğe sahip olmaları nedeniyle, farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen oldukça farklı enzimleri üretmeleri, reaktördeki işletim şartlarına göre bir esneklik sağlar.
- Genetik manipulasyonların kolaylığı sayesinde hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak binlerce kata kadar üretimi artırmak, yapıları ve aktiviteleri değiştirmek ve tümüyle yeni ürünleri yapmak gibi kullanım nedenleri vardır (Barredo, 2005).

Mikroorganizmaların hepsi endüstriyel olarak kullanılmamakla birlikte “endüstriyel mikroorganizmalar” ürettikleri bir veya birden fazla spesifik ürüne göre çok dikkatli bir şekilde klasik tarama teknikleriyle doğadan seçilmektedirler (Ogawa and Shimizu, 1999). Endüstriyel mikroorganizmaların bütün suşlarının tek kaynağı doğadır. Bir endüstriyel fermantasyon işleminin geliştirilmesindeki ilk aşama yada diğer bir deyişle doğadan seçilen bir mikroorganizmanın endüstriyel olarak kullanılabilmesinin birinci şartı, istenilen spesifik ürünü diğer mikroorganizmalardan çok daha fazla üretebilmesidir. O halde öncelikle, istenilen ürünü en fazla üretebilen mikroorganizmanın, doğadan seçilerek izole edilmesi gerekmektedir. Bunun için gerekliyse önce bir zenginleştirme uygulandıktan sonra agar ortamında istenilen ürünün üretilip üretilmediği test edilmelidir. Bu test, genellikle agar ortamında büyüyen kolonilerin etrafında oluşan metabolit difüzyonun oluşturduğu zon çapının ölçülmesiyle belirlenmektedir (Møller et al., 2004; Lowe et al., 2005). Ortam bileşenleri aranan metabolitin seçimine uygun olarak düzenlenmelidir. Örneğin; enzimler için bir görüntüleme yapılırken, ortamın aranan enzim için gerekli indükleyicileri içermesi ve enzim sentezini baskı altına alan bileşenleri içermemesi gerekmektedir.

Eleme yapıldıktan sonra bir endüstriyel suşun geliştirilmesinde yani veriminin arttırılmasında kullanılan klasik mikrobiyal biyoteknolojik yöntemlerin en önemlisi, mutasyon-seleksiyondur. Mutasyon vejetatif olarak haploit safhada bulunan mikroorganizmalar için çok etkin olurken, diploid veya çok nukleuslu mikroorganizmalarda pek kullanılmamaktadır. Endüstriyel bir mikroorganizmanın geliştirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem genetik rekombinasyondur. Bu nedenle, endüstriyel mikroorganizmanın seksüel veya bazı paraseksüel işlemlerde genetik rekombinasyon yeteneğinde olması istenmektedir. Seksüeliteye sahip olmayanlarda hibrit oluşturmak için “protoplast füzyon” tekniği de oldukça yararlıdır. Enzimatik regülasyon yaparak da endüstriyel suşların verimliliklerinin arttırılması yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Klasik mikrobiyal biyoteknolojik yöntemlerin dışında son yıllarda endüstriyel suş geliştirmede sıklıkla kullanılan diğer bir teknik de genetik mühendislik yöntemleri kullanarak rekombinant mikroorganizmaların oluşturulmasıdır (Reilly, 1999; Nielsen and Borchert, 2000; Eltem, 2004; Barredo, 2005).

Endüstriyel olarak temel olan önemli ürünler mikrobiyal hücreler, enzimler ve metabolitlerdir. Birinci grupta istenen ürün hücrenin kendisidir. Ekmekçilikte, gıda katkı maddesi olarak ve hayvan yemi olarak kullanılan maya hücreleri en önemli örnektir. Maya hücreleri endüstriyel olarak büyük ölçekte üretilerek, amaca göre yaş veya kuru formda kullanılmaktadır (Gupta et al., 2003). Yemeklik olarak üretilen şapkalı mantarlarda (kültür mantarları) bu gruptandır. Mikroorganizmalar tarafından çok çeşitli enzimler üretilmektedir. Ticari olarak öneme sahip olan bazı enzimler mikrobiyal fermantasyon işlemleriyle büyük ölçeklerde üretilmektedir. Bunlara nişastayı (amilazlar), proteinleri (proteazlar, renin) ve yağları parçalayan (lipazlar) enzimleri örnek olarak verebiliriz. Ayrıca diğer önemli endüstriyel enzimlere fruktoz şurubu eldesin de kullanılan, büyük miktarlarda üretilen glikoz izomeraz ile yarı-sentetik penisilinlerin endüstriyel olarak yapımında kullanılan penisilin açılaz enzimini örnek verebiliriz (Crabb and Shetty, 1999; Van der Maarel et al., 2002). Mikrobiyal metabolitler (primer ve sekonder metabolitler), mikroorganizmaların gelişimi için temel

ve temel olmayan küçük moleküller olup, endüstriyel olarak önemlidirler. Tüm canlı hücrelerin ara metabolizmalarının son ürünleri veya ara ürünleri olan primer metabolitler (amino asitler, nükleotidler, vitaminler, organik asitler ve etanol) çok küçük moleküllerdir. Mikrobiyal sekonder metabolitler ise sağlığımız ve beslenmemiz için aşırı derecede önemlidirler. Bu gruba antibiyotikler, diğer tıbbi bileşikler, toksinler, pestisitler, hayvan ve bitki gelişim faktörleri dahildir (Bennet and Klich, 1992; Pandey et al., 2000; Eltem, 2004)

Bütün organizmalar hücresel faaliyetlerini sürdürebilmek için küçük miktarlarda çok çeşitli enzimleri üretmektedir. Günümüze kadar tanımlanmış olan 3000'den fazla enzimin büyük bir çoğunluğu mezofilik organizmalardan izole edilmektedir. Buna karşılık bazı enzimler bazı organizmalar tarafından çok yüksek miktarlarda üretilmekte ve hücre içinde tutulmayarak hücre dışına salgılanmaktadır. Ekstraselüler enzimler olarak isimlendirilen bu enzimler protein, nişasta ve selüloz gibi suda çözünmeyen polimerleri parçalama yeteneğindedir. Bu ekstraselüler enzimlerin bazıları gıda, tekstil ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaktadır ve mikrobiyal sentez yoluyla büyük miktarlarda üretilmektedir (Bennet and Klich, 1992; Crabb and Shetty, 1999; Maheshwari et al., 2000; Pandey et al., 2000; Van der Maarel et al., 2002; Gupta et al., 2003; Eltem, 2004).

Son yıllarda enzim terminolojisinde ortaya çıkan yeni bir terim olan “ekstremozimler” ise ekstrem çevrelerde yaşayan prokaryotlardan elde edilen enzimleri ifade etmektedir. Ekstremozimler, ekstrem olarak yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, çok yüksek tuz, çok yüksek asit veya alkalik pH'larda yaşayan ve “ekstremofiller” olarak isimlendirilen mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bu enzimleri yüksek miktarlarda üreten mikrobiyal kaynakları doğadan izole etmek için, çeşitli yöntemler kullanılmakta ve yeni mikrobiyal kaynakların araştırılması sürekli olarak devam etmektedir. Burada biyoçeşitlilik önemli bir konu olup, farklı ve ekstrem çevrelerden izole edilen mikroorganizmalar önemli enzim kaynakları olarak düşünülmektedir (Lin et al., 1998; Eltem, 2004; Petrova et al., 2000).

1.2. Amilazlar

Amilazlar; glukoz ünitelerinin polimerleşmesiyle oluşmuş nişasta molekülünü hidrolize ederek dekstrinler gibi çeşitli ürünlerin oluşumunu sağlayan enzimlerdir. Amilazların tarihi, Kirchoff'un 1811'de nişasta parçalayan ilk enzimi keşfetmesiyle başlamıştır. Bunu, malt amilazlarının ve sindirim amilazlarının keşfi takip etmiştir. 1930'lara gelindiğinde Ohlsson malttaki nişasta sindiren enzimlerin, enzim reaksiyonu sonucunda ürettikleri anomerik şeker tiplerine göre α ve β amilazlar olarak sınıflandırılmasını önermiştir (Gupta et al., 2003).

Hayvanlar ve bitkilerde de bulunmasına karşılık amilazlar en yaygın olarak mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen ve birçok durumda ekstraselüler olarak salgılanan amilazlar oldukça farklı özelliklere sahiptirler. Amilazların ticari üretiminde daha çok bakteri ve fungus türleri kullanılmaktadır (Bennet and Klich, 1992; Crabb and Shetty, 1999; Pandey et al., 2000; Van der Maarel et al., 2002; Gupta et al., 2003; Wanderley et al., 2004; Gomes et al., 2005). Gram pozitif bakteriler ve özellikle *Bacillus* cinsi amilaz üretiminde ilk sırayı almaktadır. Fungusların amilaz üreten en yaygın cinsi ise özellikle *Aspergillus*'dur. Son yıllarda ise mayaların amilolitik aktiviteleri üzerine ilgi artmakta ve bu grupta da birçok çalışma yapılmaktadır (Fogarty and Kelly, 1990).

Amilazlar önemli enzimler arasındadır ve günümüz biyoteknolojisinde büyük bir öneme sahiptir. Amilazlar endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır. Amilazlar denildiğinde glukoamilaz (GA), β -amilaz ve α -amilaz referans olarak alınır. Fungal α -amilaz ve glukoamilazlar, bakteriyel glikoz izomeraz (xylose izomeraz) ile birlikte halen nişastanın glukoz ve fruktoz karışımlarına dönüştürülmesinde kullanılmaktadır. Bu "yüksek fruktozlu mısır şurupları" olarak bilinmekle birlikte, endüstriyel enzim pazarında da 1 milyar dolarlık paya sahiptir. Deterjan katkı maddesi olarak enzimlerin kullanımı halen endüstriyel enzimlerin en

büyük uygulamasını temsil etmektedir. Proteazlar, lipazlar, amilazlar, oksidazlar, peroksidazlar ve selülazlar deterjanlara eklenen başlıca enzimlerdir (Pandey et al., 2000; Reddy, 2003).

Ticari amilaz üreten suşların geliştirilmesinde gen klonlama yöntemleri kullanılmaktadır. Gen klonlamasının en temel amaçları; termostabil enzimlerin ifadesi, yüksek enzim verimliliği ve iki enzimin aynı organizmada ifadesinin sağlanmasıdır. Ticari olarak kabul edilen ürünlerin üretimi için uygun suşların seçimi tartışmalıdır. Uygun suşların seçimi; amilaz üretim işlemlerinde önemli bir faktördür. Bazen tek bir suş birden fazla enzim üretebilir. Örneğin; *Aspergillus niger* suşlarının çoğu 19 farklı enzim üretirken , 28 suşu da çok iyi derece de α -amilaz üretir (Pandey et al., 2000). Amilazların ticari üretimi çeşitli basamaklarda gerçekleşir. Çünkü, mikroorganizmaların optimum büyümesi için gerekli olan çevresel faktörler enzim üretimi için de kullanılır. Kullanılan bu parametreler şunlardır: Fermantasyon boyunca kontaminasyonun kontrolü, ortamın pH'sı, havalandırma derecesi ve ek besinlerdir. Fermantasyon aerobik şartlar altında meydana geliyorsa, ortamın saflığının devam etmesi çok önemlidir. Spesifik fermantasyon basamaklarının yapım aşamasındaki farklılığından dolayı amilaz üretimi için “katı kültür fermantasyonu” ve “batık fermantasyon” kullanılır. Katı kültür fermantasyonu; ekonomik olarak ve mühendislik bakımından avantajlarının görülmesi nedeni ile amilazların üretiminde sık kullanılır (Norouzian et al., 2006).

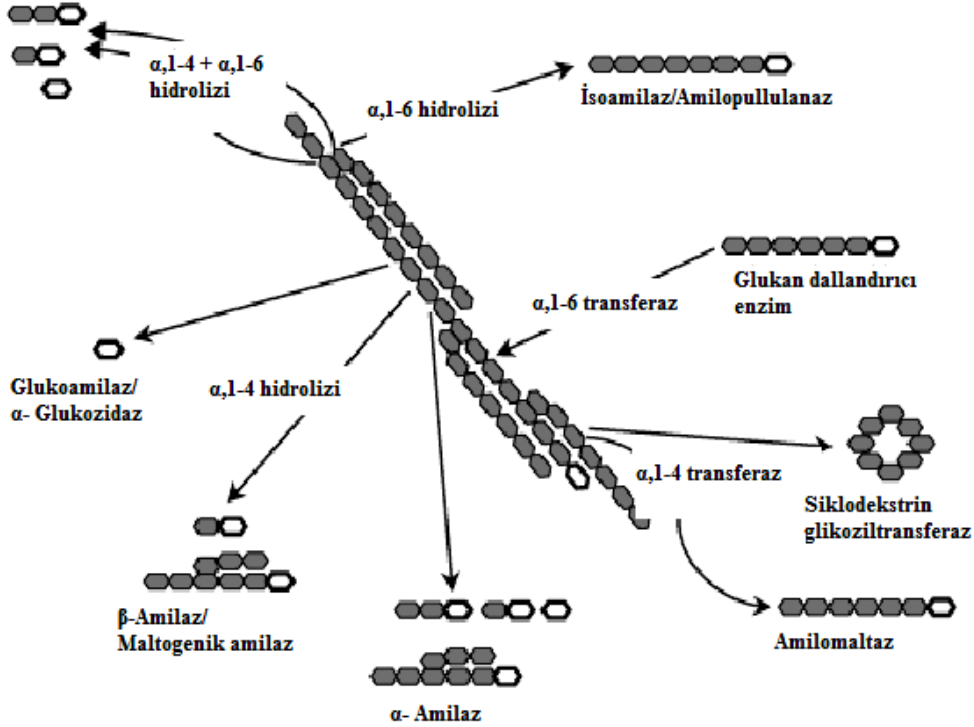
Endüstriyel uygulamalarda genellikle termostabiliteye sahip immobilize enzimler kullanılmaktadır. Termostabil mikroorganizmalardan elde edilen termofilik amilazlar da bu alanda oldukça önemli bir yere sahiptir (Kurakake et al., 1997; Bautista et al., 1999; Tanrıseven et al., 2002). Termostabil amilazların araştırılmasında (genellikle α -amilaz) ekstrem termofiller ve termofillerin enzimleri endüstriyel olarak çok yüksek potansiyelinin olması nedeniyle oldukça fazla araştırılmaktadır (Sunna et al., 1997). Mezofilik ve termofilik gruplar arasında olan ve daha yaygın olan fakültatif termofiller ise, daha az araştırılmıştır. Fakültatif termofiller genellikle mezofilik sıcaklık aralığında

(optimum 45 °C) büyüeyebilirler. Mezofilik ve termofilik sıcaklık aralığını da kapsayan, yüksek sıcaklıklarda da büyüme yetenekleri vardır. Bununla birlikte bu organizmaların enzim üretimi hakkında çok şey bilinmemektedir. İki grubun (mezofilik ve termofilik) fizyo-kimyasal ve yapısal özelliklerinin karşılaştırmalı analiziyle termostabil amilazların yüksek sıcaklığa tolerans yeteneklerinin moleküler düzeyi hakkında birçok bilgi elde edilmiştir (Nielsen and Borchert, 2000; Khajeh et al., 2001).

Nişasta molekülündeki bağları etkileyerek nişastayı hidroliz eden enzimleri başlıca dört grupta toplayabiliriz:

1. Endoamilazlar (α -amilaz),
2. Ekzoamilazlar (β -amilaz, glukoamilaz),
3. Dallanma kırıcı enzimler (isoamilaz, pullanaz),
4. Transferazlar (amilomaltaz, siklodekstrin glikoziltransferaz).

Endoamilazlar; nişasta içindeki α -1,4 bağlarını hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda α -anomerik ürünler oluşturur. Ekzoamilazlar; nişasta molekülündeki α -1,4 veya α -1,6 bağlarını redükleyici olmayan uçtan başlayarak hidrolize ederler ve hidroliz sonucunda α - veya β -anomerik ürünler oluştururlar. Dallanma kırıcı enzimler; sadece α -1,6 bağlarını hidroliz ederek uzun doğrusal ürünler oluştururlar. Transferazlar; donör molekülün α -1,4 glikozidik bağlarını ayırarak, alıcı molekülde yeni bir glikozidik bağ oluşturmak için transfer eder (Şekil 1) (Van der Maarel et al., 2002; Gomes et al., 2005; Cereia et al., 2006; Sivaramakrishnan et al., 2006)



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

β -Amilaz: β -Amilaz (α -1,4-glukan maltohidrolaz, E.C. 3.2.1.2) genellikle bitki orijinli olup, birkaç mikrobiyal suş tarafından da üretilir.

Şekil 1. Amilolitik enzimlerin sınıflandırılması (Van der Maarel et al., 2002)

Amiloz, amilopektin ve glikojen moleküllerini redükte olmayan ucundan başlayarak hidrolizleyen ekzoamilazdır. Glikozidik bağların hidrolizi sonucunda maltoz (β anomerik formu) oluşur. β -Amilaz amilopektin içindeki α -1,6-glikozidik bağlarına tamamen etki edemez, hidroliz sonucunda % 50-60 maltoz ve β -limit dekstrin oluşur. β -Amilazı *Clostridium* sp. (anaerobik), *Pseudomonas* sp. (aerobik) ve *Bacillus* sp. gibi bakteriyel suşların, *Streptomyces* sp. gibi aktinomiset suşların ve *Rhizopus* sp. gibi fungal suşların sentezlediği gösterilmiştir (Ha et al., 2001; Gupta et al., 2003).

α -Amilaz: α -Amilazlar (endo-1,4- α -D- glukoz glukohidrolaz, E.C. 3.2.1.1.), uzun amiloz zinciri içindeki glukoz üniteleri arasındaki 1,4- α -D-glikozidik bağlarını hidrolizleyen ekstraselüler enzimlerdir (Nguyen et al., 2002; Reddy et al., 2003; Aquino et al., 2003; Moreira et al., 2004). Davranış özelliklerine göre, substratın içindeki molekülleri etkileyen ve kalsiyumla birleşen endoamilazlardır. α -Amilazlar genellikle hayvan, bitki ve mikrobiyal türlerde yayılım göstermektedir. α -Amilazlar fungus, maya ve bakterilerden elde edilirler. α -Amilazlar birçok aktinomiset bakteri, maya ve funguslardan elde edilmesine rağmen, fungal ve özellikle bakteriyel kaynaklardan elde edilen enzimlerin, endüstriyel sektörlerde kullanımı daha yaygındır. Bakteriyel amilazlar, sağladığı birkaç karakteristik avantajdan dolayı (sıcaklık stabilitesi, pH gibi) tercih edilir. Başlıca *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* olmak üzere *Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp. suşları ticari uygulamalar için kullanılır (Gupta et al., 2003).

α -Amilazlar genellikle modifiye nişasta ve çözünür nişasta kullanılarak analiz edilirler. α -Amilaz, nişasta içindeki α -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalizleyerek glukoz, dekstrin ve limit dekstrinleri üretir. α -Amilaz aktivitesi çeşitli metotlarla tayin edilebilir. Bu metotlar; nişasta süspansiyonundaki viskozitenin azalması, substrat renk karışımının azalması, redükte şekerlerin artması, nişasta-iyot renk yoğunluğunun azalmasına dayanır (Bernfeld, 1955; Miller, 1959; Manonmani and Kunhi, 1999; Gupta et al., 2003).

Birçok mikroorganizmanın α -amilazının enzimatik ve fizikokimyasal özellikleri kapsamlı olarak tanımlanmış ve araştırılmıştır. Diğer enzimlerden ayrı tutulacak olursa, α -amilazın substrat spesifitesi mikroorganizmadan mikroorganizmaya çeşitlilik gösterir. Genellikle α -amilazların spesifitesi sırasıyla maltotrioz, glikojen, siklodekstrin, amilopektin, amiloz ve nişastaya doğru artış göstermektedir. α -Amilazların pH'sı 2.0 ile 12.0 arasında çeşitlilik arz ederler (Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001; Kusuda et al., 2003; Moreira et al., 2004; Wanderley et al., 2004). Bakteri ve fungus amilazlarının optimum pH'ları asidik ve alkali aralıkta değişir. α -Amilazlar genellikle pH 4.0 ile 11.0

arasında stabildir. Bununla birlikte stabilitesinin sınırlı olduğu alanlarda bulunmaktadır. α -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık mikroorganizmaların büyümesine bağlıdır (De Mot and Verachtert, 1987; Khoo et al., 1994; Aquino et al., 2003; Kusuda et al., 2003; Moreira et al., 2004). Optimum sıcaklığı çok düşük olan *F. oxysporum* amilazı için 25-30 °C gerekirken, optimum sıcaklığı çok yüksek olan *Pyrococcus wosei*, *Pyrococcus furiosus*, Archea α -amilazı için genellikle 100-130 °C gerekir (Gupta et al., 2003). α -Amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasındadır. Bazı α -amilazların moleküler ağırlığını karbohidrat kısımları yükseltir. Bakteriyal proteinlerin glikozilasyonu azdır (Lin et al., 1998; Gupta et al., 2003). Birçok metal katyonları, genellikle ağır metal iyonları, sülfidril grup ajanları, N-bromosüksinimid, p-hidroksilmerkuribenzoik asit, iyodoasetat, EDTA ve EGTA α -amilazı inhibe ederler. α -Amilaz, metalloenzimdir, çünkü yapısında en az bir Ca^{2+} iyonu bulunur. α -Amilazın kalsiyuma ilgisi diğer iyonlardan daha kuvvetlidir. Ca^{2+} , elektrodiyaliz ve EDTA ilave edilerek amilazlardan uzaklaştırılır. Kalsiyumu serbest enzimler, Ca^{2+} iyonları ortama eklendiği zaman yeniden aktive olurlar (Gupta et al., 2003).

Glukoamilaz: Glukoamilaz (EC 3.2.1.3, AG, amiloglukozidaz, GA, 1,4- α -D-glukan glukohidrolaz, glukojenik enzim, nişasta glukojenaz, γ -amilaz, maltaz) amiloz, amilopektin ve glikojenin redükte olmayan zincir sonlarından ardışık bağ hidroliziyle β -D-glukoz salınmasını sağlayan bir ekzo enzimdir. Enzim α -1,4- bağları için çok yüksek afiniteye sahip olmasına rağmen, aynı zamanda çok yavaş da olsa α -1,6- ve α -1,3- bağlarını da hidrolizleyecek afiniteye sahiptir. Glukoamilazlar mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler gibi kaynaklardan elde edilebilirler (Shenoy et al., 1985; Coutinho and Reilly, 1997; Crabb and Shetty, 1999; Reilly 1999; Maheshwari et al., 2000; Pandey et al., 2000; Sauer et al 2000; Norouzian et al., 2006). Ticari üretim avantajlarından dolayı, genellikle mikrobiyal kaynaklardan elde edilen GA'lar kullanılır.

Glukoamilazlar çoğunlukla funguslar tarafından oluşturulurlar ve genellikle ekstraselüler enzimlerdir. Malto-dekstrinlerin D-glukoza dönüştürülmesinde ticari olarak

kullanılan enzimler *Aspergillus niger* ve *Rhizopus* spp. suşlarından elde edilir (Norouzian et al., 2006).

A. niger kullanılan sıvı kültürlerde GA üretimi üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda hindistan cevizi suyu, çay suyu, mısır unu, buğday unu, fasulye unu, pirinç kapçığı, pirinç kepeği, buğday kepeği gibi tarım endüstrisi artıkları, GA üretim miktarının düzenlenmesinde kullanılmaktadır (Pandey et al., 2000; Gupta et al., 2003).

Birçok enzim, presipitasyon ve diyaliz işlemine tabi tutulduktan sonra, kromatografik tekniklerle saflaştırılır. Proteinlerin saflaştırılması için kullanılan kromatografik metotlar pahalı ve oldukça zaman alıcı tekniklerdir. Bu nedenlerden dolayı enzim saflaştırmalarında birden fazla teknik kullanmak tercih edilmemektedir. Saflaştırmanın kısa zamanda, tek bir adımda ve ucuz olan metotlarla yapılması tercih edilmektedir. Amilolitik enzimlerin ham nişastaya adsorbe olma özellikleri kullanılarak, son yıllarda yeni saflaştırma teknikleri geliştirilmiştir (Najafi and Kembhavi, 2005; Sivaramakrishnan et al., 2006).

Glukoamilazların optimum aktivite sıcaklığının genellikle 40 ve 60 °C arasında olduğu, ayrıca bir çoğunun yüksek sıcaklıklarda kısa zaman periyotlarında stabil olduğu bilinmektedir (El-Abyad et al., 1994; Vandersall et al., 1995; Silva and Peralta, 1998; Suresh et al., 1999; Pandey et al., 2000; Gomes et al., 2005; Norouzian et al., 2006).

Fungal glukoamilazların genellikle asidik pH'larda aktif oldukları ve geniş pH aralığında (pH 2.0 ile 11.0) stabil oldukları bulunmuştur (Fogarty and Kelly, 1990; Norouzian et al., 2006). *A. flavus* GA'ı ile yapılan iki çalışmada optimum pH değerinin 4.0 olduğu bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994; Gomes et al., 2005). Optimum pH'ları 3.5 ve 5.0 arasında çeşitlilik gösterir. *A. niger* Z10 pH 4.5-5.5 (Coral ve Çolak, 2000), *Aspergillus* sp. GP-21 pH 5.0-5.5 (Mamo and Gessesse, 1999), *A. tamarii* pH 4.5-5.0

(Moreira et al., 1999). *A. fumigatus* (Cherry et al., 2004) ve *A. luchuensis*'un optimum pH'sının 7.0 olduğu bulunmuştur (Marzan et al., 2005).

Fungal GA'lar Hg^{2+} iyonu tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken Mn^{2+} ve Fe^{2+} iyonları tarafından stimule edilir (Pandey et al., 2000; Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001; Najafi and Kembhavi, 2005; Cereia et al., 2006). *A. flavus* GA'sı ile yapılan tek çalışmada, GA'nın Hg^{2+} tarafından güçlü bir şekilde inhibe olduğu, Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} ve EDTA tarafından etkilenmediği bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994). *A. niger*'in GA aktivitesi üzerine Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} gibi katyonların inhibitör etkisinin olmadığı, polivalent anyonların ise enzimi aktive ettikleri bildirilmiştir (Fogarty and Benson, 1983). *Chaetomium thermophilum* GA'sının Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ve K^+ iyonları tarafından aktive edildiği, Fe^{2+} , Ag^+ ve Hg^{2+} tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Chen et al., 2005). *T. lanuginosus* ATCC 34626 GA'sının 10 mM konsantrasyonlarda Zn^{2+} iyonu tarafından inhibe edildiği, Co^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} ve EDTA tarafından aktive edildiği bulunmuştur. Mn^{2+} 'ın iyi bir aktivatör olduğu ve GA aktivitesini 1.5 kat arttırdığı bulunmuştur (Nguyen et al., 2002). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* GA'sı 1 mmol/L Mg^{2+} (% 27), Zn^{2+} (% 21), Ba^{2+} (% 8) ve Mn^{2+} (% 5) aktive etmiştir (Aquino et al., 2001).

GA'nın substratı hidrolizleme oranı moleküler büyüklük ve yapıyla hem de zincirdeki bağ tipiyle etkilenmektedir. Bu nedenle, α -1,4- bağlarının hidrolizlenme oranı, substratın nispi moleküler kütlesi ile en azından maltopentoza kadar doğrusal bir şekilde artmaktadır. Örneğin, *A. niger*'den elde edilen glukoamilazın nişasta, maltotrioz ve maltoz için nispi ilgileri sırasıyla 100, 68 ve 31 dir (Fogarty and Kelly, 1983).

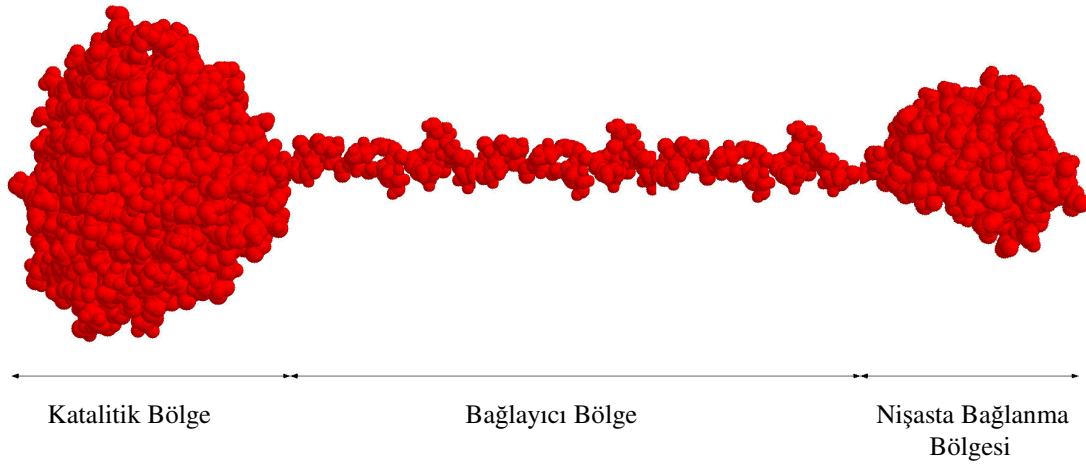
GA'lar geniş substrat spesifitesine sahiptirler. Zincir uzunluğundaki α -1,6- bağlarının artışı hidroliz oranının artışına sebep olmaktadır. Glukoamilaz çok uzun zincirlere karşı yüksek afiniteye sahiptir, bu nedenle Michaelis sabiteleri azalırken, enzimin maksimum hızı zincir uzunluğu ile artmaktadır. Michaelis-Menten kinetikleri

ile ürün inhibisyon etkilerini kullanılarak, nişastaya glukoamilazın etkisi için bir model tanımlanmıştır. Bu modele göre, V_{max} ve K_m 'in her ikisi de substrat molekül kütlesi ile değişmektedir (Fogarty and Kelly, 1990). K_m değerlerinin substrat molekülünün zincir uzunluğunun artmasıyla azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlarda moleküldeki uzun zincirlerin artmasıyla enzim ilgisinin arttığını, substrat ve enzimin aktif merkezi arasında etkileşiminde artmış olabileceği gösterilmiştir (Basaveswara Rao et al., 1981). Nguyen ve arkadaşları, *T. lanuginosus* ATCC 34626 Glukoamilazının K_m değerlerinin, substrat zincir uzunluğunun artmasıyla azaldığını bulmuştur. K_m değerleri maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz ve nişasta için sırasıyla 6.5, 3.5, 2.1, 1.1 ve 0.82 mg/mL olarak bulunmuştur (Nguyen et al., 2002).

Amilolitik enzimler tarafından substratın hidrolizlenmesiyle oluşan son ürünler (β -amilaz maltoz ve β -limit dekstrini, glukoamilaz D-glukozu, α -amilaz glukoz, dekstrin ve limit dekstrinleri üretir) kullanılarak enzimlerin tanısı yapılmaktadır. Bu son ürünlerin tanısında ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi teknikler kullanılarak yapılmaktadır. (Fogarty et al., 1994; Campos and Felix, 1995; Cereia et al., 2000; Aggarwal et al., 2001; Peixoto et al., 2003; Rivera et al., 2003; Das et al., 2004; Kusuda et al., 2004).

Glukoamilazlar hem nişasta bağlanma hem de katalitik bağlanma bölgeleri içerir. Bu iki bölümü birbirine O-glikozil bağlarıyla çubuk şeklinde amino asitlerden oluşan bir bağlayıcıyla bağlanır (Şekil 2). Nişasta bağlanma bölgesi ham nişasta (çözünmez nişasta) üzerine aktiviteden sorumludur. Proteazlar enzimin bu bölgesi üzerine etki ederek, ham nişasta üzerine olan aktivitesinde azalmaya sebep olabilirler. Glikoamilaz enzimleri değişik miktarlarda mannoz ve az miktarlarda da glikozamin içeren glikoproteinlerdir. Fungal glukoamilazların çoğu molekül ağırlıklarının % 10-20'si oranında karbohidrat bileşeni içermektedir. Karbohidrat içeriği enzimin üç boyutlu yapısını etkilememektedir fakat karbohidrat içeriğinin uzaklaştırılması ile termal stabilizasyon ve enzim salınımının azaldığı bildirilmiştir (Coutinho and Reilly, 1997;

Jafari-Aghdam et al., 2005; Norouzian et al., 2006). GA'ların molekül ağırlıklarının genellikle 25-112 kDa aralığında olduğu (Pazur et al., 1971; Vandersall et al., 1995; Kusuda et al., 2004), sadece *Saccharomyces cerevisiae* GA'nın molekül ağırlığının 150 kDa olduğu saptanmıştır (Moraes et al., 1999). Önemli bir endüstriyel enzim olan GA doğal olarak iki şekilde bulunur. Molekül ağırlığı büyük olana GAI ve küçük olana GAII adı verilir. *A. niger*'den elde edilen GAI enziminin molekül ağırlığı 82.500 Da'dur ve üç bölümden oluşur. Yaklaşık 440 amino asitten oluşan katalitik bölüm (N-terminal), 100 amino asitten oluşan granüler nişasta bağlanma bölümü (C-terminal) ve bu iki bölümü birbirine O-glikozil bağlarıyla çubuk şeklinde bağlayan 70 amino asitten oluşan bir bağlayıcı bölgeden oluşur. GAII enzimlerinde nişasta bağlanma bölgesi bulunmaz. Bu enzimlerin nişasta hidroliz aktiviteleri GAI enzimlerine göre daha azdır. Ancak maltooligosakkaritleri hidrolizlemeleri açısından diğer GA enzimleri ile aralarında aktivite farkı yoktur (Coutinho and Reilly, 1997; Bozkurt Uludağ, 2000; Morita and Fujio, 2000).



Şekil 2. Glukoamilaz enziminin bölümleri (Coutinho and Reilly, 1994)

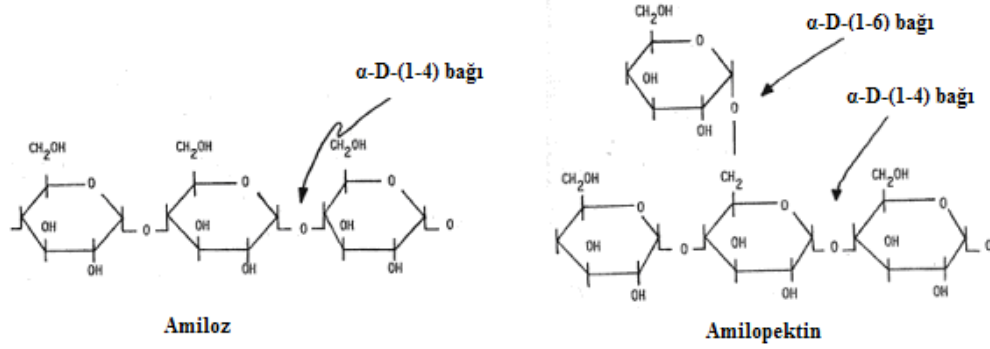
Aktif merkezde katalitik işlev gören amino asitler spesifik inhibitörler kullanılarak tayin edilir. Glukoamilazlar ile yapılan çalışmalarda genelde katalitik merkezde nişastanın hidrolizinden sorumlu amino asitler olarak histidin, triptofan, tirozin ve glutamik asit bulunduğu bildirilmiştir (Shenoy et al., 1985; Williamson et al., 1997; Reilly, 1999; Sauer et al., 2000; Juge et al., 2002; Sutthirak et al., 2005; Ševčík et al., 2006).

GA'nın en önemli kullanım alanı glukoz şurubu (HGS-High Glucose Syrup) ve fruktoz şurubu (HFCS-High Fructose Corn Syrup) üretimidir. Nişastanın şekere enzimatik dönüşümü, üç basamaklı bir işlemdir. İlk basamak olan sıvılaştırma basamağını, sakkarofikasyon basamağı ve en son olarak izomerizasyon basamağı izler (Van Der Maarel et al., 2002).

1.3. Nişasta

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

Nişasta iki yapısal bileşen olan amiloz ve amilopektinden oluşur. Amiloz, glukoz monomerlerinin α -D-(1,4) glikozidik bağıyla bir araya gelmesiyle oluşmuş doğrusal bir polimerdir ve nişastanın % 15-20'sini oluşturur (Şekil 3). Amilopektin ise glukoz monomerlerinin α -D-(1,4) ve α -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bir araya gelmesi ile oluşmuş büyük bir moleküldür ve nişastanın ana bileşenidir (Şekil 3). Amiloz iyotla mavi renkte bir kompleks oluştururken amilopektin ise menekşe renkli kompleks meydana getirir (Bamfort, 2003; Bıçak ve Ekmekçi, 2005; Nugent, 2005; Sajilata et al., 2006).



Şekil 3. Amiloz ve amilopektin yapısı (<http://www.bio-link.org>.)

1.4. *Aspergillus*

Aspergillus cinsi Deuteromycota'daki hifomisetler arasında, Moniliaceae ailesinde sınıflandırılır. Eşeyli (teleomorf) şekilleri Ascomycota'da Eurotiales takımında yer almaktadır.

Endüstriyel olarak önemli enzimlerin üretiminde kullanılan *Aspergillus*'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır. Doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalidir. Doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir ve biyolojik parçalanmada rol alırlar. Bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar. Uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Yaşam çevrimlerini tamamlamak için konak olarak insana gereksinimleri yoktur. Üreme hız ve kapasiteleri yüksektir. *Aspergillus* türleri zincirler halinde çok miktarda konidi üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidyumlar genelde 2-5 µ çapındadırlar ve hava ile taşınırlar. Atmosfere dağılan konidyumlar havada asılı kalabilir, toz ve diğer parçacıklarla her yere taşınabilirler, havada en yüksek yoğunlukta bulunan mantarlardan biridir. Üredikleri ortama aflatoksinler saldıkları için insan ve hayvan sağlığı yönünden

tehlikeli olabilirler. Ortam çalışmalarında insanların solunumla günde en az birkaç yüz konidi aldıkları belirlenmiştir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Bazı bitki ve sebzeler üzerinde, özellikle depolanmış tahıl ürünleri, turunçgiller, patates, elma, fındık ve ceviz gibi tarımsal ürünler üzerinde üreyerek çürümeye ve tarımsal kayıplara yol açarlar. Tüm bu zararlı özelliklerinin yanı sıra ekonomik önemi büyük olan bir fungus grubudur. Ticari olarak bugün tüm dünyada amilazlar ve pektinazların kaynağı olarak *Aspergillus* cinsleri tercih edilmektedir (Korkmaz,1989).

Aspergillus türlerinin sınıflandırılması kültür ve morfoloji özelliklerindeki farklılıklara dayanır; biyokimyasal yöntemlerin tanım değeri düşüktür. Tanım için hazırlanmış anahtarların dayandırıldığı esas özellikler şunlardır: Konidili başların biçimi ve rengi, sterigmata (fiyalidler) sayısı, vezikül biçimi, konidyoforların yapı ve rengi, hülle hücrelerinin (dinlenme hücreleri) biçimi, tür tanımı için üreme yapıları, cleistothecia (eşeyli sporların üretildiği tam kapalı askokarplar) bulunup bulunmadığı, askosporların ve konidilerin biçimi, boyut ve renkleri gibi özellikler kullanılır. *Aspergillus* türlerinin tanısında malt ekstrakt agar (MEA), czapek dox agar (CDA), czapek yeast agar (CYA25, CYA37), % 20 sukroz içeren czapek yeast agar (CY20S) kullanılmaktadır (Hasenekoğlu, 1991).

Endüstriyel uygulamalar oldukça farklı koşullarda (ekstrem pH ve sıcaklık) gerçekleşen işlemleri içermektedir. Enzimler ise endüstriyel işlemlerin vazgeçilmez katalizörleri arasındadır. Farklı endüstriyel işlemlerde görev alabilecek yeni enzimlerin keşfi, biyokimyacıların bu konudaki sürekli araştırmalarıyla artarak devam etmektedir. Bilindiği gibi amilazlar endüstride önemli bir pazar payına sahiptirler. Özellikle nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonunda kullanılan fungus α -amilazları ve glukoamilazları bu bakımdan oldukça dikkat çekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, yeni endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek fungus amilazlarıyla çalışılması düşünülmüştür. Bunun için mevcut funguslarda amilolitik taramayla *A. flavus* HBF34'ün

glukoamilaz ürettiği saptanmıştır. *A. flavus* glukoamilazları ile daha önce çok fazla çalışma yapılmaması da dikkate alınarak, glukoamilazın üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyon çalışmaları yapılarak endüstriyel uygulamalarda kullanıma uygun olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOD

2. 1. Kimyasallar

Agar-agar, çözünebilir nişasta, NaNO_3 , KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pepton, maltoz, laktoz, sitrik asit, NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Folin-Ciocalteu fenol belirteci, NH_4Cl , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Hg_2Cl_2 , ZnCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu ($\text{EDTA-C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), β -merkaptotanol, brom fenol blue, glisin, TEMED, commasie brillant blue G-250,, akrilamid, amonyum persülfat, sodyum dodesil sülfat (SDS), gliserol, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , Tris baz, selüloz, rafinoz, üre, n-bütanol, etanol, metanol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NiCl_2 , BaCl_2 , I_2 , HCl , sülfürik asit (H_2SO_4), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck (Darmstadt, Germany) firmasından; amilopektin, amiloz, glikojen, pirinç nişastası, rafinoz, buğday nişastası, dekstrin, orcinol, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, 5,5-Ditihiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), N-Bromo suksinamid (NBS), Sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC) ve fenil metil sülfonil florit (PMSF), Fluka (Buchs, Switzerland) firmasından; safra tuzu, aliminyum silika jel, mısır nişastası, N,N'- Metilen bis akrilamid, MES, AlCl_3 , dithiothreitol, yeast nitrojen baz, 3,5- dinitrosalisilik asit (DNS), standart karışımı [Miyosin (tavşankanı, 205000 Da), β -Galaktozidaz (E.coli, 116000 Da), Fosforilaz B (tavşankanı, 97000 Da), Albumin (Bovine 66000 Da), Albumin (yumurta, 45000 Da), Karbonik anhidraz (bovin eritrosit, 29000 Da)] ve sığır serum albumini (Fraksiyon V), Sigma (Taufkirchen, Germany) firmasından; $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ ve LiCl , AVOKADO (Karlsruhe, Germany) firmasından; NaCl , KH_2PO_4 , sukroz, Sodyum potasyum tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum sitrat, CARLO ERBA (Italy) firmasından; KI, glukoz ve propanol, Riedel-de Haën (Seelze, Germany) firmasından; malt ekstrakt agar, Lab M (Bury, England) firmasından sağlanmıştır.

2. 2. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda havadan izole edildikten sonra tanısı yapılmış olan 17 fungusda kalitatif amilaz taraması yapıldı. Fungus örneklerinin amilolitik aktiviteleri, Møller ve arkadaşlarının kısmi olarak değiştirilmiş amilaz besiyeri kullanılarak belirlendi (Møller et al., 2004). Amilaz besiyerini hazırlamak için % 2 agar-agar, % 0.5 safra tuzu ve % 1 çözünebilir nişasta içeren besi ortamı 121 °C’da 15 dakika 1.5 psi atmosfer basınçta otoklavda (Hirayama HA-240 M IV, Japan) sterilize edildi. Besiyeri 40-50 °C’da kadar soğuduktan sonra, enjektör filtresi (MFS, cellulose acetate, Japan) ile sterilizasyonu yapılan yeast nitrojen bazdan final konsantrasyonu % 0.67 olacak şekilde eklendi. Besiyeri steril petrilere dökülerek katılaşması bekledi ve daha sonra stok fungus kültürlerinden amilaz besiyeri içeren petrilere tek nokta ekimi yapıldı. Petri plakları 27 °C’daki etüvde (Heraeus T6, Germany) 72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilere iyodür çözeltisi (% 0.3 I₂, % 0.6 KI) püskürtüldü. Amilolitik aktivitenin derecesi, oluşan şeffaf zon çapının koloni çapına oranlanması ile belirlendi. En iyi amilaz aktivite zon çapı gösteren funguslar içerisinde *Aspergillus flavus* HBF34 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi. Amilaz aktivitesi gösteren funguslar yatık malt ekstrakt agar içerisinde 4 °C’da saklanarak üç aylık periyotlarla stoklar yenilendi. Ayrıca stoklar % 15’lik steril gliserol içerisine alınarak -20 °C’da uzun süre saklandı.

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

2. 3. Sporulasyon ve İnokulum Miktarının Belirlenmesi

Sporulasyon ortamı olarak % 1’lik çözünür nişasta içeren, malt ekstrakt agar kullanıldı. *A. flavus* HBF34’ü üretmek için önce sporulasyon ortamında spor oluşumu

sağlandı. Sporulasyondan sonra inokulum miktarı belirlenerek fermentasyon ortamına ekim yapıldı.

2. 3. 1. Sporulasyon ortamının hazırlanışı

500 mL'lik erlene 100 mL % 4.8'lik malt ekstrakt agar eklenerek mikrodalga fırında (Vestel, Turkey) 3 dakika ısıtıldıktan sonra 121 °C'da 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan sonra erlen, 45° eğimli olacak şekilde katılaşmaya bırakıldı. *A. flavus* HBF34'ün stok kültüründen yatık malt ekstrakt agara üç nokta ekim yapıldı. Kültür 27 °C'da etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sporulasyon ortamına % 0.5'lik steril sodyum dodesil sülfat ve cam bilye ilave edilerek sporların çözeltiye geçmesi için yavaşça karıştırıldı. Sıvı ortama geçen spor süspansiyonunun 1 mL'si, 9 mL steril fizyolojik suya (% 0.85 NaCl) ilave edildi. Uygun inokulum miktarını belirlemek için, ilk seyreltme (10^{-1}) kullanılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Her seyreltmede Thoma lamı ile mililitredeki spor sayımı yapıldı. Spor sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

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

A = 0.1 mm³ hacimde sayılan spor

SF = Seyreltme faktörü

10^4 = mililitreye çevirme çarpanı

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

2. 4. *Aspergillus flavus* HBF34'ün Fermentasyonu

Denemede kullanılan amilaz fermentasyon ortamının içeriği Tablo 1'de verilmiştir. İnokulum miktarı belirlendikten sonra, 100 mL amilaz fermentasyon ortamı içeren 500 mL'lik erlene, 10^{-3} 'lük seyreltmeden 10^8 spor/mL olacak şekilde inoküle edildi. Çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Germany) 27 °C'da 150 rpm de 6 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültür ortamı Buhner hunisinde vakum altında süzüldü ve süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Tablo 1. *Aspergillus flavus* HBF34 amilaz fermentasyon ortamı

Kimyasal Maddeler	Miktarı (g/L)
NaNO ₃	3
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01
KH ₂ PO ₄	1
Pepton	10
Çözünür patates nişastası	20
pH 5.4	

2. 5. *Aspergillus flavus* HBF34'ün Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

A. flavus HBF34 üretimi için, 500 mL'lik erlene (7 adet) 100 mL amilaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra ortama, 10^8 spor/mL inoküle edildi. Fermentasyon ortamı çalkalamalı su banyosunda 27 °C da, 150 rpm, 7 gün inkübasyona bırakıldı. *A. flavus* HBF34'ün büyüme eğrisini saptamak için erlenlerden bir tanesi, 24 saatlik periyotlarda darası ölçülmüş filtre kâğıdı (398 nolu Filtrak, Germany) kullanılarak buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 80

°C'daki etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra hassas terazide (Scaltec SBA 31, Germany) ağırlığı ölçüldü ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyoması (g/100 mL) hesaplandı. Ayrıca fermentasyon süzüntüsünün günlük pH (Senso Direct pH 200, Germany), redüktör şeker ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. En iyi enzim aktivitesi gösteren süzüntü, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere liyofilizasyon işlemi için liyofilizatör kaplarında yatık olarak, -20 °C da derin dondurucuda (Bosch, Germany) saklandı.

2. 6. Fermentasyon Ortamına Salınan Enzim Üretiminin Elektroforetik Olarak İzlenmesi

A. flavus HBF34 tarafından üretilen ve kültür ortamında nişastanın hidrolizinden sorumlu amilazı görüntülemek için, Laemmli yöntemine (Laemmli,1970) göre hazırlanan % 10'luk PAGE (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, U.S.A) kullanılarak zimografi (Kim et al., 1995) yapıldı. Bu işlem için, 500 mL'lik bir erlene 100 mL amilaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra, 10^8 spor/mL ortama inoküle edildi. Fermentasyon ortamı çalkalamalı su banyosunda 27 °C'da, 150 rpm, 6 gün inkübasyona bırakıldı. Fermentasyonun 6. gününde kültür ortamı süzöldükten sonra % 10'luk PAGE jele uygulanarak zimografi yapıldı. Ayrıca *A. flavus* HBF34 amilazın fermentasyonun hangi gününden itibaren üretilmeye başlandığını, enzimin tek bir gen ürünü mü yoksa ortamdaki proteolitik enzimler tarafından alt birimlere ayrılıp ayrılmadığını saptamak için fermentasyon ortamı % 10'luk SDS-PAGE jele uygulanarak zimografi yapıldı. Bu işlem için aynı koşullarda fermentasyon ortamı hazırlanarak çalkalamalı su banyosunda 27 °C'da, 150 rpm, 6 gün inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamından 6 gün boyunca 24 saatlik periyotlarda 1mL örnek alındı. Alınan örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'da saklandı. 6 gün boyunca alınan örnekler, saflaştırılmış örnek (6.gün) ve konsantre edilmiş 6. günün fermentasyon ortamı SDS-PAGE jele uygulanarak zimografi yapıldı.

Zimografi için kullanılan çözeltiler ve jellerin hazırlanışı molekül ağırlığı tayininde anlatıldığı gibi yapıldı.

2. 7. Liyofilizasyon

Fermentasyon ortamında süzülen enzim kaynağı liyofilizatör kaplarında yatık olarak -20 °C'da 24 saat boyunca bekletilerek donması sağlandı. Liyofilizatörde (Labconco, USA) -50 °C'da $68,10^{-3}$ mbar'da liyofilize edildi. Liyofilize olan enzim uygun kaplara alınarak, -20 °C da kullanılıncaya kadar saklandı.

2. 8. Enzimin Saflaştırılması

Enzim kaynağı olarak kullanılacak süzüntü liyofilizasyonla konsantre edildi. Liyofilize enzim kaynağının saflaştırılması için Najafi ve Kembhavi'nin (Najafi and Kembhavi, 2005) nişasta afinite kromatografi metodu kısmi olarak değiştirilerek kullanıldı. Bu işlem sırasında, 2 g çözünür olmayan mısır nişastası 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponunda çözünür patates nişastasını uzaklaştırmak için yıkandı. Yıkanan nişasta 3000 x g'de 10 dk santrifüj edildi (Hareaus Sepatech Labofuge 200, Germany). Süpernatant dökülerek nişasta 4 °C'da saklandı. Konsantre edilen enzim kaynağında denatüre protein çökeltileri olduğunda, bunları uzaklaştırmak için 3000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Enzim aktivitesini minimum seviyeye indirmek için santrifüj edilen enzim kaynağı (10 mL) ve yıkanan mısır nişastası buzlu ortamda 20 dk ayrı ayrı inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra soğutulmuş enzim ve mısır nişastası karıştırıldı. Enzim-nişasta karışımı, manyetik karıştırıcıda (IKA Yellowline MSH Basic, Germany) 4 °C'da 2 saat boyunca yavaşça karıştırılarak, enzimin nişastaya bağlanması sağlandı. İnkübasyon sonunda, enzim-nişasta karışımı 3000 x g'de, 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant ayrılarak 4 °C'da saklandı ve nişasta kolona (3x10 cm) alındı. Peristaltik pompa (ATTO AC-2110, Japan) kolona bağlanarak, kolon belirli bir akış hızında 4

°C’da, yaklaşık olarak 30 mL 0,1 M NaCl ile yıkandı. Yıkama çözeltisi daha sonraki işlemler için 4 °C’da saklandı. Yıkama işleminden sonra nişasta 10 mL, 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponuna alınarak 40 °C’da 1 saat karıştırılarak inkübe edildi. Nişasta-tampon karışımı 3000 x g’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı. Nişastaya bağlanmış olabilecek enzimi alabilmek için nişasta tekrar 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponuna alınarak aynı işlem iki kez daha tekrarlandı. Tekrarlama işlemine enzim aktivitesi kalmayınca kadar devam edildi. Kısmi saflaştırmanın her bir fraksiyonunda enzim aktivitesi ve protein tayinleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Elde edilen enzim karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

2. 9. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için gerekli deney ortamı Tablo 2’de verildi. Farklı zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 ve 105 dk) enzim substrat ile inkübe edilerek, oluşan redüktör şeker miktarı DNS metodu ile ölçüldü (Bernfeld, 1955).

Tablo 2. GA aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisi

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
% 1’lik Çözünür patates nişastası	200 µL	200 µL
Enzim	200 µL	-
60 °C de farklı zaman aralıklarında inkübasyon		
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

2. 10. Enzim Aktivitesinin Ölçümü

A. flavus HBF34 suşunun kısmi olarak saflaştırılan glukoamilaz enziminin aktivitesi, Bernfeld'in kısmi olarak değiştirilmiş 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Bernfeld, 1955). Substrat olarak 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponunda hazırlanmış, % 1'lik çözünür patates nişastası kullanıldı. Standart deney ortamının bileşenleri Tablo 3'de, DNS çözeltisinin bileşenleri Tablo 4'de verildi. Enzim aktivitesi spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japan) kullanılarak 530 nm'de standart deney koşullarında ölçüldü. Oluşan redüktör şeker miktarı standart glukoz eğrisinden hesaplandı. Enzim aktivitesi ve spesifik aktivite aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı.

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

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

Bir enzim ünitesi (IU), 60 °C'da pH 6.0'da 1 dk'da çözünür patates nişastasından 1 µmol glukozun serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edildi.

Tablo 3. Standart deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
% 1'lik Çözünür patates nişastası	200 µL	200 µL
Enzim	200 µL	-
İnkübasyon (60 °C)	30 dk	30 dk
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

Tablo 4. DNS çözeltisinin bileşenleri

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

2. 11. Glukoz Standardı

Redüktör şeker miktarını saptamak için glukozun farklı konsantrasyonlardaki (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 ve 5000 µM) çözeltileri hazırlandı. Redüktör şeker miktarı, DNS metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra, konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi. Deney ortamının bileşenleri Tablo 5'te verildi.

Tablo 5. Redüktör şeker miktarının ölçümü

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
Glukoz	400 µL	400 µL
DNS	100 µL	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

2. 12. Fermentasyon Ortamının Redüktör Şeker Tayini

Fermentasyon ortamının günlük süzüntüsündeki redüktör şeker miktarının değişimi DNS metoduna göre ölçüldü. Deney ortamının bileşenleri Tablo 6’da verildi.

Tablo 6. Fermentasyon ortamının redüktör şeker miktarının tayini

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponu	200 µL	200 µL
Fermentasyon süzüntüsü	200 µL	-
Distile su	-	200 µL
DNS	100 µL	100 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

2. 13. Protein Tayini

Protein derişimlerinin tayini Lowry ve arkadaşlarının yöntemi (Lowry et al., 1951) kullanılarak yapıldı. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 ve 200 µg) sığır serum albümini (Fraksiyon V) kullanıldı.

2. 13. 1. Kullanılan kimyasal maddeler

A Çözeltisi: 0.5 g bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve 1 g sodyum sitrat 100 mL distile suda çözüldü.

B Çözeltisi: 20 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 4 g sodyum hidroksit (NaOH) 1 litre distile suda çözüldü.

C Çözeltisi: B çözeltisinin 50 mL'sine, 1 mL A çözeltisi eklenerek taze olarak hazırlandı.

D Çözeltisi: 10 mL Folin Ciocalteu fenol belirtecine 10 mL distile su eklenerek taze olarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: 0.5 mL örnek üzerine, 2.5 mL C çözeltisi eklendi ve tüp karıştırıcısıyla (IKA model Yellowline TTS 2, USA) karıştırılarak 5-10 dk beklendi. Bu süre sonunda, örnek üzerine 0.25 mL D çözeltisi eklendi ve karıştırıcıda karıştırılarak 20-30 dk beklendi. Oluşan renk 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2. 14. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

GA üzerine sıcaklığın etkisini saptamak için farklı sıcaklıklarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C) standart deney koşullarında enzim aktivitesi

ölçüldü. Her sıcaklıkta ortam pH'sını sabit tutmak için McIlvaine tamponu pH 6.0'ya ayarlandı ve % 10'luk stok çözünür nişastadan final konsantrasyonu % 0.5 olacak şekilde (standart deney konsantrasyonudur) tamponla seyreltilerek deney ortamına eklendi.

2. 15. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

A. flavus HBF34 GA farklı zaman aralıklarında, 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponunda 27, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondaki enzim çözeltisinden belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak standart deney koşulları altında aktivite ölçümü yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

2. 16. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

A. flavus HBF34 GA üzerine pH'nın etkisini incelemek için, standart deney ortamının pH'ı 0.5 birimlik aralıklarla pH 3.0 – 9.0 aralığında ayarlandı. Tampon çözeltileri olarak pH 3.0-6.5 için 50 mM McIlvaine tamponu, pH 7.0-7.5 için 50 mM Sørensen fosfat tamponu ve pH 8.0-9.0 için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. % 2.5'lik çözünür stok nişastadan tamponlarla uygun seyreltmeler yapılarak standart deney ortamına final konsantrasyonu % 0.5'lik olacak şekilde konuldu. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü. Deney ortamı Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. pH'ın etkisini incelemek için kullanılan deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patates nişastası (% 2.5)	80 µL	80 µL
Tampon	120 µL	120 µL
Enzim	200 µL	-
İnkübasyon (60 °C)	30 dk	30 dk
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

2. 17. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi

A. flavus HBF34 GA farklı pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 40 °C'de inkübe edildi. Tampon çözeltileri olarak pH 3.0-6.5 için 50 mM McIlvaine tamponu, pH 7.0-7.5 için 50 mM Sørensen fosfat tamponu ve pH 8.0-9.0 için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Bu işlem için, tampon çözeltisinden 2 mL alındı ve 1 mL enzim çözeltisi ile karıştırıldı. Enzim çözeltisinden belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak standart deney koşulları altında aktivite ölçümü yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol olarak kabul edildi (100) ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

2. 18. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

GA aktivitesi optimum sıcaklık (60 °C), pH (6.0) ve sabit inkübasyon süresinde (30 dk) farklı konsantrasyonlarda substrat (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 ve 2 mg/mL çözünür patates nişastası) kullanılarak ölçüldü. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı. Ayrıca, aynı koşullarda GA'nın glikojen, amilopektin ve amiloz için K_m ve V_{max} değerleri saptandı.

2. 19. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla sukroz, maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz, amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, çözünür patates nişastası ve selülozun pH 6.0 McIlvaine tamponunda hazırlanan % 1'lik çözeltileri substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesi standart deney koşulları altında ölçüldü. Çözünür patates nişastası için ölçülen değer kontrol olarak (100) kabul edildi ve aktivite değişimleri % değer olarak hesaplandı. Deneyde kullanılan stok çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- Mısır nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası ve selüloz mikrodalga fırında ısıtılarak, distile su içerisinde çözünmesi beklendi. Ancak, çözünme tam olarak gerçekleşmedi ve süspansiyon halinde kaldı. Bu süspansiyonlar substrat kaynağı olarak kullanıldı.
- Amilopektin ve çözünür patates nişastası mikrodalga fırında, distile su içerisinde ısıtılarak çözüldü. Dekstrin, maltoz, sukroz ve rafinoz ısıtılmadan distile su içerisinde çözüldü.
- Amiloz farklı bir işlemle hazırlandı. Bu işlem için 0.1 g amiloz tartıldı ve 2 mL 0.5 N NaOH çözüldü. Çözeltiyi nötrlemek için 2 mL 0.5 N HCl ilave edildi.

Daha sonra 1 M pH 6.0 McIlvaine tamponundan final konsantrasyonu 0.05 M olacak şekilde ilave edildi. Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

2. 20. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının (NaCl, KCl, LiCl, NH₄Cl, CoCl₂, MnCl₂, MgCl₂, NiCl₂, Hg₂Cl₂, CuCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, AlCl₃, FeCl₃, Na₂O₃Se) ve EDTA'nın distile su içerisinde 100 mM stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonları ve EDTA 1, 5 ve 10 mM final konsantrasyonlarda deney ortamına eklendi (Tablo 8, 9 ve 10). Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü. Bu deneyde kullanılacak enzim 50 mM pH 6.0 MES tamponu kullanılarak saflaştırıldı. % 2'lik çözünür patates nişastası, 50 mM pH 6.0 MES tamponunda hazırlandı, deney ortamına final konsantrasyonu % 0.5'lik olacak şekilde ilave edildi. Metal iyonu içermeyen standart deney ortamı kontrol olarak (100) kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

Tablo 8. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patates nişastası (% 2)	100 µL	100 µL
Metal iyonları	4 µL	4 µL
50 mM MES tamponu	96 µL	96 µL
Enzim	200 µL	-
İnkübasyon (60 °C)	30 dk	30 dk
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

Tablo 9. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patates nişastası (% 2)	100 µL	100 µL
Metal iyonları	20 µL	20 µL
50 mM MES tamponu	80 µL	80 µL
Enzim	200 µL	-
İnkübasyon (60 °C)	30 dk	30 dk
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

Tablo 10. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patates nişastası (% 2)	100 µL	100 µL
Metal iyonları	40 µL	40 µL
50 mM MES tamponu	60 µL	60 µL
Enzim	200 µL	-
İnkübasyon (60 °C)	30 dk	30 dk
DNS	100 µL	100 µL
Enzim	-	200 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbands okunur		

2. 21. Enzimin Tuz Toleransı

GA'nın tuz toleransını belirlemek için, enzim final konsantrasyonu 0.05, 1, 2, 3, 4 ve 5 M NaCl ile 4 °C'da, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra standart deney koşullarında enzim aktivitesi ölçüldü. Başlangıç aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

2. 22. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; (1) sistein, histidin ve serin inhibitörü olan fenil metil sülfonil florit (PMSF); (2) SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β -merkaptetanöl; (3) SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4-dithiothreitol; (4) tiyol grubu inhibitörü olan 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB); (5) triptofan inhibitörü olan N-bromo suksinamit (NBS); (6) serin inhibitörü olan Sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC); (7) protein denatürantı olan üre ve (8) SDS kullanıldı. PMSF, β -merkaptetanöl, dithiothreitol, NBS, CMC, DTNB, üre ve SDS'nin 100 mM'lık stok çözeltilerinden, deney ortamına final konsantrasyonu 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mM olacak şekilde eklendi (Tablo 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve 17). Enzim çözeltisi bu konsantrasyonlardaki inhibe edici ajanlarla 40 °C'da 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi (Tablo 18). Aynı koşullar altında inhibitör içermeyen standart deney ortamı kontrol olarak (100) kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre aktivite değişimi % değer olarak belirlendi. Deneyde kullanılan stok çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- β -merkaptetanöl, 1,4-dithiothreitol, NBS, CMC, üre ve SDS distile suda, PMSF ise n-propanolda, DTNB ise 0.1 M NaOH de çözüldü.

- % 2.5’lik çözünür patates nişastası, 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponunda hazırlandı deney ortamında final konsantrasyonu % 0.5’lik olacak şekilde ilave edildi.

Tablo 11. 0.5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM McIlvaine tamponu	118 µL	118 µL
İnhibe edici ajan	2 µL	2 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 12. 1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM McIlvaine tamponu	116 µL	116 µL
İnhibe edici ajan	4 µL	4 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 13. 2 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM Mcllvaine tamponu	112 µL	112 µL
İnhibe edici ajan	8 µL	8 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 14. 4 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM Mcllvaine tamponu	104 µL	104 µL
İnhibe edici ajan	16 µL	16 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 15. 6 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM Mcllvaine tamponu	96 µL	96 µL
İnhibe edici ajan	24 µL	24 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 16. 8 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM McIlvaine tamponu	88 µL	88 µL
İnhibe edici ajan	32 µL	32 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 17. 10 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM McIlvaine tamponu	80 µL	80 µL
İnhibe edici ajan	40 µL	40 µL
Enzim	200 µL	200 µL
İnkübasyon süresi (40 °C)	30 dk	30 dk
Standart deney koşullarında ölçüm yapıldı		

Tablo 18. İnkübasyon sonrası deney bileşenleri (Standart deney koşulları)

Deney bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patates nişastası (% 2.5)	100 µL	100 µL
Deney ortamı	300 µL	-
İnkübasyon (60 °C)	30 dk	30 dk
DNS	100 µL	100 µL
Deney ortamı	-	300 µL
Soğuk su banyosunda inkübasyon	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosunda inkübasyon	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosunda inkübasyon	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µL	1000 µL
530 nm dalga boyunda absorbans okunur		

2. 23. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

GA'nın nişastaya adsorpsiyon oranını belirlemek için çözünür olmayan mısır nişastası, pirinç nişastası ve buğday nişastası kullanıldı. Bu işlem için 1 g nişasta örneği 2 mL saflaştırılmış enzimle (3630,28 U/mL) karıştırıldı. Enzim nişasta karışımı 4 °C'de 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim-nişasta karışımı, 2500 x g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra, süpernatantda enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü. Adsorpsiyon oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Morita and Fujio, 2000).

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

AO = Adsorpsiyon oranı

O = Başlangıç enzim aktivitesi

R = Geride kalan enzim aktivitesi

2. 24. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi için ince tabaka kromatografisi (Alugram® Sil G/UV₂₅₄ 0.20 mm, 5 x 10 cm, Germany) kullanıldı (Fontana et al., 1988). Bu işlem için 1 mL enzim çözeltisi ile 1 mL % 1'lik çözünür patates nişastası karıştırılarak 40 °C'da 48 saat inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında (2, 4, 8, 24 ve 48) enzim-nişasta karışımından 200 µL alınarak kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Örnekler kullanılıncaya kadar 4 °C'da saklandı. Standart olarak glukoz, maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltopentoz kullanıldı. Standart karışımı 50 mM McIlvaine tamponunda % 0.1'lik olacak şekilde hazırlandı. İnce tabaka plaklarının alt kısmından 0.5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizildi. Sonra standart, nişasta ve örneklerden mikropipetle 10 µL alınarak birer santim aralıklarla plaklara uygulandı ve havada kurutuldu. Hareketli faz için n-butanol; etanol; su (5; 3; 2) karışımı hazırlandı. İnce tabaka kromatografi tankına (Sigma, Germany) bu karışımından 15 mL eklendikten sonra kurutulan plaklar tanka yerleştirildi, örneklerin yürütülmesi sağlandı. Yürütme işleminden sonra çözücünün aldığı yol ölçüldü ve plaklar havada kurutuldu. Boyama işlemi için sülfürik asit; metanol (1; 9) karışımında hazırlanmış % 0.2'lik orsinol kullanıldı. Sonra plaklar boya çözeltisine batırılıp çıkarıldı ve havada kuruması sağlandı. Kuruyan plaklar 100 °C'lık etüvde 10 dakika tutularak renk gelişimi sağlandı. Oluşan lekelerin aldığı yol cetvelle ölçüldü. Örneğin ve standartların aldığı yol, çözücünün aldığı yola oranlanarak R_f değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Örneklerin R_f değerleri, standartların R_f değerleri ile karşılaştırılarak enzim hidrolizi sonucunda oluşan ürünün ve enzimin tipi belirlendi.

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

2. 25. Elektroforez ve Zimografi

2. 25. 1. GA'nın molekül ağırlık tayini

GA'nın saflığının ve moleküler ağırlığının saptanması Laemmli yöntemine (1970) göre PAGE ve SDS-PAGE kullanılarak yapıldı. Standart olarak miyozin (Tavşankanı, 205000 Da), β -galaktozidaz (E.coli, 116000 Da), fosforilaz B (Tavşankanı, 97000 Da), albumin (Sığır, 66000 Da), albumin (Yumurta, 45000 Da), karbonik anhidraz (Sığır eritrosit, 29000 Da) kullanıldı. GA'nın görüntülenmesi için PAGE ve SDS-PAGE kullanılarak zimografi (Wanderley et al., 2004) yapıldı. SDS-PAGE, PAGE ve zimografi elektroforezi, aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

a. Jelin Hazırlanışı: Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapıldı. Elektroforez camları % 70'lik etanolle iyice temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için kenarları silikonlandı. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde degaze edilmiş % 10'luk ayırma jeli TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırıldı. Hazırlanan jeller enjektör kullanılarak mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, U.S) ve büyük elektroforez (20 x 20) (UVP, Germany) camları arasına döküldü. Ayırma jelinin içeriği Tablo 19'da verildi

Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70'lik etanolle kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat beklendi. Süre sonunda jel üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaş yavaş alındı. Ayırma jelinin üzerine % 5'lik hazırlanan yoğunlaştırma jeli döküldü. Tarak, jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için bir gece beklendi. Yoğunlaştırma jelinin içeriği Tablo 20'de verildi.

b. Örneklerin Hazırlanışı ve Jele Uygulanışı: Jele uygulanacak örnekler ve standart, yürütme tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı (PAGE ve zimografi için örnekler kaynatılmadı). Tarak jele zarar vermeden çekildi. Jel distile su ile yıkanarak, polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra oluşan kuyucukların yarısına kadar elektrot tamponu koyuldu. Kuyucuklara uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden, küçük elektroforez için 15 µL, büyük elektroforez için 20 µL yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektrot tamponu eklendi. Güç kaynağı (UVP, Germany) ile üst jele 100 V 20 mA, alt jele 200 V 40 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapıldı.

c. Jelin Boyanması: Cam plaklar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrıldı. Boyanın aldığı yol kumpasla ölçüldükten sonra, ayırma jeli zimogram ve protein boyaması yapılmak üzere ikiye ayrıldı. Jellerin protein boyaması iki şekilde yapıldı.

Commasie Brilliant mavisini ile Boyama: Cam plaklar arasından çıkarılan jel commasie brilliant mavisine alınarak bir gece bekletildi. Daha sonra jel boya çözeltisinden çıkarıldı. Jeldeki boyanın giderimi için iki ayrı yıkama çözeltisi kullanıldı. 1. yıkama çözeltisinde 1 saat ve 2. yıkama çözeltisinde 6 saat bekletildi. Gerekli ölçümler yapıldıktan sonra jeller % 5'lik asetik asit çözeltisine alınarak saklandı.

2. 25. 2. Zimografi

Zimografi için cam plaklar arasından çıkarılarak ayrılan jel, oda sıcaklığında 20 dk distile su ile yıkandı. Jel 50 mM pH 6.0 McIlvaine tamponunda oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Aynı tamponda hazırlanmış % 1'lik çözünür patates nişastası içinde 4 °C'da 1 saat inkübe edildi. Jel aynı çözelti içerisinde 50 °C'da 1 saat etüvde inkübe edildi. Jel nişastadan çıkarılıp distile su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra iyot

çözeltisinde (1 mM I_2 - 0.5 M KI) bantlar belirginleşene kadar bekletildi. Gerekli ölçümler yapıldıktan sonra aynı çözelti içerisinde saklandı.

2. 25. 3. SDS-PAGE, PAGE ve zimografi için gerekli çözeltiler

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

Ayırma tamponu (separating tamponu): 34.344 g Tris-baz az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8.8'e ayarlandı. 0.8 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra hazırlanan Tris-baz üzerine eklendi ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. PAGE için hazırlanan ayırma tamponunda SDS kullanılmadı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında kullanılıncaya kadar saklandı.

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

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

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

% 2’lik Brom fenol mavis: 0.1 g brom fenol mavis 5 mL distile su içerisinde çözüldü.

Tablo 19. % 10’luk ayırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Mini elektroforez Tek jel için (mL)	Büyük elektroforez Tek jel için (mL)
Distile su	2.55	11.475
Ayırma tamponu (pH 8.8)	1.66	7.5
% 30’luk akrilamid/bis akrilamid	2.2	9.9
Vakum altında degaze işlemi.	10 dk	10 dk
TEMED	0.006	0.027
% 10’luk amonyum persülfat	0.043	0.195

Tablo 20. % 5’lik yoğunlaştırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Mini elektroforez Tek jel için (mL)	Büyük elektroforez Tek jel için (mL)
Distile su	0.965	5.80
Yoğunlaştırma tamponu (pH 8.8)	0.416	2.50
% 30’luk akrilamid/bis akrilamid	0.278	1.67
Vakum altında degaze işlemi	10 dk	10 dk
TEMED	0.0017	0.10
% 10’luk amonyum persülfat	0.017	0.01

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

Yükleme tamponu: 1 M Tris-bazdan (pH 6.8) 12.5 mL, % 10’luk SDS’den 40 mL, gliserolden 20 mL, % 2’lik brom fenol mavisinden 2 mL ve % 5’lik β -merkaptetanolden 5 mL alınarak karıştırıldı. PAGE için hazırlanan yükleme tamponunda SDS ve β -merkaptetanol kullanılmadı. Hazırlanan tampon koyu mavi

renkte değilse, renk oluşana kadar NaOH ilave edildi. Distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı. β -merkaptotanol'ün etkisi zamanla kaybolduğundan gerektiği zaman hazırlanan tampona aynı oranda ilave edildi.

Tris-Glisin Elektrot tamponu (Yürütme tamponu): 3 g Tris-baz ve 14.4 g glisin az miktarda distile su içerisinde çözöldü ve konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8.5'e ayarlandı. 1 g SDS az miktarda distile su içerisinde çözölererek Tris-glisin çözeltisine ilave edildi. Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. PAGE için hazırlanan elektrot tamponunda SDS kullanılmadı. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'da saklandı. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilendi.

Commasie Blue G-250 Çözeltisi: 0,125 g commasie blue tartıldıktan sonra bir miktar distile su içerisinde çözöldü. Üzerine 200 mL metanol ve 35 mL asetik asit ilave edilerek distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Jel bu çözeltide bir gece bekletildi.

1. **Yıkama Çözeltisi:** Metanol; asetik asit; distile su (400; 70; 530 mL) oranlarında karıştırıldı.
2. **Yıkama Çözeltisi:** Metanol; asetik asit; distile su (50; 70; 880 mL) oranlarında karıştırıldı.

2. 26. Verilerin Değerlendirilmesi

Protein derişimi, glukoz standardı, Vmax ve Km değerleri lineer regrasyon analizi ile saptandı (STATISTICA 6.0). Her deney üç tekrar üzerinden yapıldı. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Duncan Testi) yapıldı (STATISTICA 6.0). Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulandı (STATISTICA 6.0).

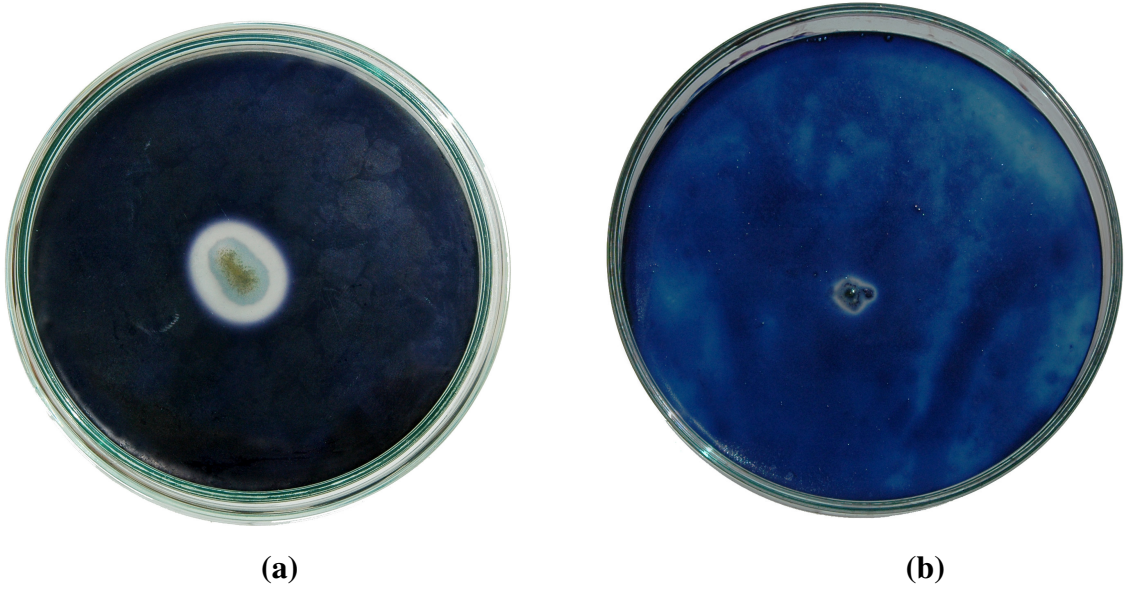
3. BULGULAR

3. 1. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi

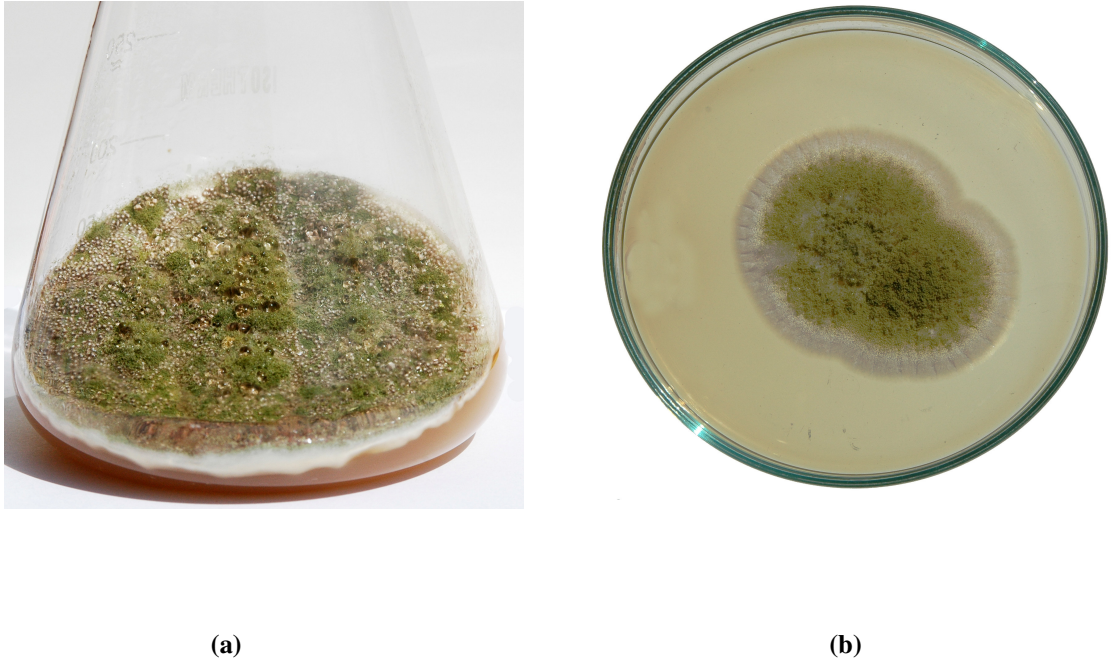
Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda havadan izole edildikten sonra tanısı yapılmış 17 fungusun kalitatif amilaz tarama sonuçları Tablo 21’de görülmektedir. Şekil 4’de amilolitik taramada pozitif ve negatif sonuca birer örnek verilmiştir. Amilolitik tarama sonuçlarına bakıldığında 8 türde amilaz aktivitesi görüldü. Bu türlerden en iyi zon çapı gösteren fungusun *Aspergillus flavus* HBF34 suşu olduğu saptandı. Bu nedenle, *A. flavus* HBF34 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi. *A. flavus* HBF34’ün fermentasyon ortamına ekimi yapılmadan önceki sporulasyon ortamındaki ve malt ekstrakt agardaki görüntüsü Şekil 5 de görülmektedir.

Tablo 21. Fungusların kalitatif amilolitik tarama sonuçları

<i>Trichoderma</i> sp. HBF 110	-	-	-
Fungus	Aktivite çapı (R)	Koloni çapı (r)	Zon Çapı (R/r)
<i>Acremonium kiliense</i> HBF 95	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i> HBF 34	14.30	7.00	2.04
<i>Aspergillus fumigatus</i> HBF 96	7.34	4.7	1.56
<i>Aspergillus japonicus</i> HBF 97	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> HBF 98	-	-	-
<i>Aspergillus niveus</i> HBF 99	-	-	-
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> HBF 100	8.20	6.36	1.29
<i>Aspergillus terreus</i> HBF 101	3.70	2.30	1.60
<i>Aspergillus versicolor</i> HBF 102	-	-	-
<i>Aspergillus wentii</i> HBF 103	9.90	7.00	1.41
<i>Cladosporium</i> sp. HBF 104	-	-	-
<i>Epicoccum</i> sp. HBF 105	1.50	1.20	1.25
<i>Penicillium chrysogenum</i> HBF 106	-	-	-
<i>Penicillium restrictus</i> HBF 107	10.20	5.26	1.93
<i>Rhizopus stolonifer</i> HBF 108	-	-	-
<i>Scapulariopsis</i> sp. HBF 109	4.56	3.72	1.21



Şekil 4. Amilolitik aktivitenin taranması. (a) *Aspergillus flavus* HBF34. (b) *A. versicolor* HBF102.



Şekil 5. (a) *Aspergillus flavus* HBF34'ün sporulasyon ortamındaki görüntüsü. (b) *A.flavus* HBF34'ün malt ekstrakt agar ortamındaki görüntüsü.

3. 2. *A. flavus* HBF34 Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

A. flavus HBF34'ün büyüme eğrisi ve en iyi enzim üretim zamanını saptamak için 7 günlük inkübasyon süresince günlük biyomas, pH, redüktör şeker ve enzim aktivite ölçümleri yapılarak, elde edilen değerler Tablo 22'de verilmiştir. İnkübasyon süresine bağlı olarak biyomas 1. günde en düşük seviyede olup, süreye bağlı olarak biyomas miktarı artmaya devam etmiş ve 5-7 günler arasında ise sabit bir değere ulaşmıştır (Şekil 6). Başlangıçta 5.4 olan pH enzim aktivitesinin en yüksek olduğu gün maksimuma ulaşmıştır (Şekil 6). İnkübasyon süresine bağlı olarak redüktör şeker miktarı 2. günde çok yüksek olup, diğer günlerle karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. 3. günden itibaren redüktör şeker miktarı azalarak minimum seviyeye inmektedir (Şekil 7). Enzim aktivitesi 1. ve 3. günlerde redüktör şeker miktarının fazla olmasından dolayı ölçülememiştir. 4. günden itibaren enzim aktivitesi artarak 6. günde maksimum değere ulaşmış ve 7. günde azalmıştır (Şekil 7). Ölçülen bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur.

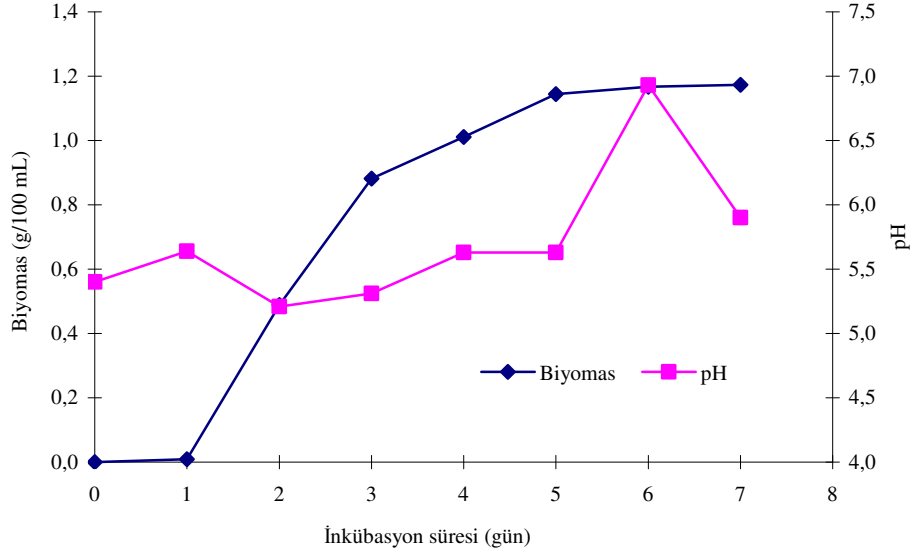
Tablo 22. *A. flavus* HBF34'ün fermentasyon ortamında zamana bağlı redüktör şeker, enzim aktivitesi, pH ve biyomas değişimi

İnkübasyon süresi (gün)	Redüktör şeker ($\mu\text{mol/mL}$) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	Enzim aktivitesi (U/mL) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	pH	Biyomas (g/100 mL)
0	-	-	-	-	5.40	-
1	508.17 $\pm$ 4.41	a	*	-	5.64	0.0089
2	8679.83 $\pm$ 133.46	b	*	-	5.21	0.4885
3	3274.83 $\pm$ 60.71	c	*	-	5.31	0.8815
4	413.17 $\pm$ 3.33	a	159.97 $\pm$ 2.22	a	5.63	1.0110
5	468.17 $\pm$ 6.01	a	328.58 $\pm$ 7.09	b	5.63	1.1441
6	523.17 $\pm$ 6.01	a	491.36 $\pm$ 12.10	c	6.93	1.1675
7	468.17 $\pm$ 1.67	a	262.19 $\pm$ 4.31	d	5.90	1.1733

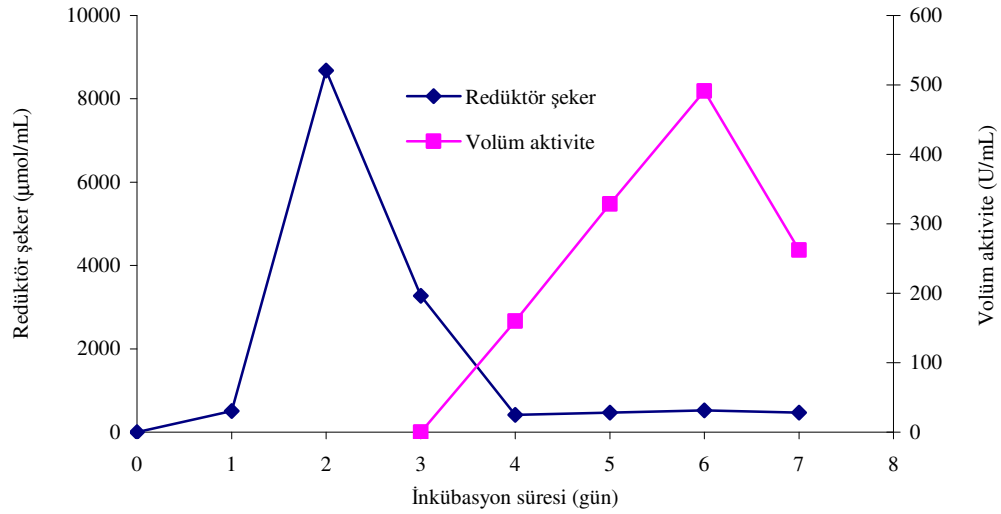
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

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

* : Aktivite ölçülemedi.



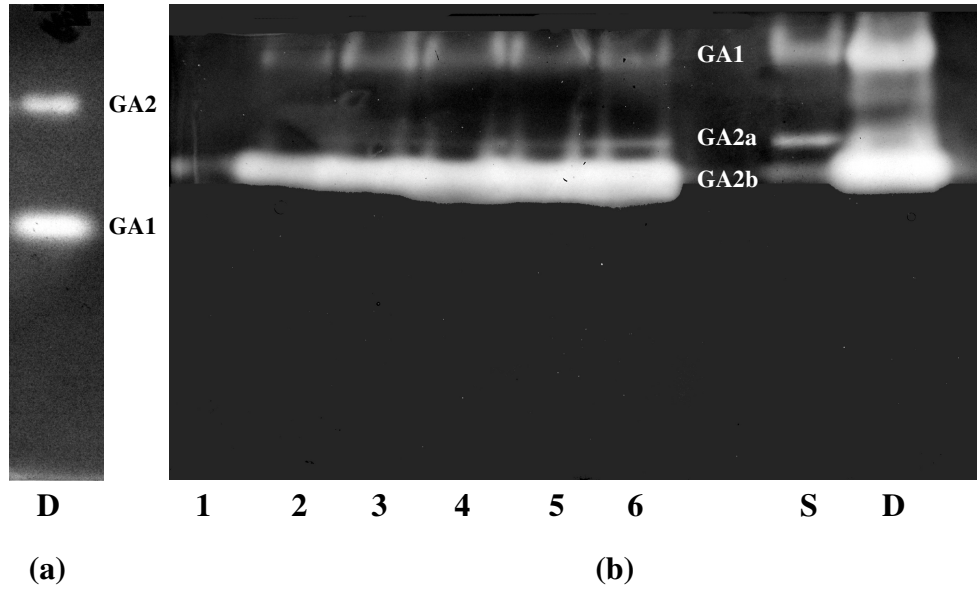
Şekil 6. *A. flavus* HBF34'ün büyüme eğrisi ve kültür ortamının pH değişimi.



Şekil 7. *A. flavus* HBF34 kültür ortamındaki redüktör şeker ve enzim aktivite değişimi

3. 3. Fermentasyon Ortamına Salınan Enzim Üretiminin Elektroforetik Olarak İzlenmesi

Enzim üretiminin maksimum olduğu 6. günde, fermentasyon ortamı süzildükten sonra PAGE jeline uygulanarak zimografi yapılmıştır. Zimografi sonucunda, *A. flavus* HBF34'ün fermentasyon ortamında iki amilaz üretildiği görülmüştür (Şekil 8a). *A. flavus* HBF34 tarafından fermentasyon ortamına salınan amilazın, fermentasyonun hangi gününden itibaren üretilmeye başladığını, enzimlerin iki gen ürünü mü yoksa ortamdaki proteolitik enzimler tarafından alt birimlere ayrılıp ayrılmadığını saptamak için fermentasyon ortamı günlük elektroforetik olarak izlenmiştir. 1. günde enzim çok düşük de olsa görüntülenmiştir. 2. günden itibaren ise fermentasyon ortamında iki enzim üretilmeye başlandığı ve bu enzimlerden GA2'nin iki alt üniteye (GA2a ve GA2b) sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 8b).



Şekil 8. *A. flavus* HBF34'ün fermentasyon ortamına saldığı amilazın elektroforetik olarak izlenmesi . (a). PAGE zimografi görüntüsü, D: Direkt kültür, GA1: Glukoamilaz 1, GA2: Glukoamilaz 2. (b) SDS-PAGE zimografi. 1-6 günlük fermentasyon ortamı, S: Saflaştırılmış enzim, GA2a: Glukoamilaz 2'nin 1. alt ünitesi, GA2b: Glukoamilaz 2'nin 2. alt ünitesi.

3. 4. Enzimin Saflaştırılması

Liyofilizasyonla konsantre edilen süzüntü, Najafi ve Kembhavi'nin (Najafi and Kembhavi, 2005) nişasta afinite kromatografi metodu kısmi olarak değiştirilerek saflaştırılmış ve saflaştırma basamakları Tablo 23'de sunulmuştur. Direkt kültürün spesifik aktivitesi 55.14 ± 1.30 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu fraksiyonun verimi (%) 100 ve saflaştırma katsayısı 1 olarak kabul edilip, sonraki fraksiyonun verim ve saflaştırma katsayısı bu fraksiyon temel alınarak hesaplanmıştır. Saflaştırma sonucunda enzimin spesifik aktivitesi 6671 ± 358 U/mg protein, verimi $\% 25 \pm 0.21$ ve saflaştırma katsayısı 117 ± 2.7 kat olarak hesaplanmıştır.

3. 5. Glukoz Standardı

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

Glukoamilazın hidroliziyle oluşan redüktör şeker miktarını saptamak için, glukoz standart çözeltilerinin spektrofotometrik olarak absorbsanları ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorbsan grafiği linear regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin glukoz konsantrasyonu, grafik denklem formülünden hesaplanmıştır (Şekil 9). Grafiğin denklemi $y = 0.0002x - 0.0653$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.9998$ dir.

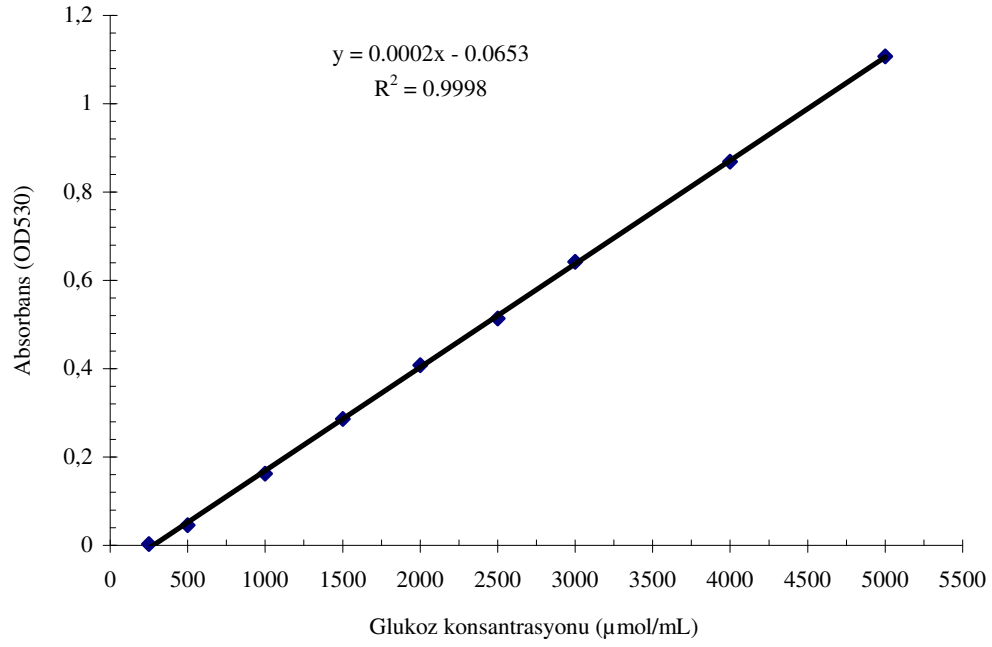
3. 6. Protein Tayini

Fermentasyon ortamının ve saflaştırmanın her basamağında protein tayini yapıldı. Örneklerin protein konsantrasyonlarını saptamak için, standart olarak sığır serum albumini kullanılarak konsantrasyona karşı absorbans grafiği linear regresyon analiziyle çizilip (Şekil 10), bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu bu grafiğin denklem formülünden ($y = 0.0014x + 0.011$, $R^2 = 0.9955$) hesaplanmıştır.

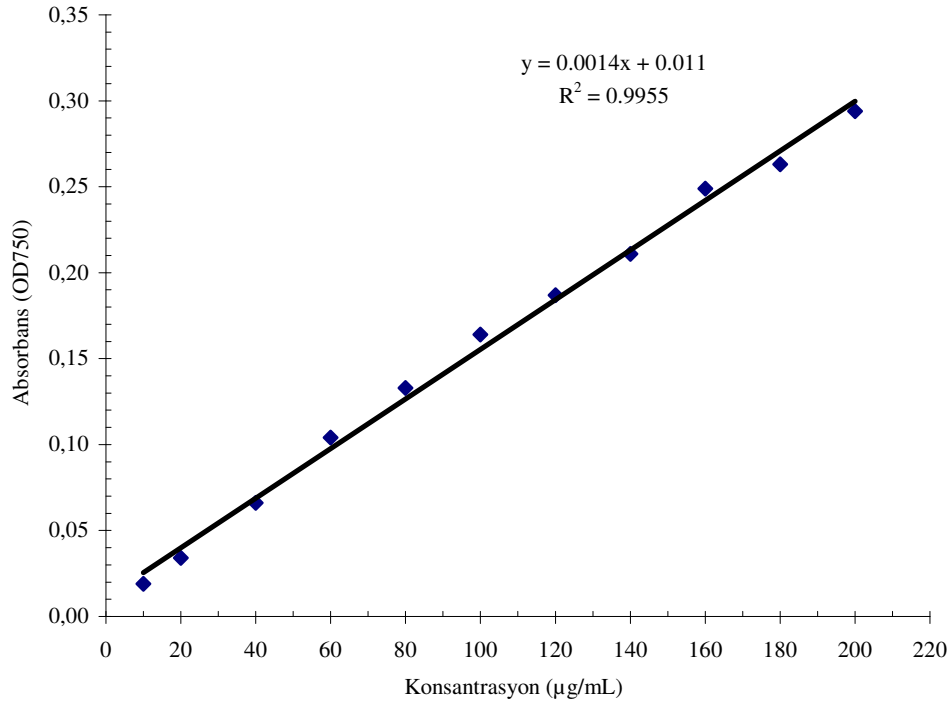
Tablo 23. *A. flavus* HBF34 GA'sının nişasta afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Saflaştırma Basamakları	Fraksiyon Hacmi (mL)	Protein (mg/mL) (ORT. $\pm$ S. H.)	Total Protein (mg) (ORT. $\pm$ S. H.)	Enzim Aktivitesi (U/mL) (ORT. $\pm$ S. H.)	Total Aktivite (U) (ORT. $\pm$ S. H.)	Spesifik aktivite (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	Verim (%) (ORT. $\pm$ S. H.)	Saflaştırma Katsayısı (ORT. $\pm$ S. H.)
Direkt kültür	31	9.63 $\pm$ 0.12	298.56 $\pm$ 3.85	530.81 $\pm$ 7.94	16455 $\pm$ 246	55.14 $\pm$ 1.30	100	1
Nişasta Affinite Kromatografisi	15	0.041 $\pm$ 0.002	0.62 $\pm$ 0.03	273.58 $\pm$ 3.85	4104 $\pm$ 58	6671 $\pm$ 358	25 $\pm$ 0.21	117 $\pm$ 2.70

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



Şekil 9. Glukoz standart eğrisi.



Şekil 10. Protein standart eğrisi.

3. 7. İnkübasyon Süresinin Etkisi

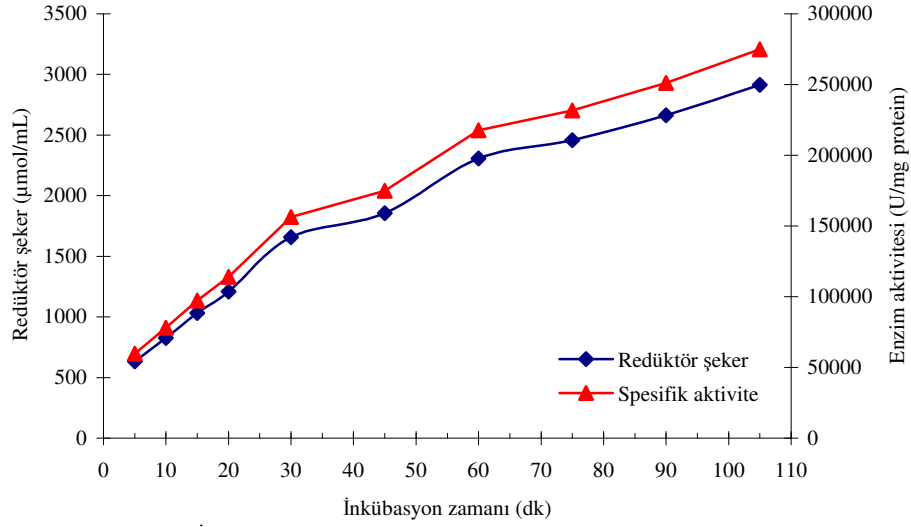
Enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübe edildiklerinde redüktör şeker miktarı zamana bağlı olarak artmakta ise de, ilk 30 dakikalık artış doğrusaldır (Şekil 11 ve Tablo 24). Bu nedenle bundan sonraki standart enzim aktivite deneyleri 30 dakikalık inkübasyonlar ile yapılmıştır. İnkübasyon periyotları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Ancak, 60 ve 75 dakikalık inkübasyonlar arasındaki fark önemsiz iken diğer inkübasyonlarla arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

Tablo 24. *A. flavus* HBF34'ün GA aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisi

İnkübasyon Zamanı (dk)	Redüktör şeker ($\mu\text{mol/mL}$) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x
5	633.17 $\pm$ 3.33	a	59733 $\pm$ 314	a
10	826.50 $\pm$ 22.55	b	77972 $\pm$ 2127	b
15	1031.50 $\pm$ 36.06	c	97311 $\pm$ 3401	c
20	1209.83 $\pm$ 22.42	d	114135 $\pm$ 2115	d
30	1656.50 $\pm$ 85.05	e	156274 $\pm$ 8023	e
45	1854.83 $\pm$ 29.20	f	174984 $\pm$ 2755	f
60	2306.50 $\pm$ 57.95	g	217594 $\pm$ 5467	g
75	2456.50 $\pm$ 122.17	g	231745 $\pm$ 11525	g
90	2663.17 $\pm$ 78.81	h	251242 $\pm$ 7435	h
105	2914.83 $\pm$ 17.6	i	274984 $\pm$ 1664	i

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

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



Şekil 11. İnkübasyon zamanının enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3. 8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

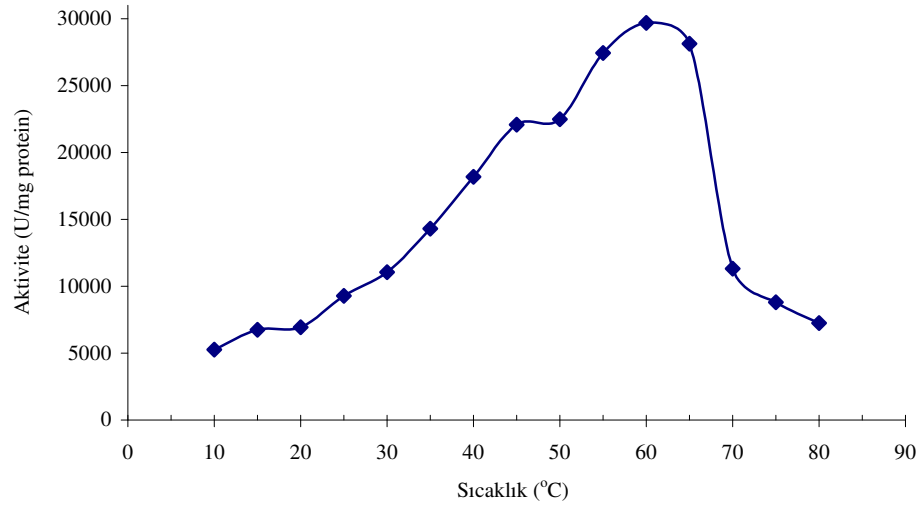
GA aktivitesi (U/mg protein) üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 10 ile 80 °C arasında 5 °C'lık aralıklarla aktivite ölçümleri yapılmış olup, sonuçlar Tablo 25 ve Şekil 12'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi 10 °C'da en düşük değerde (5270.31 ± 183.52) olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivite doğrusal bir şekilde artarak 60 °C'da maksimum seviyeye (29687.87 ± 311.84) ulaşmıştır. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivite 65 °C'dan sonra hızla düşmektedir. 60 °C'daki maksimum enzim aktivitesi ile 65 °C'daki maksimum enzim aktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz, diğer sıcaklıklarda ise önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edilerek, diğer sıcaklıklardaki aktivite değişimi maksimum aktiviteye göre % olarak saptandı. Her ne kadar maksimum aktivite 60 °C'da saptanmış ise de, 40, 45, 50, 55 ve 65 °C'larda maksimum aktivitenin sırasıyla % 61, 74, 75, 92 ve 94 olduğu görülmüştür.

Tablo 25. *A. flavus* HBF34'ün GA aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/mg protein) (ORT. ± S. H.)	x	% Aktivite
10	5270.31 ± 183.52	a	17.75
15	6733.87 ± 144.02	acj	22.68
20	6928.02 ± 395.97	acj	23.34
25	9287.63 ± 806.45	b	31.28
30	11049.88 ± 544.03	di	37.22
35	14305.56 ± 846.92	e	48.19
40	18173.54 ± 1209.49	f	61.22
45	22071.39 ± 929.17	g	74.34
50	22489.55 ± 371.56	g	75.75
55	27447.73 ± 240.34	h	92.45
60	29687.87 ± 311.84	i	100
65	28119.77 ± 308.60	h ₁	94.72
70	11303.76 ± 491.47	di	38.08
75	8809.74 ± 481.38	bdj	29.67
80	7241.64 ± 39.51	j	24.39

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

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



Şekil 12. *A. flavus* HBF34'ün GA aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

3. 9. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

GA stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 26, 27 ve Şekil 13, 14, 15’de gösterilmiştir. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla enzim, farklı sıcaklıklarda (27, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C) inkübe edilmiştir. Enzim çözeltisinden belli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edilmiş ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlenmiştir.

GA 27 °C’da 15 dakikadan başlayarak 192 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. GA’nın 3 günlük inkübasyonu sonunda aktivitesini büyük ölçüde koruduğu (% 92) ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). 4. günden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 8. günde dahi aktivitenin % 86’sının korunduğu saptanmıştır.

GA 40 °C’da 15 dakikadan başlayarak 268 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. GA’nın 5 günlük inkübasyonu sonunda aktivitesini büyük ölçüde koruduğu (% 95) ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). 6. günden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 11. günde dahi aktivitenin % 82’sinin korunduğu saptanmıştır.

GA 50 °C’da 15 dakikadan başlayarak 96 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. Denenen tüm inkübasyon periyotlarında GA aktivitesinin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). İnkübasyon periyotlarındaki azalma, kontrole göre önemli olmasına rağmen, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlarda aktivitenin sırasıyla % 75, 68, 56 ve 40’ının korunduğu görülmüştür.

GA 60 °C’da 15 dakikadan başlayarak 2 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. Denenen tüm inkübasyon periyotlarında GA aktivitesinin kontrol ile arasındaki farkın

istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). İlk 15 dakikada enzimin % 55 aktivitesini koruduğu, 2 saatte ise % 23'ü korunduğu saptanmıştır.

GA 70 °C'da 15 dakikadan başlayarak 1 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. Denenen tüm inkübasyon periyotlarında GA aktivitesinin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). İlk 15 dakikada enzimin % 19 aktivitesini koruduğu, 1 saatte ise % 17'si korunduğu saptanmıştır.

GA 80 °C'da 15 dakikadan başlayarak 1 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. Denenen tüm inkübasyon periyotlarında GA aktivitesinin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). İlk 15 dakikada enzimin % 20 aktivitesini koruduğu, 1 saatte ise % 19'unun korunduğu saptanmıştır.

Tablo 26. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi

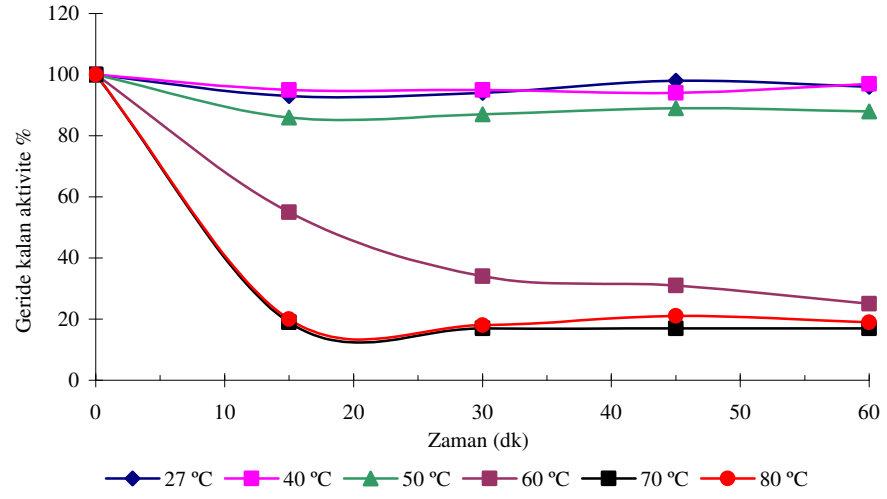
İnkübasyon zamanı	Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesindeki değişim											
	27 °C (ORT. ± S. H.)	x	40 °C (ORT. ± S. H.)	x	50 °C (ORT. ± S. H.)	x	60 °C (ORT. ± S. H.)	x	70 °C (ORT. ± S. H.)	x	80 °C (ORT. ± S. H.)	x
Kontrol	4775 ± 99	a	2890 ± 6	a	4952 ± 155	a	537 ± 22	a	7809 ± 290	a	436 ± 16	a
15 dk	4443 ± 63	a	2751 ± 40	a	4281 ± 16	b	295 ± 19	b	1451 ± 96	b	86 ± 3	b
30 dk	4475 ± 64	a	2738 ± 40	a	4329 ± 9	b	182 ± 6	b	1352 ± 10	b	77 ± 4	b
45 dk	4672 ± 10	a	2728 ± 9	a	4418 ± 26	b	166 ± 9	b	1299 ± 34	b	92 ± 3	b
1 saat	4580 ± 92	a	2797 ± 60	a	4371 ± 58	b	133 ± 9	b	1362 ± 134	b	83 ± 3	b
2 saat	4523 ± 229	a	3350 ± 80	a	4318 ± 139	b	121 ± 5	b	-	-	-	-
3 saat	4941 ± 90	a	2804 ± 54	a	4339 ± 100	b	-	-	-	-	-	-
4 saat	4895 ± 191	a	2817 ± 80	a	4219 ± 40	b	-	-	-	-	-	-
5 saat	4569 ± 101	a	2956 ± 102	a	4329 ± 113	b	-	-	-	-	-	-
6 saat	4632 ± 109	a	2824 ± 9	a	4271 ± 241	b	-	-	-	-	-	-
7 saat	4415 ± 59	a	2827 ± 58	a	4035 ± 82	b	-	-	-	-	-	-
8 saat	4569 ± 69	a	2807 ± 49	a	3841 ± 73	b	-	-	-	-	-	-
9 saat	4397 ± 103	a	2903 ± 27	a	-	-	-	-	-	-	-	-
10 saat	4712 ± 109	a	2824 ± 26	a	3899 ± 142	b	-	-	-	-	-	-
24 saat	4506 ± 89	a	2870 ± 52	a	3710 ± 100	b	-	-	-	-	-	-
48 saat	4701 ± 35	a	2824 ± 72	a	3369 ± 64	b	-	-	-	-	-	-
72 saat	4380 ± 79	a	2824 ± 112	a	2777 ± 82	b	-	-	-	-	-	-
96 saat	3728 ± 79	b	2883 ± 49	a	1960 ± 94	b	-	-	-	-	-	-
120 saat	3785 ± 163	b	2744 ± 63	a	-	-	-	-	-	-	-	-
144 saat	3957 ± 55	b	2301 ± 48	b	-	-	-	-	-	-	-	-
168 saat	3585 ± 152	b	2493 ± 40	b	-	-	-	-	-	-	-	-
192 saat	4123 ± 107	b	2357 ± 37	b	-	-	-	-	-	-	-	-
216 saat	-	-	2563 ± 77	b	-	-	-	-	-	-	-	-
240 saat	-	-	2516 ± 83	b	-	-	-	-	-	-	-	-
268 saat	-	-	2381 ± 33	b	-	-	-	-	-	-	-	-

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

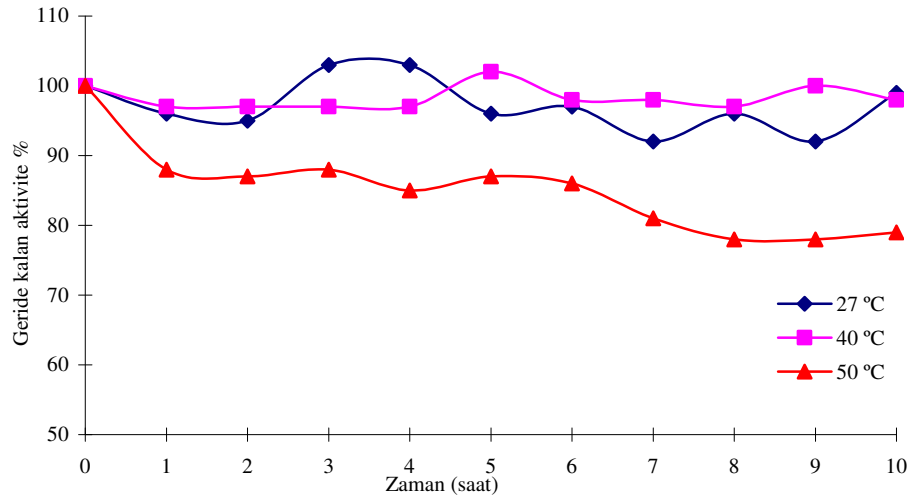
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (27, 50, 40, 60, 70, 80 °C; p< 0.05).

Tablo 27. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite %

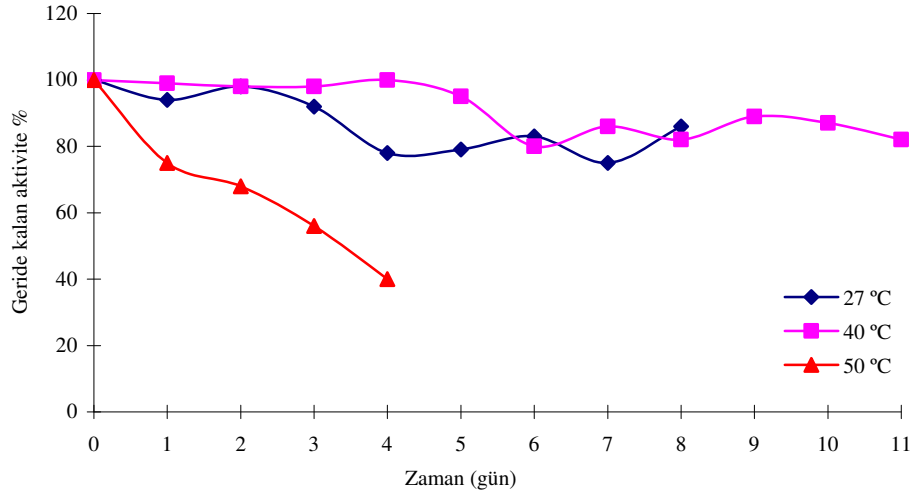
İnkübasyon zamanı	Geride kalan aktivite %					
	27 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
Kontrol	100	100	100	100	100	100
15 dk	93	95	86	55	19	20
30 dk	94	95	87	34	17	18
45 dk	98	94	89	31	17	21
1 saat	96	97	88	25	17	19
2 saat	95	97	87	23	-	-
3 saat	103	97	88	-	-	-
4 saat	103	97	85	-	-	-
5 saat	96	102	87	-	-	-
6 saat	97	98	86	-	-	-
7 saat	92	98	81	-	-	-
8 saat	96	97	78	-	-	-
9 saat	92	100	-	-	-	-
10 saat	99	98	79	-	-	-
24 saat	94	99	75	-	-	-
48 saat	98	98	68	-	-	-
72 saat	92	98	56	-	-	-
96 saat	78	100	40	-	-	-
120 saat	79	95	-	-	-	-
144 saat	83	80	-	-	-	-
168 saat	75	86	-	-	-	-
192 saat	86	82	-	-	-	-
216 saat	-	89	-	-	-	-
240 saat	-	87	-	-	-	-
268 saat	-	82	-	-	-	-



Şekil 13. GA'nın farklı sıcaklıklarda geride kalan aktivite yüzdesi.



Şekil 14. GA'nın 10 saatlik geride kalan aktivite yüzdesi.



Şekil 15. GA'nın günlük geride kalan aktivite yüzdesi.

3. 10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

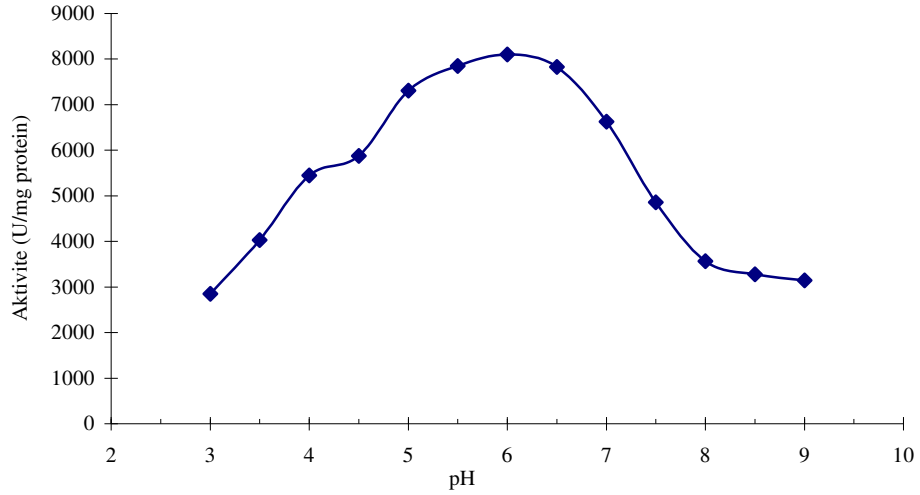
GA aktivitesi (U/mg protein) üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Tablo 28 ve Şekil 16'da gösterilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla, enzimin pH 3.0-9.0 arasında aktiviteleri ölçülmüştür. Enzim aktivitesi pH 3.0'de en düşük seviyede olup (2847.66 ± 146.17), pH'daki 0.50'şer birimlik artışlarla beraber enzim aktivitesi de istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. Maksimum enzim aktivitesi pH 6.0'da görülmekle birlikte (8102.44 ± 30.64), pH 5.5 ve 6.5'da bulunan değerlerle arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). pH 6.5'dan itibaren enzim aktivitesi önemli bir düşüş göstermiştir. Her ne kadar maksimum enzim aktivitesi pH 6.0'da görülmüş ise de, pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.5, 7.0 ve 7.5'da maksimum aktivitenin, sırasıyla % 64, 67, 72, 90, 97, 97, 82 ve 79'u görülmüştür.

Tablo 28. *A. flavus* HBF34 GA aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	% Aktivite
3.0	2847.66 $\pm$ 146.17	a	35
3.5	5183.12 $\pm$ 76.61	c	64
4.0	5448.51 $\pm$ 631.95	bc	67
4.5	5873.14 $\pm$ 146.17	bd	72
5.0	7306.26 $\pm$ 53.08	e	90
5.5	7845.90 $\pm$ 243.40	ef	97
6.0	8102.44 $\pm$ 30.64	f	100
6.5	7828.20 $\pm$ 154.24	ef	97
7.0	6625.09 $\pm$ 261.98	g	82
7.5	6412.77 $\pm$ 23.41	dg	79
8.0	3564.23 $\pm$ 91.93	h	44
8.5	3281.14 $\pm$ 88.46	ah	40
9.0	3148.44 $\pm$ 58.01	ah	39

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

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



Şekil 16. *A. flavus* HBF34 GA aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

3. 11. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 29, 30 ve Şekil 17, 18'de gösterilmiştir. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla enzim, farklı pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edilmiştir ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlenmiştir.

Enzim, pH 3.0'de 12-60 saat arasında inkübe edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesindeki değişimin, kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Enzimin 60 saatlik inkübasyon sonunda, aktivitesinin % 78'ini koruduğu, ancak kontrol değerine göre önemli olduğu görülmüştür.

Enzim, pH 4.0'de 12-108 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzimin 96 saat boyunca stabil kaldığı bulunmuş ve bu süre sonunda ölçülen değerlerin kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Enzim, 108. saat sonunda ise aktivitesinin % 88'ini korumuş, ancak kontrol değeri ile arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür.

Enzim, pH 5.0'de 12-108 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzimin 96 saat boyunca stabil kaldığı bulunmuş (% 92) ve bu süre sonunda ölçülen değerlerin kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Enzim, 108. saat sonunda ise aktivitesinin % 86'sını korumuş, ancak kontrol değeri ile arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür.

Enzim, pH 6.0'da 12-108 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzim, 108 saat boyunca stabil kalmış (% 95) ve bulunan değerlerin kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür.

Enzim, pH 7.0'de 12-108 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzim, 96 saat boyunca stabil kalmış (% 98) ve bulunan değerlerin kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Enzim, 108. saat sonunda ise aktivitesinin % 90'ını korumuş, ancak kontrol değeri ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Enzim, pH 8.0'de 12-108 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzim, 96 saat boyunca stabil kalmış (% 97) ve bulunan değerlerin kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Enzim, 108. saat sonunda ise aktivitesinin % 82'sini korumuş, ancak kontrol değeri ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Enzim, pH 9.0'da 12-60 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzim, 48 saat boyunca stabil kalmış (% 92) ve bulunan değerlerin kontrol değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Enzim, 60. saat sonunda ise aktivitesinin % 87'sini korumuş, ancak kontrol değeri ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Tablo 29. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı pH'lardaki stabilitesi

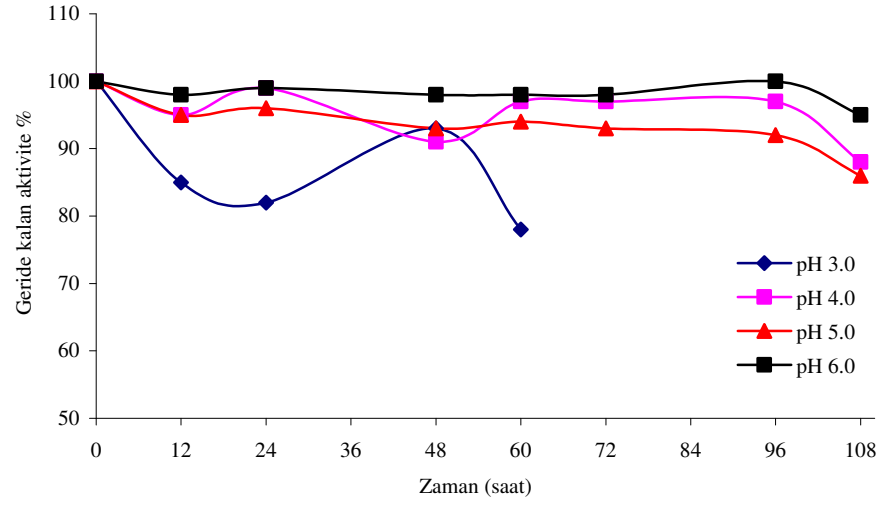
Zaman (saat)	Farklı pH'lardaki enzim aktivitesi (U/mg protein)													
	pH 3.0 (ORT. ± S. H.)	x	pH 4.0 (ORT. ± S. H.)	x	pH 5.0 (ORT. ± S. H.)	x	pH 6.0 (ORT. ± S. H.)	x	pH 7.0 (ORT. ± S. H.)	x	pH 8.0 (ORT. ± S. H.)	x	pH 9.0 (ORT. ± S. H.)	x
0	606.62 ± 24.08	a	1106.62 ± 33.38	a	1036.11 ± 20.38	a	2890 ± 6	a	974.15 ± 30.14	a	880.13 ± 33.92	a	852.35 ± 24.64	a
12	512.61 ± 39.57	a	1053.21 ± 42.68	a	980.56 ± 20.38	a	2824 ± 26	a	944.23 ± 12.82	a	920.73 ± 20.38	a	809.62 ± 25.91	a
24	499.79 ± 51.33	a	1093.80 ± 55.56	a	993.38 ± 27.78	a	2870 ± 52	a	959.19 ± 35.18	a	933.55 ± 38.87	a	837.39 ± 27.78	a
48	563.89 ± 48.16	a	1008.33 ± 51.81	a	959.19 ± 20.38	a	2824 ± 72	a	933.55 ± 33.58	a	873.72 ± 42.03	a	781.84 ± 32.33	a
60	474.15 ± 2.14	b	1076.71 ± 18.26	a	969.87 ± 13.34	a	2829 ± 62	a	1027.56 ± 6.41	a	912.18 ± 31.62	a	743.38 ± 11.31	b
72	-	-	1070.30 ± 5.65	a	959.19 ± 22.61	a	2824 ± 112	a	848.08 ± 69.34	a	937.82 ± 22.51	a	-	-
96	-	-	1070.30 ± 7.70	a	957.05 ± 42.03	a	2883 ± 49	a	959.19 ± 26.26	a	854.49 ± 19.58	a	-	-
108	-	-	969.87 ± 41.21	b	886.54 ± 42.68	b	2744 ± 63	a	875.85 ± 21.69	b	719.87 ± 18.50	b	-	-

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

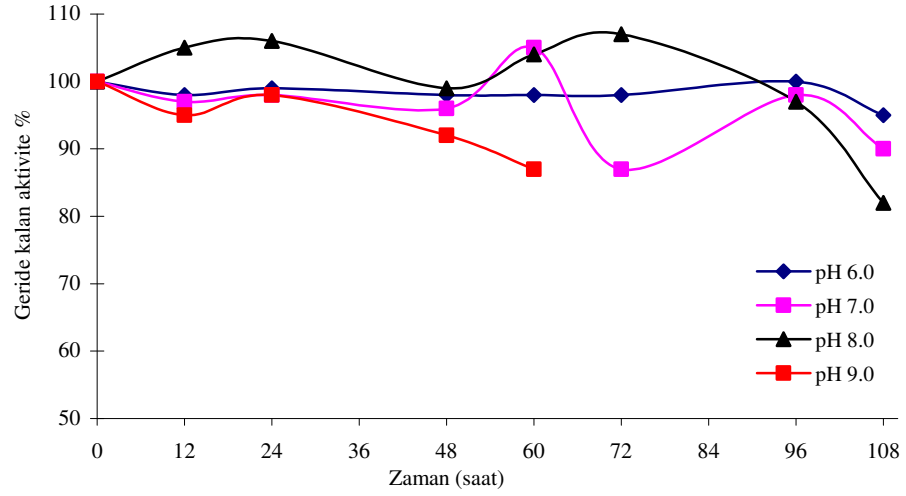
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0.05)

Tablo 30. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı pH'lardaki geride kalan aktivite %

İnkübasyon Zamanı (saat)	Farklı pH'lardaki geride kalan aktivite %						
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
0	100	100	100	100	100	100	100
12	85	95	95	98	97	105	95
24	82	99	96	99	98	106	98
48	93	91	93	98	96	99	92
60	78	97	94	98	105	104	87
72	-	97	93	98	87	107	-
96	-	97	92	100	98	97	-
108	-	88	86	95	90	82	-



Şekil 17. GA' nın farklı pH'lardaki (3.0-6.0) stabilitesi



Şekil 18. GA'nın farklı pH'lardaki (6.0-9.0) stabilitesi.

3. 12. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

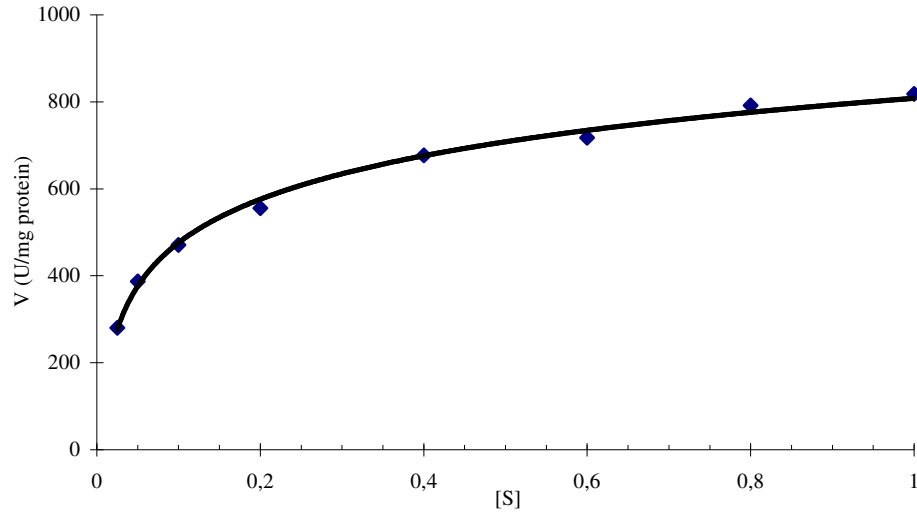
GA aktivitesi üzerine substrat (çözünür patates nişastası) konsantrasyonunun etkisi Tablo 31 ile Şekil 19 ve 20’de gösterilmiştir. GA aktivitesi üzerine çözünür patates nişastasının etkisini saptamak amacıyla, 0.025-1.0 mg/mL arasında konsantrasyonları kullanılmıştır. Substrat konsantrasyonunun 0.025 mg/mL’den (280.34 ± 10.40 U/mg protein), 0.2 mg/mL’ye (555.47 ± 22.26 U/mg protein) kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak hızla arttığı ve bu değerler arasındaki farkın da istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (Tablo 31). 0.4 ve 0.6 mg/mL konsantrasyon değerlerinde görülen aktiviteler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamakla beraber az da olsa bir artış olmuştur. Aktivitedeki artış, 0.8-1.0 mg/mL arasında maksimum seviyeye ulaşmakla beraber, bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür.

GA’nın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, Lineweaver-Burk $y = a + bx$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V$ ’ye karşı $1/[S]$ olarak çizilmiştir (Şekil 20). Bu grafiğin doğru denklemi ise, $y = 0.0013 + 6E-05x$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0.98 bulunmuştur. Denklemin doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0.0013$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 769.23 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -21.66$ değerinde olup, K_m değeri 0,046 mg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca, GA’nın glikojen, amilopektin ve amiloz için K_m ve V_{max} değerleri aynı koşullarda saptanmıştır (Tablo 32). GA’nın glikojen için K_m değeri 0.075 mg/mL ve V_{max} değeri 1250 U/mg protein (Şekil 21), amilopektin için K_m değeri 0.1 mg/mL ve V_{max} değeri 3333.33 U/mg protein (Şekil 22) ve amiloz için K_m değeri 0.125 mg/mL ve V_{max} değeri 2500 U/mg protein olarak hesaplanmıştır (Şekil 23).

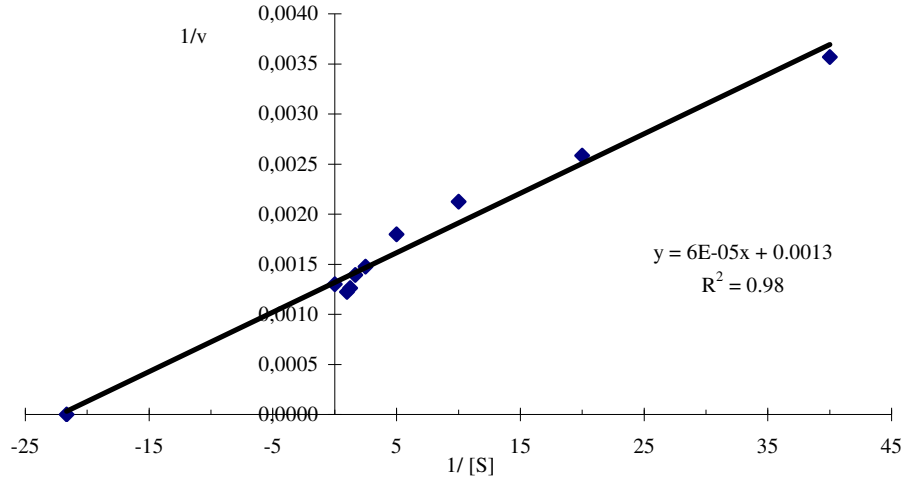
Tablo 31. *A. flavus* HBF34 GA aktivitesi üzerine substrat (çözünür patates nişastası) konsantrasyonunun (mg/mL) etkisi

[S]	V (ORT. $\pm$ S. H.)	x	1/V	1/[S]
0.025	280.34 $\pm$ 10.40	a	0.0036	40.00
0.05	387.04 $\pm$ 18.33	b	0.0026	20.00
0.1	470.81 $\pm$ 18.41	c	0.0021	10.00
0.2	555.47 $\pm$ 22.26	d	0.0018	5.00
0.4	677.16 $\pm$ 6.17	e	0.0015	2.50
0.6	717.72 $\pm$ 4.58	e	0.0014	1.67
0.8	791.80 $\pm$ 13.32	f	0.0013	1.25
1.0	818.25 $\pm$ 6.11	f	0.0012	1.00

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). **V:** U/mg protein



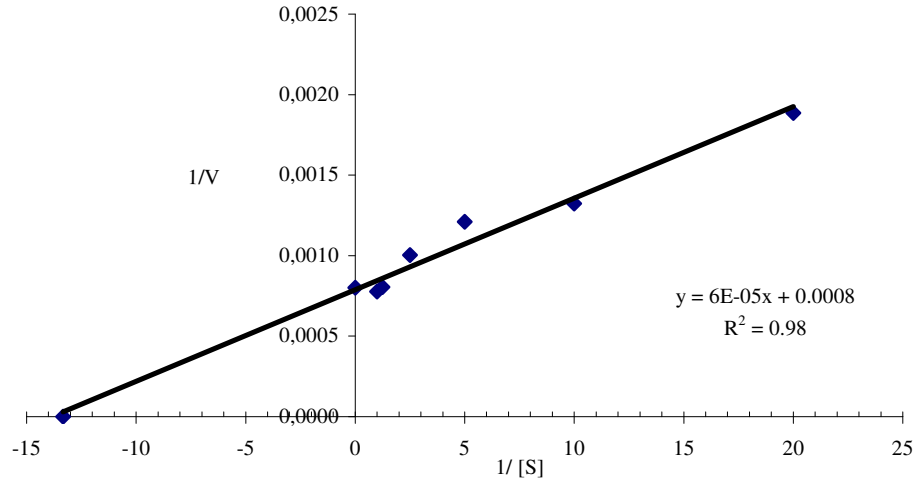
Şekil 19. GA aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis- Menten Grafiği).



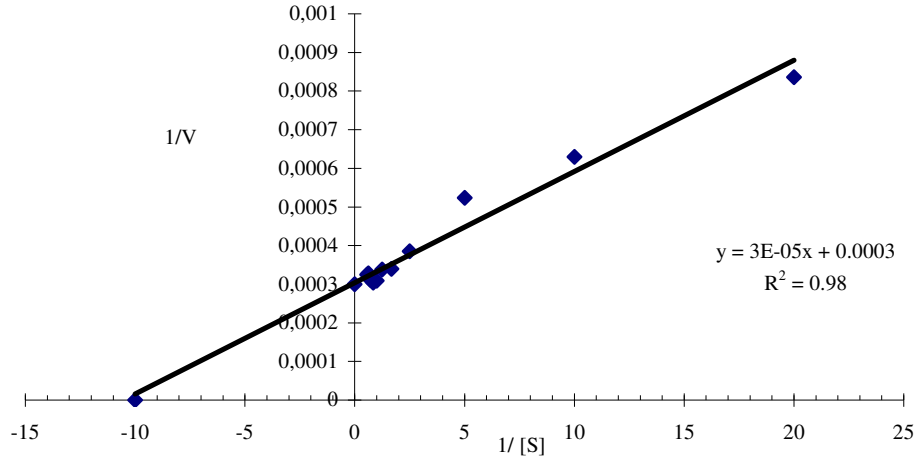
Şekil 20. GA aktivitesi üzerine çözünür patates nişastası konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).

Tablo 32. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı substratlar için Km ve Vmax değerleri

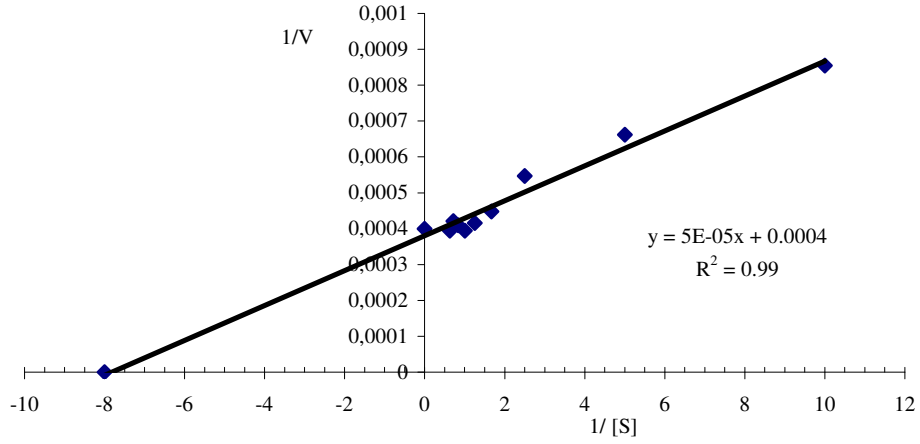
Substrat	Km (mg/mL)	Vmax (U/mg protein)
Niştasta	0.046	769.23
Glikojen	0.075	1250
Amilopektin	0.100	3333.33
Amiloz	0.125	2500



Şekil 21. GA aktivitesi üzerine glikojen konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği).



Şekil 22. GA aktivitesi üzerine amilopektin konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği).



Şekil 23. GA aktivitesi üzerine amiloz konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafiği).

3. 13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

GA'nın substrat spesifitesi Tablo 33'de gösterilmiştir. Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla sukroz, maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz,

amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, çözünür patates nişastası ve selüloz kullanılmıştır. Bütün substratların enzimatik hidrolizi sonucunda, kontrol grubuna göre en iyi enzim aktivitesi glikojen (1511.50 ± 21.73 U/mg protein) için bulunmasına rağmen, kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Amilopektin, mısır nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası, maltoz, amiloz, dekstrin, selüloz, maltotrioz, rafinoz ve sukroz için bulunan enzim aktivite değerlerinin (Tablo 33) kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çözünür patates nişastası için ölçülen değer kontrol (100) kabul edilerek, aktivite değişimleri % değer olarak hesaplanmıştır. Glikojen, amilopektin, mısır nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası, maltoz, amiloz, dekstrin, selüloz, maltotrioz, rafinoz ve sukroz için % aktivite değerleri sırasıyla % 102, 84, 72, 70, 69, 68, 59, 57, 53, 50, 42 ve 36 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 33. *A. flavus* HBF34 GA'sının substrat spesifitesi

Substrat	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	% Aktivite
Çözünür patates nişastası	1477.91 ± 21.35	a	100
Glikojen	1511.50 ± 21.73	a	102
Amilopektin	1241.47 ± 17.90	b	84
Mısır nişastası	1059.30 ± 11.84	b	72
Pirinç nişastası	1030.88 ± 13.49	b	70
Buğday nişastası	1019.25 ± 16.80	b	69
Maltoz	1002.46 ± 1.29	b	68
Amiloz	878.42 ± 22.86	b	59
Dekstrin	839.66 ± 1.29	b	57
Selüloz	776.36 ± 29.26	b	53
Maltotrioz	742.77 ± 7.19	b	50
Rafinoz	613.57 ± 8.07	b	42
Sukroz	537.34 ± 1.29	b	36

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

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

3. 14. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

GA aktivitesi üzerine metal iyonlarının (NaCl, KCl, LiCl, NH₄Cl, CoCl₂, MnCl₂, MgCl₂, NiCl₂, Hg₂Cl₂, CuCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, AlCl₃, FeCl₃, Na₂O₃Se) ve EDTA'nın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 34 ile Şekil 24, 25, 26 ve 27'de gösterilmiştir.

Mn²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının 1, 5 ve 10 M'luk konsantrasyonları GA aktivitesini kuvvetli bir şekilde aktive etmiştir. İnkübasyon sonunda geriye kalan enzim aktivitesi Mn²⁺ için sırasıyla % 239, 269 ve 214, Ca²⁺ için ise, % 134, 164, 167 olarak ölçülmüştür. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p< 0.05). Co²⁺ iyonunun 1 mM'luk konsantrasyonu aktiviteyi arttırmış ve kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (p< 0.05). Co²⁺ iyonunun 5 ve 10 mM'luk konsantrasyonunda aktivitede az bir artış olmasına rağmen, kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Ba²⁺ iyonunun 1 mM'luk konsantrasyonunda aktivitedeki değişim fazla olmamakla beraber, kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p> 0.05). Ba²⁺ iyonunun 5 ve 10 mM'luk konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde artış görülmüş ve kontrol ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 21).

Ni²⁺ iyonunun 1 mM'luk konsantrasyonunda aktivitedeki değişim ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p> 0.05). Ni²⁺ iyonunun 5 ve 10 mM'luk konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde bir azalma görülmüş ve kontrol ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p< 0.05). Mg²⁺ iyonunun konsantrasyonun artışıyla GA aktivitesi azalmış ve kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p< 0.05). Li²⁺, K⁺, NH₄⁺ ve Na⁺ iyonlarının her üç konsantrasyonunda enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik olmayıp, kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>

0.05). Li^+ , K^+ , NH_4^+ ve Na^+ iyonlarının bütün konsantrasyonlarda aktivitenin % 90-100'ünün korunmuş olması da dikkate değerdir (Şekil 25).

Cu^{2+} iyonunun konsantrasyonun artışıyla GA aktivitesi azalmış ve kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Fe^{3+} iyonunun 1 mM'lık konsantrasyonunda aktivitedeki değişim fazla olmamakla beraber, kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Fe^{3+} iyonunun 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin hemen hemen tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Hg^{2+} iyonu 1 mM'lık konsantrasyonda GA aktivitesini % 50 azaltmış, diğer konsantrasyonlarda ise enzimi tamamen inhibe etmiştir. Al^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarının 1 mM'lık konsantrasyonları GA aktivitesini sırasıyla % 90 ve 60 azaltmış ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Al^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarının 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini oldukça düşürmüştür. $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ 1 mM'lık konsantrasyonunda aktivitenin % 97'sini koruduğu görülmüş ve kontrol grubuyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonunda aktivitenin sırasıyla % 81 ve 24'ünü koruduğu ve bu değerler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (Şekil 26).

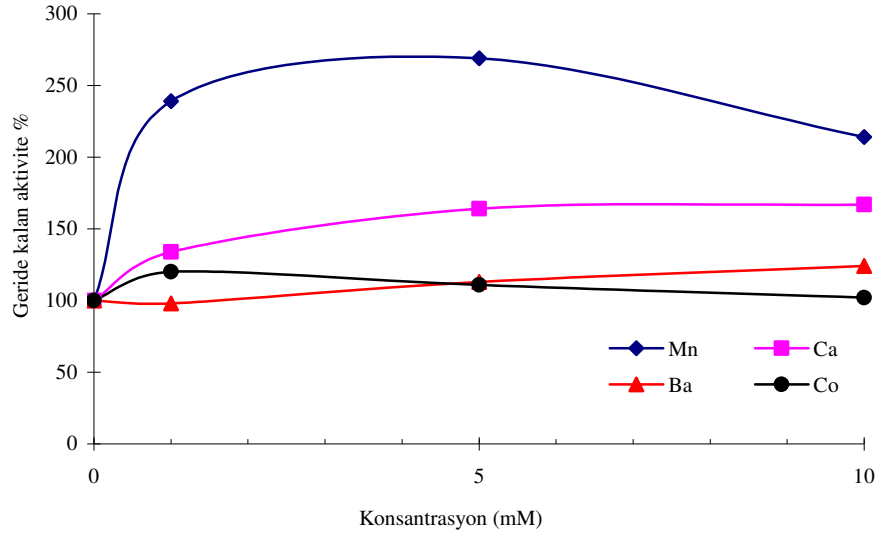
EDTA 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarında aynı oranlarda aktiviteyi inhibe etmiş olup, aktivitenin yaklaşık % 80'sini korunmuştur. 10 mM'lık konsantrasyonunda ise aktivitenin % 61'inin korunduğu ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (Şekil 27).

Tablo 34. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi

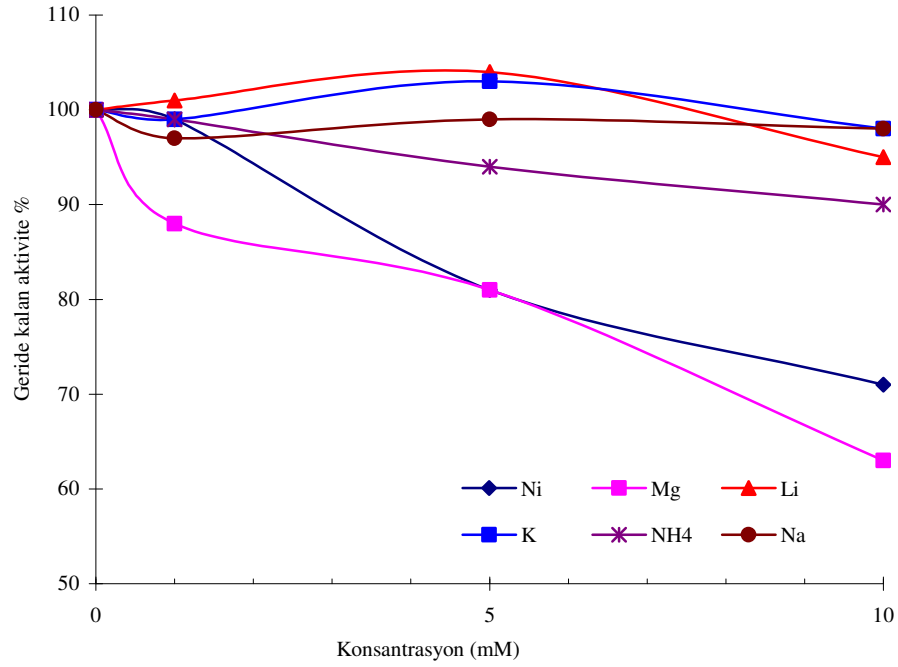
Metal iyonu	Farklı metal iyon konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi (U/mg protein) ve geride kalan aktivite %								
	1 mM (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite	5 mM (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite	10 mM (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	5890.57 $\pm$ 160.06	a	100	5890.57 $\pm$ 160.06	a	100	5890.57 $\pm$ 160.06	a	100
FeCl₃	6416.67 $\pm$ 114.59	a	109	748.88 $\pm$ 48.68	b	13	0.00 $\pm$ 0.00	b	0
AlCl₃	5280.30 $\pm$ 362.25	b	90	2423.96 $\pm$ 129.43	b	41	701.18 $\pm$ 4.86	b	12
MnCl₂	14056.40 $\pm$ 185.76	b	239	15849.33 $\pm$ 681.40	b	269	12625.42 $\pm$ 319.87	b	214
CaCl₂	7877.95 $\pm$ 364.59	b	134	9662.46 $\pm$ 187.47	b	164	9813.97 $\pm$ 269.75	b	167
CoCl₂	7073.23 $\pm$ 102.40	b	120	6531.71 $\pm$ 33.08	a	111	5981.76 $\pm$ 106.73	a	102
NiCl₂	5810.61 $\pm$ 130.67	a	99	4750.00 $\pm$ 84.18	b	81	4186.03 $\pm$ 117.95	b	71
BaCl₂	5788.16 $\pm$ 26.77	a	98	6641.13 $\pm$ 85.06	b	113	7275.25 $\pm$ 291.63	b	124
MgCl₂	5201.74 $\pm$ 77.50	b	88	4772.45 $\pm$ 56.33	b	81	3734.29 $\pm$ 87.52	b	63
HgCl₂	2971.10 $\pm$ 11.22	b	50	0.00 $\pm$ 0.00	b	0	0.00 $\pm$ 0.00	b	0
CuCl₂	4671.44 $\pm$ 133.65	b	79	3462.12 $\pm$ 416.82	b	59	1913.30 $\pm$ 296.45	b	32
ZnCl₂	3546.30 $\pm$ 210.49	b	60	3302.19 $\pm$ 143.10	b	56	718.01 $\pm$ 29.16	b	12
LiCl	5967.73 $\pm$ 116.47	a	101	6113.64 $\pm$ 59.12	a	104	5625.42 $\pm$ 113.66	a	95
KCl	5821.83 $\pm$ 103.93	a	99	6068.74 $\pm$ 131.70	a	103	5790.97 $\pm$ 36.48	a	98
NH₄Cl	5827.44 $\pm$ 244.01	a	99	5515.99 $\pm$ 122.66	a	94	5294.33 $\pm$ 269.77	a	90
Na₂O₃Se	5737.65 $\pm$ 70.31	a	97	4792.09 $\pm$ 100.42	b	81	1422.28 $\pm$ 76.28	b	24
NaCl	5718.01 $\pm$ 67.52	a	97	5841.47 $\pm$ 146.47	a	99	5751.68 $\pm$ 75.91	a	98
EDTA	4901.52 $\pm$ 102.06	b	83	4755.61 $\pm$ 108.05	b	81	3596.80 $\pm$ 370.21	b	61

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

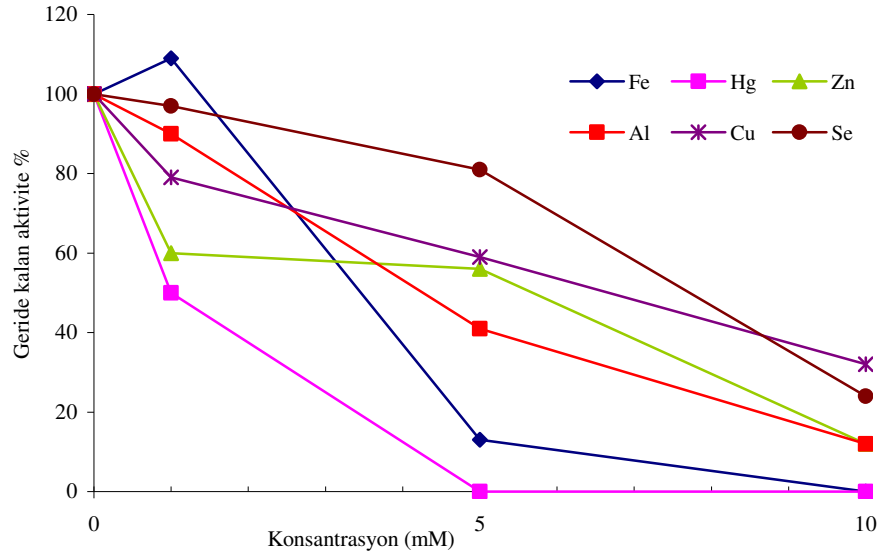
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0.05).



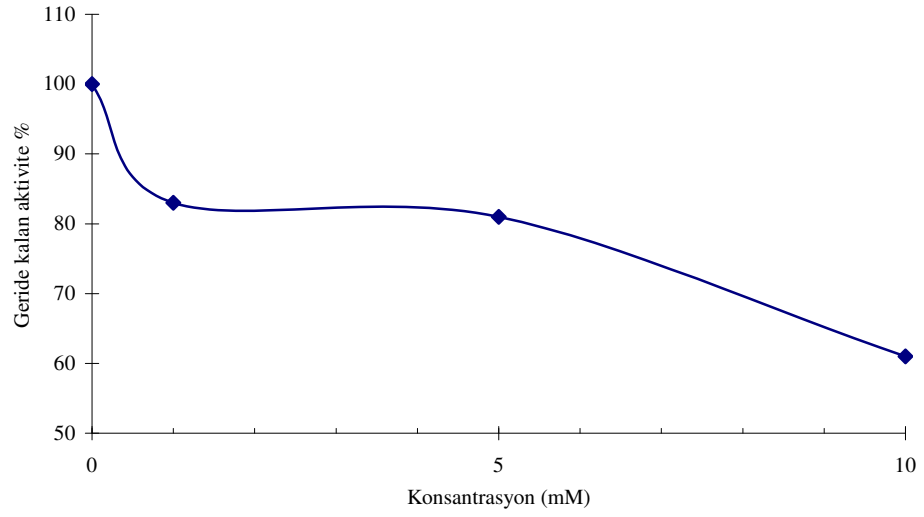
Şekil 24. GA aktivitesi üzerine Mn, Ca, Ba ve Co iyonlarının etkisi.



Şekil 25. GA aktivitesi üzerine Ni, Mg, Li, K, NH₄ ve Na iyonlarının etkisi.



Şekil 26. GA aktivitesi üzerine Cu, Se, Fe, Hg, Zn ve Al iyonlarının etkisi.



Şekil 27. GA aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.

3. 15. Enzimin Tuz Toleransı

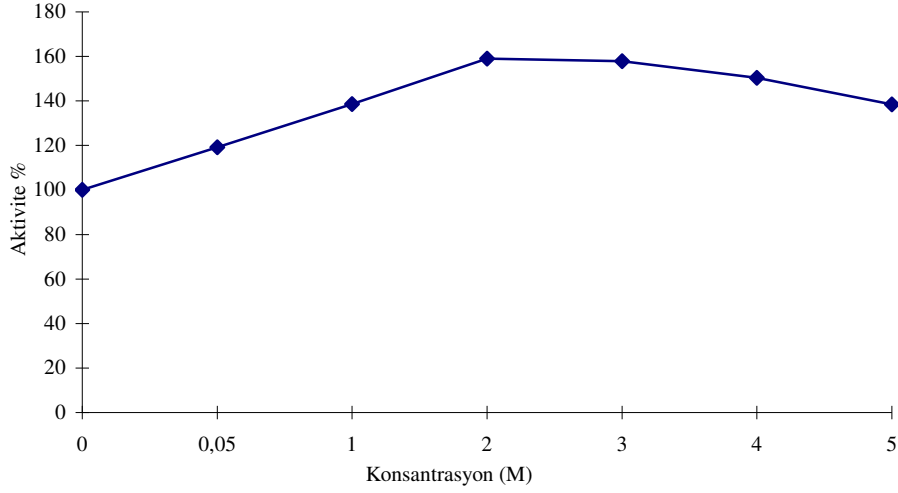
GA'nın tuz toleransı Tablo 35 ve Şekil 28'de gösterilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra GA aktivitesi denenen tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre önemli bir artış göstermiştir ($p < 0.05$). 0.05-2 M NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde kademeli bir artış olmuştur. Ancak konsantrasyon arttırıldığında aktivitede yavaş yavaş azalma görülmüştür. NaCl'nin 0.05, 1, 2, 3, 4 ve 5 M konsantrasyonları için kalan aktivite sırasıyla % 119, 139, 159, 158, 150 ve 139 olarak bulunmuştur.

Tablo 35. *A. flavus* HBF34 GA'sının tuz toleransı

NaCl Konsantrasyonu (M)	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	% Aktivite
Kontrol	3919.47 $\pm$ 66.34	a	100
0.05	4674.24 $\pm$ 97.08	b	119
1	5434.62 $\pm$ 106.07	b	139
2	6234.29 $\pm$ 99.16	b	159
3	6186.59 $\pm$ 230.13	b	158
4	5891.98 $\pm$ 48.92	b	150
5	5429.01 $\pm$ 90.96	b	139

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

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



Şekil 28. GA aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisi.

3. 16. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

Serin inhibitörü olan CMC'nin 0.5 ve 1 mM konsantrasyonlarda GA aktivitesinde bir azalma görülmüş ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). CMC'nin daha üst konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinde bir artış (% 41) görülmüş ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 36, Şekil 29).

Tiyol grubu inhibitörü olan DTNB'nin 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonları GA aktivitesinde bir azalmaya neden olmamış ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). DTNB'nin daha üst konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinde bir artış (% 74) görülmüş ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 36, Şekil 29).

SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4-dithiothreitol 0.5 ile 1 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde azalma (%)

10), daha üst konsantrasyonlarda ise artış (% 25) göstermiş olup kontrol ile aralarındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 36, Şekil 29).

Sistein, histidin ve serin inhibitörü olan PMSF'nin bütün konsantrasyonlarında GA aktivitesinde azalma görülmüş ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). PMSF'nin 0.5 mM'lık konsantrasyonunda geride kalan enzim aktivitesi % 77, 10 mM'lık konsantrasyonunda ise % 45 olarak bulunmuştur (Tablo 36, Şekil 30).

SH-grubu inhibitörü olan β -merkaptotanol'ün denenen bütün konsantrasyonları enzim aktivitesinde hafif bir inhibisyona neden olmuş ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). β -merkaptotanol'ün 10 mM'lık konsantrasyonunda geride kalan enzim aktivitesi % 84 olarak bulunmuştur (Tablo 36, Şekil 30).

Triptofan inhibitörü olan NBS denenen bütün konsantrasyonlarda GA aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır (Tablo 36, Şekil 30).

Protein denaturantı olan SDS'nin bütün konsantrasyonlarında GA aktivitesinde azalma görüldü ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). SDS'nin 0.5 mM'lık konsantrasyonunda geride kalan enzim aktivitesi % 81, 6 mM konsantrasyonunda ise % 35 olarak bulunmuştur. Daha üst konsantrasyonlarda oluşan çökeltiden dolayı aktivite ölçülememiştir (Tablo 37, Şekil 31).

Protein denaturantı olan üre denenen bütün konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde hafif bir inhibisyona neden olmuş ve kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Üre 10 mM'lık konsantrasyonunda geride kalan enzim aktivitesi % 86 olarak bulunmuştur (Tablo 37, Şekil 31).

Tablo 36. *A. flavus* HBF34 GA aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki inhibitörlerin etkisi

İnhibitör Konst. (mM)	Farklı inhibitör konsantrasyonlarında geride kalan aktivite %															
	PMSF (ORT. ± S. H.)	x	%	DTT (ORT. ± S.H.)	x	%	CMC (ORT. ± S. H.)	x	%	β-merkaptotanol (ORT. ± S. H.)	x	%	DTNB (ORT. ± S. H.)	x	%	NBS (ORT. ± S. H.)
Kontrol	3839.54 ± 11.78	a	100	4222.50 ± 83.09	a	100	1767,49 ± 43,67	a	100	3839.54 ± 11.78	a	100	1767,49 ± 43,67	a	100	1767,49 ± 43,67
0.5	2957.19 ± 42.48	b	77	3748.32 ± 126.36	b	89	1742,53 ± 65,73	a	99	3388.56 ± 103.81	b	88	1746,69 ± 149,78	a	99	*
1	3218.63 ± 44.21	b	84	3812.85 ± 187.36	b	90	1929,70 ± 216,48	a	109	3470.26 ± 60.52	b	90	1958,82 ± 230,45	a	111	*
2	3300.33 ± 135.89	b	86	5027.78 ± 80.30	b	119	2414,26 ± 193,34	b	137	3143.46 ± 77.06	b	82	1958,82 ± 131,51	a	111	*
4	2983.33 ± 65.28	b	78	5016.55 ± 222.41	b	119	2075,28 ± 56,27	b	117	3208.82 ± 20.41	b	84	2692,93 ± 78,01	b	152	*
6	2842.81 ± 138.92	b	74	5226.99 ± 103.93	b	124	2225,01 ± 106,12	b	126	3457.19 ± 37.69	b	90	2850,98 ± 277,36	b	161	*
8	2143.46 ± 14.24	b	56	5288.72 ± 25.72	b	125	2287,40 ± 96,92	b	129	3264.38 ± 26.75	b	85	3131,73 ± 172,71	b	177	*
10	1718.63 ± 44.93	b	45	5064.25 ± 95.52	b	120	2493,28 ± 285,52	b	141	3228.43 ± 61.23	b	84	3069,34 ± 96,72	b	174	*

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

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

*: Aktivite ölçülemedi.

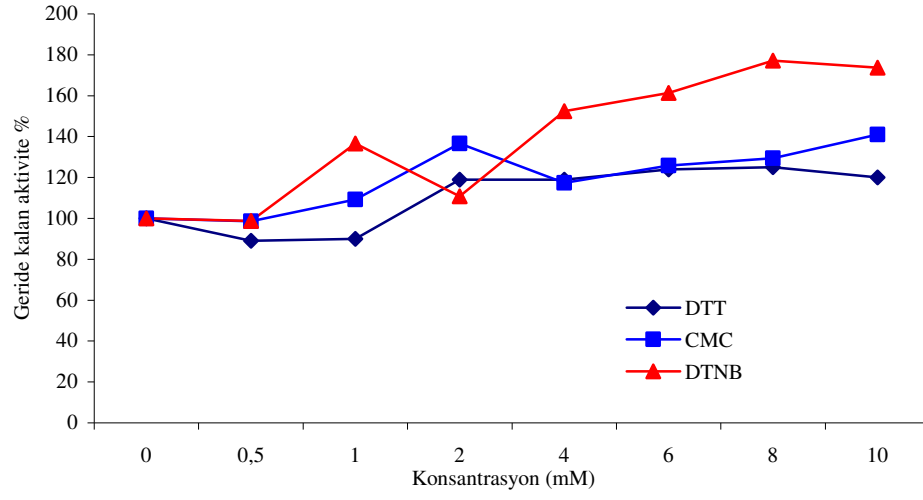
Tablo 37. *A. flavus* HBF34 GA aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki denatürantların etkisi

Denaturant Konsantrasyon (mM)	Farklı denaturant konsantrasyonlarında geride kalan aktivite %					
	Üre (ORT. ± S. H.)	x	%	SDS (ORT. ± S. H.)	x	%
Kontrol	3839.54 ± 11.78	a	100	3839.54 ± 11.78	a	100
0.5	2986.60 ± 111.26	b	78	3107.52 ± 8.65	b	81
1	3225.16 ± 126.10	b	84	3218.63 ± 93.18	b	84
2	3293.79 ± 22.88	b	86	3346.08 ± 5.66	b	87
4	3290.52 ± 104.73	b	86	1712.09 ± 13.07	b	45
6	3404.90 ± 74.88	b	89	1362.42 ± 101.47	b	35
8	3127.12 ± 22.88	b	81	*		*
10	3300.33 ± 34.58	b	86	*		*

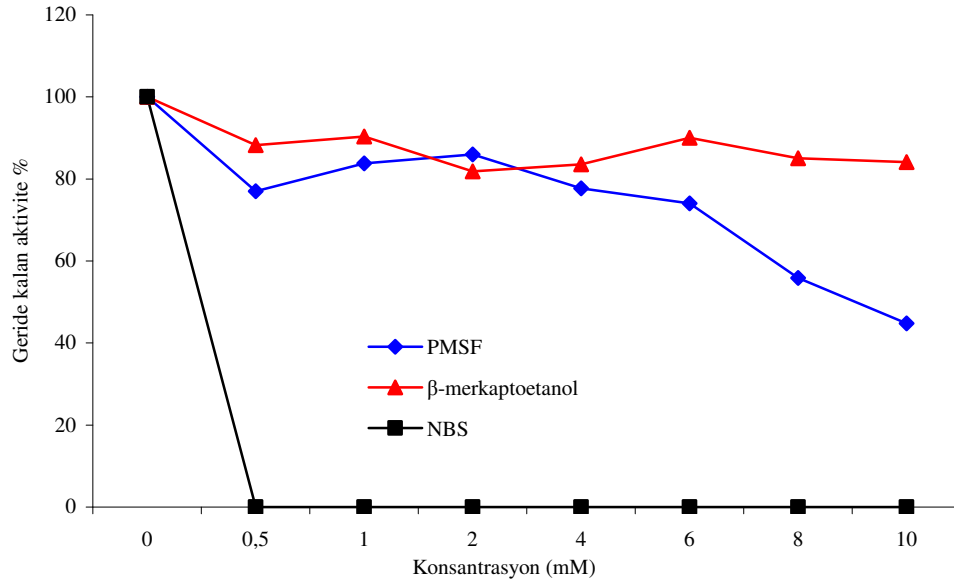
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

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

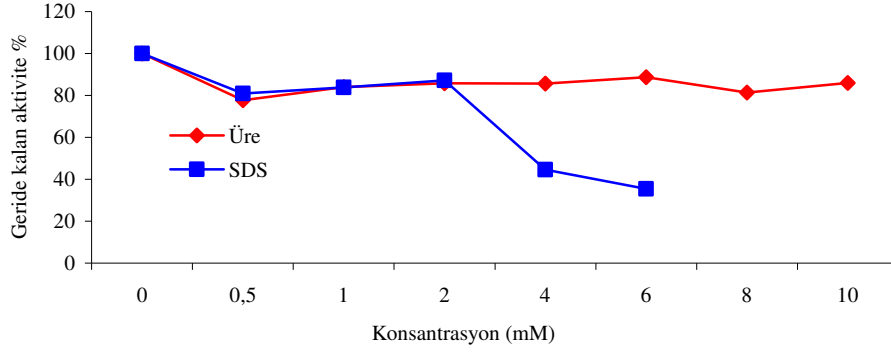
*:Aktivite ölçülemedi.



Şekil 29. GA aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi



Şekil 30. GA aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi.



Şekil 31. GA aktivitesi üzerine denatürantların etkisi

3. 17. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

GA'nın farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı Tablo 38'de gösterilmiştir. GA'nın en iyi adsorbe olduğu nişasta kaynağı, mısır nişastasası olarak bulunmuştur. GA'nın başlangıç aktivitesi ile farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyonu sonrasında kalan aktivite arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Mısır nişastasası, pirinç nişastasası ve buğday nişastasasında adsorpsiyon oranı sırasıyla % 93, 47 ve 19 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 38. *A. flavus* HBF34 GA'sının farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranı

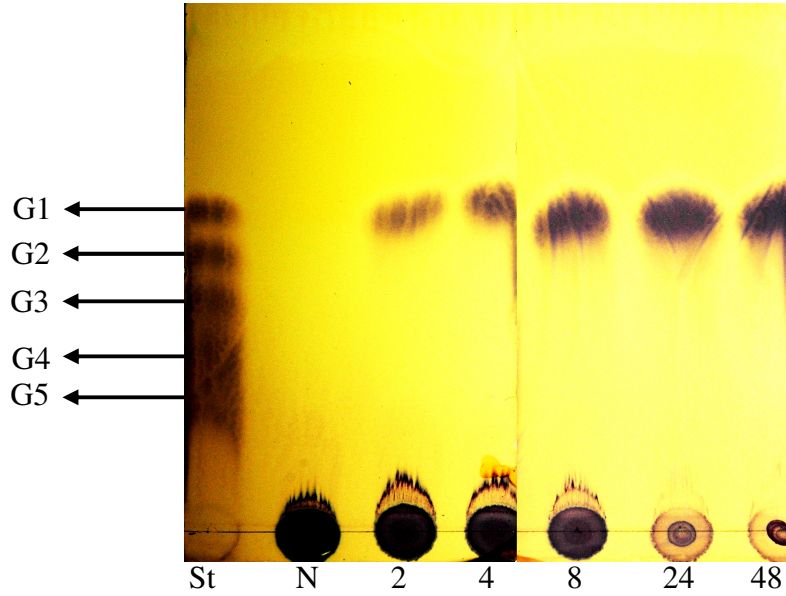
Nişasta	Enzim aktivitesi (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S. H.)	x	Adsorpsiyon %
Kontrol	2717,884 $\pm$ 166,28	a	100
Mısır nişastasası	202,349 $\pm$ 350,479	b	93
Buğday nişastasası	1432,665 $\pm$ 152,098	b	47
Pirinç nişastasası	2210,451 $\pm$ 146,183	b	19

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

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

3. 18. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

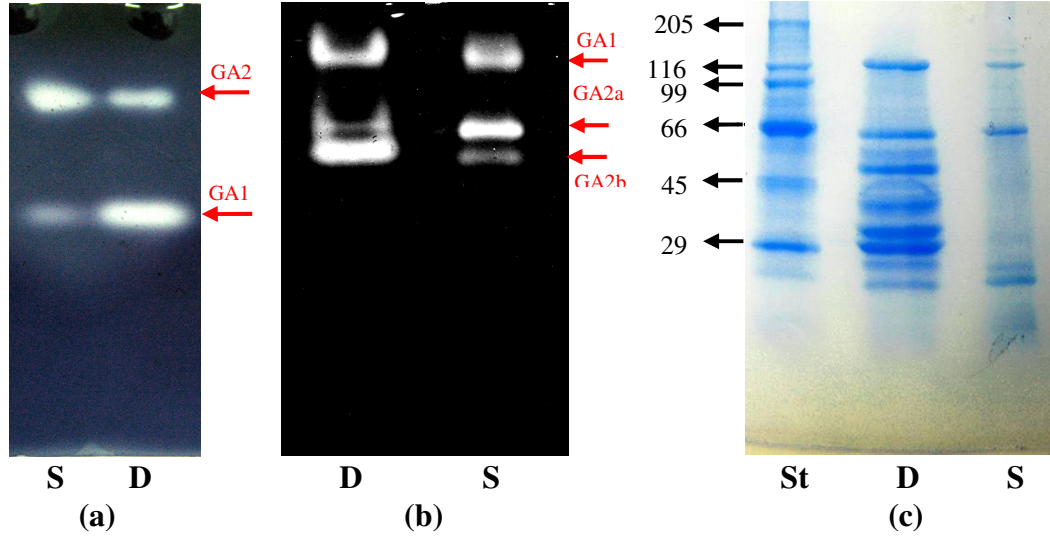
Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi ve enzim tipinin belirlenmesi için ince tabaka kromatografisi kullanıldı. İnce tabaka kromatografi analizi sonucunda, nişastanın zamana bağlı (saat) enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan son ürünün glukoz olduğu bulunmuştur (Şekil 32). Oluşan son ürünün sadece glukoz olması, enzimin glukoamilaz olduğunu göstermektedir.



Şekil 32. Nişastanın enzimatik hidrolizi. G1: Glukoz, G2: Maltoz, G3: Maltotrioz, G4: Maltotetroz, G5: Maltopentoz, St: Standart, N: Nişasta.

3. 19. Elektroforez ve Zimografi

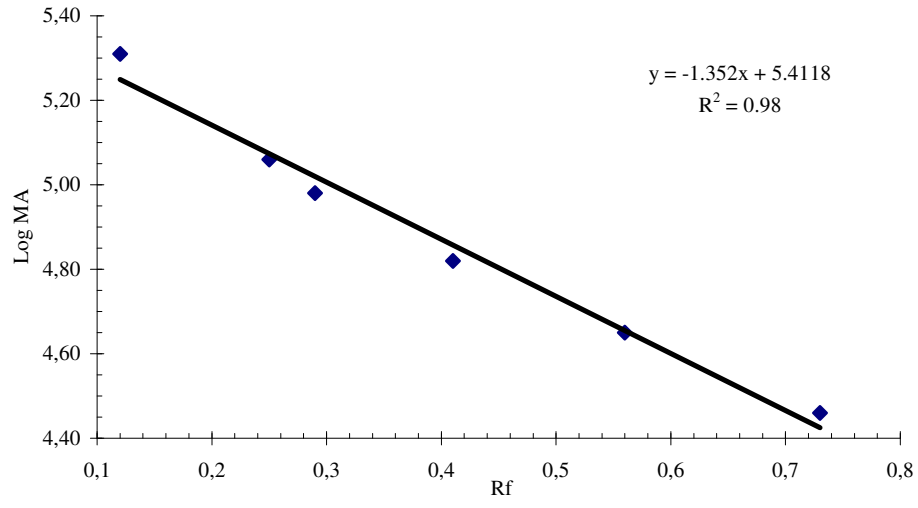
GA'nın PAGE zimografisi ile görüntülenmesi yapıldığında, hem saflaştırılmış hem de direkt kültürde nişastanın hidrolizinden sorumlu iki enzim bandı (GA1 ve GA2) saptanmıştır (Şekil 33a). Bu enzimlerin saflığını, molekül ağırlıklarını ve birden fazla alt üniteye sahip olup olmadıklarını saptamak için SDS-PAGE yapılmıştır. Aynı jelin yarısına saflaştırılmış ve direkt kültür uygulanarak zimografi yapıldığında GA1'in tek bir üniteden oluştuğu, GA2'nin ise iki alt üniteye sahip olduğu (GA2a ve GA2b) saptanmıştır (Şekil 33b). Diğer yarısına ise protein standartları, konsantre edilmiş direkt kültür ve saflaştırılmış enzim kaynağı uygulandığında, direkt kültürde 9 protein bandı, saflaştırılmış enzim kaynağında ise 4 protein bandı tespit edilmiştir (Şekil 33c). Zimografi jelindeki saflaştırılmış enzim ve direkt kültür sütunlarındaki aktivite bantlarının Rf değerleri ile protein jelindeki saflaştırılmış enzim sütunundaki bantların Rf değeri karşılaştırıldığında, saf enzim sütunundaki ilk bandın GA1, ikinci bandın ise GA2a olduğu saptanmıştır. GA2b ise bu sütunda görülememiştir. Direkt kültür sütunu ile kıyaslandığında ise, ilk 3 bandın sırasıyla GA1, GA2a ve GA2b olduğu saptanmıştır (Tablo 39). Protein standartlarının Rf değerleri ile molekül ağırlıklarının logaritması alınarak standart grafiği çizilmiştir (Şekil 34). Bu grafiğin denklemi $y = -1.352x + 5.4118$, tamamlayıcılık katsayısı $R^2 = 0.98$ bulunmuştur. Bu denklemden yararlanarak enzimlerin molekül ağırlıkları hesaplanmıştır. Buna göre moleküler ağırlıkları GA1 için yaklaşık olarak 125 kDa, GA2 için ise 134 kDa (GA2a: 70 kDa ve GA2b: 64 kDa) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 33. *A. flavus* HBF34 glukoamilazının zimografi ve elektroforez görüntüleri. (a) PAGE zimografi görüntüsü, S: Saflaştırılmış enzim, D: Direkt kültür. (b) SDS-PAGE zimografi. (c) SDS-PAGE, St: Standart, 205 kDa miyozin, 116 kDa β -galaktozidaz, 97 kDa fosforilaz B, 66 kDa albumin, 45 kDa albumin, 29 kDa karbonik anhidraz.

Tablo 39. Standart proteinler, saflaştırılmış enzim ve direkt kültürdeki SDS-PAGE ve zimografi bantlarının Rf değerleri

Bantlar	SDS-PAGE			SDS-PAGE Zimogram	
	Standartlar	Direkt kültür	Saf enzim	Direkt kültür	Saf enzim
1	0.12	0.23	0.23	0.23	0.23
2	0.25	0.42	0.42	0.41	0.41
3	0.29	0.45		0.44	0.44
4	0.41	0.50			
5	0.56	0.61			
6	0.73	0.66			
7		0.71			
8		0.75	0.75		
9		0.81	0.81		



Şekil 34. SDS-PAGE protein standart eğrisi.

4. TARTIŞMA

Enzimler organik sentezleri, klinik analizler, farmasötikler, deterjanlar, yiyecek üretimi ve fermentasyonunu içeren birçok alanda uygulamalara sahiptir. Organik maddelerin sentezi için enzimlerin kullanılması güncel bir şekilde gittikçe daha da artmaktadır. Yeni mikrobiyal enzimlerin keşfi, sentetik işlemler için yeni basit yöntemler ve çevresel problemleri çözmek içinde yeni yollar açacaktır. Yeni bir sentetik işlem tasarlandığında, reaksiyon için uygun bir katalizör bulunması gerekir ve enzimler bu rol için ideal adaylardır. Geçen son on yılda, enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımı hızlı bir gelişme gösterdi. Enzimlerin eşsiz fonksiyonlarından dolayı, özelliklede gıda ve çevresel problemleri çözmek için kullanılmaları gittikçe daha fazla dikkat çekmektedir. Bununla birlikte birçok endüstriyel işlemlerde substratlar yapay bileşiklerdir ve böyle işlemleri katalizleyecek uygun enzimler halen bilinmemektedir. Bu yüzden yeni reaksiyonları katalizleyebilen yeni enzimleri aramak daima gereklidir. Ayrıca yeni enzimlerin keşfi, yeni enzimatik işlemleri tasarlamak için de ipuçları sağlayacaktır.

Enzimler; bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilmektedir. Ancak, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan enzimlerin saf olarak elde edilebilmesi oldukça zor ve pahalı bir işlemdir. Elde edilen enzimlerin endüstriyel uygulama potansiyelleri oldukça yetersizdir. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin; üretiminin kolay ve ucuz olması, biyokimyasal çeşitliliklerinin çok fazla olması ve farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen oldukça farklı enzimleri üretmesinden dolayı endüstriyel uygulamalarda tercih edilirler. Mikrobiyal kaynaklı enzimler; ilaç, analitik kimya, nişastanın sakkarofikasyonu, tekstil, deterjan, gıda ve kâğıt endüstrileri gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir. Endüstride en çok kullanılan enzimlerin başında lipazlar, proteazlar ve amilazlar gelmektedir. Endüstride kullanılan mikrobiyal kaynaklı enzimlerin % 25’lik kısmını mikrobiyal amilazlar oluşturmaktadır. Amilazların ticari üretiminde daha çok bakteri ve fungus türleri kullanılmaktadır. Amilaz üretiminde ilk

sırayı gram pozitif bakteriler ve özellikle *Bacillus* cinsi almaktadır. Fungusların (küflerin) amilaz üreten en yaygın cinsi ise özellikle *Aspergillus*'dur. Mikroorganizmaların hepsi endüstriyel olarak kullanılmamakla birlikte “endüstriyel mikroorganizmalar” ürettikleri bir veya birden fazla spesifik ürüne göre çok dikkatli bir şekilde klasik tarama teknikleriyle doğadan seçilmektedirler (Pandey et al. 2000).

4. 1. Fungusların Amilolitik Taranması ve Seçimi

Çalışmamızda havadan izole edilmiş ve tanısı yapılmış 17 fungusta amilolitik tarama yapılmış (Møller et al., 2004) ve tarama sonucunda 8 fungus da amilaz aktivitesi görülmüştür. Her ne kadar çalışmada tarama yapılan tür sayısı azda olsa, en çok amilaz aktivitesi gösteren cins *Aspergillus* olarak bulunmuştur. Bir çok fungus türünde yapılan amilaz tarama sonuçları, bu sonucu desteklemektedir (Gopinath et al., 2005; Omemu et al., 2005). Bu türlerden, en iyi zon çapı gösteren fungus *A. flavus* HBF34 suşu olması nedeniyle, *A. flavus* HBF34 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçilmiştir. Amilaz aktivitesi gösteren diğer türler, daha sonraki çalışmalar için bir kaynak oluşturmak üzere kültür koleksiyonuna kaydedilmiştir.

4. 2. *Aspergillus flavus* HBF34 Büyüme Eğrisi ve Enzim Üretimi

İnkübasyon süresine bağlı olarak *A.flavus* HBF34 1. günde lag fazında olup biyomas en düşük seviyededir. 2. ve 4. günler arasında büyüme log fazında olup biyomas artmaya devam etmiştir. 5. ve 7. günler arasında ise durgunluk fazına girerek büyüme durmuştur. Redüktör şeker miktarı ise, biyomas artışına paralel olarak 1. günden itibaren ortamda artmış, 2. günde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Redüktör şeker miktarı 3. günden itibaren azalmış, 4. ve 7. günler arasında ise minimum seviyeye inerek sabitlenmiştir. Enzim aktivitesi 1. 2. ve 3. günlerde ortamda redüktör şeker miktarının fazla olmasından dolayı ölçülememiştir. Oysa ki ortamda redüktör şeker miktarının fazla olması enzim aktivitesi olduğunu ve ortamdaki nişastanın hidrolize

olduğunu göstermektedir. Enzim aktivite ölçümünün yapılamamasının iki nedene bağlı olduğunu düşünüyoruz. Birinci neden enzimin ortamdaki glukoz (ürün) tarafından baskılanmış olabileceğidir. Aktivitenin ölçülememesinin ikinci nedeni ise, fermentasyon ortamında enzimatik hidroliz sonucunda oluşan redüktör şeker miktarının, aktivite ölçümünde oluşan redüktör şeker miktarından çok yüksek olmasıdır. Çünkü kullandığımız aktivite ölçüm metodu nişastanın hidrolizi sonucunda ortamda oluşan redüktör şeker miktarını ölçmeye dayanır. 4. günden itibaren ortamdaki redüktör şeker miktarının azalmasıyla, enzim aktivitesi ölçülmeye başlanmış ve 6. günde maksimum değere ulaşmıştır. 7. günde ise enzim aktivitesi düşmeye başlamıştır. Kültür ortamının pH'sı lag fazından durgunluk fazının başına kadar başlangıç pH'sına yakın değerlerde olup, enzim aktivitesinin maksimum olduğu 6. günde hızlı bir şekilde yükselmiş ve 7. günde tekrar düşmeye başlamıştır.

Redüktör şeker miktarının minimum seviyeye indiği durgunluk fazında kullanılan besin kaynakları azaldığı için, hücreler arasında bir rekabet başlamıştır, hücrelerin bir kısmı üreme özelliği ve canlılığını korurken bir kısmı ise ölmektedir. Bu durumda mikroorganizmaların zamana göre biyomasında net bir artış veya azalış gözlenmemiştir. Durgunluk fazında enzim aktivitesi de maksimum seviyeye ulaşmıştır. Enzim aktivitesinin bu dönemde yüksek çıkması birkaç nedene bağlı olabilir. (1) Enzimlerin üretimi mikroorganizmaların gelişme ve üreme evrelerine göre farklılık gösterir. Amilaz üretimi ile ilgili yapılan bir çok araştırmaya göre amilazların üretimi durağan fazda maksimum seviyeye ulaşmıştır (Olama and Sabry,1989; El-Abyad et al., 1994; Abou-Zeid, 1997; Goto et al., 1998; Mohapatra et al., 1998; Yang and Wang, 1999; Bignell et al., 2000; Marlida et al., 2000; Okolo et al., 2000; Petrova et al., 2000; Cherry et al, 2004; Katemai and Rittiboon, 2004). (2) Hücreler depoladığı maddeleri veya metabolik ürünler gibi diğer enerji kaynaklarını amilaz üretimi için kullanabilirler (Spohr et al., 1997). (3) Bu fazda hücre lizisinin görülmesinden dolayı aktivitede bir artış olmuştur (Tung et al., 2004). Büyüme ortamının pH'sı, enzim salgılanması ve organizmanın morfolojik değişmesine neden olan önemli fizyolojik parametreler

arasındadır. Organizmanın büyümesi boyunca değişiklik gösteren pH, ortamdaki ürün stabilitesini de etkilemektedir. pH değeri, enzim sentezini başlatan veya bitiren indikatör görevini de görmektedir (Gupta et al., 2003). Bu dönemdeki pH artışı, hücrelerin otolizise uğraması ve hücrel metabolizma esnasında ortama salınan metabolitlerin birikmesi ile açıklanabilir (Tung et al., 2004).

4. 3. Fermentasyon Ortamına Salınan Enzim Üretiminin Elektroforetik Olarak İzlenmesi

Çalışmamızda *A. flavus* HBF34 tarafından fermentasyon ortamında iki glukoamilazın üretildiği saptandı. Üretilen glukoamilazların (GA1 ve GA2) öncül bir glukoamilazdan proteolitik enzimler tarafından alt birimlerine ayrılarak oluşturulmadığı ve glukoamilazların iki gen ürünü olduğu, günlük fermentasyon ortamının zimografisi ile saptanmıştır. Yapılan birçok çalışma sonuçları bulgularımızı desteklemektedir. Fungusların büyük bir çoğunluğunun fermentasyon ortamında genellikle birden fazla glukoamilaz ürettiği ve bir kısmının da hem α -amilaz hem de glukoamilazı aynı anda ürettikleri bir çok araştırmacı tarafından saptanmıştır (Shenoy et al., 1985; Svensson et al., 1986; De Mot and Verachtert, 1987; Fogarty and Kelly, 1990; Morita and Fujio, 1997; Spohr et al., 1998; Morita and Fujio, 2000; Primarini and Ohta, 2000; Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001; Frolova et al., 2002; Nguyen et al., 2002; Peixoto et al., 2003; Pacheco-Chávez et al., 2004; Norouzian et al., 2006; Cereia et al., 2006). Bazı *Bacillus* suşlarında molekül ağırlığı büyük olan öncül bir amilaz molekülünden, proteolitik yıkım sonucunda farklı amilazların olduğu bilinmektedir (Mamo and Gessesse, 1999). Morita ve Fujio, *Rhizopus* sp. MKU 40 suşunun bir GA ürettiğini, ancak fermentasyon esnasında proteolitik aktivite sonucunda iki aktif alt birime ayrıldığını saptamışlardır (Morita and Fujio, 2000).

4. 4. Enzimin Saflaştırılması

Glukoamilazlar çoğunlukla funguslar tarafından oluşturulduğu ve genellikle hücre dışına salgılanan enzimler olduğu bilinmektedir (Fogarty and Kelly, 1990). Bu sebepten dolayı *A. flavus* HBF34'ün kültür sıvısı, enzim kaynağı olarak kullanıldığında enzimin hücre dışına salgılandığı saptanmıştır. Enzim saflaştırmalarının çoğunda, birden fazla kromatografik teknik aynı anda kullanılarak saflaştırma yapılmaktadır. Saflaştırma katsayısı ve verim kullanılan yöntemlere göre büyük farklılık göstermektedir. Saflaştırmada kullanılan tekniklerin sayısı arttıkça, enzimin veriminde büyük kayıplar olabileceği bilinmektedir. Ayrıca kromatografik metotlar pahalı ve oldukça zaman alıcı tekniklerdir. Bu nedenlerden dolayı saflaştırmanın kısa zamanda, tek bir adımda ve ucuz olan metotlarla yapılması tercih edilmektedir.

Najafi ve Kembhavi (2005) tarafından geliştirilen ve yeni bir teknik olan nişasta afinite yöntemini kullandığımızda, saflaştırma için birden fazla tekniği birlikte uygulayan birçok araştırma sonuçlarından çok daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. GA bu teknikle fermentasyon ortamından % 25'lik verimle, 117 kat saflaştırılmıştır. Bu metodu ilk kez uygulayan Najafi and Kembhavi *Vibrio* sp. amilazını 163.5 kat, % 78 verim ile saflaştırmışlardır (Najafi and Kembhavi, 2005). *A. flavus* ile yapılan bir çalışmada α -amilazının saflaştırılmasında farklı bir nişasta afinite metodu ile aseton çöktürme metodu kullanılmış ve saflaştırma sonucunda saflaştırma katsayısı 262.32, verim ise % 0.57 olarak bulunmuştur (Abou-Zeid, 1997). *Streptomyces* sp. No.4 amilazının saflaştırılmasında nişasta adsorbsiyon metodu, afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılmış 126 kat saflaştırma ve % 2 verim elde edilmiştir (Primarini and Ohta, 2000). *Thermus* sp. α -amilazı ile yapılan bir çalışmada enzim; amonyum sülfat çöktürmesi, FPLC-hidrofobik etkileşim kromatografisi ve mısır nişastası afinite adsorbsiyonundan oluşan saflaştırma adımlarıyla 399 kat, % 2.6'lık verimle saflaştırılmıştır (Shaw et al., 1995). Yapılan çalışma sonuçlarından da görüldüğü gibi

saflaştırma katsayısı ve verim kullanılan yöntemlere göre büyük farklılık göstermektedir.

4. 5. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivite ölçümlerinde, reaksiyon karışımında enzim ve substratın uygun konsantrasyonlarda bulunmasının yanı sıra diğer önemli faktör de inkübasyon zamanıdır. Reaksiyon karışımı *in vitro* ortamda gerçekleşmesinden dolayı başlangıçta reaksiyon için uygun olan ortam şartlarının zamana bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Ayrıca aktivite ölçümü enzimin birinci dereceden kinetik gösterdiği zamanda ölçülmelidir. Bu nedenlerden dolayı, ideal inkübasyon süresinin saptanması düşünülmüştür. Çalışmamızda enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübe edildiklerinde redüktör şeker miktarı ve enzim aktivitesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Özellikle ilk 30 dk doğrusal olarak artmasından dolayı inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. *A. niger* Z10 izolatına ait glukoamilazın inkübasyon süresine bağlı olarak indirgenen şeker miktarı 60 dakikaya kadar artış, daha sonra ise azalma göstermiştir. Bu araştırmada da inkübasyon süresi 30 dk olarak belirlenmiştir (Coral and Çolak, 2000). Yine birçok araştırmada inkübasyon süresinin amilaz aktivitesine etkisi üzerine bir deney planı ile belirtmemiş olmasına rağmen aktivite ölçümlerinde inkübasyon süresi olarak 30 dk alınmıştır (Hyun and Zeikus, 1985; Saha et al., 1988; Campos and Felix, 1995; McMahon et al., 1999; Bignell et al., 2000; Marlida et al., 2000; Primarini and Ohta, 2000; Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001; Frolova et al., 2002).

4. 6. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi etkileyen önemli parametrelerden biri olan sıcaklığın GA aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, optimum aktivite sıcaklığını 60 °C olduğu bulunmuştur. 35, 40, 45, 50, 55 ve 65 °C'daki sıcaklıklarda optimum aktivitenin sırasıyla

% 48, 61, 74, 76, 92 ve 95'ini gösterdiği bulunmuştur. Aktivitenin 35 ve 65 °C'da arasında büyük bir kısmının görülmüş olması enzimimizin endüstriyel işlemlerde kullanılabileceğini göstermektedir. GA'ların genellikle optimum aktivite sıcaklığının 40 ve 60 °C arasında olduğu bilinmekte (Pandey et al., 2000; Norouzian et al., 2006) ve sonucumuz bu genel ifadeyle uygunluk göstermektedir. Fungal glukoamilazlarla ve özellikle *A. flavus* glukoamilazı ile yapılan çalışmalar oldukça azdır. *A. flavus* HBF34 GA'sının optimum sıcaklığı, yapılan bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir. *A. flavus* glukoamilazının maksimum aktivite sıcaklığının 60 °C (El-Abyad, 1994), *A. flavus* A1.1 glukoamilazının maksimum aktivite sıcaklığının 65 °C (Gomes et al., 2005) olduğu bulunmuştur. *Aspergillus* cinsi glukoamilazları ile yapılan diğer çalışmalarda ise optimum sıcaklık *A. niger* NRRL 3135 (Vandersall et al., 1995) ve *A. niger* için 60 °C (Suresh et al.,1999), *Aspergillus fumigatus* (Silva and Peralta, 1998) ve *Aspergillus* sp GP-21 için 65 °C (Mamo and Gessesse, 1999) olduğu bulunmuştur. Diğer fungusların GA ve α -amilazlarıyla yapılan optimum sıcaklık sonuçları Tablo 40'da özetlenmiştir.

4. 7. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim stabilizasyonu, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için oldukça önemli bir özelliktir. Bu amaçla GA'nın sıcaklık stabilitesi araştırıldığında, 27 °C'da 8 gün ve 40 °C'da 11 gün sonra aktivitenin % 80'den fazlasının korunduğu görülmüştür. GA aktivitesi 50 °C'da 3 gün sonra % 50'den fazlasının, 60 °C'da 2 saat sonra % 23'ünün, 70 °C'da 1 saat sonra % 17'sinin ve 80 °C'da 1 saat sonra aktivitenin % 19'unun korunduğu görülmüştür.

A. flavus HBF34 GA'sının 27, 40 ve 50 °C'larda uzun süre stabilitesini korumuş olması, bu sıcaklıklarda işlem yapan endüstriyel uygulamalar için uygun olabileceğini göstermektedir. Ancak 60 °C'nın üzerinde işlem yapan endüstriyel işlemler için çok uygun değildir. Enzimin üç boyutlu yapısını oluşturan zayıf bağlar (hidrojen, iyonik ve

Tablo 40. Fungus GA ve α -amilazlarıyla yapılan optimum sıcaklık literatür sonuçları

Fungus	GA/ α -amilaz	Optimum Sıcaklık (°C)	Kaynaklar
<i>A. flavus</i> HBF34	GA	60	
<i>T. lanuginosus</i> ML-M	GA	70	Basaveswara Rao et al., 1981
<i>Humicola grisea</i>	GA	60	Campos and Felix, 1995
<i>Scytalidium thermophilum</i>	GA	55-60	Cereia et al., 2000
<i>Scytalidium thermophilum</i>	GA	65-70	Aquino et al., 2001
<i>Scytalidium thermophilum</i> 15.8	GA	55-60	Cereia et al., 2006
<i>Chaetomium thermophilum</i>	GA	65	Chen et al., 2005
<i>T. lanuginosus</i> A13.37	GA	70	Gomes et al., 2005
<i>Lyophyllum shimeji</i>	GA	40	Kusuda et al., 2004
<i>T. lanuginosus</i> F1	GA/ α -amilaz	70/60	Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001
<i>T. lanuginosus</i>	GA/ α -amilaz	70	Nguyen et al., 2002
<i>Candida antartica</i> CBS 6678	GA/ α -amilaz	57/62	De Mot and Verachtert, 1987
<i>A. flavus</i>	α -amilaz	55	Khoo et al., 1994
<i>A. flavus</i>	α -amilaz	30	Abou-Zeid, 1997
<i>A. tamarii</i>	α -amilaz	50-55	Moreira et al., 2004
<i>Cryptococcus flavus</i>	α -amilaz	50	Wanderley et al., 2004
<i>A. niger</i> AM07	α -amilaz	60	Omemu et al., 2005

moleküler bağlar) ve özellikle disülfid bağlarının azlığı veya çokluğu enzimin pH ve sıcaklık stabilizasyonu için önemli rol oynadığı bilinmektedir (Shenoy et al., 1985). GA'nın üç boyutlu yapısını oluşturan zayıf bağların ve özellikle disülfid bağlarının yüksek sıcaklıklarda kırılarak açılmasının, stabilitenin düşük olmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca GA'nın üç boyutlu yapısında disülfid bağlarının az olduğunu da düşünmekteyiz. Fungal glukoamilazların bir çoğunun yüksek sıcaklıklarda kısa zaman periyotlarında stabil olduğu bildirilmiştir (Norouzian et al., 2006). Bu da bizim sonuçlarımızla uygunluk göstermemektedir. Yapılan bir çok çalışmada ise kısa süreli olsa GA'nın yüksek sıcaklıklarda stabil olduğu gösterilmiştir.

A. flavus GA'sı ile yapılan kısa zamanlı stabilizasyon çalışmasında aktivitenin 20-60 °C arasında 30 dk, 70 °C'da 15 dk stabil olduğu ve 90 °C'da ise 30 dakikada denature olduğu bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994). *A. flavus* GA ile yapılan diğer bir çalışmada 60 °C'da 1 saat sonra aktivitenin % 85'inin korunduğu, aynı sıcaklıkta 7 saat sonra ise aktivitenin % 45'inin korunduğu bulunmuştur (Gomes et al., 2005). *Aspergillus niger* glukoamilazının 50 °C'da % 100 stabil olduğu, 60 °C'da 30 dakika inkübasyondan sonra aktivitenin % 90'ının geri kazanıldığı, bunun üstündeki sıcaklıklarda ise hızlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur. Gliserol veya nişasta varlığında enzimin sıcaklık stabilite süresinin uzadığı ve *Aspergillus* spp. suşlarından elde edilen glukoamilazların stabilite için substrata gereksinim duydukları bildirilmiştir (Fogarty and Benson, 1983; De Mot and Verachtert, 1987). *Aspergillus awamori* ATCC 22342 glukoamilazının 40 °C'da stabil olduğu, 50 ve 60 °C'da 30 dk bekletildiği zaman aktivitenin % 70 ve 90'ını kaybettiği, enzimin termal inaktivasyonunun ortamda nişasta bulunduğu zaman yavaşladığı bulunmuştur (Pestana and Castillo, 1985). *Aspergillus* sp. GP-21 glukoamilazının 60 °C'daki sıcaklık stabilitesini, reaksiyon ortamına eklenen Ca^{2+} 'un etkilemediği ve kalsiyum varlığında veya yokluğunda enzimin bu sıcaklıkta yarı ömrünün 90 dakika olduğu saptanmıştır (Mamo and Gessesse, 1999). *A. niger* Z10 izolatının glukoamilazı 15 dakika 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'da inkübasyondan sonra,

aktivitenin sırasıyla % 100, 93.4, 90.2, 86.8 ve 16.7'sini gösterdiği bulunmuştur (Coral and Çolak, 2000).

Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* glukoamilazının 50 °C'da 6 saat tamamen stabil olduğu, 60 °C'da aktivitenin yavaşça azaldığı ve 70 ile 80 °C'da ise hızlı bir şekilde inaktive olduğu bulunmuştur. Enzimin yarı ömrü 60 °C'da 7.3 saat, 70 °C'da 30 dakika ve 80 °C'da 20 dakika olarak hesaplanmıştır (Basaveswara Rao et al., 1981). Termofilik fungus *H. grisea* glukoamilazının 55 °C'da 2 saat % 100 stabil kaldığı bulunmuştur (Campos and Felix, 1995). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* glukoamilazının termostabilitesinin % 10'luk sorbitol veya % 1'lik nişasta varlığında 60 °C'da 60 dakika inkübe edildikten sonra % 100 oranında stabil kaldığı bulunmuştur (Cereia et al., 2000). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* glukoamilazının 55 °C'da 1 saat ve 4 °C'da 8 gün stabil olduğu bulunmuştur (Aquino et al., 2001). Ektomikorizal fungus *Lyophyllum shimeji* glukoamilazının 20 ve 35 °C'da stabil olduğu bulunmuştur (Kusuda et al., 2004). Termofilik fungus *Chaetomium thermophilum* glukoamilazının 50 ve 60 °C'da termostabil olduğu, 65 °C'da 60 dakika sonra aktivitenin % 50'sin termostabilanıldığı, enzimin yarı ömrünün 70 °C'da 20 dakika olduğu bulunmuştur (Chen et al., 2005). *Thermomyces lanuginosus* A13.37 glukoamilazının 60 °C'da 1 saat sonra enzim aktivitesinde % 20'lik bir artış gözlenmiş, 8 saat sonra ise aktivitenin % 55'nin geri kazanıldığı bulunmuştur (Gomes et al., 2005).

α -Amilazlarla yapılan çalışmalarda ise, *A. flavus* α -amilazının 50 °C'da 1 saat stabil olduğu bulunmuştur (Khoo et al., 1994). *A. carbonarius* amilazının 20 dk inkübasyondan sonra 30 °C ile 80 °C arasında aktivitesinin % 85'ini, 90 °C'da ise % 65'ini gösterdiği bulunmuştur (Okolo et al., 2000). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* α -amilazının 50 °C'da 1 saat stabil olduğu, enzimin yarı ömrünün 55 °C'da 25 dk ve 60 °C'da 12 dk olduğu, % 1'lik nişasta varlığında 60 °C'da 1 saat tamamen stabil olduğu bulunmuştur (Aquino et al., 2003). *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* amilolitik aktivitesinin sıcaklık stabilitesinin oldukça yüksek olduğu, 60

$^{\circ}\text{C}$ 'da 120 dk sonra enzim aktivitesinin % 50'sinin geri kazanıldığı, 65°C 'da stabil olmadığı fakat ortama % 1'lik nişasta eklendiği zaman termal inaktivasyondan korunduğu bulunmuştur (Peixoto et al., 2003). *A. tamarii* α -amilazının 65°C 'da birkaç saat tamamen aktif olduğu, enzimin yarı ömrünün 70°C 'da 30 dakika olduğu ve 75°C 'da ise stabil olmadığı bulunmuştur. % 1'lik nişasta ile inkübe edildiğinde enzimin yarı ömrünün 70°C 'da 70 dakika ve 75°C 'da 40 dakika olduğu bulunmuştur (Moreira et al., 2004).

Endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda yapılan şekerleştirme yöntemlerinde genellikle yüksek termostabiliteye sahip mikrobiyal amilazlar kullanılmaktadır (Peixoto et al., 2003). Şekerleştirme yöntemleri, yüksek substrat çözünürlüğü sağlamak için genellikle 60°C ve üstündeki sıcaklıklarda gerçekleşir ve bu şekilde mikrobiyal kontaminasyon da önlenmiş olur (Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001). Elde ettiğimiz enzimin yüksek sıcaklıklarda stabil olmaması nedeniyle, daha sonraki çalışmalarda stabilizasyonu arttıracak işlemler denenmesi hedeflenmektedir. Bunun için nişasta, organik çözücüler ve Ca^{2+} gibi iyonların stabilizasyona etkisi araştırılarak, enzimimizin yüksek sıcaklıklardaki endüstriyel işlemler için uygun hale getirilmesine çalışılacaktır.

4. 8. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzimler protein yapısında olmasından dolayı ortam pH'sı enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Bu amaçla, GA aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde maksimum aktivite pH 6.0'da saptanmıştır. pH 3.5'den 5.5'e kadar maksimum aktivitenin % 64'den fazlasını, pH 6.5'dan 7.5'a kadar ise % 79'dan fazlasını gösterdiği, pH 8.0'den sonra ise aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür. Sonuçlar enzimin, pH 3.5 ile 7.5 arası gibi geniş bir pH aralığında çalıştığını göstermektedir. Bununla birlikte enzimin asidik pH'larda daha aktif olduğu söylenebilir.

Nişastadan glukoz eldesi endüstride önemli bir yer tutmaktadır. Nişastanın sıvılaştırılmasında (liquefaction) α -amilaz, şekerleştirilmesinde (sakarifikasyon) ise glukozamilaz kullanılmaktadır. Bu işlemler pH 4.2 ile 6.2 arasında yapılmaktadır (Crabb and Shetty, 1999; Moreira et al., 1999). GA'nın geniş pH aralığında çalışması, bu gibi koşullarda çalışan endüstriyel işlemlerde kolaylıkla kullanılabileceğini de göstermektedir. *A. flavus* HBF34 glukozamilazının optimum pH'sının, yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Fungal glukozamilazların genellikle asidik pH'larda aktif oldukları bildirilmiştir (Norouzian et al., 2006). *A. flavus* GA aktivitesi üzerine çok fazla araştırma bulunmamaktadır. *A. flavus* GA'ı ile yapılan iki çalışmada optimum pH değerinin 4.0 olduğu bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994; Gomes et al., 2005). Bu değerlerin bizim optimum pH değerimizden farklı olması, enzimin bu enzimlerden farklı bir protein yapısına sahip olduğunu göstermektedir.

Diğer *Aspergillus* cinslerinin GA'ları ile yapılan çalışmalarda ise, *A. niger* Z10 pH 4.5-5.5 (Coral ve olak, 2000), *Aspergillus* sp. GP-21 pH 5.0-5.5 (Mamo and Gessesse, 1999), *A. tamarii* pH 4.5-5.0 (Moreira et al., 1999). *A. fumigatus* (Cherry et al., 2004) ve *A. luchuensis*'un optimum pH'sının 7.0 olduğu bulunmuştur (Marzan et al., 2005). Diğer fungusların GA ve α -amilazlarıyla yapılan optimum pH sonuçları Tablo 41'de özetlenmiştir.

Tablo 41. Fungus GA ve α -amilazlarıyla yapılan optimum pH literatür sonuçları

Fungus	GA/ α -amilaz	Optimum pH	Kaynaklar
<i>A. flavus</i> HBF34	GA	6.0	
<i>Scytalidium thermophilum</i> 15.8	GA	5.5	Cereia et al., 2006
<i>Scytalidium thermophilum</i>	GA	5.0-6.5	Cereia et al., 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GA	4.5-6.5	Kleinman et al., 1988
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GA	5.0	Thorsen et al., 2006
<i>Thermomyces lanuginosus</i> A 13.37	GA	4.5	Gomes et al., 2005
<i>Humicola grisea</i>	GA	6.0	Campos and Felix, 1995
<i>Lyophyllum shimeji</i>	GA	5.0	Kusuda et al., 2004
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 34626	GA/ α -amilaz	4.4-5.6 /4.6-6.6	Nguyen et al., 2002
<i>Candida antarctica</i> CBS 6678	GA/ α -amilaz	4.2	De Mot and Verachtert, 1987
<i>Thermomyces lanuginosus</i> F ₁	GA/ α -amilaz	6.0/5.0	Odibo and Ulbrich- Hofmann, 2001
<i>Scytalidium thermophilum</i>	α -amilaz	6.0	Aquino et al., 2003
<i>A. tamarii</i>	α -amilaz	4.5-5.0	Moreira et al., 1999
<i>A. flavus</i>	α -amilaz	7.0	Abou-Zeid, 1997
<i>A. flavus</i>	α -amilaz	6.0	Khoo et al., 1994
<i>A. tamarii</i>	α -amilaz	4.5-6.5	Moreira et al., 2004
<i>Mucor</i> sp.	α -amilaz	5.0	Mohapatra et al., 1998
<i>Streptomyces</i> sp. No.4	α -amilaz	5.5	Primarini and Ohta, 2000
<i>Tricholoma matsutake</i> Z-1	α -amilaz	5.0-6.0	Kusuda et al., 2003
<i>Thermomonospora curvata</i>	α -amilaz	6.0	Glymph and Stutzenberger, 1977
<i>Thermoascus auranticus</i>	α -amilaz	4.5-5.0	Ohno et al., 1998

4. 9. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Ekstrem pH'larda gerçekleşen ve uzun süren endüstriyel işlemler için, enzim stabilizasyonu oldukça önemli bir özelliktir. Enzimin geniş bir pH aralığında ve uzun süre aktivitesini koruyor olması, endüstriyel işlemler için tercih edilen bir özelliktir. Bu amaçla *A. flavus* HBF34 GA'sı ile yaptığımız pH stabilizasyon çalışmaları sonucunda enzimimizin geniş bir pH aralığında oldukça stabil olduğu bulunmuştur. pH 3.0'de 60 saat sonra % 78'den fazlası, pH 4.0-8.0 arasında 108 saatlik inkübasyondan sonra % 82'den fazlasının geri kazanıldığı ve pH 9.0'da ise 60 saatlik inkübasyon periyodundan sonra aktivitenin % 87'sinin geri kazanıldığı görülmüştür. *A. flavus* HBF34 GA'sının asidik ve alkali pH aralığında stabil olması endüstriyel işlemlerde kullanılabileceğini göstermektedir. Glukoamilazlar geniş pH aralığında (pH 2.0 ile 11.0) stabildir (Fogarty and Kelly, 1990; Norouzian et al., 2006). *A. flavus* GA'sının pH 4.0 ile 9.0 aralığında stabil olduğu, pH 3.0 ile 10.0'da aktivitenin önemli bir kısmının azaldığı bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994). *A. flavus* A 1.1 GA'sının geniş pH aralığında (pH 5.0 ile 9.0 aralığında % 100 stabil) stabil olduğu, pH 3.0'de aktivitenin % 80'inin geri kazanıldığı, pH 10.0'da ise aktivitenin % 90'nının geri kazanıldığı bulunmuştur (Gomes et al., 2005). Görüldüğü gibi *A. flavus* GA'ları ile yapılan çalışmalar bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Diğer *Aspergillus* GA'ları ile yapılan çalışmalarda ise şu sonuçlar elde edilmiştir. *A. niger*'den elde edilen glukoamilazın geniş pH stabilitesine sahip olduğu, pH 2.0 ile pH 11.0'de aktivitenin % 79 ve % 50'sini gösterdiği bulunmuştur (Fogarty and Benson, 1983). *Aspergillus* GP-21 GA'sının pH 5.0-5.5 aralığında stabil olduğu bulunmuştur (Mamo and Gessesse, 1999). *A. tamarii* GA'sının pH 4.0 ile 7.2 arasında 40 °C'da 2 gün boyunca stabil olduğu bulunmuştur (Moreira et al., 1999). *A. tamarii* GA'sının pH 3.0 ile 8.0 arasında 2 saat boyunca tamamen stabil olduğu bulunmuştur (Moreira et al., 2004). Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 GA'sı pH 4.4-7.5 arasında 50 °C stabil olduğu saptanmıştır (Nguyen et al., 2002). Termofilik fungus

Thermomyces lanuginosus F₁ GA ve α -amilazının pH 4.0'da oda sıcaklığında 24 saat tamamen stabil oldukları, pH 5.0 ve 6.0 arasında ise % 80'inin geri kazanıldığı bulunmuştur (Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001). *A. flavus* α -amilazının pH 5.0 ile 8.5 aralığında stabil olduğu bulunmuştur (Khoo et al., 1994). Ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake* α -amilazının geniş pH aralığında (4.0 ile 10.0) stabil olduğu bulunmuştur (Kusuda et al., 2003). Maya *Candida antarctica* CBS 6678 glukoamilazının asidik pH'larda stabil olduğu, α -amilazının alkali pH'larda hızlı bir şekilde aktivitesinde kayıplar olduğu bulunmuştur (De Mot and Verachtert, 1987).

4. 10. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

A. flavus HBF34'ün GA aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun (çözünür patates nişastası) etkisi incelendiğinde, substrat konsantrasyonunun belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin de buna bağlı olarak hızla arttığı görülmüştür. Bu durumda enzimatik reaksiyon birinci dereceden (first-order) bir kinetik göstermiştir. Ancak, belli bir substrat konsantrasyonundan sonra aktivitenin artık daha fazla artmadığı ve sabit kaldığı görülmüştür. Bu da enzimin substratına karşı doygun hale geldiğini ve maksimum hızla çalıştığını göstermektedir. Bu durumda enzimatik reaksiyon sıfırıncı dereceden (zero-order) bir kinetik göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak *A. flavus* HBF34 GA'sının Michaelis-Menten kinetiği gösterdiğini söyleyebiliriz. Michaelis-Menten grafiğinden enzimin Km ve Vmax değerlerinin saptanması oldukça zor olması nedeniyle, Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. Bu grafiğe göre, *A. flavus* HBF34 GA'sının Km değeri 0.046 mg/mL ve Vmax değeri 769.23 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Glikojen, amilopektin ve amilozun Km ve Vmax değerlerini saptamak amacıyla da Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. Glikojen, amilopektin ve amiloz için sırasıyla Km değerleri 0.075, 0.1 ve 0.125 mg/mL ve Vmax değerleri 1250, 3333.33 ve 2500 U/mg protein olarak bulunmuştur. *A. flavus* HBF34 glukoamilazının farklı substratlara

karşı Km değerlerine bakıldığında en iyi özgülüğün çözünür patates nişastası için olduğu, daha sonra ise sırasıyla glikojen, amilopektin ve amiloz için olduğu görülmektedir. α -1,6 bağlarıyla zincir uzunluğundaki artış hidroliz oranının artışına sebep olmaktadır. Glukoamilaz çok uzun zincirli substratlara karşı çok fazla afiniteye sahiptir, bu nedenle Michaelis sabiteleri azalırken maksimum hız zincir uzunluğu ile artmaktadır (De Mot and Verachtert, 1987; Fogart and Kelly, 1990). Michaelis-Menten kinetikleri ile ürün inhibisyon etkilerini kullanılarak, nişastaya glukoamilazın etkisi için bir model tanımlanmıştır. Bu modele göre, Vmax ve Km'in her ikisi de substrat molekül kütlesi ile değişmektedir (Fogart and Kelly, 1990). *A. flavus* GA'sı ile yapılan bir çalışmada Km değeri 2.85 mg/mL olup, bulgularımıza göre oldukça yüksektir (El-Abyad et al., 1994). *A. niger* NRRL 3135 GA'sının çözünür nişasta, maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz ve izomaltoz için Km değerleri % 0.09, 0.67, 0.76, 0.76, 0.68 ve 122.01 mM olarak, Vmax değerleri ise sırasıyla 55.2, 11.7, 32.3, 47.8, 59.2 ve 12.5 nKat glukoz/saniye olarak bulunmuştur (Vandersall et al., 1995). *A. niger* GA'sının nişasta, maltotrioz ve maltoza karşı gösterdiği afinite oranları sırasıyla % 100, 68 ve 31 olup, nişasta ve maltoz için Km değerleri sırasıyla % 0.025 ve 1.42 mM olarak bulunmuştur (Fogarty and Benson, 1983). *A. awamori* GA'sı çözünür nişasta ve dekstrin için Km değeri 12.5 ve 33.3 mg/mL olduğu bulunmuştur (Pestana and Castillo, 1985). *A. fumigatus* GA'sı çözünür nişasta için Km ve Vmax değerleri 0.1 mg/mL ve 161 μ mol glukoz/dk/mg protein olarak bulunmuştur (Silva and Peralta, 1998). Termofilik fungus *Humicola grisea* GA'sının nişasta için Km değerinin 0.14 mg/mL, Vmax değerinin 0.21 μ mol glukoz/dk/ μ g olduğu bulunmuştur (Campos and Felix, 1995). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* GA'sının nişasta ve maltoz için Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0.21, 3.9 g/L ve 62, 9.0 U/mg protein olarak bulunmuştur (Aquino et al., 2001). *T. lanuginosus* ATCC 34626 GA'sının Km değerlerinin substrat zincir uzunluğunun artmasıyla azaldığı bulunmuştur. Km değerleri maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz ve nişasta için sırasıyla 6.5, 3.5, 2.1, 1.1 ve 0.82 mg/mL olarak bulunmuştur (Nguyen et al., 2002). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* 15.8 GA'sının nişastaya karşı yüksek afinite (Km 0.2 mg/mL, Vmax 22.3 μ mol /dk/mg

protein), maltoza karşı ise zayıf afinite (1.5 mg/mL, V_{max} 4.30 μ mol /dk/mg protein) gösterdiği bulunmuştur (Cereia et al., 2006).

A. flavus α -amilazının jelatinize tapioka nişastası için K_m ve V_{max} değerinin 0.5 g/L ve 108.67 μ mol redüktör şeker/min/ mg protein olduğu bulunmuştur (Khoo et al., 1994). *Streptomyces* sp. tarafından üretilen üç farklı α -amilazın (Amilaz 1, 2 ve 3) amiloz için yüksek afiniteye sahip olup K_m değerleri sırasıyla 0.2, 0.3 ve 0.2 mM olarak, maltotrioza karşı zayıf afiniteye sahip olup K_m değerleri sırasıyla 8.2, 8 ve 8.2 mM olarak bulunmuştur (McMahon et al., 1999). Maya *Cryptococcus flavus* α -amilazının nişasta için K_m değeri 0.056 mg/mL olarak bulunmuştur (Wanderley et al., 2004). Termofilik fungus *T. lanuginosus* ATCC 200065 glukoamilazının maltoz için K_m değerinin 3.5 mM olduğu bulunmuştur (Thorsen et al., 2006).

Yukarıdaki literatür sonuçlarının tümü ile *A. flavus* HBF34 GA'sının K_m değerleri karşılaştırıldığında, diğer GA ve α -amilazlara göre oldukça düşük bir K_m değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç enzimimizin çok düşük substrat konsantrasyonlarında dahi substratına olan ilgisinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. K_m değerinin düşük olması endüstriyel işlemlerin hızlı ve kolay olarak yapılmasına olanak sağlayacağından, GA'nın endüstriyel potansiyelinin de yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

4. 11. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

A. flavus HBF34 GA'sının substrat spesifitesini belirlemek için, sukroz, maltoz, maltotrioz, rafinoz, dekstrin, amiloz, amilopektin, glikojen, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, çözünür patates nişastası ve selüloz kullanılmıştır. GA, bu substratlar içinde en yüksek aktiviteyi glikojene karşı göstermesine rağmen, bulunan değer nişastayla hemen hemen aynıdır. GA'nın glikojen, amilopektin, mısır nişastası, pirinç nişastası, buğday nişastası, maltoz, amiloz, dekstrin, selüloz ve maltotrioza karşı

olan aktivitesi ise sırasıyla % 102, 84, 72, 70, 69, 68, 59, 57, 53 ve 50 olarak bulunmuştur. GA'nın rafinoz ve sukroza karşı oldukça az aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, *A. flavus* HBF34 GA'sının geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğunu söyleyebiliriz. *A. flavus* HBF34 GA'sı sukroza karşı az aktivite, nişasta ve glikojen gibi uzun zincirli substratlara karşı yüksek aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar literatür bulguları ile paralellik göstermektedir. GA'lar genellikle, α -1,4 bağları için çok yüksek afiniteye sahip olmasına rağmen, aynı zamanda çok yavaş da olsa α -1,6 ve α -1,3 bağlarını da hidrolizleyecek afiniteye sahiptir. Substratın hidrolizlenme oranı hem moleküler büyüklük ve yapıyla hem de zincirdeki bağ tipiyle etkilemektedir. Bu nedenle, α -1,4 bağlarının hidrolizlenme oranı substratın nispi moleküler kütlesi ile en azından maltopentoza kadar doğrusal bir şekilde arttığı belirtilmiştir (Fogarty and Benson, 1983).

A. flavus GA'sının yapılan bir çalışmada çözünür nişasta, dekstrin, mısır unu, D-mannitol ve pirinç unu gibi karbohidratları hidrolizleyebildiğini ve hidrolizleme oranının asidik koşullar altında en iyi olduğu bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994). *A. fumigatus* GA'sının nişasta, glikojen, amilopektin ve amiloz gibi polisakkaritleri, maltoz ve maltotriozdan daha hızlı hidrolizlediği bulunmuştur (Silva and Peralta, 1998). Ektomikorizal fungus *Lyophyllum shimeji* GA'sının amiloz A ve dekstrin gibi α -1,4 bağları içeren polisakkaritleri kolaylıkla hidrolizlediği, α -1,6 bağları içeren amilopektin ve izomaltohekzozu hidrolizlediği, siklik polisakkaritleri ise hidrolizleyemediği bulunmuştur (Kusuda et al., 2004). Termofilik fungus *T. lanuginosus* ATCC 200065 GA'sının amilopektin, glikojen, maltotrioz ve maltozun hidrolizleme oranları, amilozun hidroliz oranı ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 94, 87, 40 ve 14 olarak bulunmuştur (Thorsen et al., 2006). p-Nitrofenil α -D-glukozid, maltoz, maltotrioz, dekstrin, çözünür nişasta ve glikojen için termofilik fungus *T. lanuginosus* GA'sının Km değerlerinin sırasıyla 833 (2.75 mM), 833 (2.3 mM), 556 (1.1 mM), 114, 46 ve 22 μ g/mL olarak bulunduğu, Km değerlerinin substrat molekülünün zincir uzunluğunun artmasıyla azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlarla moleküldeki uzun zincirlerin artmasıyla enzim

afinitesinin arttığı, substrat ve enzimin aktif merkezi arasındaki etkileşimin de artmış olabileceğini gösterilmiştir (Basaveswara Rao et al., 1981).

Termofilik fungus *T. lanuginosus* F₁ α -amilazı ve glukaoamilazının amilozu hızlı bir şekilde hidrolizlediği, pullulanı ise çok az hidrolizlediği bulunmuştur (Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001). *A. tamarii* α -amilazının nişasta, amilopektin ve amilozu hidrolizleme oranının yüksek olduğu, glikojen ve pullulanı çok yavaş hidrolizlediği, siklodekstrinleri (α ve β) hidrolizleyemediği bulunmuştur (Moreira et al., 2004). Ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake* α -amilazının substrat spesifitesi için farklı polisakkaritler kullanılmış, en iyi hidrolizlenen substratın çözünür nişasta olduğu daha sonra sırası ile amiloz A, amiloz, amiloz B ve glikojen olduğu bulunmuştur. *Tricholoma matsutake* α -amilazı α -1,6 bağlarını ve siklik polisakkaritleri (α - ve β -siklodekstrin), α -1,4, α -1,6 ve α -1,3 bağlarını da içeren pullulanı hidrolizleyemediğini göstermiştir (Kusuda et al., 2003). Maya *Cryptococcus flavus* α -amilazının nişastaya karşı maksimum aktivitesinin % 100 olduğu, glikojen, amilopektin ve amiloza karşı ise sırasıyla % 18.9, 16.7 ve 7.1 olduğu bulunmuştur (Wanderley et al., 2004).

4. 12. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapılarının oluşumunda ve aktif merkezde substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar. Bu sebeple, *A. flavus* HBF34'ün GA aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelendiğinde, Mn^{2+} , Ca^{2+} ve Co^{2+} 'in bütün konsantrasyonlarda, Ba^{2+} 'un ise 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Bu iyonlarda özellikle Mn^{2+} enzim aktivitesini % 169, Ca^{2+} % 67, Co^{2+} % 20 ve Ba^{2+} ise % 24 oranda arttırmıştır. Bu iyonların enzimin stabilizasyonunda veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini sağladığını düşünmekteyiz.

A. flavus HBF34'ün GA aktivitesi Ni^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ , K^+ , NH_4^+ , $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ ve Na^+ gibi metal iyonlarının tüm konsantrasyonlarında çok fazla etkilenmediği, sadece Se^{3+} iyonunun 10 mM'lık konsantrasyonunda % 76 oranda inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Bu iyonların enzim yapısı ve substrat ile etkileşime girmedeği veya yapıya katılmış olsalar dahi üç boyutlu yapıyı değiştirmedeğini düşünmekteyiz.

Fe^{3+} ve Al^{3+} 'un 1 mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini çok fazla inhibe etmezken, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları yüksek oranda inhibisyona neden olmuştur. Hg^{2+} 1 mM'lık konsantrasyonda % 50 oranında inhibisyona neden olurken, özellikle 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Cu^{2+} ve Zn^{2+} 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini yaklaşık olarak % 21-44 oranında inhibe ederken, 10 mM'lık konsantrasyonda inhibisyon oranı artmaktadır. Bu metal iyonları GA'nın substrat bağlama bölgesine ve katalitik merkezinde görev alan amino asitlerle etkileşerek inhibisyona neden olduğunu, ayrıca yapıya katılarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiğini veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini etkilediğini düşünmekteyiz. Genel olarak GA aktivitesini özellikle Hg^{2+} kuvvetle inhibe ederken, Mn^{2+} ve Fe^{2+} tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (Pandey et al., 2000; Najafi and Kumbhavi, 2005). Bu sonuçlardan Hg^{2+} ve Mn^{2+} bizim çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermiş, ancak Fe^{2+} aynı sonucu göstermemiştir. Amilazların özellikle α -amilazların çoğunun metal iyonlarına bağımlı olduğu bilinmektedir. Hg^{2+} iyonlarının inhibisyonunun enzim fonksiyonunda görev alan indol amino asitinin bir belirteci olabileceği de belirtilmiştir (Wanderley et al., 2004).

Bir metal tutucu ajan olan EDTA, denenen konsantrasyonlarda enzim aktivitesini % 17-39 oranında inhibe etmiştir. GA'nın metal tutucu bir ajan olan EDTA tarafından yaklaşık % 40 oranında inhibe olması, GA'nın bir metalloenzim olmadığı düşüncesini akla getirmektedir. Çünkü enzim EDTA tarafından yüksek konsantrasyonlarda bile tamamen inhibe olmamıştır. Bu durumda bazı metal iyonlarının aktiviteyi arttırmış

olması, bu metal iyonlarının katalitik bir mekanizmada rol almaktan çok yapısal bir role sahip olduklarını göstermektedir.

Metal iyonlarının amilazlar üzerine etkisi ile yapılan çalışmalar sonucunda enzim aktivitelerini çok farklı bir şekilde etkiledikleri bulunmuştur. Bunlardan bazıları enzim aktivitesini arttırırken, bazıları inhibe etmiş veya hiç etkilememiştir. *A. flavus* GA'sı ile yapılan tek çalışmada, GA'nın Hg^{2+} tarafından güçlü bir şekilde inhibe olduğu, Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} ve EDTA tarafından etkilenmediği bulunmuştur (El-Abyad et al., 1994). Hg^{2+} ve Ni^{2+} sonuçları bizim çalışmamızla benzerlik, diğer sonuçlar ise farklılık göstermektedir. *A. niger*'in GA aktivitesi üzerine Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} gibi katyonların inhibitör etkisinin olmadığı, polivalent anyonların ise enzimi aktive ettikleri bildirilmiştir (Fogarty and Benson, 1983).

Chaetomium thermophilum GA'sının Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ve K^+ iyonları tarafından aktive edildiği, Fe^{2+} , Ag^+ ve Hg^{2+} tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Chen et al., 2005). Termofilik fungus *T. lanuginosus* F₁'in GA aktivitesi 2 mM Mn^{2+} (% 63), Co^{2+} (% 51), Ca^{2+} (% 27), Fe^{2+} (% 15) ve Zn^{2+} (% 11) tarafından aktive edildiği, Ba^{2+} (% 3) tarafından etkilenmediği, EDTA (% 43) ve Hg^{2+} (% 83) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur. Aynı fungusun α -amilazı 2 mM Co^{2+} (% 78), Mn^{2+} (% 24), Zn^{2+} (% 13), Ca^{2+} (% 11) ve Fe^{2+} (% 8) tarafından aktive edildiği, Ba^{2+} (% 11), EDTA (% 46) ve Hg^{2+} (% 90) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001). *Scytalidium thermophilum* GA'sının 1 mM Ba^{2+} (% 20), Ca^{2+} (% 22.7), Cu^{2+} (% 17.2), EDTA (% 23), Hg^{2+} (% 24.4), Mg^{2+} (% 20.8), Mn^{2+} (% 21.1), Na^+ (% 22.8), NH_4^+ (% 13.7) ve Zn^{2+} (% 24.1) tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Cereia et al., 2000). *T. lanuginosus* ATCC 34626 GA'sının 10 mM konsantrasyonlarda Zn^{2+} iyonu tarafından inhibe edildiği, Co^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} ve EDTA tarafından aktive edildiği bulunmuştur. Mn^{2+} 'in iyi bir aktivatör olduğu ve GA aktivitesini 1.5 kat arttırdığı bulunmuştur (Nguyen et al., 2002). *Lyophyllum shimeji*'nin GA aktivitesinin 0.1 M Ca^{2+} iyonu varlığında önemli derecede aktive olduğu, Pb^{2+}

iyonunun aktiviteyi fazla etkilemediği, Al^{3+} , K^+ , Li^+ , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} ve EDTA'nın enzimi % 33-67 oranında inhibe ettiği, Ag^+ ve Ba^{2+} iyonlarının ise enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Kusuda et al., 2004). *Scytalidium thermophilum* 15.8'in GA aktivitesinin 1mM Mg^{2+} (% 8.9), Cu^{2+} (% 8.2), Mn^{2+} (% 4.4), Na^+ (% 3.6) ve EDTA (% 2) tarafından aktive, Ca^{2+} (% 21) ve Hg^{2+} (% 20) tarafından inhibe ettiği, NH_4^+ , Ba^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise aktivite üzerine önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonda (10 mM) ise metal iyonlarının hepsi, özellikle Hg^{2+} 'nın (% 91) inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada, substrat olarak maltoz kullanıldığı 1 mM iyon konsantrasyonunda aktivite bir artış gözlenmemiş % 15-46'lık bir azalma olmuş, 10 mM Ba^{2+} ve NH_4^+ GA aktivitesini % 6 oranında arttırırken, Hg^{2+} % 90 oranında inhibe etmiştir (Cereia et al., 2006). Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* GA'sı 1 mmol/L Mg^{2+} (% 27), Zn^{2+} (% 21), Ba^{2+} (% 8) ve Mn^{2+} (% 5) aktive etmiştir (Aquino et al., 2001).

Çeşitli mikroorganizmaların nişasta hidrolizleyen amilazlarının aktivite için Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} gibi divalent katyonlara gereksinim duyduğu bildirilmiştir. *A. carbonarius* nişasta hidrolizleyen amilazı 2 mM Fe^{2+} ve Co^{2+} tarafından aktive edilmiş, Ca^{2+} gibi divalent veya Na^+ gibi monovalent katyonlara aktivite için gereksinim göstermemiştir. Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} ve EDTA enzim aktivitesini inhibe etmiştir (Okolo et al., 2000). *Scytalidium thermophilum* α -amilaz aktivitesinde 1 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Na^+ iyonları % 4-8 oranında bir artışa sebep olurken, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} ve NH_4^+ sırasıyla % 47, 17, 12 ve 12 oranında, özellikle Hg^{2+} ile Cu^{2+} ise % 85 ile 75 oranında inhibisyona sebep olmuştur. 10 mM konsantrasyonda ise aktivitede Na^+ iyonu % 10'luk bir artış göstermiş, Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^+ iyonları yaklaşık olarak % 18'lik inhibisyona ve özellikle Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları ise % 93, 96 ve 100'lük inhibisyona neden olmuştur (Aquino et al., 2003). Maya *Cryptococcus flavus*'un α -amilaz aktivitesinde 4 mM Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonları sırasıyla % 4, 5, 15, 30, 71, 80 ve 100 azalmaya sebep olmuştur (Wanderley et al., 2004). *A. tamarisii* α -amilazı 10 mM Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} tarafından % 90-98 oranında inhibe edilmiş,

Ba^{2+} tarafından % 23 oranında aktive edilmiş ve denenen diğer metal iyonları tarafından önemli bir şekilde etkilenmediği bulunmuştur (Moreira et al., 2004). *Streptomyces* sp. No.4 amilazları (Amilaz 1 ve 2) üzerine 1 mM metal iyonlarının etkisi incelenmiş, Amilaz 1'in Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} tarafından çok azda olsa aktive edildiği, Ni^{2+} ve Mn^{2+} tarafından etkilenmediği, Sn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} (%100) ve EDTA tarafından inhibe edildiği bulunmuştur. Amilaz 2'nin ise, denenen tüm metal iyonları ile inhibe olduğu, EDTA ise aktivitede % 13'lük bir artışa neden olduğu bulunmuştur (Primarini and Ohta, 2000).

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

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

4. 13. Enzimin Tuz Toleransı

Sıcaklık, tuzluluk ve pH gibi endüstriyel işlemlerde kullanılmak üzere ekstrem koşullara toleranslı ve yeni fizyolojik özelliklere sahip amilazlar üreten

mikroorganizmaların keşfi oldukça önemlidir. *A. flavus* HBF34 glukoamilazının, 0.05-2 M NaCl konsantrasyonları arasında enzim aktivitesinde bir artış (% 59) olurken, artan konsantrasyonlarında çok az bir inhibisyona neden olmuş, fakat enzim aktivitesi başlangıç aktivitesine oranla yüksek bulunmuştur. *A. flavus* HBF34 glukoamilazının tuz toleransının oldukça yüksek olması, enzimin yüksek tuz konsantrasyonu gerektiren endüstriyel işlemlerde de kullanıma uygun olabileceğini göstermiştir. Nişastanın şekerleştirme işlemlerinde ve endüstrideki farklı uygulamalarda kullanılan amilazlar için, yüksek tuz toleransına sahip olmanın yararlı bir özellik olduğu bildirilmiştir (Mohapatra et al., 1998). Tuz tolerans testinin, kirlilik kontrol mekanizmalarında, selüloz, nişasta ve yüksek oranda tuz içeren atık suların işlenmesinde önemli olduğu belirtilmiştir (Banerjee et al., 2001; Cordeiro et al., 2002).

4. 14. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

A. flavus HBF34 glukoamilaz aktivitesi üzerine SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4-dithiothreitol, serin inhibitörü olan CMC ve tiyol grubu inhibitörü olan DTNB sırasıyla % 25, 41 ve 74'lük bir artış sağlamış olması, enzimin aktif merkezinde bu grupları içeren amino asitlerin bulunmadığını göstermektedir. İnhibitörler muhtemelen, ortamda bulunma ihtimali olan proteazların inhibisyonuna neden olmuş ve GA'yı proteolizisden korumuştur. Bu nedenle, aktivite kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır.

Triptofan inhibitörü olan NBS, GA aktivitesini tamamen inhibe etmiştir. Buda GA'nın aktif merkezinde katalizden sorumlu amino asidin triptofan olduğunu göstermektedir. Yine Hg^{2+} iyonunun enzim inhibisyonu, aktif merkezde rol oynayan indol grubu içeren triptofan amino asidinin bir belirteci olabileceği belirtilmiştir (Wanderley et al., 2004). Bu bulguya göre GA'nın Hg^{2+} tarafından kuvvetle inhibe olması, GA aktif merkezinde triptofanın bulunabileceğinin ikinci bir kanıtıdır.

SH-grubu inhibitörü olan β -merkaptetanol'ün denenen bütün konsantrasyonlarında, enzim aktivitesinde çok fazla bir inhibisyona neden olmaması, enzimin katalitik merkezinde sülfidril gruplarının bulunmadığını veya sülfidril gruplarının kataliz işleminde önemli bir rol oynamadığını göstermiştir.

Sistein, histidin ve serin inhibitörü olan PMSF'nin etkisine bakıldığında enzim aktivitesinde 6 mM'a kadar % 25, 10 mM'lık konsantrasyonda yaklaşık olarak % 55'lik bir inhibisyon görülmüştür. Ancak enzim tamamen inhibe olmamıştır. Bu da enzimimizin aktif merkezinde, bu amino asitlerin katalitik işlevlerde azda olsa önemli olduğunu göstermektedir.

Protein denaturantı olan üre, yüksek konsantrasyonlarda bile enzimin aktivitesini çok fazla etkilememesi enzimimizin üre'ye karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir. Diğer bir protein denaturantı olan SDS, artan konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde yaklaşık olarak % 65'lik bir inhibisyona neden olmuş, daha üst konsantrasyonlarda ise oluşan çökeltiden dolayı aktivite ölçülememiştir. Enzimimizin SDS'ye karşı çok fazla dayanıklı olmadığını söyleyebiliriz.

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

Termofilik fungus *Scytalidium thermophilum* 15.8'in GA ve α -amilazı 1 mM β -merkaptetanol tarafından tamamen inhibe edilmiş ve disülfid bağlarının varlığı gösterilmiştir (Cereia et al., 2006). *Streptomyces* sp. No.4'ün amilazlarının (A1 ve A2) 1mM β -merkaptetanol tarafında aktive edildiği bulunmuştur (Pirimarini and Ohta, 2000).

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum GA'sı 10 mM dithiothreitol tarafından inhibe edilmediği bulunmuştur (Feng et al., 2002). *Natronococcus* sp. α -

amilazının % 1'lik SDS ve 1 M üre varlığında aktivitesini % 80 ve 74 oranında inhibe etmiş, 1 mM PMSF inhibitör etkisi göstermemiş, N-bromosuksinamidin ise % 73 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre enzimin aktif merkezinde triptofan olduğu bulunmuştur (Kobayashi et al., 1992). Termofilik fungus *T. lanuginosus* ATCC 34626'nın GA ve α -amilazının 10 mM üre tarafından aktive edildiği bulunmuştur (Nguyen et al., 2002). Termofilik fungus *T. lanuginosus* F₁'in GA ve α -amilaz aktivitesinin 2 mM SDS tarafından aktive edildiği, üre tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001). *Thermus* sp. α -amilazı üre tarafından etkilenmemiş, SDS ise % 63 oranında inhibe edilmiştir (Shaw et al., 1995). *Clostridium perfringens* Type A α -amilazı 10 mM SDS tarafından inhibe edilmiştir (Shih and Labbé, 1995).

Bacillus subtilis DM-03'ün α -amilazı PMSF ve SDS tarafından inhibe edilmiş, üre'nin 2 M konsantrasyonunda etkilenmezken, 8 M konsantrasyonunda % 78 oranında inhibe edildiği bulunmuştur (Das et al., 2004). *Vibrio*. sp. α -amilazı 5mM PMSF tarafından etkilenmemiştir (Najafi and Kumbhavi, 2005). *A. carbonarius* amilazı 2 mM N-bromosuksinamid tarafından % 49 oranında inhibe edilmiştir (Okolo et al., 2000). *Thermomyces lanuginosus* α -amilazı CMC (1-Sikloheksil-3-(2-morfolinil-4-etil)-karboimid) ve N-bromosuksinamid tarafından inhibe edilmiş ve bu sonuçlara göre enzimin aktif merkezinde karboksil grupları ve triptofan amino asidinin olduğu görülmüştür (Petrova et al., 2000).

4. 15. Ham Nişasta Adsorpsiyonu

GA'nın ham nişasta kaynaklarını sindirebilme yetenekleri ve immobilizasyonu endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Bu amaçla farklı nişasta kaynaklarına GA'nın adsorpsiyon oranı bulmak için ham mısır nişastası, buğday nişastası ve pirinç nişastası kullanıldığında, adsorpsiyon oranı sırasıyla % 93, 47 ve 19 olarak bulundu. *A. flavus* GA'sının mısır nişastasına adsorpsiyon kapasitesinin, buğday ve pirinç nişastasına göre daha iyi olduğu görülmektedir. Enzimimizin mısır nişastasına adsorbe olma oranı,

yapılan birçok çalışmayla benzerlik göstermektedir. GA'ın buğday ve pirinç nişastasına adsorpsiyon oranı oldukça düşüktür. Bu belki de enzimimizin doğal davranışı olabilir.

Maya *Candida antarctica* CBS 6678 glukozamilazının 4 °C'da 20 dk sonra mısır, waxy mısır ve buğday nişastasına % 90'dan daha fazla adsorbe olduğu, patates ve pirinç nişastasına % 70 ile 60 oranında adsorbe olduğu bulunmuştur (De Mot and Verachtert, 1987). *Rhizopus* sp. A-11 GA'sının 4 °C'da 20 dk sonra kasava, buğday ve mısır nişastasına adsorbe olma oranları % 99 olarak bulunmuştur (Morita and Fujio, 1997). Organik nitrojen kaynağı içeren ortama % 1.5'lik farklı azot kaynakları eklenerek üretilen *Rhizopus* sp. MKU 40 GA'sının 4 °C'da 20 dk sonra farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranlarının farklı olduğu bulunmuştur. Organik nitrojen kaynağı kullanılarak üretilen GA'nın kasava, buğday ve mısır nişastasına adsorpsiyon oranı % 100, neopepton kullanıldığında adsorpsiyon oranı % 45, 44 ve 43, kazein kullanıldığında adsorpsiyon oranı % 37, 32 ve 36, meat ekstrakt kullanıldığında adsorpsiyon oranı % 49, 41 ve 48 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre organik nitrojen kaynağı kullanılarak üretilen GA'nın GA1 olduğu, ortama farklı nitrojen kaynakları eklendiğinde GA1 ve GA2 üretildiği bulunmuştur (Morita and Fujio, 2000). *Aspergillus* sp. GP-21 GA'sının 15 dk oda sıcaklığında mısır ve patates nişastasına adsorpsiyon oranı % 70 olarak bulunmuştur (Mamo and Gessesse, 1999). *Rhizopus* sp. A-11 tarafından sıvı kültürde üretilen GA'nın kasava, buğday ve mısır nişastasına adsorbe olma oranları % 99, katı kültürde üretilen GA'nın ise, sırasıyla % 25, 29 ve 24 olarak bulunmuştur. *Rhizopus* sp. F 62 için katı kültürde sırasıyla % 27, 24 ve 20, *Rhizopus* sp. TISTR 3211 için % 14, 15 ve 10, *Rhizopus* sp. MKU 24 için % 25, 26 ve 26 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlere göre de sıvı kültürde *Rhizopus* sp. A-11'in daha iyi GA ürettiği bulunmuştur (Morita et al., 1998).

4. 16. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

α -Amilaz enzimleri, nişasta molekülünün α -1,4 bağlarını gelişigüzel hidrolizleyerek dekstrin, maltoz ve çok az miktarda glukoz meydana getirir. Glukoamilazlar ise nişasta ve dekstrin moleküllerini indirgenmemiş uçlarından hidrolizleyerek son ürün olarak, bu moleküllerden glukoz meydana getirir. Glukoamilazlar aynı zamanda nişastadaki α -1,6 bağlarını da parçalayabilme yeteneğine sahiptir. İnce tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi tekniklerle enzimatik son ürünler tespit edilerek amilolitik enzimlerin tanısı yapılmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda *A.flavus* HBF34 tarafından üretilen enzimin tanısını yapmak için ince tabaka kromatografisi kullanılarak, nişastanın enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan son ürünün sadece glukoz olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara göre enzimlerimizin glukoamilaz olduğu sonucuna varılmıştır.

Birçok mikroorganizma tarafından üretilen amilolitik enzimlerin tanısını için yapılan çalışmalarda nişastanın hidrolizi sonucu oluşan son ürün analizi, ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *Humicola grisea*, *Scytalidium thermophilum*, *Lyophyllum shimeji* ve *Scytalidium thermophilum* 15.8 GA'ları (Campos and Felix, 1995; Cereia et al., 2000; Kusuda et al., 2004; Cereia et al., 2006), *Saccharomyces cerevisiae*'in iki farklı enzimi (GA ve α -amilaz) (Moraes et al., 1999) ile *Tricholoma matsutake*, *Scytalidium thermophilum*, *Aspergillus tamarrii* ve *Cryptococcus flavus* α -amilazlarının tanısı yapılmıştır (Kusuda et al., 2003; Aquino et al., 2003; Moreira et al., 2004; Wanderley et al., 2004).

4. 17. Elektroforez ve Zimografi

A. flavus HBF34 tarafından fermentasyon ortamında üretilen iki GA'nın (GA1 ve GA2) olduğu ve bunlarda GA2'nin iki alt ünitesi olduğu fermentasyon ortamının günlük zimografisi ile saptanmıştır. Saflaştırılan GA'ların saflığını ve molekül ağırlıklarını

tain etmek için PAGE, SDS-PAGE ve bunların zimografisi yapılmıştır. GA'nın PAGE zimografisi ile görüntülenmesi yapıldığında, iki enzim bandı GA1 ve GA2 saptanmıştır. Bu enzimlerin SDS-PAGE sonuçlarına göre, direkt kültürde 9 protein bandı, saflaştırılmış enzim kaynağında ise 4 protein bandı tespit edilmiştir. Zimografi sonucunda ise GA1'in tek bir üniteden oluştuğu, GA2'nin ise iki alt üniteye sahip olduğu (GA2a ve GA2b) saptanmıştır. Moleküler ağırlıkları GA1 için yaklaşık olarak 125 kDa, GA2 için ise 134 kDa (GA2a: 70 kDa ve GA2b: 64 kDa) olarak hesaplanmıştır.

Glukoamilazlar, hem nişasta bağlanma hem de katalitik bağlanma bölgeleri içerir. Bu iki bölümü birbirine O-glikozil bağlarıyla çubuk şeklinde amino asitlerden oluşan bir bağlayıcı bölgesi ile bağlanır. Nişasta bağlanma bölgesi ham nişasta (çözünmez nişasta) üzerine aktiviteden sorumludur. Proteazlar, enzimin bu bölgesi üzerine etki ederek, ham nişasta üzerine olan aktivitesinde azalmaya sebep olabilirler. Fungal glukoamilazların çoğu molekül ağırlıklarının % 10-20 oranında karbohidrat bileşeni içermektedir. Karbohidrat içeriği enzimin üç boyutlu yapısını etkilememektedir fakat karbohidrat içeriğinin uzaklaştırılmasının, termal stabilizasyonu ve enzim sekresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Coutinho and Reilly, 1997). Karbohidrat içeriği protein konformasyonunun stabilizasyonuna, hücreler arası etkileşime ve protein katlanmalarına katkıda bulunmasının yanı sıra enzimi proteolizisten de korumaya yardımcı olmaktadır (Jafari-Aghdam et al., 2005; Norouzzian et al., 2006).

Çeşitli fungus kaynaklarından elde edilen GA'ların molekül ağırlıklarının genellikle 25-112 kDa aralığında olduğu Tablo 42'de özetlenmiştir. Ancak sadece *Saccharomyces cerevisiae* GA'sının molekül ağırlığı 150 kDa olarak saptanmıştır (Moraes et al., 1999). Bu sonuçlara bakıldığında çalışmamızda elde edilen GA'ların molekül ağırlıklarının büyüklüğü ile oldukça ilginç oldukları görülmektedir. Yaptığımız çalışmada enzimlerin karbohidrat içerip içermedikleri saptanmadı, ancak daha sonra yapılacak çalışmalarda karbohidrat içeriğinin saptanması düşünülmektedir.

Tablo 42. Farklı fungus GA'larının moleküler ağırlıkları

Fungus	GA/ α -amilaz	MA (kDa)	Kaynaklar
<i>A. flavus</i> HBF34	GA1/2a/2b	125/70/64	
<i>A. flavus</i>	GA	51.3	El-Abyad et al., 1994
<i>A. fumigatus</i>	GA	42	Silva and Peralta, 1998
<i>A. niger</i>	GA	100	Coral and Çolak, 2000
<i>A. niger</i> NRRL 3135	GA	90	Vandersall et al., 1995
<i>A. niger</i>	GA	63	Fogarty and Benson, 1983
<i>A. niger</i>	GA1/2	99/112	Pazur et al., 1971
<i>A. niger</i>	GA1/ 2/ 3	91/73/59	Aalbæk et al., 2002
<i>Aspergillus awamori</i>	GA	49	Pestana and Castillo, 1985
<i>Scytalidium thermophilum</i> 15.8	GA	83	Cereia et al., 2006
<i>Scytalidium thermophilum</i>	GA	75 -60	Aquino et al., 2001
<i>Scytalidium thermophilum</i>	GA	86-68.5	Cereia et al., 2000
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GA	66	Thorsen et al., 2006
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GA	57	Basaveswara Rao et al., 1981
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GA/ α -amilaz	75/61	Nguyen et al., 2002
<i>Lyophyllum shimeji</i>	GA	25	Kusuda et al., 2004
<i>Humicola grisea</i>	GA	74	Campos and Felix, 1995
<i>Rhizopus</i> sp. A-11	GA	72.4	Morita and Fujio, 1997
<i>Chaetomium thermophilum</i>	GA	64	Chen et al., 2005
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GA/ α -amilaz	70/55	Odibo and Ulbrich-Hofmann, 2001
<i>Candida antarctica</i> CBS 6678	GA/ α -amilaz	48.5/50	De Mot and Verachtert, 1987
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GA/ α -amilaz	150/97	Moraes et al., 1999
<i>A. tamarii</i>	α -amilaz	37.5	Moreira et al., 2004
<i>A. flavus</i>	α -amilaz	52.5	Khoo et al., 1994
<i>A. flavus</i>	α -amilaz	75	Abou-Zeid, 1997
<i>A. oryzae</i>	α -amilaz	68	Ramachandran et al., 2004
<i>A. niger</i>	Amilaz	60-54	Mitidieri et al., 2005
<i>A. carbonarius</i>	Amilaz	31.6-32	Okolo et al., 2000
<i>A. flavipes</i>	Amilaz1a/1b/2	50/14.5/ 63	Frolova et al., 2002
<i>A. niger</i>	Amilolitik	125	Suresh et al., 1999

Tablo 42. Farklı fungus GA'larının moleküler ağırlıkları (devamı)

<i>Thermomyces lanuginosus</i>	α -amilaz	58	Petrova et al., 2000
<i>Thermomonospora curvata</i>	α -amilaz	62	Glymph and Stutzenberger, 1977
<i>Scytalidium thermophilum</i>	α -amilaz	49	Aquino et al., 2003
<i>Cryptococcus flavus</i>	α -amilaz	75-84.5	Wanderley et al., 2004
<i>Tricholoma matsutake</i>	α -amilaz	46-34	Kusuda et al., 2003
<i>Thermomonospora fusca</i> NTU22	α -amilaz	64-60	Yang and Liu, 2004
<i>Streptomyces</i> sp. No. 4	Amilaz1/2	56/77	Primarini and Ohta, 2000
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Amilaz1/2/3	50/70/80	Bignell et al., 2000
<i>Thermoascus auranticus</i>	Amilaz1,2	75/56	Ohno et al., 1998

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür koleksiyonunda havadan izole edildikten sonra tanısı yapılmış olan 17 fungusta kalitatif amilaz taraması yapıldı.
- Havadan izole edilerek tanısı yapılmış 17 fungustan kalitatif amilaz taraması sonucunda 8 suş da amilolitik aktivite saptanmıştır. En iyi aktivite gösteren *Aspergillus flavus* HBF34 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi. Diğer amilolitik aktivite gösteren suşlar ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür koleksiyonunda kaydedilmiştir.
- Fermentasyon ortamında *A. flavus* HBF34'ün GA üretimi yapıldı. Ancak üretim ortamının koşulları üzerine araştırmalar eksik kalmıştır. Bu araştırmaların daha sonra yapılması planlanmıştır.
- GA nişasta afinite kromatografi tekniği ile 117 kat saflaştırıldı. Bu saflaştırma tekniği oldukça iyi olup, bu tekniğin daha da geliştirilmesine çalışılacaktır. Ayrıca ileride yapılacak çalışmalarda iki enzimin, diğer kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması planlanmaktadır.
- Saflaştırılan GA'nın optimum pH'sı 6.0 ve sıcaklığı 60 °C olarak bulundu. GA'nın 50 °C ye kadar olan sıcaklıklarda ve pH 3-9 aralığında uzun süre stabil olduğu saptandı. Enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında çalışıyor olması endüstriyel olarak oldukça önemli olduğu göstermektedir.

- GA'nın farklı substratlar için Km ve Vmax değerlerine bakıldığında en iyi afiniteyi patates nişastası için gösterdiği bulundu. Ayrıca birçok substratı hidrolizleme yeteneğinin olması endüstriyel uygulamalar için uygun olduğunu göstermektedir.
- GA, Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Ba^{2+} tarafından aktive edildiği, Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ve özellikle Hg^{2+} tarafından inhibe edildiği ve diğer iyonların ise aktiviteyi etkilemediği bulundu. Buda endüstriyel açıdan oldukça önemli bir özelliktir.
- GA'nın NaCl'e karşı toleransının yüksek olarak bulunması zor koşullarda gerçekleşen endüstriyel işlemler için önemli bir özelliktir.
- DTT, CMC ve DTNB GA aktivitesini yükseltirken, PMSF ve β -merkaptoetanol, GA'yı çok az inhibe etti. NBS ise enzim aktivitesini tamamen inhibe etti. Bu sonuç GA'nın aktif merkezinde katalizden sorumlu amino asidin triptofan olduğunu göstermiştir. Üre GA aktivitesini çok fazla etkilemezken, SDS inhibisyona neden olmuştur
- GA'nın mısır nişastasına adsorbsiyon oranı yüksek bulundu. Pirinç ve buğday nişastasına adsorbe olma oranı düşük bulunmuştur. Bu sonuç enzimin doğal davranışı olabilir.
- İnce tabaka kromatografisi ile amilazın glukoamilaz olduğu saptandı. Bu durum beklenen bir sonuçtu. Çünkü fungusların çoğunun glukoamilaz ürettiği bilinmektedir.

- Saflaştırılan enzimin PAGE zimografi yapıldığında iki GA ürettiği belirlendi. Bu durumda beklenen bir sonuçtu, çünkü fungusların nişastanın hidrolizinden sorumlu birden fazla enzim ürettiği bilinmektedir. SDS-PAGE zimografisi ile bir tanesinin 2 alt üniteye sahip olduğu ve enzimlerin moleküler ağırlıkları GA1 için yaklaşık olarak 125 kDa, GA2 için ise 134 kDa (GA2a: 70 kDa ve GA2b: 64 kDa) olarak hesaplandı.
- Sonuç olarak *Aspergillus flavus* HBF34 tarafından elde edilen GA'ların karakterizasyon özelliklerine bakılarak enzimlerin ekstrem şartlarda gerçekleşen endüstriyel işlemler için kullanım potansiyellerinin olduğunu düşünmekteyiz.

ÖZET

Havadan izole edilerek tanısı yapılmış 17 fungusdan kalitatif amilaz taraması sonucunda *Aspergillus flavus* HBF34 suşu amilaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi. Fermentasyon ortamında *A. flavus* HBF34'ün GA üretimi yapıldı. GA nişasta afinite kromatografi tekniği ile 117 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan GA'nın optimum pH'sı 6.0 ve sıcaklığı 60 °C olarak bulundu. GA'nın 50 °C ye kadar olan sıcaklıklarda ve pH 3-9 aralığında uzun süre stabil olduğu saptandı. GA'nın farklı substratlar için Km ve Vmax değerlerine bakıldığında en iyi afiniteyi patates nişastası için gösterdiği bulundu. GA Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Ba^{2+} tarafından aktive edilirken, Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ve özellikle Hg^{2+} tarafından inhibe edildiği ve diğer iyonların ise aktiviteyi etkilemediği bulundu. GA'nın NaCl'e karşı toleransının yüksek olduğu bulundu. DTT, CMC ve DTNB GA aktivitesini yükseltirken, PMSF ve β -merkaptotanol, GA'yı çok az inhibe etti. NBS ise enzim aktivitesini tamamen inhibe etti. Bu sonuç GA'nın aktif merkezinde katalizden sorumlu amino asidin triptofan olduğunu göstermiştir. Üre GA aktivitesini çok fazla etkilemezken, SDS inhibisyona neden olmuştur. GA'nın ham nişasta adsorbsiyonu yüksek bulundu. İnce tabaka kromatografisi ile amilazın glukoamilaz olduğu saptandı. Saflaştırılan enzimin PAGE zimografi yapıldığında iki GA belirlendi. SDS-PAGE zimografisi ile bir tanesinin 2 alt üniteye sahip olduğu bulundu. Enzimlerin moleküler ağırlıkları GA1 için yaklaşık olarak 125 kDa, GA2 için ise 134 kDa (GA2a: 70 kDa ve GA2b: 64 kDa) olarak hesaplandı.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus flavus*, amilaz, saflaştırma, karakterizasyon.

Production, partial purification and kinetics properties of glucoamylase from *Aspergillus flavus* HBF34

SUMMARY

As a result of quantitative amylase survey of seventeen fungi, isolated and identified from air, *Aspergillus flavus* HBF34 strain were selected for amylase production, purification and characterization. Production of GA from *A. flavus* HBF34 was accomplished in the fermentation medium. GA was purified by 117 folds by starch affinity chromatography. Optimal pH and temperature of the purified GA were 6.0 and 60 °C, respectively. GA was found to be stable at the temperature up to 50 °C and a pH range between 3 and 9. When K_m and V_{max} values were taken into consideration for different substrates, the best affinity was shown for the potatoes starch. While GA was activated by Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} and Ba^{2+} , it is inhibited by Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , especially Hg^{2+} , and have found that the other ions have had no affect on its activity. The tolerance of the GA against NaCl was found to be high. While DTT, CMC and DTNB activated the GA, PMSF and β -mercaptoethanol caused a slight inhibition. NBS inhibited the enzyme activity completely. These results show that the tryptophan is the amino acid responsible to catalyze. While urea inhibited the enzyme slightly, SDS caused an inhibition. Raw starch adsorption of GA have found higher. It has been determined by thin layer chromatography that amylase is in fact a glucoamylase. When PAGE zymography of the purified enzyme was carried out, two types of GA were identified. It has been found that one of these enzyme have had two subunits. The molecular weight of GA1 enzyme and GA2 were estimated as 125 kDa and 134 kDa (GA2a: 70 kDa ve GA2b: 64 kDa), respectively.

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

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, sahip olduğu bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, araştırmalarım sırasında beni yönlendiren saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a teşekkürlerimi sunarım. Tez yazımında benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI'ya teşekkürlerimi sunarım. Tez fotoğraflarını çeken çalışma arkadaşım Arş. Gör. Aziz AVCI'ya, tezin deney aşamasındaki yardımlarından dolayı Yüksek Lisans öğrencisi Turgut ÖZTÜRK'e, tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Z. Burcu BAKIR ATEŞLİER'e, fungusların tanılanmasındaki yardımlarından dolayı Aslı ŞAHİNER'e ve tezimin tüm aşamalarında benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Bülent KOÇ'a sonsuz teşekkürler.

KAYNAKLAR

- AALBAEK T., REESLEV M., JENSEN B., ERIKSEN S. H. (2002).** Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 410–415.
- ABOU-ZEÏD A.M. (1997).** Production, purification and characterization of an extracellular α -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. *Microbios* 89: 55-66.
- AGGARWAL N.K., YADAV S.K., DHAMIJA S.S., YADAV B.S. (2001).** Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Pearlmillet for Glucose Production. *Starch/Stärke* 53: 330–335.
- AQUINO A.C., JORGE J.A., TERENCE H.F., POLIZELI M.L. (2001).** Thermostable glucose-tolerant glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Folia Microbiol (Praha)*;46(1): 11-16.
- AQUINO A.C.M.M., JORGE J.A., TERENCE H.F. POLIZELI M.L.T.M. (2003).** Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 323-328.
- BAMFORTH C.W. (2003).** Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review. *MBAA TQ* Vol. 40, No. 2, pp. 89-97.
- BANERJEE D., MONDAL K.C. and PATI B.R. (2001).** Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. *J. Basic Microbiol.* 41 (6):, 313-318.
- BARREDO J.L. (2005).** *Methods in Biotechnology™* 17: Microbial enzymes and biotransformations. 1-27. Human Press, Totowa, New Jersey.

- BASAVESWARA RAO V., SASTRI N.V.S. and SUBBA RAO P.V. (1981).** Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Biochem. J. Vol. 193, 379-387.
- BAUTISTA L.F., MARTÍNEZ M. and ARACIL J. (1999).** Adsorption Equilibrium of α -Amylase in Aqueous Solutions. AIChE Journal Vol. 45, No. 4, 761-768.
- BENNET J.W. and KLICH M.A. (1992).** “*Aspergillus*: Biology and Industrial Applications” in *Aspergillus*: Biology and Industrial Applications edited by J.W. Bennet and M.A. Klich. Boston: Butterworth-Heinemann, pp.329-353.
- BERNFELD, P. (1955).** Amylases, alpha and beta. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O (eds.). Methods in enzymology. New York: Academic Press. v. 1. pp. 149-158.
- BIÇAK Ö., EKMEKÇİ Z. (2005).** Polisakkaritlerin Flotasyonda Bastırıcı Olarak Kullanımı ve Soğurum Mekanizmaları. Madencilik. Cilt 44, Sayı 1, Sayfa 19-31.
- BIGNELL G.R., BRUCE I.J. & EVANS I.H. (2000).** Amylolytic enzymes of *Lipomyces starkeyi*: purification and size-determination. Biotechnology Letters 22: 1713-1718.
- BOZKURT ULUDAĞ Y. (2000).** İmmobilize Glukoamilaz İle Maltodekstrinden Glukoz Üretimi. Gebze Yüksek Teknoloji ve Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- CAMPOS L. and FELIX C.R. (1995).** Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, No. 6 p. 2436–2438.

- CEREIA M., GUIMARÃES L.H.S., PEIXOTO-NOGUEIRA S.C., JORGE J.A., TERENCE H.F., GREENE L.J. and POLIZELI M.L.T.M. (2006).** Glucoamylase isoform (GAII) purified from a thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* 15.8 with biotechnological potential. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (12), pp. 1239-1245.
- CEREIA M., TERENCE H.F., JORGE J.A., GREENE L.J., ROSA J.C. and POLIZELI M.L.T.M. (2000).** Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. J. Basic Microbiol. 40: 83-92.
- CHEN J., LI D.C., ZHANG Y.Q. and ZHOU Q.X. (2005).** Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum*. The Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 51, No. 3 pp.175-181.
- CHERRY H.M., HOSSAIN M.T. and ANWAR M.N. (2004).** Extracellular Glucoamylase from the Isolate *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Sciences 7 (11): 1988-1992.
- CORAL G., ÇOLAK Ö. (2000).** Bir *Aspergillus niger* izolatına ait glikoamilaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu. Turk J Biol. 24: 601–609.
- CORDEIRO C.A.M., MARTINS M.L.L., LUCIANO A.B. (2002).** Production and properties of α -amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology 33: 57-61.
- COUTINHO P.M. and REILLY P. J. (1994).** Glucoamylase Structure: Insight for Protein Engineering. <http://nte-serveur.univ>.

- COUTINHO P.M. and REILLY P.J. (1997).** Glucoamylase Structural, Functional, and Evolutionary Relationships. *Proteins; Structure, Function, and Genetics* 29: 334-347.
- CRABB W.D. and SHETTY J.K. (1999).** Commodity scale production of sugars from starches. *Ecology and Industrial Microbiology*, 2: 252-256.
- DAS K., DOLEY R. and MUKHERJEE A.K. (2004).** Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40: 291-298.
- DE MOT R. and VERACHTERT H. (1987).** Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *Eur. J. Biochem.* 164: 643-654.
- EL-ABYAD M.S., EL-SHANSHOURY A.R. and HAFEZ M. (1994).** Purification and characterization of the glucoamylase produced by a strain of *Aspergillus flavus*. *Microbios.* 80: 7-15.
- ELTEM R. (2004).** Endüstriyel mikroorganizmaların doğal kaynaklardan izolasyonu ve geliştirilmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü.
- FENG P.H., BERENSMEIERS., BUCHHOLZ K., REILLY P.J. (2002).** Production, Purification, and Characterization of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Glucoamylase. *Starch/Stärke* 54: 328-337.
- FOGARTY W.M. and BENSON C.P. (1983).** Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 18(5), Pages 271-278.

- FOGARTY W.M., KELLY C.T., BOURKE A.C. and DOYLE E.M. (1994).** Extracellular maltotetraose-forming amylase of *Pseudomonas* sp. Imd 353. Biotechnology Letters, Volume 16 No.5, pp.473-478.
- FOGARTY, M.W. and KELLY, C.T. (1990).** Recent advances in microbial amylases. In Microbial Enzymes and Biotechnology. pp. 71-131. London: Elsevier Applied Science Publishers. ISBN 1-85166-486-6.
- FONTANA J.D., GEBARA M., BLUMEL M., SCHNEIDER H., MACKENZIE C.R., JOHNSON K.G. (1988).** α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. Methods Enzymol. 160: 560-571.
- FROLOVA G.M., SIL'CHENKO A.S., PIVKIN M.V., and MIKHAILOV V.V. (2002).** Amylases of the Fungus *Aspergillus flavipes* Associated with *Fucus evanescens*. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 38, No. 2, pp. 134-138.
- GLYMPH J.L. and STUTZENBERGER F.J. (1977).** Production, purification and characterization of α -amylase from *Thermomonospora curvata*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 34, No. 4, p. 391-397.
- GOMES E., DE SOUZA S.R., GRANDI R.P., DA SILVA R. (2005).** Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* a 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. Brazilian Journal of Microbiology 36: 75-82.
- GOPINATH S.C.B., ANBU P., HILDA A. (2005).** Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience 46:119-126.
- GOTO C.E., BARBOSA E.P., KISTNER L.C.L., MOREIRA F.G., LENARTOVICZ V., PERALTA R.M. (1998).** Production of amylase by

Aspergillus fumigatus utilizing α -methyl-D-glycoside, a syntetic analogue of maltose, as substrate. FEMS Microbiology Letters. 167: 139-143.

GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATRA H., GOSWAMI V.K., CHAUHAN B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 38: 1599-1616.

HA Y.M., LEE D.G., YOON J.H., PARK Y.H. and KIM Y. (2001). Rapid and simple purification of a novel extracellular β -amylase from *Bacillus* sp.. Biotechnology Letters 23: 1435-1438.

HASENEKOĞLU İ. (1991). Toprak Mikrofungusları. Cilt 1:324-325. Atatürk Üniversitesi Yayınları No. 689, Erzurum.

HYUN H.H. and ZEIKUS J.G. (1985). General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Appl Environ Microbiol. 49(5): 1168–1173.

HYUN H.H. and ZEIKUS J.G. (1985). General biochemical characterization of thermostable extracellular β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. Applied And Environmental Microbiology, Vol. 49, No. 5, p. 1162-1167.

JAFARI-AGHDAM J., KHAJEH K., RANJBAR B., NEMAT-GORGANI M. (2005). Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: Effects on structure, activity and stability. Biochimica et Biophysica Acta 1750: 61-68.

JUGE N., LE GAL-COËFFET M.F., FURNISS C.S.M., GUNNING A.P., KRAMHOFT B., MORRIS V.J., WILLIAMSON G. & SVENSSON B. (2002). The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw-starch hydrolysis. Biologia, Bratislava, 57/Suppl. 11: 239-245.

- KANTARCIOĞLU A.S., YÜCEL A. (2003).** *Aspergillus* Cinsi Mantarlar Ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç Ve Duyarlılık Deneyleri. Cerrahpaşa J Med 34: 140-157.
- KATEMAI W. and RITTIBOON A. (2004).** Production of starch-digesting glucoamylase from *Aspergillus niger* ATCC 10864. *KMITL Science and Technology Journal* Vol. 1(1), ISSN 1685-2044
- KHAJEH K. and NEMAT-GORGANI M. (2001).** Comparative Studies on a Mesophilic and a Thermophilic α -Amylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 90: 47-55.
- KHOO S.L., AMIRUL A.A., KAMARUZAMAN M., NAZALAN N., AZIZAN M.N. (1994).** Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiologica* Volume 39, Issue 5, Pages 392-398.
- KIM T. U., GU B. G., JEONG J. Y., BYUN S. M., and SHIN Y. C. (1995).** Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61, No. 8, p. 3105-3112.
- KLEINMAN M.J., WILKINSON A.E., WRIGHT I.P., EVANS I.H. and BEVAN E.A. (1988).** Purification and properties of an extracellular glucoamylase from a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* Vol. 249, 163-170.
- KOBAYASHI T., KANAI H., HAYASHI T., AKIBA T., AKABOSHI R. and HORIKOSHI K. (1992).** Haloalkaliphilic maltotriose-forming α -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *J. Bacteriol.* 174(11): 3439-3444.

- KORKMAZ Ö. (1989).** *Aspergillus niger* Üremesini ve Alfa-Amilaz Aktivitesini Etkileyen Bazı Parametrelerin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi.
- KURAKAKE M., UEKI M., HASHIMOTO S. and KOMAKI T. (1997).** Adsorption of α -amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin. Carbohydrate Polymers 34: 55-59.
- KUSUDA M., NAGAI M., HUR T.C., UEDA M., TERASHITA T. (2003).** Purification and some properties of α -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. Mycoscience 44: 311-317.
- KUSUDA M., UEDA M., KONISHI Y., MATSUZAWA K., SHIRASAKA N., NAKAZAWA M., MIYATAKE K., TERASHITA T. (2004).** Characterization of extracellular glucoamylase from the ectomycorrhizal mushroom *Lyophyllum shimeji*. Mycoscience 45: 383-389.
- LAEMMLI UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- LIN L.L., CHYAU C.C. and HSU W.H. (1998).** Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechnol. Appl. Biochem. 28: 61-68.
- LOWE D.P., ARENDT E.K., SORIANO A.M. and ULMER H.M. (2005).** The Influence of Lactic Acid Bacteria on the Quality of Malt. J. Inst. Brew. 111(1): 42-50.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951).** Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- MAHESHWARI R., BHARADWAJ G., and BHAT M.K. (2000).** Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 64, No. 3 p. 461-488.
- MAMO G. and GESSESSE A. (1999).** Production of raw-starch digesting amyloglucosidase by *Aspergillus* sp GP-21 in solid state fermentation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 22: 622-626.
- MAMO G. and GESSESSE A. (1999).** Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme and Microbial Technology 25: 433-438.
- MANONMANI H.K. and KUNHI A.A.M. (1999).** Interference of thiol-compounds with dextrinizing activity assay of α -amylase by starch-iodine colour reaction: Modification of the method to eliminate this interference. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 485-487.
- MARLIDA Y., SAARI N., HASSAN Z. and RADU S. (2000).** Raw starch-degrading enzyme from newly isolated strains of endophytic fungi. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 573-578.
- MARLIDA Y., SAARI N., RADU S. & BAKAR F. A. (2000).** Production of an amylase-degrading raw starch by *Gibberella pulicaris*. Biotechnology Letters 22: 95-97.
- MARZAN L.W., HOSSAIN Md.T. and ANWAR M.N. (2005).** Glucoamylase from the isolate *Aspergillus luchuensis*. European Journal of Scientific Research, Vol 6, No 3, 53-59.

- MCCMAHON H.E.M., KELLY C.T. & FOGARTY W.M. (1999).** High maltose-producing amylolytic system of a *Streptomyces* sp.. Biotechnology Letters 21: 23-26.
- MILLER G.L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry Vol. 31, No. 3, 426-428.
- MITIDIERI S., MARTINELLI A.H.S., SCHRANK A., VAINSTEIN M.H. (2006).** Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. Bioresource Technology. 97:10, 1217-1224.
- MOHAPATRA B.R., BANERJEE U.C., BAPUJI M. (1998).** Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp.. Journal of Biotechnology 60: 113-117.
- MØLLER K., SHARIF M.Z., OLSSON L. (2004).** Production of fungal α -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. Journal of Biotechnology 111: 311-318.
- MORAES L.M.P., FILHO S.A. and ULHOA C.J. (1999).** Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 561-564.
- MOREIRA F.G., LENARTOVICZ V. and PERALTA R.M. (2004).** A thermostable maltose-tolerant α -amylase from *Aspergillus tamarii*. J. Basic Microbiol. 44(1): 29-35.
- MOREIRA F.G., LIMA F.A., PEDRINHO S.R.F., LENARTOVICZ V., SOUZA C.G.M., PERALTA R.M. (1999).** Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. Revista de Microbiologia 30: 157-162.

- MORITA H. and FUJIO Y. (1997).**High specific activity of raw-starch digesting-glucoamylase producing *Rhizopus* sp. A-11 in Liquid Culture. Starch/Stärke 49 Nr. 7/8, S. 293-296.
- MORITA H. and FUJIO Y. (2000).** Effect of organic nitrogen sources on raw starch-digesting glucoamylase production of *Rhizopus* sp. MKU 40. Starch/Stärke 52 Nr. 1, S. 18-21.
- MORITA H., MATSUNAGA M., MIZUNO K. and FUJIO Y. (1998).** A comparison of raw starch-digesting glucoamylase production in liquid and solid cultures of *Rhizopus* strains. J. Gen. Appl. Microbiol., 44: 211-216.
- NAJAFI M.F. and KEMBHAVI A. (2005).** One step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp.. Enzyme and Microbial Technology 36: 535-539.
- NGUYEN Q.D., REZESSY-SZABÓ J.M., CLAEYSSSENS M., STALS I., HOSCHKE Á. (2002).** Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. Enzyme and Microbial Technology 31: 345-352.
- NIELSEN J.E. and BORCHERT T.V. (2000).** Protein engineering of bacterial α -amylases. Biochimica et Biophysica Acta 1543: 253-274.
- NOROUZIAN D., AKBARZADEH A., SCHARER J.M., YOUNG M.M. (2006).** Fungal glucoamylases. Biotechnology Advances 24: 80-85.
- NUGENT A.P. (2005).** Health properties of resistant starch. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 30: 27-54.

- ODIBO F.J.C. and ULBRICH-HOFMANN R. (2001).** Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F₁. Acta Biotechnol. 21(2): 141-153.
- OGAWA J. and SHIMIZU S. (1999).** Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. Tibtech. Vol 17:13-27.
- OHNO N., FUKUDA H., WANG H., KASAMURA M., SHINOYAMA H., and FUJII T. (1998).** Amylases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and some of their properties. Seibutsu-Kogaku 76:3 111-117.
- OKOLO B.N., IRE F.S., EZEUGU L.I., ANYANWU C.U. and ODIBO F.J.C. (2000).** Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. J Sci Food Agric 81: 329-336.
- OLAMA Z.A. and SABRY S.A. (1989).** Extracellular amylase synthesis by *Aspergillus flavus* and *Penicillium purpurescence*. Journal of Islamic Academy of Science 2:4, 272-276.
- OMEMU A.M., AKPAN I. BANKOLE M.O. and TENIOLA O.D. (2005).** Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. African Journal of Biotechnology Vol. 4(1), pp.19-25.
- PACHECO-CHÁVEZ R.A., CARVALHO J.C.M., TAVARES L.C., VESSONI PENNA T.C. CONVERTI A. and SATO S. (2004).** Production of α -amylase and glucoamylase by a new isolate of *Trichoderma* sp. using sorghum starch as a carbon source. Eng. Life Sci. Vol. 4, No. 4, 369-372.
- PANDEY A., NIGMAN P., SOCCOL C.R., SOCCOL V.T., SINGH D. and MOHAN R. (2000).** Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31:135-152.

- PAZUR J. H., KNULL H. R. and CEPURE A. (1971).** Glycoenzymes: Structure and properties of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. Carbohydrate Research. Volume 20 (1); 83-96.
- PEIXOTO S.C., JORGE J.A., TERENCE H.F. POLIZELI M.L.T.M. (2003).** *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* : a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. Int Microbiol 6: 269-273.
- PESTANA F. and CASTILLO F.J. (1985).** Glucoamylase production by *Aspergillus awamori* on rice flour medium and partial characterization of the enzyme. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 1(3), Pages 225-237.
- PETROVA S.D., ILIEVA S.Z., BAKALOVA N.G., ATEV A.P., BHAT M.K. & KOLEV D.N. (2000).** Production and characterization of extracellular α -amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). Biotechnology Letters 22: 1619-1624.
- PRIMARINI D. and OHTA Y. (2000).** Some enzyme properties of raw starch digesting amylases from *Streptomyces* sp. No. 4. Starch/Stärke 52: Nr. 1, S. 28-32.
- RAMACHANDRAN S., PATEL A.K., NAMPOOTHIRI K.M., CHANDRAN S., SZAKACS G., SOCCOL C.R. and PANDEY A. (2004).** Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol.47, n. 2 : pp. 309-317.
- REDDY N.S., NIMMAGADDA A. and SAMBASIVA RAO K.R.S. (2003).** An overview of the microbial α -amylase family. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (12), pp. 645-648.

- REILLY P.J. (1999).** Protein Engineering of Glucoamylase to Improve Industrial Performance – A Review. *Starch/Stärke* 51 Nr. 8-9, S. 269-274.
- RIVERA M.H., LÓPEZ-MUNGUÍA A., SOBERÓN X. and SAAB-RINCÓN G. (2003).** α -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Engineering* Vol. 16, No. 7, pp. 505-514.
- SAHA B.C., LECUREUX L.W. and ZEIKUS J.G. (1988).** Raw starch adsorption – desorption purification of a thermostable β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Analytical Biochemistry* 175:569-572.
- SAJILATA M.G., SINGHAL R.S. and KULKARNI P.R. (2006).** Resistant Starch-A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety* Vol. 5: 1-17.
- SAUER J., SIGURSKJOLD B.W., CHRISTENSEN U., FRANDSEN T.P., MIRGORODSKAYA E., HARRISON M., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2000).** Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 275-293.
- ŠEVČIK J., HOSTINOVÁ E., SOLOVICOVÁ A., GAŠPERIK J., DAUTER Z. and WILSON K. S. (2006).** Structure of the complex of a yeast glucoamylase with acarbose reveals the presence of a raw starch binding site on the catalytic domain. *FEBS Journal* 273: 2161-2171.
- SHAW J.F., LÌN F.P., CHEN S.C. and CHEN H.C. (1995).** Purification and Properties of An Extracellular α -amylase from *Thermus* sp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36: 195-200.

- SHENOY B.C., KATWA L.C., APPU RAO A.G. and RAGHAVENDRA RAO M.R. (1985).** Fungal glucoamylases. J. Biosci., Vol. 7, Numbers 3 & 4, pp. 399-419.
- SHIH N.J. and LABBE R.G. (1995).** Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* Type A. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, No. 5 p. 1776-1779.
- SILVA W.B. and PERALTA R.M. (1998).** Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*. Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol. 44(5): 493-497
- SIVARAMAKRISHNAN S., GANGADHARAN D., NAMPOOTHIRI K.M., SOCCOL C.R. and PANDEY A. (2006).** α -Amylases from Microbial Sources- An Overview on Recent Developments. Food Technol. Biotechnol. 44(2): 173-184.
- SPECKA U., MAYER F., and ANTRANIKIAN G. (1991).** Purification and Properties of a Thermoactive Glucoamylase from *Clostridium thermosaccharolyticum*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, No. 8, p. 2317-2323.
- SPOHR A., CARLSEN M., NIELSEN J. and VILLADSEN J. (1997).** Morphological characterization of recombinant strains of *Aspergillus oryzae* production α -amylase during batch cultivations. Biotechnology Letters, Vol 19, No 3, pp. 257-261.
- SPOHR A., CARLSEN M., NIELSEN J., and VILLADSEN J. (1998).** α -Amylase Production in Recombinant *Aspergillus oryzae* during Fed-Batch and Continuous Cultivations. Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 86, No. 1, 49-56.

- SUNNA A., MORACCI M., ROSSI M., ANTRANIKIAN G. (1997).** Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* 1: 2-13.
- SURESH C., DUBEY A.K., SRĪKANTA S., KUMAR S.U., KARANTH N.G. (1999).** Characterisation of a starch-hydrolysing enzyme of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 673-675.
- SUTTHIRAK P., DHARMSTHITI S., LERTSIRI S. (2005).** Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 40: 2821-2826.
- SVENSSON B., LARSEN K. and GUNNARSSON A. (1986).** Characterization of a glucoamylase G 2 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* 154: 497-502.
- TANRISEVEN A., ULUDAĞ Y.B., DOĞAN Ş. (2002).** A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 406-409.
- THORSEN T.S., JOHNSEN A.H., JOSEFSEN K., JENSEN B. (2006).** Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764: 671–676.
- TUNG T.Q., MIYATA N. and IWAHORI K. (2004).** Growth of *Aspergillus oryzae* during Treatment of Cassava Starch Processing Wastewater with High Content of Suspended Solids. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 97, No. 5, 329-335.
- VAN DER MAAREL M.J.E.C., VAN DER VEEN B., UITDEHAAG J.C.M., LEEMHUIS H., DIJKHUIZEN L. (2002).** Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology* 94: 137-155.

- VANDERSALL A.S., CAMERON R.G., NAIRN C.J., YELENOSKY G., WODZINSKI R.J. (1995).** Identification, characterization, and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus niger* (syn *A. ficuum*) NRRL 3135. *Preparative Biochemistry* 25(1-2): 29-55.
- WANDERLEY K.J., TORRES F.A.G., MORAES L.M.P., ULHOA C.J. (2004).** Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters* 231: 165-169.
- WILLIAMSON M.P., LE GAL-COËFFET M.F., SORIMACHI K., FURNISS C.S.M., ARCHER D.B., and WILLIAMSON G. (1997).** Function of Conserved Tryptophans in the *Aspergillus niger* Glucoamylase 1 Starch Binding Domain. *Biochemistry* 36: 7535-7539.
- YANG C.H. and Liu W.H. (2004).** Purification and properties of a maltotriose-producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 254-260.
- YANG S.S. and WANG J.Y. (1999).** Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* submerged and solid state cultivations. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 259-265.

<http://www.bio-link.org>.

ÖZGEÇMİŞ

22.01.1979 Pertek-TUNCELİ’de doğdu. İlkokul ve orta öğrenimi 1986-1993 yılları arasında Geyiksuyu Yatılı İlköğretim Bölge Okulunda okudu ve bu okullardan birincilikle mezun oldu. 1993-1996 yılları arasında Lise öğrenimimi Hozat Kazım Karabekir Lisesinde okudu ve liseyi birincilikle bitirdi. 1998 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite öğrenimime başladı. 2002 yılında Biyoloji Bölümünden dördüncü olarak mezun oldu. 2003-2004 öğretim yılında aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Öğrencisi olarak öğrenimime başladı. 2003-2004 öğretim yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında tahsisli kadroda araştırma görevlisi olarak işe başladı. Evli olup, halen Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak öğrenimine devam etmektedir.