

**ATIK MADDELER VE *ASPERGILLUS NIGER* KULLANILARAK
GLUKOZ OKSİDAZ ÜRETİMİ**

Neslihan GÜREL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2012

ANKARA

Neslihan GÜREL tarafından hazırlanan‘ATIK MADDELER VE *ASPERGILLUS NIGER* KULLANILARAK GLUKOZ OKSİDAZ ÜRETİMİ ‘adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Selma ATEŞ
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR
Kimya Müh. Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Selma ATEŞ
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma ARSLAN
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 30.11.2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof.Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Neslihan GÜREL

**ATIK MADDELER VE *ASPERGILLUS NIGER* KULLANILARAK
GLUKOZ OKSİDAZ ÜRETİMİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Neslihan GÜREL

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kasım 2012**

ÖZET

Bu çalışmada atık maddeler kullanılarak, katı ortamda *Aspergillus niger* ile Glukoz Oksidaz üretimi araştırılmıştır. Karbonhidrat olarak şeker pancarı melası, katı destek maddesi olarak çay atıkları, kalsiyum karbonat kaynağı olarak da yumurta kabuğu kullanılmıştır. Glukoz Oksidaz üretimi için optimum şartlar (süre, MnO_2 , O_2 etkisi) incelenmiştir. En fazla enzim üretimi 96 saatte gözlenmiştir. Hücre dışı enzim aktivitesi 10,6 ünite/mL olarak, spesifik aktivite ise 10,2 ünite/mg protein olarak saptanmıştır. MnO_2 kullanıldığında enzim aktivitesi 1,57 kat artmıştır. Üretim ortamından hava geçirildiğinde (akış hızı 16 mL/s) enzim aktivitesi kontrole göre 1,64 kat artmıştır.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Glukoz oksidaz, *Aspergillus niger*, Atık maddeler, MnO_2
Sayfa Adedi : 53
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Selma ATEŞ

**GLUCOSE OXIDASE PRODUCTION BY USING WASTE MATERIALS
AND *ASPERGILLUS NIGER***

(M.Sc. Thesis)

Neslihan GÜREL

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

November 2012

ABSTRACT

In this study, Glucose Oxidase production was investigated with *Aspergillus niger* in solid state medium by using waste material. Sugarcane molasses as carbohydrates, tea waste as a solid support material, the egg shell as a source of calcium carbonate were used. The optimum conditions for production of Glucose Oxidase (time, the effect of MnO₂ and O₂) were investigated. Maximum enzyme production was obtained at 96 hours. Extracellular enzyme activity and specific activity were found 10.6 units / mL and 10.2 units / mg protein, respectively. Enzyme activity was 1.57-fold increased by using MnO₂. When air (flow rate 16 mL/s) passed through production medium, enzyme activity was 1.64-fold increased according to the control.

Science Code	: 201.1.020
Key Words	: Glucose oxidase, <i>Aspergillus niger</i> , Waste materials, MnO ₂
Page Number	: 53
Adviser	: Prof. Dr. Selma ATEŞ

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, desteğini gösteren, yardım ve katkılarıyla bana ışık tutan Sayın Hocam Prof. Dr. Selma ATEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında Biyoloji Araştırma Laboratuvarının olanaklarını kullanmama izin veren Sayın Hocam Prof. Dr. Belma Aslım'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında bana manevi desteklerinden dolayı dostlarım Şebnem BUDAK ve Dilek ÇİMEN'e sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

Varlıklarıyla her zaman gurur duyduğum ve mutlu olduğum, hayatım boyunca her konuda desteklerini gördüğüm, tezimin oluşturulmasında göstermiş oldukları sabır, destek ve hoşgörüden dolayı annem Şerife GÜREL ve kardeşlerim Lütfiye TAŞKIRAN, Zafer GÜREL ve Lütfü GÜREL'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL VE TEORİK BİLGİLER	3
2.1. Çay	3
2.2. Melas.....	4
2.2.1. Organik maddeler.....	6
2.2.2. İnorganik maddeler	6
2.3. Yumurta Kabuğu.....	6
2.4. Mikroorganizmalar	7
2.4.1. Mikroorganizmaların tarihsel gelişimi.....	9
2.4.2. Mikroorganizmaların hayatımızdaki önemi.....	10
2.4.3. Mikroorganizmaların biyoteknolojideki önemi.....	10
2.5. Funguslar.....	11
2.6. Enzimler.....	15
2.6.1. Enzimlerin yapısı.....	16
2.6.2. Enzimlerin isimlendirilmesi.....	16
2.6.3. Enzimlerin sınıflandırılması.....	17

Sayfa

2.6.4. Enzimlerin özgüllüğü.....	18
2.6.5. Enzim araştırmalarının tarihçesi.....	18
2.6.6. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları.....	18
2.7. Glukoz Oksidaz (GOD)	21
2.7.1. Aktif merkez.....	22
2.7.2. Glukoz Oksidaz' ı saklanma koşulları.....	24
2.7.3. Glukoz Oksidaz' ın inhibitörleri.....	24
2.7.4. Glukoz Oksidaz' ın kullanım alanları.....	24
2.8. Fermentasyon.....	25
2.8.1. Fermentasyon teknikleri.....	25
2.9. Kaynak Araştırması.....	27
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. Materyaller.....	29
3.2. Mikroorganizma.....	29
3.3. Aspergillus niger Fungusunun Spor Sayım Yöntemi	29
3.4. Aspergillus niger Fungusunun Çoğaltılması.....	30
3.5. Üretim Ortamının Hazırlanması ve Glukoz Oksidaz Üretimi.....	30
3.6. Glukoz Oksidaz' ın Ortamdan İzolasyonu.....	31
3.7. Glukoz Oksidaz' ın Aktivite Tayini.....	32
3.7.1. Hidrokinonun kalibrasyon rafığı.....	32
3.7.2. Spektrofotometrik yöntem.....	34
3.7.3. Enzim aktivitesi.....	34
3.8. Protein Derişimi Tayini	35
3.9. Glukoz Oksidaz' ın Vm ve Km Değerlerinin Tayini.....	36
3.10. Biyokütle.....	36

Sayfa

3.11. Glukoz Oksidaz Üretiminde Besi Yeri Seçimi.....	36
3.12. Glukoz Oksidaz Üretiminde MnO ₂ Etkisi.....	37
3.13. Glukoz Oksidaz Üretiminde Yumurta Kabuğunun Etkisi.....	38
3.14. Glukoz Oksidaz Üretiminde O ₂ 'nin Etkisi.....	38
3.15. Glukoz Oksidaz Üretiminde NaOH Etkisi.....	39
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. Aspergillus Niger'in Kültür Seçimi	40
4.2. Glukoz Oksidaz Üretiminde Besi Yerinin Etkisi.....	41
4.3. Glukoz Oksidaz Üretiminde MnO ₂ Derişiminin Etkisi.....	42
4.4. Glukoz Oksidaz Üretiminde Yumurta Kabuğunun Etkisi.....	44
4.5. Glukoz Oksidaz Üretiminde O ₂ 'nin Etkisi.....	44
4.6. Glukoz Oksidaz Üretiminde NaOH Etkisi.....	45
4.7. Glukoz Oksidaz'ın V _m ve K _m Değerlerinin Belirlenmesi.....	45
4.7.1 Glukoz Oksidaz için Lineweaver-Burk grafiğı.....	45
4.8. Enzim Protein Tayini.....	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kuru siyah çayın mineral bileşimi	4
Çizelge 2.2. Şeker pancarı melas bileşimi.....	5
Çizelge 2.3. Yumurta kabuğu bileşimi.....	6
Çizelge 2.4. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları	20
Çizelge 3.1. GOD üretiminde kullanılan katı besi ortamı.....	31
Çizelge 3.2. Farklı derişimlerdeki hidrokinon çözeltilerinin absorbens değerleri.	33
Çizelge 3.3. Farklı derişimlerdeki protein çözeltilerinin absorbens değerleri	35
Çizelge 3.4. GOD üretimi için farklı besi ortamı içeriği.....	37
Çizelge 3.5. Yumurta kabuğu içeren besi ortamı içeriği.....	38
Çizelge 4.1. Farklı kültürlerin ekstraselüler ve intraselüler enzim üretimine etkisinin zamana bağlı değişimi.....	40
Çizelge 4.2. Farklı besi yerlerindeki ekstraselüler ve intraselüler GOD üretimi... ..	41
Çizelge 4.3. Farklı derişimlerdeki MnO ₂ 'nin GOD üretimine etkisi.....	43
Çizelge 4.4. Yumurta kabuğu içeren besi ortamlarında GOD Üretimi.....	44
Çizelge 4.5. Glukoz Oksidaz'ın farklı substrat derişimlerine karşı V değerleri.....	45
Çizelge 4.6. 1/[S] ye karşı 1/V değerleri.....	46

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Glukozun glukonik asite oksidasyonu.....	21
Şekil 3.1. GOD aktivite tayini için reaksiyon mekanizması.....	33
Şekil 3.2. Hidrokinonun kalibrasyon grafiği.....	34
Şekil 3.3. Protein derişimlerinin absorbansa göre kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 4.1. Ekstraselüler ve İntraselüler GOD üretiminin zamanla değişimi.....	41
Şekil 4.2. MnO ₂ derişimine bağlı GOD üretimi grafiği.....	43
Şekil 4.3. Glukoz'un MnO ₂ 'li ortamda oksidasyonu.....	43
Şekil 4.4. GOD için L-B grafiği.....	46

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD'ın pozisyonu.....	23
Resim 2.2. Glukoz oksidazın protein yapısı.....	23
Resim 2.3. Aspergillum.....	27
Resim 3.1. Aspergillus niger hücresinin patlatılmasında kullanılan düzenek.....	32
Resim 3.2. Hava beslemeli kültür ortamı.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simge ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

S	Substrat
V	Hız
μm	Mikrometre
T	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
T	Süre (dk)

Kısaltmalar

ES	Enzim Substrat
EÜ	Enzim Ürün
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
GOD	Glukoz Oksidaz
PDA	Patates Dekstroz Agar

1. GİRİŞ

Çay, dünyada sudan sonra, en fazla içilen ve içme alışkanlığı gittikçe artan bir bitki olarak 5000 yıllık bir geçmişe sahiptir. Türkiye'nin çayla tanışması 1787 tarihinde, Japonya'dan getirilen çay tohumlarının ekilmesiyle başlar. Türkiye yıllık kişi başına çay tüketimi bakımından dünya ülkeleri arasında 4. sırada yer almaktadır. Çay da salep, boza, ayran gibi Türk insanının milli içecekleri arasında yerini almıştır. Yurt içi yıllık tüketim miktarı ise 140 bin tonun üzerindedir [Akova, 2005].

Çayın içerdiği kafein nedeni ile yorgunluk giderici ve canlılık verici etkisi bilinmektedir. Çayın demlenmesi sırasında içerdiği kafein büyük bir oranda deme geçmektedir. Çayda kafeinin yanı sıra Fosfor (P), Kalsiyum (Ca), Potasyum (K), Bakır (Cu), Mangan (Mn), Çinko (Zn), Magnezyum (Mg), Demir (Fe) gibi mineraller ile polifenoller bulunur ve demleme sırasında deme geçer [Öl, 1981].

Atık çaylarda da polifenoller, kafein, amino asitler, şekerler, organik asitler, yağlar, mineraller, pigmentler, proteinler bulunur [Menon, 1993]. Atık çayda bulunan bu kimyasal içerik yani fenoller, şekerler ve amino asitler mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortamdır [Selvakumar ve ark., 1998].

Mikroorganizmalar ekosistemde hayati rol oynarlar. Enzim, vitamin, organik asit ve antibiyotik gibi maddelerin üretimi için endüstriyel olarak kullanılırlar. Mikroorganizmalar yapılarına ve gelişmişlik durumlarına göre başlıca üç grupta incelenir; ökaryotik, prokaryotik ve virüs. Mantarlar ökaryotik canlılar olup klorofilleri olmadığından fotosentez yapamazlar, genellikle aerobik özellik gösterirler. Oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişir ve ürerler [Mikrobiyoloji.org].

Bu çalışmada *Aspergillus niger* kullanılmıştır. *Aspergillus niger* çevrede sık rastlanan ve insanda enfeksiyona sebep olan filamentöz bir mantardır. *A.niger* daha çok sitrik asit üretimindeki rolüyle bilinir. Bu mikroorganizma toprakta yaşam alanı bulur ve yeryüzünde ki karbon çevriminde önemli rol oynar. Organizma hidrolitik ve oksidatif enzimleri ile toprakta bulunan bitkilerin lignin ve selüloz yapılarını bozarak

ayrıştırır, çürümelerine sebep olur. *A.niger*' in salgıladığı enzimlerin bu özelliğinden dolayı mikroorganizma biyoteknoloji endüstrisinde önemli kullanım alanı bulmuştur [Baker, 2006].

Glukoz Oksidazın gıdaların renk, koku özelliklerinin iyileştirilmesi, raf ömrünün arttırılması gibi gıda sanayinde çeşitli kullanım alanları vardır. Biyosensör olarak kullanılır; vücut sıvılarında, içeceklerde ve gıdalarda bulunan glukozun nicel analizini sağlar [Bankar ve ark., 2009].

Bu çalışmada enzim üretimi için katı faz fermentasyonu kullanılmıştır. Katı faz fermentasyon mikroorganizmaların susuz veya suyun az bulunduğu katı ortamlarda fermentasyon yapmasıdır ancak mikroorganizmanın büyümesi ve üremesi için yeterli neme de sahip olması gerekir. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken birkaç nokta vardır; Uygun mikroorganizma ve substrat seçimi, ürün izolasyonu ve saflaştırılması ayrıca üretim için gerekli olan parametrelerin optimizasyonu. Katı faz fermentasyon tekniği tarımsal sanayi atıklarının biyolojik detoksifikasyonu, ekin ve ekin artıklarının besin değerlerinin artırılmasının biyolojik dönüşümü, mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin yıkımı ve enzim, alkoloit, organik asit vb bileşiklerin üretilmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [Pandey, 2003].

2. GENEL VE TEORİK BİLGİLER

2.1. Çay

Çay bitkisi taze sürgünlerin değişik yöntemlerle işlenmesi ile elde edilir. Çay bitkisi botanikte “Angiospermea” çiçek açanlar bölümünden, “Dicotyledonea” sınıfından ve “Camellia” familyasındandır. Çay üretimi tropik ve subtropik iklim koşullarında yapılabilmektedir. Yıllık toplam yağışı 500 mm’ nin üzerinde olan ılıman bölgelerde yetişir. Besin maddelerince zengin, derin, geçirgen ve asidik reaksiyonlu topraklarda yetişebilir. Kalsiyumu sevmez ve pH aralığı 4,5-6,0 olan topraklar çay yetiştiriciliğine uygundur.

Taze çay yapraklarından elde edilen sulu ekstraktın içecek olarak hiçbir hoşâ gider özelliği yoktur. Taze çay ürünü ancak belirli işlemlerden geçtikten sonra içilebilir hale gelmektedir ve çay bu işlemlerin yapılmasına göre siyah çay, yeşil çay gibi sınıflara ayrılır.

Taze yeşil çay yaprakları siyah çaya dönüşürken bir seri kimyasal yapı değişikliğine uğrar. Flavonoid yapılarında değişiklik olur, karotenoidler ve yağ asitleri gibi bazı bileşenler de parçalanarak uçucu aroma maddelerine dönüşürler. Serbest amino asitler de bir taraftan proteinlerin parçalanması ile oluşurken bir taraftan da kompleks oksidasyon ürünlerin yapısına katılırlar. Yeşil çaydan siyah çaya geçişte organik maddeler tamamen yok olmaz aroma bileşenlerine dönüşür. Siyah çayda organik maddeler yanında anorganik maddeler de vardır ve anorganik madde bileşimi Çizelge 2.1.’ de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kuru siyah çayın mineral bileşimi

Bileşen	Miktarı (ppm)	Bileşen	Miktarı (ppm)
Na	19-667	Mn	155-1533
K	9000-14000	Fe	56-333
Mg	1200-3400	Ni	3-15
Ca	1400-10000	Cu	12-70
Sr	12-43	Zn	20-36
B	11-50	Al	200-1100
Si	200-600	N	33000-73000
P	2600-6500	S	800-3700
Se	116	F	3.2-260
Cl	200-1000	Ti, V, Cr, Co, Mo, Cd, Sn, Pb, Bi	<10

Çayda bulunan anorganik maddelerin büyük bir kısmı bitkilerde bulunan esas maddelerdendir. Ancak bazıları bitkinin yaşı ve genetik yapısına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Çay bitkisinde bulunan bu minerallerin çok az bir kısmı demleme sırasında sıvıya geçmektedir [Tüfekçi, 1989].

2.2. Melas

Melas, şeker endüstrisinin bir yan ürünüdür. Şeker pancarı özünden elde edilen sakkarozun kristalize ve santrifüj edilmesinden sonra geriye kalan kısmıdır. Şeker fabrikasyonu teknolojisinde var olan teknik olanaklar ile içinden şeker elde edilemeyen kısımdır. Şeker fabrikalarında şeker pancarından ve şeker kamışından sakkaroz elde edilirken hasat şekli, depolanma şekli ve kullanılan yöntemle bağlı olmak üzere kristallenmeyen kısmın yaklaşık %4 ü melas olarak çıkar.

Melasın yaklaşık olarak %15' i su, %50'si sakkaroz, %35'i sakkaroz dışı maddelerden oluşmaktadır. Melasın bileşimi Çizelge 2.2.' de verilmiştir [Deveci, 2008].

Çizelge 2.2. Şeker pancarı melas bileşimi

Şeker %	Şeker Dışı Maddeler		
	İnorganik Mad. %	Organik Mad. %	Vitaminler µg/kg
Sakkaroz 48-50	Kül 10,09	Toplam N 2,2	İnozitol 5000-8000
Rafinoz 0,8-1,2	Sülfat 11,73	Glutamik Asit 0,53	Biotin 0,04-0,15
Kestoz 0,5-0,8	Potasyum 4,68	Asparagin 0,23	Pantotenik asit
Galaktoz 0,3	Sodyum 0,73	Lösin 0,41	50-110
İndir. Şeker 0,3	Kalsiyum 0,35	Glikokol 0,27	Vitamin B1 1,3
	Magnezyum 0,08	Alanin 0,22	Vitamin B2 0,41
	Demir 0,04	Valin 0,22	Vitamin B3 5,4
	Alüminyum 0,12	Aminobütirikasit 0,26	Folik asit 0,29
	Klor 1,03	Betain 5,5	Niyasin 51
	Sülfit 0,03	Aminoasit 0,6	
	Fosfor 0,06	Laktik asit 1,88	
	Nitrat 0,29	Asetik asit 0,81	
	Nitrat(µg/kg) 50-400	Stearik asit 0,29	
	SO ₂ (µg/kg) 10-2	Formik asit 0,23	
		Butirik asit 0,18	
		Propiyonik asit 0,11	
		Okzalik asit 0,068	

Melastaki sakkaroz dışı maddeler organik ve inorganik maddeler olmak üzere ikiye ayrılabilir.

2.2.1. Organik maddeler

Organik maddeler içinde en önemlisi azotlu maddelerdir. Bunların %20'si amino asit azotu oluşturur. Melastaki asitler arasında en fazla glutamik asit bulunur. Protein yaklaşık %0.6'lık kısmını oluşturur. Bu da toplam azotun %1.6'sını geçmez. Melasta bulunan azotsuz organik maddeler ise pektin, dikarboksilik asitleri (okzalik, malonik, süksinik, glutarik, adipik asitler) ve oksikarboksilik asitleri (glikolik, laktik, malik, tartarik asitler) sayılabilir. Uçucu asitlerden (formik, bütirik, propiyonik asitler) de melasta az miktarda bulunur [Deveci, 2008].

2.2.2. İnorganik maddeler

Bu maddelerin miktarı ve bileşimi toprak ve meteoroloji koşullarına ve pancar çeşidine bağlıdır. Sodyum, potasyum, kalsiyum miktarları mikroorganizma gelişimi için yeterli olmakla beraber magnezyum ve fosfor miktarı yetersizdir [Deveci, 2008].

2.3. Yumurta Kabuğu

Yumurtanın büyüklüğüne göre yumurtanın %7,8-13,6'sını yumurta kabuğu oluşturur. Kabuk mineral ve organik maddeler ile sudan ibarettir. %3-4 oranında protein ağı ve %95-96 oranında birikerek yerleşmiş anorganik tuzlardan oluşmuştur. Yumurta kabuğunun kimyasal bileşimi Çizelge 2.3.' te verilmiştir [Ay ve ark., 2011].

Çizelge 2.3. Yumurta Kabuğunun Kimyasal Bileşimi

	% Bileşim
Kalsiyum Karbonat	93,7
Magnezyum Karbonat	1,0
Kalsiyum Fosfat	1,0
Organik maddeler	3,3
Su	0,1

2.4. Mikroorganizmalar

Tek hücre veya hücre toplulukları şeklindeki mikroskobik canlıları ve hücre yapısında olmayan mikroskobik olan virüsleri içeren büyük ve çeşitlilik gösteren bir gruptur. Mikroorganizmalar, hayvan ve bitki gibi makroorganizma hücrelerinden farklıdırlar. Bitki ve hayvan hücreleri doğada tek başlarına yaşayamazlar, çok hücreli yapıların birer parçası olarak bulunurlar. Ancak mikroorganizmalar büyüme, enerji üretimi ve üreme gibi yaşamsal süreçleri diğer hücrelerden bağımsız olarak yerine getirirler [Madigan ve Martinko, 2010].

Mikroorganizmalardan bazıları; bakteriler, funguslar, algler, protozoalar ve virüslerdir. Mikroorganizmaları hayvanlar ve bitkiler aleminden ayıran özellikleri; boyutları, şekilleri, aktiviteleri, metabolizmalarındaki esneklik, ekolojilerindeki genişlik ve laboratuvarındaki elde edilebilirlikleridir. Mikroorganizmaların boyutları ancak mikrometre (μm) ile ölçülebilmektedir. Bakterilerin çoğu 0,2-2,0 μm çapındadır. Mayalar ve protozoaların büyüklükleri de 10 μm 'nin altındadır.

Gelişmiş bitki ve hayvanlar enzim donanımları bakımından oldukça stabildir, bu nedenle ortam farklılaştığında meydana gelen değişiklikler önemsiz boyutta kalmaktadır. Mikroorganizmalar da ise ortamdaki besin maddelerine uygun enzim salgılayabilme yeteneklerine bağlı olarak gerekli enzimlerin depolanması şart olmamaktadır, bu nedenle metabolik aktiviteleri çok esnektir [Güven ve Zorba, 2011].

Hücreler iç yapılarına göre prokaryot ve ökaryot olarak iki yapısal tipe ayrılmıştır. Ökaryot hücreler prokaryot hücrelerden daha büyük ve yapısal olarak daha komplekstir. Ökaryotik mikroorganizmalara algler, funguslar ve protozoalar dahildir. Tüm çok hücreli bitki ve hayvanlar da ökaryotik hücrelerden oluşmuştur. Ökaryotik hücreleri prokaryotik hücrelerden ayıran en önemli özellik, organel adlı membranla çevrili yapılarının bulunmasıdır. Prokaryotik hücrelerde membran ile çevrili organel bulunmaz ve daha basit bir iç yapısı vardır. Prokaryot mikroorganizmalara ise bakteriler girmektedir [Madigan ve Martinko, 2010].

Mikroorganizmaların gelişmesi canlı materyalin geriye dönüşümü olmayan artışı olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmanın gelişmesiyle yüzlerce küme, yüzbinlerce koloni veya milyarlarca popülasyonun birikimiyle sayı artışı olur. Mikrobiyal gelişme için bazı koşullar gerekir. Başlıcaları; sıcaklık, pH, ozmotik basınç, oksijen ve diğer elementler ve organik maddeler.

Mikroorganizmaların çoğalması eşeyli, eşeysiz olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Eşeysiz çoğalma, tek bir hücrenin kendi başına çoğalmasıdır. Bu nedenle kromozom artışı veya yarılanması söz konusu değildir. Eşeysiz çoğalma; vegetatif ve sporla çoğalma olmak üzere iki grupta incelenir. Vegetatif çoğalma gerek ökaryotlarda gerekse prokaryotlarda yaygın olarak görülür. Çoğalma sırasında yaşlı hücreden yavru hücrenin meydana geliş şekli dikkate alınarak, tomurcuklanma ve bölünme olmak üzere ikiye ayrılır. Sporla çoğalmada ise sporlar cinsel (seksüel) ve cinsel olmayan (aseksüel) olmak üzere ayrılırlar. Cinsel sporlar aynı cinse ait iki farklı bireyin füzyonundan meydana gelirler. Cinsel olmayan sporlar fungusun bireysel olarak mitoz ve takiben hücre bölünmesiyle üretilir. Sporla çoğalmanın en çok rastlandığı mikroorganizmalar misel oluşturan mantarlardır [Güven ve Zorba, 2011].

Ticari ürünleri üretmek veya önemli kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek için mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizmalar, çevremizdeki hemen hemen her yerde bulunmaktadır. Suda, havada ve gıdalarda bulunabilirler. Tükettiğimiz bu gıdaların büyük bir kısmı, mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu üretilir. Örneğin; peynir, tereyağı ve yoğurt mikrobiyal fermentasyon sonucu üretilen süt ürünleridir. Sosisler, salamlar ve sucuklar gibi et ürünleri de mikrobiyal fermentasyon teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Sirke laktik asit bakterileri, alkollü içkiler ise maya kullanılarak fermentasyon işlemleri ile üretilmektedir. Mikroorganizmalar, fermente gıdaların oluşturulmasında önemli olmalarına rağmen, mikroorganizmaların gıdalarda gelişmesi sonucunda gıdalardaki besinler bozularak önemli ekonomik kayıplar da oluşturmaktadır [Madigan ve Martinko, 2010].

2.4.1. Mikroorganizmaların tarihsel gelişimi

Mikroskobik canlıların, gelişmiş canlılardan çok daha önce yeryüzünde var oldukları düşünülmektedir. Varoluşları çok eskiye dayanan mikroskobik canlılar, günümüze kadar ve günümüzde de varlıklarını sürdürürler, gelişmiş canlılar ile de etkileşim içindedirler. İnsanoğlu toplumsal yaşama geçişle birlikte, bilinçli veya bilinçsiz olarak mikroorganizmalarla ilgilenmiştir. Bira, şarap, sirke, turşu vb. fermentasyon ürünleri, yoğurt, peynir vb. süt ürünleri, ekmek vb. hububat ürünleri üretimleri ile bazı besin maddelerinin tuzlanarak veya kurutularak dayanıklı hale getirilmeleri örnek verilebilir. Bunlardan bir bölümünde mikroorganizmalardan yararlanmak bir bölümünde korunmak amaçlanmıştır.

Mikroorganizmalar hakkında ilk bilgiler, Romalı akademisyen Marcus Terentius Varro'nun MÖ 1. yüzyılda yayımlanan 'Tarım Üzerine' adlı kitabında yer almıştır [Loeb, 1993]. Leeuwenhoek, 1675'te mikroskobu kullanarak, çıplak gözle görülmeyecek yaşam biçimleri olduğunu kanıtladı [Leeuwenhoek, 2008]. Leeuwenhoek yağmur suyu, tükürük, toz biberi inceleyerek günümüzde "bakteri ve protozoa" olarak adlandırılan mikroorganizmaları, kendi deyimiyle "hayvancıkları"saptamıştır [Güven ve Zorba, 2011].

Lazzaro Spallanzani mikroorganizmaların sadece hava ile teması olan etsuyunda çoğaldığını keşfetti. Louis Pasteur, Spallanzani'nin bulgularını kaynatılmış et sularının havayla temasını sağlayarak geliştirdi. Pasteur deneyinin başında etsuyunu önceden kaynatarak etsuyu içinde hiç mikroorganizma kalmadığını ortaya koymuştu. Pasteur'ün deneyinde etsularında herhangi bir canlı üremedi. Bu şu anlama geliyordu içinde mikroorganizma üreyen et sularına bu canlılar dışarıdan geliyordu. Böylece Pasteur kendiliğinden oluş teorisini yıktı ve mikrop teorisini ortaya koydu. 1876'da Robert Koch mikropların hastalık yapabileceğini ortaya koydu [O' Brien ve Geodert, 1996]. Koch, sığırların ölümüne neden olan antraks hastalığını kanlarındaki çubuk şekilli bir bakterinin yaptığını bulmuştur. Bakteriyi yapay bir besi yerinde kültüre almış ve sağlıklı hayvanlara enjekte etmiştir. Bu mikroorganizma ile aşılanan hayvanlar da hastalanarak ölmüştür. Koch, bakterilerin besiyerlerinde

çoğaltılabileceğini ve bunların hastalık etmeni olabileceğini belirlemiştir [Güven ve Zorba, 2011].

2.4.2. Mikroorganizmaların hayatımızdaki önemi

Mikroorganizmalar, boyutlarının küçük olması nedeniyle havada, suda ve karada kolayca her yere ulaşabilmekte, çevre koşullarına hemen uyum sağlamakta, kolayca üreyebilmektedir. Mikroorganizmalar değişik faaliyetlerde bulunarak yararlı ve zararlı birçok işlev yapmaktadır. Yeryüzünde madde değişim zincirinde önemli rol oynar, organik maddeleri parçalar, karbon, azot, kükürt, fosfor gibi elementlerin tekrar doğaya dönmesini sağlar. Bunun yanında tıpta ilaç üretiminde, besin maddelerinin elde edilmesinde, kimya sanayinde, yağ, vitamin ve bazı amino asitlerin üretiminde mikroorganizmalardan yararlanılmıştır.

Mikroorganizmaların zararlı yanları da vardır; Hastalık ve infeksiyon nedeni olmaktadır. Meyve, sebze ve diğer besin maddelerinin bozulmasına yol açmaktadır [Güven ve Zorba, 2011].

2.4.3. Mikroorganizmaların biyoteknolojideki önemi

Mikroorganizmaların biyoteknolojideki önemi, insanların kullanabileceği maddeleri üretmelerindendir. Bu maddeler enzim, vitamin, organik asit ve antibiyotiklerdir. Büyük olmayışı nedeniyle mikroorganizmalar, hacimlerine oranla önemli bir yüzeye sahiptir. Böylece besin maddeleri hücre içine, metabolik ürünler ise hücre dışına nakledilir. Mikroorganizmaların biyoteknolojik tercihlerinin en büyük nedeni ise çok çabuk büyüyüp çoğalmalarıdır [Özçelik, 1998].

Biyoteknolojilerindeki son gelişmelerle endüstriyel fungusların önemi de artmaktadır. Günümüzde bilinen yaklaşık 120 000 fungus türünden pek çoğu endüstriyel öneme sahiptir. Örneğin *Aspergillus niger* önemli bir fungusdur; tıpta (vücut sıvılarında) ve içeceklerde glukozun miktarını tespit etmek amacıyla

biyosensör olarak kullanılan glukoz oksidaz enziminin üretiminde kullanılır. [Kona ve ark., 2001].

Enzim teknolojisi; ekonomik etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin, büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında, kullanabilirliği; maliyet bakımından ucuz olmasını, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmasını ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasını gerektirmektedir [Wiseman, 1987].

Yeryüzünde bulunan çok sayıda fungus türü çeşitli kimyasal maddeleri sentezleyebilmekte ve bu yetenekleri uzun yıllardan beri araştırmalara konu olmaktadır. Funguslar çok sayıda ve farklı karbon kaynaklarını kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Fungus kullandığı besin maddelerini; enerjiye, ısıya ve hücre oluşumu için gerekli maddelere çevirir. Üreme için gerekli olan bileşiklere birincil metabolitler, bu olaya da birincil metabolizma denilmektedir. Birincil metabolitlerin birçoğu hücre replikasyonu ve büyümesi için gerekli maddelerdir. Birincil metabolit olan bu maddelere sitrik asit, etanol, glukonik asit, vitamin, aminoasit ve polisakkarit örnek olarak verilebilir. İkincil metabolizma birincil metabolizmaya zıt olarak fungus büyümesi için esas olmayan metabolitlerin üretildiği, büyümenin olmadığı, durduğu fazdır. Literatür bilgilerine göre genelde funguslarda üreme ortamında besin maddelerinin azalması ve dengeli büyümenin sona ermesi sonucunda ikincil metabolizmanın dolayısıyla ikincil metabolitlerin sentezinin başladığı bildirilmiştir. Antibiyotikler, toksinler, alkaloidler, antikanser ilaç ham maddeleri, boyalar, büyüme düzenleyicileri gibi maddeler endüstri ve tarım açısından öneme sahip en iyi bilinen ikincil metabolitlerdir [Wentzel, 1988].

2.5. Funguslar

Ökaryotik canlılar olup, gelişmiş bir çekirdeğe sahiptirler. Bakterilerden bu yönleriyle ayrılırlar. Ayrıca bakterilerden daha büyük hücrelere sahiptirler.

Fotosentetik pigment içermezler bu yüzden parazit veya çürükçül yaşarlar. Eşeyli ve eşeysiz çoğalabilirler. Genel olarak 3 kısımda incelenirler.

Küfler

Besin maddeleri üzerinde beyaz ya da renkli görünümleriyle dikkat çekerler. Çürükçül, parazit ya da simbiyotik olarak yaşarlar. Heterotrofturlar. Yani organik maddeleri enerji kaynağı olarak kullanırlar. Karbon kaynağı olarak genellikle glukoz, sakkaroz ve maltozu seçerler. En çok amonyum azotunu bazı türleri nitrat ve nitrit azotlarını kullanırlar. Küf mantarları aerob olduklarından yüzeyde gelişirler.

Günümüzde pekçok ülkede fermente ürünlerin elde edilmesinde kullanılırlar. Tercih edilmelerinin en büyük nedeni, patojen olmamaları ve toksik madde oluşturmamalarıdır. Buna rağmen insanlar için çok tehlikeli olduğu bilinen bazı küf türleri de vardır. Bunlardan *Aspergillus fumigatus* toksik madde üreten küflere bir örnektir. Küflerin bileşiminde % 15-50 oranında protein bulunur. Nükleik asit oranı % 10 kadardır. Proteinlerin aminoasit yapısı diğer mikroorganizmalara benzer. Doğada çok yaygın olarak bulunan küfler, çok hücreli iplikçikler oluşturarak gelişirler. Yapısında hif adı verilen, tüp şeklinde dallanmış iplikler bulunur. Hifler yaklaşık 2-10 mikrometre genişliğindedir. Bazı hifler bölmeli, bazıları bölmesizdir. Hiflerin uçlarından uzamaları, dallanmaları ve birleşmelerinden oluşmuş ağ şeklindeki yapılarına miselyum adı verilir. Küfler diğer mikroorganizmalara kıyasla, adapte olma özelliği en fazla olan gruptur. Çoğalmaları sporlar yardımıyla olur. Sporlar eşeyli veya eşeysiz olarak oluşabilir.

Büyük bir kısmı 25 °C ile 36 °C’lerde iyi gelişirler. Ancak genel olarak küf miselleri 30 °C’nin üstündeki sıcaklıklara dayanıklı değildir. Küflerden alkol, antibiyotik ve organik asitlerin üretiminde endüstri alanında geniş ölçüde yararlanılmaktadır [Özçelik, 1998].

Küflerin gelişmesine etki eden faktörler nem, sıcaklık, pH, oksijen ve ışık olarak belirtilebilir. Nem; bakteriler ve mayalar kadar olmamakla beraber küflerin de

gelişebilmeleri için öneme sahiptir. Nem oranının % 10-13'ün altına düştüğü ortamlarda üreyemez. Sıcaklık; küflerin gelişmesinde en önemli etkidir. En düşük gelişme sıcaklığı 8 °C olarak verilse de 0 °C gelişen küflerin özellikle buzdolabında saklanan besinlere zarar vermeleri mümkündür. En iyi gelişmeleri 20-30 °C arasında görülür. Bunun için gıdalar oda sıcaklığında saklanmamalıdır. Küflerin gelişmesinde pH da önemli bir etkidir. Örneğin; 1,3 – 9,6 pH'lar arasında faaliyet gösterebilir. Optimum gelişme pH'ları 5 – 6 olan hafif asitli ortamlarda daha iyi gelişir. Küfler aerob mikroorganizmalardır. Bu nedenle, daha çok yüzeyde gelişme gösterir. Küflenmeyi engellemek için gıda maddelerinin hava ile temas etmeyecek şekilde ambalajlanması gerekir. Küflerle yapılan çalışmalarda, bazı cinsler belirli dönemlerin dışında gelişmelerini karanlıkta sürdürür.

Mayalar

Mayalar mantar ailesinin geniş bir bölümünü oluşturur. Doğada çok yaygın olarak bulunan mayaların hücre yapıları büyük oranda proteinler, polisakkaritler, lipidler ve nükleik asitlerden oluşur.

Mayaların üremeleri bölünerek ya da tomurcuklanarak olmaktadır. Bölünerek çoğalan maya hücreleri, hücre ortasından bölünerek bir ara bölme oluşturur ve buradan hücre ikiye ayrılarak aynı büyüklükte iki yavru hücre oluşur. Tomurcuklanarak çoğalan mayalar uygun çevre koşulları bulurlarsa tomurcuklanma ile bir hücreden bir veya daha çok çıkıntı meydana gelir ve bunlar yeni hücreler halinde gelişir. Gelişen bu hücreler daha sonra ana hücreden ayrılır. Tomurcuklanarak çoğalan bir maya hücresi yaklaşık 50-55 defa tomurcuklanarak çoğalabilmektedir.

Maya hücreleri, hücre boyutları, şekilleri ve renkleri bakımından geniş bir dağılım gösterirler. Hücre biçimleri genellikle küresel, elipsoidal, uç kısımları küresel silindirik (limon yapısına benzer) veya oval olabilmektedir. Mayaların hücre çapları bazı türlerde farklılık göstermesine karşın, genellikle 1-10 µm aralığında değişmektedir.

Mayaların gelişebilmeleri ve aktivitelerini devam ettirebilmeleri için bazı ortam şartlarına ve bazı besin maddelerine ihtiyaçları vardır. Mayaların üremelerini etkileyen en önemli ortam şartları, pH, sıcaklık ve havalandırmadır. Mayalar asidik ortamda gelişebilen mikroorganizmalardır. Mayalar için en uygun üreme pH' sı 4-4,5'dur. Ayrıca mayalar, 0-50 °C arasında değişen geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilir. Mayadan mayaya fark etmesine rağmen genellikle hepsi en iyi üremeyi 25-27 °C'de gösterir. Ancak daha düşük ve yüksek sıcaklık maya aktivitesini ve üremesini oldukça yavaşlatır. Mayaların üremesini etkileyen diğer bir etken ise havalandırmadır. Mayalar havalandırmalı ve havasız ortamda üreyebilirler. Ancak havalandırmalı ortamda daha hızlı ürerler. Havasız ortamda ise besin maddesini ürüne (etil alkol) dönüştürürler. Maya büyümesine ortam şartları dışında bazı besin maddeleri de doğrudan etki eder. Heterotrof bir mikroorganizma olan mayaların en önemli ve üremesini kısıtlayan ve kontrol eden besin maddesi karbonhidratlardır. Bu karbonhidrat kaynağı glukoz, sakkaroz, fruktoz, mannoz veya laktoz olabilir. Mayaların üremesini etkileyen diğer bir önemli madde ise azottur. Bunun yanında, potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum gibi maddelere de ihtiyaç duyarlar.

İnsanlık tarihinde ilk kullanılan mikroorganizmalar mayalardır. Günümüze kadar yaklaşık 700 çeşit maya kültürü belirlenmiş olmakla beraber yeni maya kültürlerinin tanımlanmasına da halen devam edilmektedir. Mayalar binlerce yıldır insanlar tarafından değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Mayaların ilk kullanımının Babilliler, Sümerler ve Mısırlılar tarafından bira ve şarap üretiminde ve hamurun mayalanmasında olduğu sanılmaktadır. Modern çağda ise mayalar geleneksel gıda endüstrisinde (ekmek mayası üretimi, çeşitli enzimler, pigmentler, gıda asitlendiricilerin elde edilmesi) kullanımlarının yanısıra, birçok fermentasyon prosesinde (bira, etanol) de kullanılmaktadır.

Mayaların gelecekte yenilenebilir enerji kaynaklarında, çevresel biyoteknolojide ve insan sağlığını ilgilendiren pek çok biyolojik gelişmede daha geniş uygulama alanı bulacağı beklenmektedir. İlaç endüstrisinde aşı üretimi ve özellikle insan tedavi amaçlı proteinlerin, hormonların ve kan faktörlerinin üretiminde de mayalar kullanılmaktadır [Çetin, 1983].

Şapkalı mantarlar

Fungusların bu grubu üzerinde şapka şeklinde bir yapıya sahiptir. Beslenmede tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Şapkalı mantarın ticari üretimine daha 16. yüzyılda başlanmıştır. Bugün yeryüzünde bilinen mantar türlerinin ancak 25'i beslenmede kullanılır. Bu mantarlar gıda olarak yüksek potansiyele sahiptir. Özellikle protein bakımından zengindir. Besin olarak kullanımlarının dışında bazı ilaçların yapımında da kullanılırlar [Beyatlı, 1996].

2.6. Enzimler

Reaksiyon hızını artıran bileşiklere katalizör denir. Enzimler canlı organizmalarda meydana gelen, protein yapısında ve biyokimyasal reaksiyon sırasında tüketilmeyen katalizörlerdir. Organizmadaki çeşitli moleküllerin yapımını, yıkımını ve yeniden düzenlenmesini sağlayan reaksiyonları hızlandırarak; organizmaların fonksiyonlarını ve canlılığını sürdürmesi için gerekli enerji ve maddeleri sağlarlar. Enzimler olmasaydı bu reaksiyonlar çok yavaş meydana gelirdi [Bohager, 2006]. Enzimler enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyon arasında substratları seçici olarak belirli bir reaksiyona kanalize ederler. Böylece enzimler bütün metabolik olayları yönlendirirler.

Enzimleri biyolojik sistemlerdeki reaksiyonları, canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan “biyokatalizörler” olarak da tanımlayabiliriz. Bununla birlikte; yeterli koşullar sağlandığında etkilerini canlı organizma dışında da gösterebilmeleri, enzimlerden doğal ortamlarının dışında pek çok alanda yararlanabilme imkânını ortaya çıkarmaktadır [Chanp ve ark., 1997].

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni: mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması ve maliyetlerinin az olması, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil;

mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bu gün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenlidir.

2.6.1. Enzimlerin yapısı

Enzimlerin protein kısmına “apoenzim” denir. Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısmı doğrudan doğruya proteinin polipeptid zinciridir. Birçok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için proteinden başka metal iyonuna, bazılarının protein olmayan bir organik bileşiğe, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak “kofaktör” adı verilir. Kofaktör organik bir bileşik ise buna koenzim denir. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile kovalent bağla bağlı ve ayrılmıyorsa “prostetik grup” adını alır. Koenzimi ile birleşik halde bulunan apoenzim-koenzim bütününe “holoenzim” adı verilir. Yani holoenzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif durumdadır. Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyon aynı olan enzimlere “izoenzim” veya “izozim” adı verilmektedir. Enzimin özgül olarak etki ettiği maddeye veya madde karışımına bu “enzimin substratı” denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise “ürün” adı verilir [Whitaker, 1994].

2.6.2. Enzimlerin isimlendirilmesi

Her enzime iki isim verilmiştir. Birincisi, günlük kullanım için olan kısa, yaygın isimdir. İkincisi, enzimin detaylı olarak tanımlanması gerektiğinde kullanılan daha kapsamlı sistematik isimdir. Sistematik isim Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilmiştir. IUBMB isimleri net ve bilgi vericidir fakat genel kullanım için oldukça zordur. Yaygın isim oluşturulurken ya substratın adına örneğin, “glukozidaz”, “üreaz”, “sukraz” yada tepkimenin adına örneğin, “laktat dehidrojenaz”, “adenilat siklaz” gibi “az” eki eklenmiştir. Enzimler etkili olduğu substratın sonuna – litik eki getirilerek de isimlendirilirler. Örneğin proteinleri parçalayan enzimlere “proteazlar” denildiği gibi “proteolitik enzimler” de denilir [Chanp ve ark., 1997].

2.6.3. Enzimlerin sınıflandırılması

IUBMB, enzimleri katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayırır. Bu sınıflarda yer alan her enzim, EC olarak kısaltılmış ve dört rakamdan oluşan kod numarası ile karakterize edilmiştir. EC numarasının kapsadığı dört rakamdan ilki enzimin altı ana sınıftan hangisi içinde olduğunu, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam alt - alt sınıfı ve dördüncü rakam ise o enzimin bulunduğu sınıftaki seri numarasını ifade eder. Üçüncü rakam o alt sınıfa ait özellikleri belirtir. Örneğin, oksidoredüktazlarda elektron verici grubu transferazlarda transfer edilen grubun özelliğini (metil transferi, hidroksimetil transferi gibi) belirtir.

Enzimlerin altı ana sınıfı kısaca şöyledir.

1. Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizlerler. Sistemik ismin oluşturulmasında “donör: akseptör oksidoredüktaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
2. Transferazlar: Metil, açıl, amino, glikozil yada fosfat gibi spesifik bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir. Sistemik ismin oluşturulmasında “donör: akseptör gruptransferaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
3. Hidrolazlar: C-O, C-N, C-C gibi bağların hidrolitik yıkımını katalizler. Sistemik ismin oluşturulmasında “substrat gruphidrolaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi bağların eliminasyon yoluyla yıkımını katalizler. Sistemik ismin oluşturulmasında “substrat grupliyaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
5. İzomerazlar: İzomerazlar bir molekül içindeki geometrik yada yapısal yeniden düzenlenmeyi katalizlerler. Sistemik ismin oluşturulmasında “substrat grupizomeraz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
6. Ligazlar: Ligazlar ATP yada diğer bir nükleozit trifosfat yapısındaki bir pirofosfat bağının hidrolizi yardımıyla iki molekülü birbirine bağlayarak sentez gerçekleştiren enzimlerdir. Sistemik ismin oluşturulmasında “X:Y ligaz (Z)” (Z) tepkime sırasında trifosfattan oluşan ürünü göstermektedir [Whitaker, 1994].

2.6.4. Enzimlerin özgüllüğü

Enzimlerden ancak pek azı, belirli bir substrat için özgüldür. Bazı enzimler sadece bir tek substrata etki edebilirler. Örneğin, üreaz sadece üreye, karbonik anhidraz karbonik aside ve fumaraz yalnız fumarik aside etki eder. Enzimlerin bazıları ise stereoözellük gösterirler. Yani stereoizomerleri tek bir enantiyomerine etki ederler. Örneğin, arginaz sadece L-arginini hidroliz eder, D izomerine etki etmez.

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir cep ya da boşluk bulunur. Aktif bölge substratın yapısına uygun olan üç boyutlu bir hacim oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge, substratı bağlayarak bir enzim substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES sonradan enzim ve ürüne parçalanan (EÜ)' ye dönüşür [Telefoncu ve Dinçkaya, 1997].

2.6.5. Enzim araştırmalarının tarihçesi

İlk defa 1833 lerde Payen ve Persoz, alkol kullanmak suretiyle malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi ayırt ettiler ve buna “Diastaz” adını verdiler. 1836 yılında Schwan mide suyundan “Pepsini” elde etti. Kristal halde bulunan ilk enzim olan “Üreaz” ancak 1926 yılında Summer tarafından izole edildi.

Enzim terimi ilk defa 1878 yılında Kühne tarafından fermente yerine kullanılmış bir terim olup orijini Yunanca “Maya” kelimesinden almaktadır. Mayalanma bir sıra enzimatik faaliyetler sonucunda oluşmaktadır. Mayalanma sırasında sentezlenen enzimlerin cins ve derişimleri bunları yapan mikroorganizmaların genetik yapılarına bağlıdır [Bingöl, 1997].

2.6.6. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları

Enzimler binlerce yıldır bilinçsizce de olsa insanlar tarafından peynir, yoğurt, bira, şarap gibi ürünlerin yapımında ve ilaç olarak kullanılmıştır. Günümüzde enzimler çeşitli endüstri dallarında kullanılmaktadır. Bugün bildiğimiz enzim endüstrisi,

özellikle son 40 yılda; modern biyoteknolojinin ilerlemesiyle birlikte görülen hızlı gelişmenin bir sonucudur. Biyokatalizörler atık gıda ve kimya endüstrisinde, ilaç hammaddelerinin sentezinde başarıyla kullanılmaktadır [Zhao ve ark., 2002]. Çizelge 2.4. enzimlerin endüstriyel uygulamalardaki dağılımlarını göstermektedir.

Proteazlar deterjan ve süt endüstrisindeki geniş kullanım alanına sahiptirler. Çeşitli karbohidrazlar, amilazlar ve selülozlar nişasta, tekstil, deterjan ve fırıncılık endüstrilerinde kullanılan ikinci büyük enzim grubudur. Dünya çapında tüketilen endüstriyel enzimlerin değeri 2000 yılında 1,5 milyar dolara ulaşmıştır [Kirk ve ark., 2002].

Enzimler kiral ve pozisyonel seçicilikleri sayesinde mükemmel spesifikliğe sahiptirler; enantiyoselektif ve rejyoselektif organik sentezlerdeki bezdirici bloke ve debloke etme basamaklarına gerek kalmadan tepkimeleri katalizleyebilirler. Ayrıca enzimler, yaygın kimyasal katalizörlerden çevre dostu olmaları nedeniyle avantajlıdırlar [Schmid ve ark., 2001].

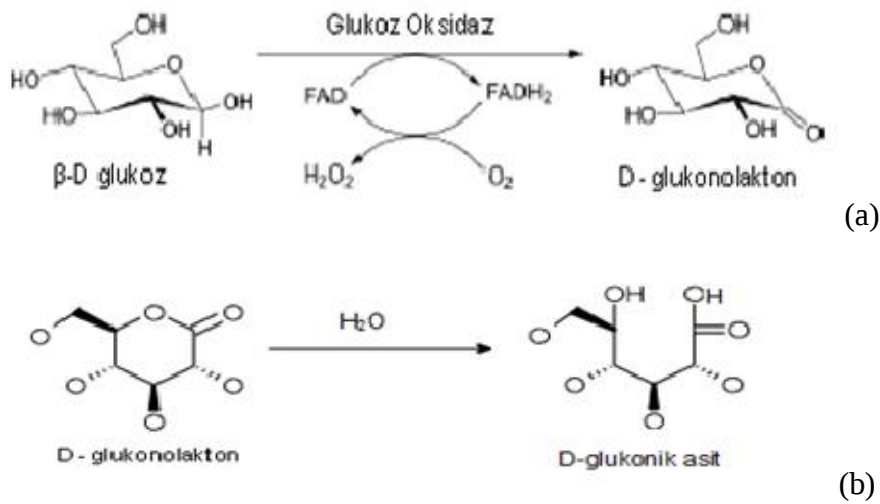
Çizelge 2.4. Enzimlerin endüstriyel alandaki uygulamaları

Endüstri	Enzim sınıfı	Uygulama
Deterjan	Proteaz	Protein lekesi çıkarma
	Amilaz	Nişasta lekesi çıkarma
	Lipaz	Yağ lekesi çıkarma
	Selulaz	Temizleme, renk berraklaştırma
	Mannanaz	Mannan lekesi çıkarma
Nişasta ve yakıt	Amilaz	Nişasta çözünürleştirme ve sakkarifikasyon
	Amiloglukosidaz	Sakkarifikasyon
	Pullulanaz	Sakkarifikasyon
	Glukoz izomeraz	Glukozu fruktoza dönüştürmek
	Siklodekstrin-glikozil transferaz	Siklodekstrin üretimi
	Ksilenaz	Vizkozite düşürme
Gıda ve süt endüstrisi	Proteaz	Maya beslenmesi
	Proteaz	Süt pıhtılaştırma, yeni doğan formülleri, aroma
	Lipaz	Peynir aroması
	Laktaz	Laktöz giderme
	Pektin metil esteraz	Meyve bazlı ürünler oluşturma
	Pektinaz	Meyve bazlı ürünler
	Trans glutaminaz	Modifiye visko-elastik özellikler
Fırıncılık	Amilaz	Ekmek yumuşatma ve hacim, un ayarlama
	Ksilenaz	Hamur şartlandırıcı
	Lipaz	Hamur stabilitesi ve şartlandırılması
	Fosfolipaz	Hamur stabilitesi ve şartlandırılması
	Glukoz oksidaz	Hamur güçlendirilmesi
	Lipoksijenaz	Hamur güçlendirilmesi ve ekmek beyazlatma
	Proteaz	Bisküviler, kurabiyeler
	Transglutaminaz	Katlı hamurların güçlendirilmesi
Hayvan yemi	fitaz	Fitat sindirimi, fosfor salınması
	Ksilenaz	Sindirilebilirlik
	B-glukanaz	Sindirilebilirlik
İçecek	Pektinaz	Pektin giderimi, püreleştirme
	Amilaz	Meyve suyu sağaltma, düşük kalorili bira
	B-glukanaz	Püre
	Asetolaktat dekarbosilaz	Bira olgunlaştırma
	Lakkaz	Berraklaştırma, aroma
Tekstil	Selulaz	Denim bitirme, pamuk yumuşatma
	Amilaz	Büyüme giderme
	Pektat liyaz	Temizlik
	Katalaz	Beyazlatma bitirme
	Lakkaz	Beyazlatma
	Peroksidaz	Aşırı boya çıkarma
Kağıt hamuru ve kağıt	Lipaz	Safsızlık kontrolü
	Proteaz	Biyofilm çıkarma
	Amilaz	Nişasta kaplama, mürekkep çıkarma
	Ksilenaz	Beyazlık artırma
	Selulaz	Mürekkep çıkarma, fiber modifikasyon
	Lipaz	Transesterifikasyon
Katı ve sıvı yağlar	Lipaz	Sakızlaşma giderici, liso-lesitin
	Fosfolipaz	Sakızlaşma giderici, liso-lesitin
Organik sentez	Lipaz	Kiral alkollerin ve amidlerin çözünmesi
	Açilaz	Yarısentetik penisilinlerin sentezi
	Nitrilaz	Enantiyosaf karboksilik asitlerin sentezi
Dericilik	Proteaz	Darbeleme
	Lipaz	De- pikle işleminde
Kişisel bakım	Amiloglukozidaz	Antimikrobiyal
	Glukoz oksidaz	Beyazlatma, antimikrobiyal
	Peroksidaz	Antimikrobiyal

2.7. Glukoz Oksidaz (GOD)

Glukoz oksidaz çoğunlukla *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri tarafından salgılanan bir enzimdir [Clark ve ark., 2006]. Büyük oranda bu fungusların etrafını çevreleyen hücre dışı sıvıda ve müsilaj tabakası içinde, bir kısmı da hücre duvarında bulunur [Miron ve ark., 2002]. Katalizledikleri reaksiyonlar aynı olsa da farklı kaynaklardan elde edilen enzimler farklı kimyasal özellikler gösterirler.

Glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4 β -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturduğu reaksiyonu katalizler. Lakton ve hidrojen peroksit aynı zamanda oluşur ve laktonun sulu ortamda katalizlenmesinden glukonik asit oluşurken hidrojen peroksitin katalizlenmesinden su ve oksijen oluşur. Ancak hidrojen peroksitin ve glukonik asitin ortamda fazla birikmesi enzim aktivitesini düşürür. Glukozun glukonik asit ve hidrojen peroksite oksidasyonu eş zamanlı gerçekleşir ve bu reaksiyonlar Şekil 2.1.' de verilmiştir [Wong ve ark., 2008].



Şekil 2.1. Glukozdan glukonik asitin oluşmasının enzimatik mekanizması [Wolhfart ve ark., 2005].

a) D-glukozdan D-glukonolakton oluşumu

b) D-glukonolaktonun su varlığında glukonik asite hidrolizi

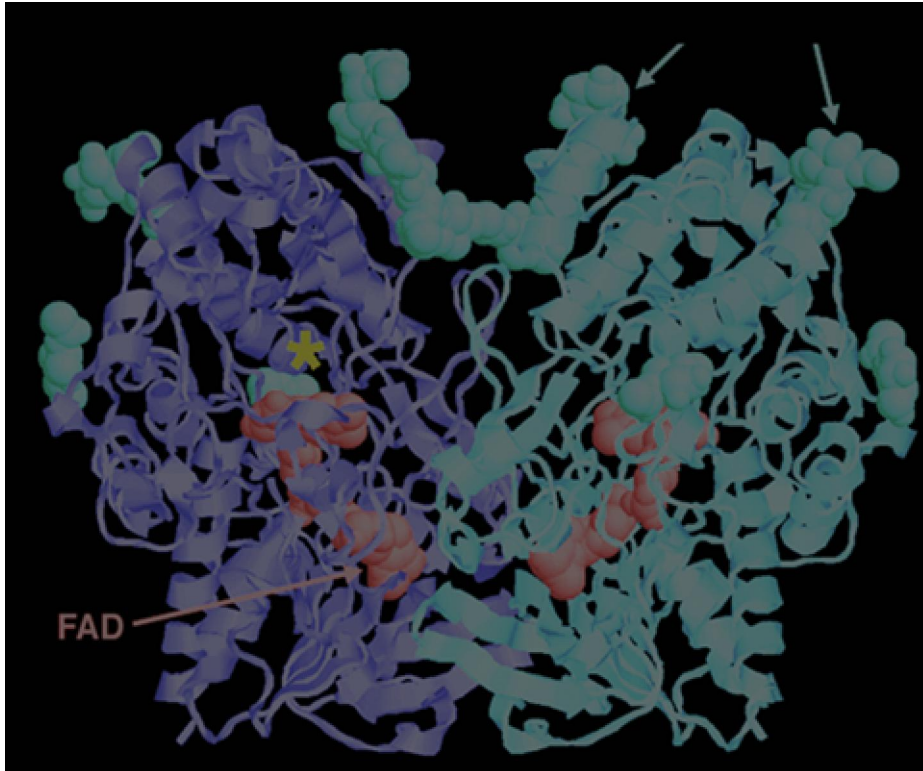
2.7.1. Aktif merkez

Glukoz oksidaz iki özdeş alt birimden oluşan (MA 160 kDa) dimerik yapıya sahip bir proteindir. Monomerler tuz köprüleri ve hidrojen bağlarıyla birleşirler. Her monomer 583 amino asit kalıntısından oluşan tek polipeptid zincirine sahiptir. Monomerler kendi içlerinde katlanarak iki bölge oluştururlar. Bölgenin birine substrat (β -D-Glukoz) bağlanırken diğer bölgeye güçlü bir yükseltgeyici ajan olarak flavin adenin dinükleotid koenzimi sıkıca bağlıdır [Haouz ve ark., 2001]. Her monomer bir mol demir içerir. Katalitik reaksiyonun merkezi FAD' ın izoalloksazin halkasının N5 pozisyonudur. Bu reaksiyon merkezini örtecek kadar yakında yalnız üç amino asit yan zinciri vardır. Glutamik asit yan zinciri Glu412 ve iki Histidin kalıntısının yan zincirleri His516 ve His559 bulunur, Resim 2.1.' de gösterilmiştir.

Glukoz oksidaz, genelde kütesinin yaklaşık % 16' sını oluşturan ve büyük oranda mannoz içeren bir karbonhidrat birimi ile birlikte bulunan, bir glukoproteindir. Karbonhidrat N yada O-glikozit olarak proteine bağlanır [Wolhfart ve ark., 2005]. Resim 2.2.'de Glukoz oksidazın yapısı görülmektedir.



Resim 2.1. Glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD'ın pozisyonu



Resim 2.2. Glukoz oksidazın protein yapısı "*" ile gösterilen kısım aktif merkezdır.

2.7.2. Glukoz Oksidaz'ı saklama koşulları

Kristal halde bulunan GOD karalıdır. 0 °C de 2 yıl -15 °C de 8 yıl durabilir. Çözünmüş halde bulunan GOD'nin kararlılığı pH ya bağlıdır, pH 5,0'te çoğunlukla kararlıdır. pH 2,0'nin altında ve pH 8,0'in üzerinde katalitik aktivitesini kaybeder. GOD 40 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda da aktivitesini kaybeder, bu termal denaturasyon GOD gliserol içinde saklanarak engellenebilir [Wilson ve Turner, 1992].

2.7.3. Glukoz Oksidaz'ın inhibitörleri

Ag, Pb, Hg gibi ağır metaller GOD inhibe ederler. Ayrıca hidrazin, hidroksilamin ve fenilhidrazinin milimolar miktarları bu enzimi kısmi olarak inhibe eder. Örneğin 10 mM konsantrasyondaki hidroksikinolin %11, sodyum nitrat %13, semikarbazit %20 oranında inhibisyon gösterir. 2-deoksi-d-glukoz yarışmalı inhibitör olarak davranır. Halojen iyonları düşük pH ta inhibisyon gösterir örneğin, 0,1 M KCl pH 3 te enzimi tamamiyle inhibe eder. enzim [Wilson ve Turner, 1992].

2.7.4. Glukoz Oksidaz'ın kullanım alanları

GOD enzimi glukozun glukonik asite ve hidrojen peroksite oksitlenmesini katalizlemektedir. Tıpta vücut sıvılarında (kan, üre vb.) bulunan glukozun nicel tayini için kullanılan biyosensör immobilize edilmiş Glukoz Oksidaz enzimi içerir. Gıda sanayinde ise GOD glukozu glukonik aside ve hidrojen peroksite oksitlediği için genellikle şekerli içeceklerin raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılır. GOD, sıvı veya toz halinde gıda ürünlerine eklenmektedir. Oluşan glukonik asit ve hidrojen peroksit anti fungal ve anti bakteriyel özelliğinden dolayı gıdanın bozulmasını engellemektedir [Lu ve ark., 1996].

GOD fırıncılık endüstrisinde çok kullanılan bir enzimdir. Süne (insektisit) zararı görmüş buğday unlarının gluten yapısı bozulur. Gluten yapısı bozulmuş düşük kaliteli buğday unları, ekmek yapımında kullanılamazlar. GOD oluşturduğu hidrojen

peroksit sayesinde glutenin çapraz bağlarının onarımı ile buğday ununun kalitesini arttırmaktadır [Şahin ve ark., 2007].

Kuru yumurta tozu hazırlamak amacıyla da GOD kullanılmaktadır. Enzim olmadan yapılan kavurma işlemlerinde protein ve amino asitlerin amino grupları ve şekerler bozunur ve hoşla gitmeyen bir kahverengileşme oluşur. Bu yüzden bu işlem sırasında da GOD kullanılır.

Oksijen birçok gıda için problem oluşturur örneğin yüksek yağ içeren gıdalardan mayonez ortamda oksijenin olması ile çok çabuk bozulur. GOD'nin varlığında oksijeni enzim kullanır ve glukonik asit oluşturur [Wong ve ark., 2008].

2.8. Fermentasyon

Mikroorganizmalar aerobik veya anaerobik koşullarda gelişirler. Bu bir tepkimeler zinciridir ve glukozun pirüvik aside parçalanmasından sonra fermentasyon (mayalanma) veya solunuma uğraması sonucu oluşmaktadır. Solunum, kimyasal bileşiklerin okside edildiği ve son elektron alıcısının daima bir inorganik molekül olduğu ATP-oluşum prosesidir. Oksijen varlığında son elektron alıcısı oksijendir (aerobik solunum). Fermentasyon (mayalanma) anaerobik koşullarda, glukozun pirüvik aside parçalanması ve son elektron alıcısı olarak organik molekülün sentezlenmesidir. Fermentasyonda; şeker veya amino asitler, organik asitler, pürinler ve primidinler gibi moleküller enerji kaynağı olarak kullanılır [Güven ve Zorba, 2011].

2.8.1. Fermentasyon teknikleri

Fermentasyon yolu ile ürün elde etmede kullanılan metotlar iki grupta toplanabilir.

Yüzeysel veya üst fermentasyon metodu

Bu metoda göre mikroorganizmalar yarı katı veya katı substratın yüzeyinde gelişir ve yüzeyde mikroorganizma hücreleri ve bunların metabolitlerinden oluşan bir tabaka

ortaya çıkar. Metabolitlerin besi ortamına difüzlenmesi de mümkündür. Besi ortamı sıvı, yarı katı veya katı olabilir. Yüzey alanı arttıkça havadan oksijen sağlanması daha kolay olur ve ürün oluşumu artar. Bu amaçla genellikle mikroorganizmanın fungus türleri kullanılır. Zira funguslar zaten yüzeyde kolaylıkla ürerler. Yüzeysel fermentasyon metodu ile; Aşı hazırlanması, antibiyotik üretimi, bazı enzimlerin üretimi, atık suların arıtılması yapılmaktadır.

Bu fermentasyonda suda çözünmeyen, hem fiziksel destek hem de besin kaynağı olarak hizmet eden katı materyal besin kaynağı olarak kullanılırsa katı hal fermentasyonu adını alır. Katı materyal olarak çeşitli tahılların kepeği, şeker kamışı küspesi, meyve püresi , zeytin küspesi gibi çeşitli atık maddeler kullanılır. Böylece atıkların değerlendirilmesi de sağlanmış olur.

Katı hal fermentasyonunun bazı avantajları vardır; Kompleks makine ve ekipman gerektirmez, fermentasyon ortamı az suya ihtiyaç duyar, doğrudan sporlar kullanılabilir ve çok miktarda ürün elde edilebilir [Pandey, 2003].

Derin (veya Batık) fermentasyon metodu

Bu yöntemde mikroorganizmalar besin çözeltisinin içinde gelişir (Batık kültür) Bu tip fermentasyon 3 şekilde uygulanır;

- Kesikli(Batch)
- Yarı Kesikli (Semi Batch)
- Sürekli (Continuous)

Kesikli Fermentasyon: Tank substrat ile doldurulur, organizma ile aşılır ve fermentasyona tabii tutulur. Ürün işlem bittikten sonra fermentörden çıkarılır.

Yarı Kesikli Fermentasyon: Fermentasyondan sonra biyoreaktör tamamen boşaltılmaz, bir kısım materyal tankda bırakılır (aşılama kültürü) ve bunun üzeri yeni substrat ile doldurulur

Sürekli Fermentasyon: Bu sistemde sisteme bir taraftan substrat verilir bir taraftan da ürün alınır. Bu sistemde substrat, mikroorganizmanın (logaritmik fazının) çoğalma fazının sona erdiği anda tanka verilirken ve aynı miktar ürün alınır. Bu yöntemle THP (tek hücre proteini) ve ekmek mayası üretimi, atık suların arıtılması gibi işlemler yapılmaktadır.

2.9. Kaynak Araştırması

Aspergillus ilk olarak 1729'da İtalyan rahip ve biyolog Pietro Antonio Michelli tarafından bulunmuştur. Daha sonra mantarın şekli Pietro'ya ayinlerde kutsal su serpmeye yarayan aspergillumu (Resim 2.3) hatırlattığı için *Aspergillus* ismini vermiştir [Rypien, 2008].



Resim 2.3. Aspergillum

Aspergillus türleri şekeri kullanarak TCA çevrimi ara ürünleri olan endüstriyel asitlerin üretiminde (sitrik asit, α -keto glutarik asit, süksinik asit, fumarik asit, malik asit, oksaloasetik asit) üretimi için önemli bir fermentasyon aracıdır. Yapılan çalışmalarda farklı teknikler kullanılarak *A. niger* fungusunun strese girmeden gelişmesi ve çeşitli endüstriyel maddelerin üretilmesi için optimum koşullar belirlenmiştir. Ayrıca üretilen bu maddelerin ortamdan alınması, saflaştırılması ve karakterizasyonu için sistemler kurulmuştur [Baker, 2006].

Lu ve arkadaşları 1996'da Na- Glukonat, Potasyum-Glukonat, Magnezyum-Glukonat üretimi sonrası atık *A. niger* misellerini glukoz oksidaz enzim üretimi için kullanmışlardır. Ayrıca, enzim üretimine metal iyonlarının etkisini incelemişlerdir.. Düşük tuz konsantrasyonlarında, metal klorürler ve metal glukonatların GOD aktivitesini olumlu etkilediğini gözlemişlerdir [Lu ve ark., 1996].

Nakao ve arkadaşları 1997’ de çok ince paladyum tozunu, hidrojen peroksitin inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için glukoz oksidaz ile birlikte alginat jellerde immobilize etmişlerdir ve değişik reaktör tipleriyle denemeler yapmışlardır [Nakao ve ark., 1997].

Singh ve arkadaşları 2003’te mikroorganizmanın gelişme ortamını değiştirerek denemeler yapmıştır. Daldırılmış hal fermentasyonu, yarı katı hal fermentasyonu, yüzey fermentasyonu tekniklerini uygulamışlar ve glukonik asit üretimini sağlamışlardır. En yüksek glukonik asit verimi katı hal fermentasyonu altında gerçekleşmiştir [Singh ve ark., 2003].

Betancor ve arkadaşları 2006’da yaptıkları çalışmada glutaraldehit ile aktive edilmiş değişik desteklere enzimi immobilize etmişlerdir. İmmobilize işlemini farklı materyaller ile gerçekleştirmişler ve en iyi GOD aktivitesini belirlemişlerdir. [Betancor ve ark., 2006].

Jafari ve arkadaşları 2007’de, *Aspergillus niger* fungusunu kullanarak GOD üretiminde; ortam bileşiminin, çalkalama ve havalandırma hızının etkisini incelemişlerdir. Çalkalama hızını 300 rpm ve çözünmüş oksijen hızını ise 2 vvm olarak bulmuşlardır [Jafari ve ark., 2007].

Ramachandran ve arkadaşları 2008’de yaptığı çalışmada glukonik asit üretiminde kullanılan *A.Niger* sporlarının gelişim ve inhibisyonu üzerine sodyum azid ve sitralin etkisini araştırmışlardır [Ramachandran ve ark., 2008].

Miron ve arkadaşları 2010’da yaptıkları çalışmada poliüretan sünger maddesini destek maddesi olarak kullanmışlardır ve midye işleme tesisinin atık sularını besin ortamı olarak kullanarak katı ortam fermentasyonu ile glukoz oksidaz üretmişlerdir [Miron ve ark., 2010].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Bu çalışmada Patates Dekstroz Agar (Merck), $MgSO_4$, $CaCO_3$, $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4 , MnO_2 , Glukoz, Sodyum Sitrat (Sigma); Etanol, Asetik Asit ve Hidroklorik Asit (Carlo Erba) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan çay posası; demlenmiş çaydan süzöldü, saf su ile birkaç kez yıkandı, sonra 100 °C de bir gece etövide bekletilerek kullanıldı. Yumurta kabuğu olarak haşlanmış yumurta kabuğu kullanıldı; kabuk kaynatıldı, havanda döväldü ve kullanıldı. Şeker fabrikasından temin edilen melas doğrudan kullanıldı.

3.2. Mikroorganizma

Bu çalışmada *Aspergillus niger* fungusunun farklı suşları kullanıldı. NRRL 3 nolu suş ‘Northern Regional Research Laboratory, Department of Agriculture Peoria, Illinois, U.S.A.’dan getirtildi. Ayrıca Ankara Üniversitesinden temin edilen ve sitrik asit üretiminde kullanılan NRRL 2270 nolu suş, Hollanda’dan getirtilen glukoz oksidaz üretiminde kullanılan CBS 513.88 nolu suş da çalışmamızda kullanıldı. Bu suşlar PDA ya ekildi ve en iyi üretim yapan suş araştırmamız için seçildi.

3.3. *Aspergillus Niger* Fungusunun Spor Sayım Yöntemi

Petri üzerinde PDA da çoğaltılan, *Aspergillus niger* fungusunun sporları 20 mL steril fizyolojik sıvı ile alındı. Bu sıvı % 0,1 (m/v) NaCl ve % 0,2 (v/v) Tween 80 içermektedir. Bu spor çözeltisi uygun oranda steril su ile seyreltildi ve Thoma lamı üzerinde mikroskop altında spor sayımı yapıldı. Thoma lamının esası, 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmasıdır. 0,1 mm³ hacim içindeki 16 büyük kareden okunan spor sayılarının ortalamaları alınarak aşağıdaki Eşitlik 3.1 ile spor sayısı hesaplandı [Gürgün ve Halkman, 1990].

$$SS= A \times SF \times 10000 \quad (3.1)$$

Eşitlikteki,

SS: Sayım sonucu

A: 16 büyük kareden sayılan spor sayısı

SF: Seyreltme faktörü

10000: 0,1 mm³ deki sayım sonucundan 1 mL deki sayım sonucuna geçmek için kullanılan sabit sayı

Yaptığımız tüm çalışmalarda bu yöntemle elde ettiğimiz süspansiyon (7,5 x10⁸ spor/mL) kullanıldı.

3.4. *Aspergillus Niger* Fungusunun Çoğaltılması

Aspergillus niger fungusunun çoğaltılmasında, Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanıldı. Katı besi ortamı hazırlanırken 9,75 g PDA 250 mL' ye seyreltildi. Bu çözelti, otoklavda 121°C'de 1,2 atm basınç altında 15 dakika süreyle steril edildi. Hazırlanan çözelti UV kabini içerisinde steril petri kaplarına dökülerek soğumaya bırakıldı. Soğutulan besi ortamlarına, spor ekimi yapıldı. Ekim yapılan petriler 30 °C'de 7 gün süreyle inkübatörde bekletilerek mikroorganizma üretimi yapıldı. Üretilen sporlar kullanıma kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı. Sporların aktifliklerini kaybetmemesi için ayda bir kez üretim yenilendi.

3.5. Üretim Ortamının Hazırlanması ve Glukoz Oksidaz Üretimi

Çizelge 3.1.'de Glukoz oksidaz üretimi için kullanılan katı besi ortamının bileşimi verilmiştir [Sharma, 2007]. Hazırlanan besi ortamı 121°C'de 1,2 atm basınç altında 15 dakika süreyle steril edildi. Besi ortamından ayrı olarak steril edilen CaCO₃ ise mikrobiyal ekimden önce besi ortamına eklendi ve manyetik karıştırıcı ile homojen olarak karıştırıldı. Hazırlanan bu ortam steril petri kaplarına eşit miktarlarda dağıtıldı.

Bölüm 3.4.'te hazırlanan petrilerin yüzeyinde üreyen sporlar, % 0,1 (m/v) NaCl ve

% 0,2 (v/v) Tween 80 içeren 20 mL steril suya aseptik koşullarda alındı. Petrilerdeki katı besi ortamına 0,6 mL eklendi ve drigalski spatülü ile sporların homojen dağılımı sağlandı. Glukoz Oksidaz üretimi, 30 °C sıcaklıkta 48, 72, 96 ve 120 saatlik inkübasyon sonrasında intraselüler ve ekstraselüler olarak ölçüldü.

Çizelge 3.1. Glukoz oksidaz üretiminde kullanılan katı besi ortamı

Madde	Derişim
Çay	20 mg/100mL
Melas	20 mg/100mL
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,75mg/100 mL
KH ₂ PO ₄	0,05 mg/100 mL
MgSO ₄	0,01 mg/100 mL
CaCO ₃	4,0 mg/100 mL

3.6. Glukoz Oksidaz'ın Ortamdan İzolasyonu

Üretim süresinin sonunda üretim ortamı tamamen 250 mL lik erlene alındı ve üzerine pH 5,4 olan 30 mL asetat tamponu eklenerek 30 dk oda koşullarında çalkalamalı su banyosunda çalkalandı. Ekstraselüler (hücre dışı) enzimin besin ortamından sıvı ortama geçmesi sağlandıktan sonra whatman no:4 süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntü spektrofotometrede analiz için hazırlandı.

Süzgeç kağıdında kalan katı kısım ise intraselüler (hücre içi) enzim tayini için alındı ve tartıldı. Her bir gram için 1 mL pH 5,4 olan asetat tamponu eklendi. Homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra hücre patlatmasını sağlamak için Resim 3.1.'de görülen sonikatör cihazı kullanıldı (sonics&Materials MC). Bu işlem sonikatörün ısınmaması ve enzim aktivitesini inhibe etmemesi için ortam buz banyosu yardımıyla soğutularak ve 1 dk süreler ile 6 kez gerçekleştirildi. Enzimin sıvı ortama geçme işleminin tamamlanabilmesi için +4 °C'de 1 gece buz dolabında

bekletildi. Daha sonra soğutmalı santrifüj (Sigma 2-15KC) kullanılarak $+2^{\circ}\text{C}$ 'de ve 15000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım alındı ve enzim tayini için hazırlandı.



Resim 3.1. *A.niger* fungusunun hücresinin patlatılmasında kullanılan düzenek

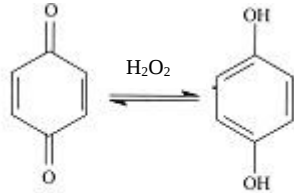
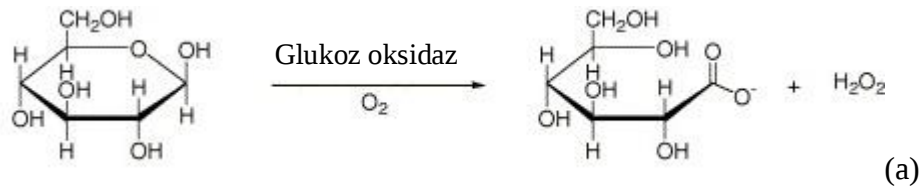
Hücre içi ve hücre dışı enzim çalışmaları sırasında alınan sıvı kısımlar 1:4 oranında EtOH ile muamele edildi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece buz dolabında bekletilerek enzimin denatüre olması ve çökmesi sağlandı. Bu karışım $+2^{\circ}\text{C}$ ' de 15000 rpm de 30 dk santrifüj edildi ve enzim pellet şeklinde tüpün alt kısmında kaldı sıvı kısım ise dekantasyon ile boşaltıldı. Pellet şeklindeki enzim 0.5 mL suda çözülerek UV (UV-GB spektrofotometre Hach) de aktivite tayini için kullanıldı.

3.7. Glukoz Oksidaz Aktivite Tayini

3.7.1. Hidrokinon kalibrasyon grafiği

Glukoz oksidaz aktivite tayini spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Aşağıdaki tepkimelerde görüldüğü gibi, GOD, glukozu glukonik asite yükseltir. Bu

tepkimenin başlangıç hızı, glukoz oksidaz enziminin aktivitesidir. Glukozun glukonik aside yükseltgenme tepkimesi spektrofotometrede ölçülebilir bir absorbans değeri vermez; bu nedenle Şekil 3.1. (a)' da verilen tepkimede oluşan ürünü substrat olarak kullanan ve spektrofotometrede ölçülebilir bir absorbans değeri veren Şekil 3.1. (b)' deki tepkimeden yararlanılır. Burada ilk tepkime sırasında açığa çıkan H_2O_2 , benzokinonla tepkimeye girerek hidrokinon oluşturur.



1,4-Benzokinon Hidrokinon

(b)

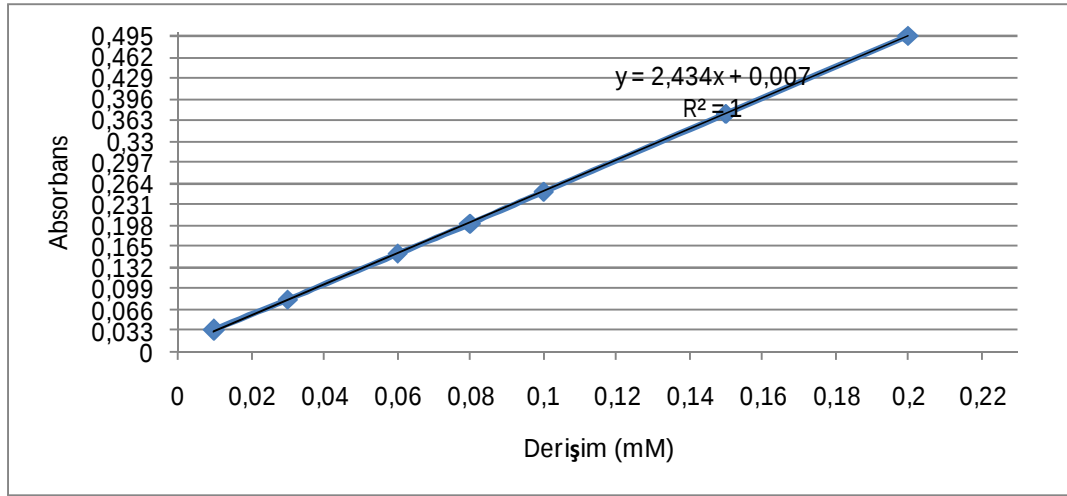
Şekil 3.1. Glukoz oksidaz aktivite tayini reaksiyon mekanizması

- Glukozdan glukoz oksidaz varlığında H_2O_2 oluşumu
- H_2O_2 varlığında benzokinondan hidrokinon oluşumu

Kalibrasyon grafiği için sırasıyla 0,01 mM, 0,03 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,15 mM ve 0,2 mM hidrokinon derişimlerine sahip çözeltiler hazırlandı ve spektrofotometrede 290 nm dalga boyunda absorbsiyon ölçümleri Çizelge 3.2.'te verildiği gibi alındı ve Şekil 3.2'deki kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Çizelge 3.2. Farklı derişimlerdeki hidrokinon çözeltilerinin absorbans değerleri

Derişim (mM)	0,01	0,03	0,06	0,08	0,10	0,15	0,20
Absorbans (290 nm)	0,03	0,08	0,15	0,20	0,25	0,37	0,50



Şekil 3.2. Hidrokinon'un kalibrasyon grafiği (λ= 290 nm)

3.7.2. Spektroskopik yöntem

Bu tayin için 1 M glukoz çözeltisi tayinden bir gün önce hazırlandı ve oda sıcaklığında anomerlerinin dengeye gelmesi için bekletildi. % 0,1 (m/v) derişiminde benzokinon çözeltisi ve 0,1 M pH 5 olan sodyum sitrat tamponu hazırlandı.

1 mL 1 M glukoz, 0,5 mL %0,1 (m/v) benzokinon çözeltisi ve 0,5 mL sitrat tamponu eklenerek toplam 2 mL hacminde kör hazırlanmıştır. Numune ise; 1 mL 1 M glukoz, 0,5 mL %0,1 (m/v) benzokinon, 0,48 mL sitrat tamponu eklenerek hazırlandı ve 25 °C'de 5 dk oda sıcaklığına gelmesi için bekletildi. Daha sonra 0,02 mL enzim çözeltisi eklendi ve 30 °C'de 1 dk bekletildikten sonra absorbans değeri 290 nm'de okundu ve oluşan hidrokinon derişimi kalibrasyon grafiğinden hesaplandı [Ciucu ve Patrocou, 1984].

3.7.3. Enzim aktivitesi

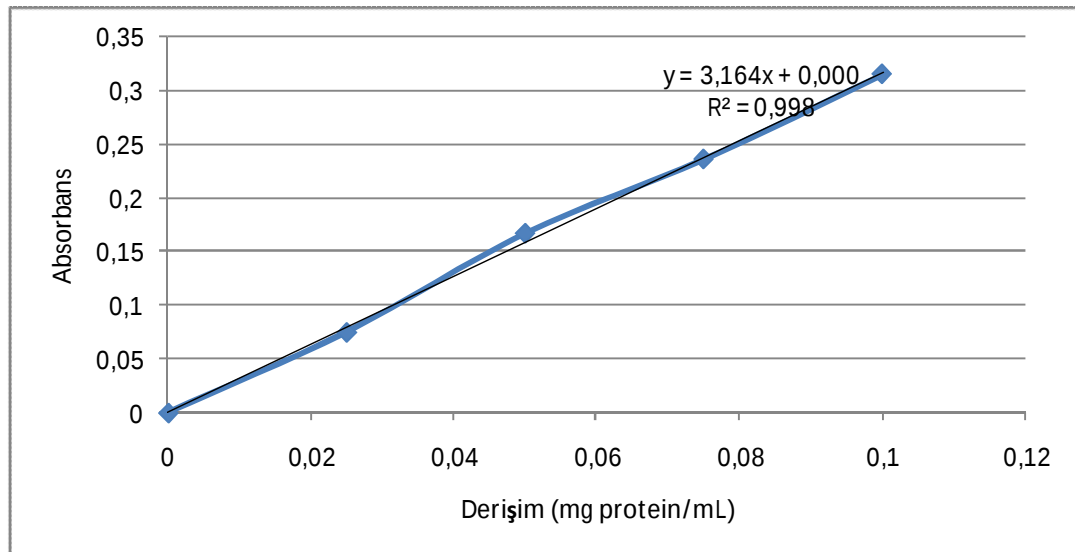
Reaksiyon başlangıç hızı enzim aktivitesidir. Enzim aktivitesi (ünite) 30 °C de 1 dakikada oluşan hidrokinonun µmol'üdür. Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak hesaplanır [Ciucu ve Patrocou, 1984].

3.8. Protein Derişimi Tayini

0,5 mg/ mL BSA (Bovin Serum Albümin çözeltisinden) 5, 10, 15, 20 μ L' lik kısımlar alındı ve her birinin hacimleri 0,15N NaCl çözeltisi ile 100 μ L' ye tamamlandı. Her tüpe 1 ml Bradford Reaktifi eklendi, vorteksle karıştırıldı ve 2 dakika bekletildi. Bu çözeltilerin kör çözeltisine karşı (kör: 0,1 mL 0,15N NaCl ve 1,0 mL Bradford Reaktifi) UV spektrofotometrede 595 nm'de absorbansları okundu. Farklı derişimlere karşı elde edilen absorbans değerleri Çizelge 3.3.'te verildi. Bu çizelgede verilen değerler kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiği Şekil 3.3.'te verilmiştir. Enzim içeren örneğin, 595 nm'deki absorbansı ölçüldü ve kalibrasyon grafiği yardımıyla 'mg protein/mL' olarak protein derişimi hesaplandı.

Çizelge 3.3. Farklı derişimlerdeki protein çözeltilerinin absorpsiyon değerleri

Derişim mg protein/mL	0	0,025	0,050	0,075	0,100
Absorbans (595 nm)	0	0,070	0,170	0,236	0,315



Şekil 3.3. Protein derişimlerinin absorbansa göre kalibrasyon grafiği (λ= 595 nm)

3.9. Glukoz Oksidaz'ın V_m ve K_m Değerlerinin Tayini

Enzimin V_m ve K_m değerleri, Lineweaver-Burk (LB) grafiği yardımıyla tayin edildi. Farklı derişimlerde (1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM) glukoz çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden yararlanılarak Bölüm 3.7.2.'de anlatıldığı gibi 30 °C sıcaklıkta deneyler yapıldı. Glukozun farklı derişimlerinde hazırlanan ve subsrat olarak kullanılan bu çözeltiler ile başlangıç reaksiyon hızları (v) $\mu\text{mol/dk}$ olarak saptandı. $1/(v)$ değerleri, $1/[S]$ değerlerine karşı grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Çizilen Lineweaver-Burk grafiğindeki doğrunun x eksenini kestiği noktadan $-1/K_m$, y eksenini kestiği noktadan ise $1/V_m$ belirlendi.

3.10. Biyokütle

Enz28im üretim ortamında oluşan miseller pH 5.4 olan asetat tamponuna yüzeyden kazıma işlemi yapılarak alındı. Biyokütle içeren bu süspansiyon süzgeç kağıdından süzüldü ve 75 °C de etüvde kurutuldu. Süzgeç kağıdı sabit tartıma geldiğinde biyokütle 0,011 g/mL olarak hesaplandı.

3.11. Glukoz Oksidaz Üretiminde Besi Yeri Seçimi

Maksimum enzim üretimi ve mikroorganizmanın ortamdan en iyi şekilde faydalanabilmesi için bileşimi çizelge 3.4.'te verilen farklı besi yerleri denendi. Bu besi yerleri seçiminde çay posası, melas, yumurta kabuğu gibi atık maddelerin değerlendirilmesi düşünüldü.

Çizelge 3.4. GOD üretimi için farklı besi ortamı içeriği

Besi Yeri 1	Besi Yeri 2	Besi Yeri 3	Besi Yeri 4
Çay	Çay	Çay	Çay
Melas	Melas	Glukoz	Melas
(NH ₄) ₂ HPO ₄	----	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄
KH ₂ PO ₄	----	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄
MgSO ₄	----	MgSO ₄	MgSO ₄
CaCO ₃	Yumurta Kabuğu	CaCO ₃	CaCO ₃
----	----	----	MnO ₂

3.12. Glukoz Oksidaz Üretiminde MnO₂ Derişiminin Etkisi

MnO₂'nin katı ortamda glukoz oksidaz üretimine etkisi incelendi. Bu amaçla ortamdaki derişim % 0,05, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3 ve 0,5 (m/v) MnO₂ olacak şekilde besi ortamına MnO₂ eklendi.

3.13. Glukoz Oksidaz Üretimine Yumurta Kabuğu Etkisi

Bu çalışmada da besi ortamına Çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi % 4 (m/v) derişiminde CaCO₃ eklenmiştir. Çizelge 2.3.'te verildiği gibi yumurta kabuğu %93,7 CaCO₃ ve daha az oranlarda da MgCO₃, Ca₃(PO₄)₂, organik maddeler içermektedir. Bu atık madde (yumurta kabuğu) normal besi ortamında bulunan (Besi Yeri 1) (NH₄)₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄ ve CaCO₃ yerine kullanılabilir. Bu çalışmada Çizelge 3.5.'te görüldüğü gibi yumurta kabuğu % 4 (m/v) oranında besi ortamına 8 üeklendi.

Çizelge 3.5. Yumurta kabuğu içeren besi ortamı içeriği

Besi Yeri 1	Besi Yeri 2	Besi Yeri 3
Çay	Çay	Çay
Melas	Melas	Melas
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	----	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
KH_2PO_4	----	KH_2PO_4
MgSO_4	----	MgSO_4
CaCO_3	Yumurta Kabuğu	Yumurta Kabuğu

3.14. Glukoz Oksidaz Üretimine O_2 'nin Etkisi

Fermentasyon aerobik koşullarda gerçekleşmektedir ve *A. niger* aerob bir küf mantarıdır ve ortama hava beslemesi yapılarak oksijenin etkisi gözlenmiştir. Resim 3.2.'de görülen sistem bütün bağlantılarıyla birlikte sterillenerek kullanıldı. Akvaryum hava pompası (Champion CX-0088) vasıtasıyla steril filtreden geçirilen nemlendirilmiş hava ortama gönderildi. Havanın akış hızı flow metre ile 16 mL/sn olarak ölçüldü.



Resim 3.2. Hava beslemeli kültür ortamı

3.15. Glukoz Oksidaz Üretimine NaOH Etkisi

Çay, melas, yumurta kabuğu, MnO_2 içeren ortama % 0,016 (m/v) derişiminde NaOH eklendi, ortamdan hava geçirilerek (16 mL/s) glukoz oksidaz üretimi araştırıldı.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

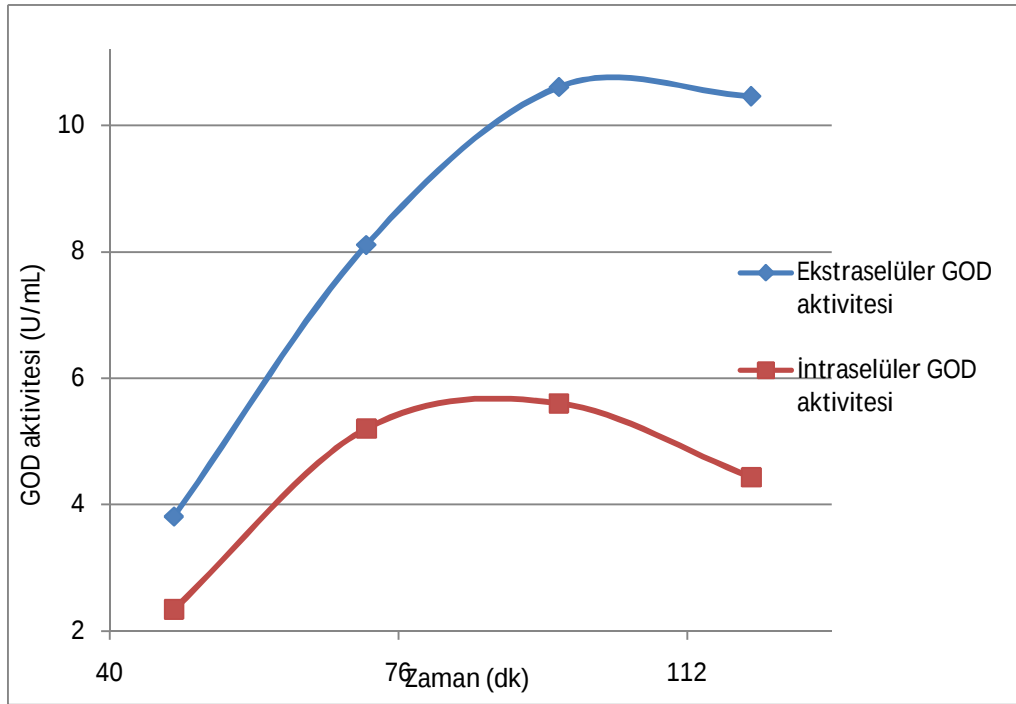
4.1. *Aspergillus Niger* 'in Kültür Seçimi

Bölüm 3.2. ve 3.4.'te anlatıldığı gibi petrilere üç farklı suştan üretilen *Aspergillus niger* süspansiyonu bileşimi Çizelge 3.1.'de verilen ortama ekildi. Kültür seçimi için suşlar üçer paralel olacak şekilde ve 48, 72, 96 ve 120. saatler için ayrı ayrı ekim yapıldı. Bu sürelerde alınan örneklerimiz intraselüler ve ekstraselüler enzim tayini için analiz edildi. Çıkan sonuçlar Çizelge 4.1.'de U/mL cinsinden verildi.

Çizelge 4.1. Farklı kültürlerin ekstraselüler ve intraselüler enzim üretimine etkisinin zamana bağlı değişimi

Saat (dk)	Ekstraselüler (U/mL)		
	NRRL 3	NRRL 2270	CBS 513.88
48	3,82 ±0,43	4,10 ±0,35	4,22 ±0,29
72	8,11 ±0,30	4,13 ±0,31	3,54 ±0,33
96	10,61 ±0,73	5,02 ±0,42	4,93 ±0,38
120	10,46 ±0,37	4,61 ±0,30	4,82 ±0,27
Saat (dk)	İntraselüler (U/mL)		
	NRRL 3	NRRL 2270	CBS 513.88
48	2,36 ±0,28	1,42 ±0,24	1,93 ±0,23
72	5,21 ±0,25	2,07 ±0,22	1,31 ±0,31
96	5,61 ±0,36	2,55 ±0,28	4,92 ±0,26
120	4,44 ±0,32	3,71 ±0,25	5,36 ±0,37

Ekstraselüler ve intraselüler enzim üretiminin en iyi olduğu kültür NRRL 3 olarak belirlenmiştir. Ekstraselüler ve intraselüler enzim üretimi 96. saatte maksimum değere ulaşmıştır. NRRL 3 kültürü için ekstraselüler ve intraselüler enzim üretimi Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Ekstraselüler ve İntraselüler GOD üretiminin zamanla değişimi

4.2. Glukoz Oksidaz Üretimine Besi Yerinin Etkisi

Çizelge 3.4.'te verilen dört farklı besi yerleri hazırlanarak Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi ekim yapıldı ve 96 saat, 30 °C'da inkübatörde bekletildi. Bölüm 3.6.'da anlatıldığı şekilde hücre dışı ve hücre içi enzim izolasyonu yapıldı. Enzim aktivite tayinleri Bölüm 3.7. 'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmektedir.

Çizelge 4.2. Farklı besi yerlerindeki Ekstraselüler ve İntraselüler GOD üretimi

	Ekstraselüler (U/mL)	İntraselüler (U/mL)
Besi Yeri 1	8,60 ±0,33	4,60 ±0,28
Besi Yeri 2	9,06 ±0,29	4,82 ±0,31
Besi Yeri 3	3,02 ±0,39	2,18 ±0,45
Besi yeri 4	13,58 ±0,72	8,73 ±0,61

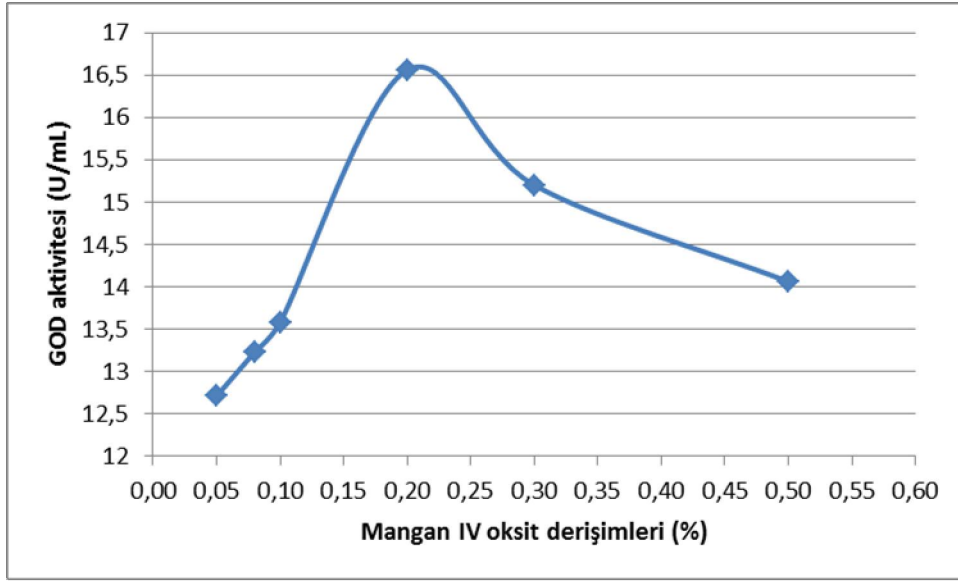
Besi yeri 4 kullanıldığında ekstraselüler ve intraselüler enzim aktivitesi sırasıyla 13,58 U/mL ve 8,73 U/mL olarak bulundu. Besi yeri 4 diğer besi ortamlarından farklı olarak % 0,1 (m/v) MnO_2 içermektedir. Ortama MnO_2 katılması Glukoz oksidaz verimini kontrole göre 1,58 kat arttırmıştır. Glukoz Oksidaz üretiminde yan ürün olarak oluşan hidrojen peroksitin inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için MnO_2 ortama katılmaktadır. MnO_2 hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalamaktadır ve Glukoz Oksidaz aktivitesini artırmaktadır [Nakao ve ark., 1997].

4.3. Glukoz Oksidaz Üretimine MnO_2 Derişiminin Etkisi

Bölüm 3.12.'de verilen MnO_2 derişimleri kullanılarak hazırlanan besi yerlerine ekim yapıldı. *A.niger* ekstraselüler ve intraselüler enzim tayini için Bölüm 3.6. ve 3.7.'de anlatılan yöntem kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.2.'de MnO_2 derişimine bağlı GOD üretim grafiği gösterilmiştir. Çizelge ve Şekilden görüldüğü gibi en iyi aktivasyon %0,2 (m/v) MnO_2 derişiminde elde edilmiştir. Ortama %0,2 (m/v) MnO_2 katılması, Glukoz oksidaz verimini kontrole göre 1,92 kat arttırmıştır.

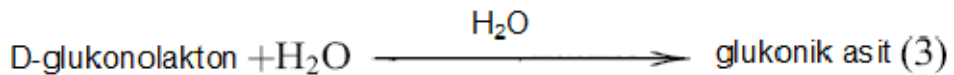
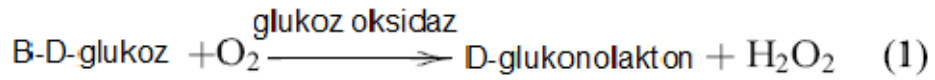
Çizelge 4.3. Farkı derişimlerdeki MnO_2 'nin GOD üretimine etkisi

MnO_2 Derişimleri (%) (m/v)	Ekstraselüler (U/mL)	İntraselüler (U/mL)
0,05	12,71 $\pm$ 0,48	5,90 $\pm$ 0,39
0,08	13,23 $\pm$ 0,56	6,22 $\pm$ 0,35
0,1	13,58 $\pm$ 0,72	8,73 $\pm$ 0,61
0,2	16,56 $\pm$ 0,63	7,62 $\pm$ 0,54
0,3	15,20 $\pm$ 0,61	6,19 $\pm$ 0,58
0,5	14,06 $\pm$ 0,41	6,10 $\pm$ 0,49



Şekil 4.2. MnO_2 derişimine bağı GOD üretimi ($T = 30^\circ\text{C}$, $t = 96$ saat)

Glukoz Oksidaz üretiminde yan ürün olarak oluşan hidrojen peroksitin inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için ortama katalaz enzimi katılmaktadır. Katalaz enzimi pahalı ve kararsız bir yapıda olduğu için aynı işlevi gören MnO_2 ortama katılmaktadır. MnO_2 hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalamaktadır ve Glukoz Oksidaz aktivitesini artırmaktadır [Nakao ve ark., 1997]. Şekil 4.3.'te Glukozun oksidasyon mekanizması ve H_2O_2 'nin, MnO_2 tarafından O_2 ve H_2O 'ya parçalanması gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Glukozun MnO_2 'li ortamda oksidasyonu

4.4. Glukoz Oksidaz Üretimine Yumurta Kabuğu Etkisi

Çizelge 3.4.'te verilen besi ortamı kullanılarak glukoz oksidaz enzim üretimi yapılmıştır ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $t = 96$ saat). Yumurta kabuğu kullanıldığında Besi Yeri 1 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 ve CaCO_3 maddelerini içermekte Besi Yeri 2 ise bunların yerine sadece yumurta kabuğu içermektedir, Besi Yeri 3 ise her ikisini de içermektedir. Sonuçlar Çizelge 4.4.'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. Yumurta kabuğu içeren besi ortamlarının GOD üretimi

	Ekstraselüler (U/mL)	İntraselüler (U/mL)
Besi Yeri 1	8,60 $\pm$ 0,33	4,60 $\pm$ 0,28
Besi Yeri 2	9,06 $\pm$ 0,29	4,82 $\pm$ 0,31
Besi Yeri 3	14,56 $\pm$ 0,38	6,79 $\pm$ 0,24

Çizelgede görüldüğü gibi (Besi Yeri 3 ve Besi Yeri 1) yumurta kabuğu kullanılması halinde ekstraselüler GOD aktivite değeri 1,70 kat artmıştır. Literatürde verilen besi ortamında yüksek derişimde CaCO_3 ortama eklenmektedir. Literatür verilerine göre CaCO_3 glukoz oksidaz sentezini arttırmaktadır. Bunun nedeni olarak katı ortamda Ca^{+2} iyonlarının miselin gelişmesini arttırdığı bildirilmiştir[Rogalski ve ark., 1988]. Bankar ve arkadaşları GOD üretiminin pH 4 altında düştüğünü ve ortama CaCO_3 eklenmesinin üretim sırasında pH değerinin düşmesini engelleyici etki gösterdiğini bildirmişlerdir [Bankar ve ark., 2009].

4.5. Glukoz Oksidaz Üretimine O_2 'nin Etkisi

En iyi ortam olarak seçilen Besi yeri 4'e % 0,2 (m/v) MnO_2 ekleyerek Resim 3.2'de görülen düzenek kullanılarak üretim yapıldı ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $t = 96$ saat, Hava akış hızı= 16,0 mL/s). Glukoz oksidaz enzim aktivitesi Bölüm 3.6 ve 3.7.'de anlatıldığı gibi saptandı. Ekstraselüler Glukoz oksidaz aktivitesi 18,7 U/mL olarak

bulunmuştur. Glukoz oksidaz verimi kontrole göre (%0,2 MnO₂ içeren besi yeri 4) 1,64 kat artmıştır.

4.6. Glukoz Oksidaz Üretimine NaOH Etkisi

Bileşimi Bölüm 3.15.'te verilen besi ortamında GOD üretimi yapıldı. Ekstraselüler Glukoz oksidaz aktivitesi 34,23 U/mL olarak ölçüldü. Bankar ve arkadaşlarının 2009, Ramachandran ve arkadaşlarının 2006 yıllarındaki gözlemlerine göre ortam pH'ı 4 ün altına düşmemelidir. Ramachandran ve arkadaşları ortama CaCO₃ veya NaOH katılmasının aktiviteyi artırdığını bildirmişlerdir. NaOH'ın ortama çözünür halde eklenmesi daha etkin bir nötralleştirme aracıdır. Bu nedenle glukoz oksidaz aktivitesini 1,83 kat arttırmıştır.

4.7. Glukoz Oksidazın V_m ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi

4.7.1. Glukoz oksidaz Lineweaver-Burk grafiği

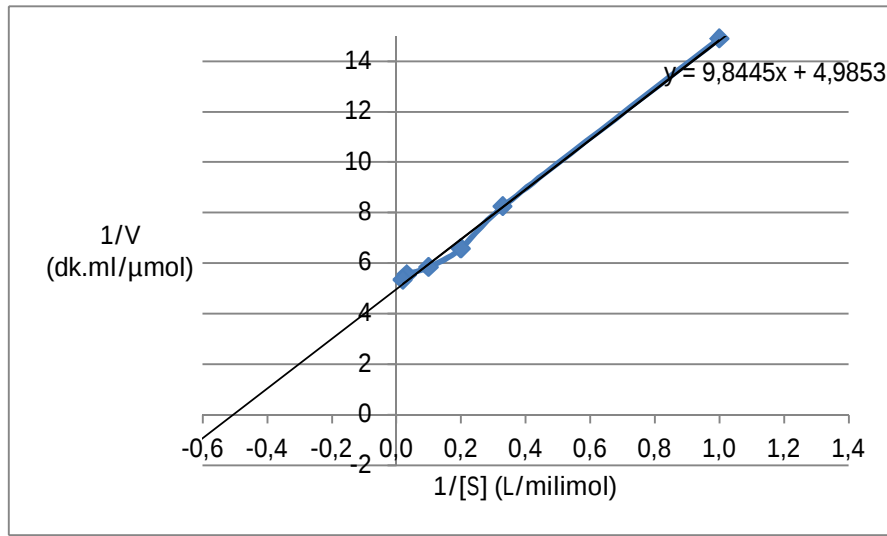
Besi yeri 4 kullanılarak ve % 0,2 (m/v) MnO₂ içeren koşullarda ürettiğimiz Glukoz oksidaz için LB grafiği Bölüm 3.9.'da verilen glukoz (substrat) derişimlerine karşı çizildi. Çizelge 4.5.'te verilen v ve [S] değerlerinden yararlanarak, 1/v ve 1/[S] değerleri hesaplandı; 1/v ve 1/[S] değerlerini kullanarak LB grafiği çizildi. Çizilen grafikten K_m ve V_m değerleri hesaplandı. Bulunan değerler sırasıyla K_m=1,98 mM ve V_m=2,01 x 10⁻¹U/mL'dir.

Çizelge 4.5. GOD için substrat derişimlerine karşı v değerleri

[S] (mM)	1,00	3,00	5,00	10,0	30,0	50,0
V (μmol/dk.ml) (x10 ⁻¹)	0,67	1,21	1,52	1,71	1,80	1,87

Çizelge 4.6. $1/[S]$ ye karşı $1/V$ değerleri

$1/[S]$ (L/milimol)	1,00	0,33	0,21	0.10	0.03	0.02
$1/V$ (dk.ml/ μ mol)	14.9	8.25	6.58	5.85	5.55	5.35



Şekil 4.4. GOD için Lineweaver-Burk grafiği

4.8. Enzim Protein Tayini

Bölüm 3.8.'de anlatıldığı gibi enzim içeren örneğimizin protein derişimini 1,62 mg protein/mL olarak hesaplandı, Spesifik aktivite 10,2 U /mg protein olarak bulundu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

“Mikroorganizma Hücreleri Kullanarak Glukoz Oksidaz Enzim Üretimi” tez çalışmasının sonuçları ve literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırılması aşağıda verilmiştir.

1. Üç ayrı *Aspergillus niger* suşu, içeriği aynı besi ortamlarına ekilerek en iyi GOD üretimi sağlayan suş olarak **NRRL 3** seçilmiştir.

Ramachandran ve arkadaşları 2007’ de yaptıkları “glukonik asit üretim çalışmasında” NRRL 3 kültürünü kullanmıştır.

2. Fermentasyon zamanının (48, 72, 96 ve 120 saat) GOD üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. 96. saatte NRRL 3 suşunun en yüksek ekstraselüler GOD aktivasyonu 10,6 U/ml, intraselüler GOD aktivasyonu 5,6 U/mL olarak bulunmuştur.

Kashmiri ve arkadaşları 2008’de yaptıkları çalışmada GCUC-10 numaralı *Aspergillus niger* fungusunu kullanmışlardır. Kültür ortamına ve periyoduna bağlı olarak en yüksek GOD üretimi ekstraselüler için 72 saatte, intraselüler için 36 saatte elde edilmiştir.

3. Çalışmamızda serbest mikroorganizma kullanılarak, farklı katı ortamlar denenmiştir. En yüksek GOD derişimi, MnO_2 içeren katı besi yerinde ekstraselüler ve intraselüler enzim aktivasyonu sırasıyla 13,6 U/mL ve 8,73 U/mL olarak bulunmuştur.

Nakao ve arkadaşları 2001’de yaptıkları çalışmada, hidrojen peroksitin inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için MnO_2 kullanmışlardır.

4. Çalışmamızda mikroorganizma kullanılarak yapılan deneylerde, MnO_2 ’nin farklı derişimleri denenmiştir ve % 0.2 (m/v) derişiminde ekstraselüler GOD

aktivitesi 16,6 U/mL olarak bulunmuştur. MnO_2 katılması Glukoz oksidaz verimini kontrole göre 1,93 kat arttırmıştır.

“Serbest mikroorganizma kullanılarak, MnO_2 ’nin farklı konsantrasyonlarının GOD üretimine etkisi” hakkında literatürde herhangi bir bulguya rastlanmamıştır

5. Çalışmamızda mikroorganizma kullanılarak, hava beslemesinin GOD üretimine etkisi araştırılmıştır. %0,2 (m/v) MnO_2 içeren ortamda, 16 mL/s akış hızındaki havayla beslenen ortamdaki ekstraselüler GOD aktivitesi 18,7 U/mL olarak bulunmuştur.
6. Çalışmamızda katı ortam kullanılarak atık değerlendirme yapılmıştır; çay, melas ve yumurta kabuğu GOD üretimi için kullanılmıştır.

Sharma ve arkadaşlarının 2008’de yaptığı çalışma da çay atıkları ve şeker melası kullanılmış ve glukonik asit üretimi yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Akova, Y., *İhracatı Geliştirme Etüt Merkezi* (2005).
- Ay, M., Sökmen, M., Bilgin, Y., "Yumurta Kabuklarından Tozsuz Tebeşir Eldesi", *Tübitak-Bideb Lise Öğretmenleri Proje Danışmanlığı Eğitim Çalıştayı* (2011).
- Baker, S.E., "Aspergillus niger genomics: Past, present and into the future", *Medical Mycology September*, Washington USA, 44:17-21 (2006).
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., "Optimization of *Aspergillus niger* Fermentation for the Production of Glucose Oxidase", *Food Bioprocess Technol*, 2:344-352 (2009).
- Beyatlı, Y., "Biyoteknoloji ve biyoprotein üretimi", *Kükem Yayınları*, Ankara, 24-34 (1996).
- Betancor, L., Gallego, F.L., Hidalgo, A., Morales, N.A., Ortiz, G.D., Guisan, J.M., Lafuente, R.F., "Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*", *Journal of Biotechnology*, 121:284-289 (2006).
- Bingöl, G., "Vitaminler ve Enzimler", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, No:46 (1997).
- Bohager, T., "Enzymes:What the experts know 1nd ed." , *One World Press*, Prescott USA, 11 (2006).
- Chanp, P.C., Harvey, R.A., "Biyokimya 2. baskı", Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E., *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 47-51 (1997).
- Clark, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., Harrison, S.T.L., "Location of Glucose Oxidase During Production by *Aspergillus Niger*", *Appl .Microbiol. Biothcnol.*, 70: 72-77 (2006).
- Çetin, E., İ., "Endüstriyel Mikrobiyoloji" *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Vakfı Bayda Yayınları*, İstanbul, 2:45-160 (1983).
- Ciucu, A., Patrocou, C., "Fast Spectrophotometric Method or Determining Activity of GOX", *Analytical Letters*, 14:1417-1427 (1984).
- Dececi, E.Ü., "Portakal Atıklarından *Aspergillus niger* Flamentli Fungusu Kullanılarak Sitrik Asit Üretiminde Değerlendirilmesi", Doktora Tezi, *Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Mersin, 1-242 (2008).
- Gürgün, V., Halkman, K., "Mikrobiyolojide sayım yöntemleri", *Gıda Teknolojisi Derneği Dergisi*, Ankara, 7:10-20 (1990).

Güven, S., Zorba Demirel, N.N., "Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu", **Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yayınları**, 3.basım (2011).

Haouz, A., Glandieres, J.M., Alpert, B., "Involvement of Protein Dynamics in Enzyme Stability The Case of Glucose Oxidase ", **FEBS Letters** , 506: 216-220 (2001).

İnternet: Mikrobiyoloji.org "Mikroorganizmalar"
http://www.mikrobiyoloji.org (2012).

İçli, N., "İmmobilize glukoz oksidaz enziminin özellikleri ve enzim aktifliğinin arttırılması", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, 1-104 (2008).

Jafari, A.R., Sarrafzadeh, M.H., Alemzadeh, I., Vosoughi, M., "Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*", **Journal of Biological Sciences**, 7(2):270-275 (2007).

Kashmiri, M.A., Khurshid, S., Qureshi, M.Z., Subbani, Q., "Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Glucose Oxidase by *Aspergillus niger*", **Pakistan Journal of Science**, 60:1-2 (2008).

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., "Industrial Enzyme Applications", **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 345-351 (2002).

Kona, R.P., Oureshi, N., Pai, J.S., "Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor", **Bioresource Technology**, 78:123-126 (2001).

Leeuwenhoek, A., "Microscopy goes cold: frozen viruses reveal their structural secrets", **Philosophical Transactions**, 363:2441-2451 (2008).

Loeb, J., "Cato on Agriculture Varro on Agriculture", **The Loeb Classical Library**, Harvard University Press, London, 7:422-423 (1993).

Lu, T., Peng, X., Yang, H. and Ji, L., "The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase", **Enzyme and Microbial Technology**, 19:339-342 (1996).

Madigan, M.T., Martinko, J.M., "Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi" **Palme Yayıncılık**, Ankara, 11:26-36 (2010).

Menon, K.K.G., Mulky, M.J., Sharma, V.S., "The tea industry in India: how to redesign a native. tea culture, processing and marketing", **Oxford and IBH**, New Delhi, pp. 3-10 (1993).

Miron, J., Gonzales, M.P., Pastrana, L., Murado, M.A., "Diauxic Production of Glucose oxidase by *Aspergillus Niger* in Submerged Culture A Dynamic Model", **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 615-620 (2002).

Nakao, K., Kiefner, A., Frumoto, K., Harada, T., "Production of Gluconic Acid with Immobilized Glucose Oxidase in Airlift Reactors", **Chemical Engineering Science**, 52 (21-22): 4127-4133 (1997).

O'Brien, S. Geodert, J., "HIV causes AIDS: Koch's postulates fulfilled", **Curr Opin Immunol**, 8(5): 613-18 (1996).

Öl, G., "Çayın Besin değeri ve Yararlı Etkileri", **A.Ü.Z.F. Yayınları** 771

Özçelik, S., "Genel Mikrobiyoloji, 1.basım", **Süleyman Demirel Üniversitesi, Atabey/ Isparta**, 1-9 (1998).

Pandey, A., "Solid-State fermentation", **Biochemical Engineering Journal**, 13:81-84 (2003).

Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C., "Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose", **Bioresource Technology**, 99:4559-4565 (2008).

Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C., "Gluconic acid: Properties, Applications and Microbial Production", **Food Technol. Biotechnol.**, 44(2)185-195 (2006).

Rogalski, J., Fiedurek, J., Szczordrak, J., Kapuska, K., Leonowicz, A., "Optimization of Glucose Oxidase Synthesis in Submerged Cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant", **Enzyme and Microbiology Technology**, 10:508-511 (1988).

Rypien, K., "The origins and spread of *Aspergillus sydowii*, an opportunistic pathogen of Caribbean gorgonian corals", **Cornell University** (2008).

Şahin M., Akçura M., Akçacık A.G., Aydoğan S., "Glukoz oksidaz enziminin süne zararlı buğday unlarının hamur ve ekemek özellikleri üzerine etkisi" **Bitkisel Araştırma Dergisi**, 1:24-28 (2007).

Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Wubbolts, M., Witholt, B., "Industrial Biocatalysis Today And Tomorrow", **Nature**, 409: 259-268 (2001).

Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A., "Biosynthesis of glucoamylase from *Apergillus Niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate", **Bioresource Technol.** 65:83-85 (1998).

Sharma, A., Vivekanand, V., Singh, R.P., "Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support", **Bioresource Technology**, India, 99:3444-3450 (2008).

Singh, O.V., Jain, R.K., Singh, R.P., "Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*", **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, India, 78:208-212 (2003).

Telefoncu, A., Dinçkaya, E., "Enzimoloji 2. baskı", Telefoncu, A., **Ege Üniversitesi Yayınları**, İzmir, 3-12, 193-231 (1997).

Tüfekçi, M., "Türk Çaylarında Bazı Toksik Metallerin (Kurşun, Kadmiyum, Civa) Araştırılması", Doktora Tezi, **Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Trabzon, 1-173 (1989).

Wentzel, C.A., Gelderblom, P.G.T. and Kristen, J., "The chemical and enzymatic interaction of glutathione with the fungal metabolite, fusarin C", **Mutat. Res.**, 199: 207-214 (1988).

Whitaker J.R., "Principles of Enzymology for the Food Sciences", **Marcel Dekker Inc.**, 1994

Wiemann, P., Willmann, A., Straen M., Kleigrew, K., Bayer, M., Humpf, H.U., Tudzynski, B., "Biosynthesis of red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation", **Mol Microbiol.**, 72:931-946 (2009).

Wilson, R., Turner, A.P.F., "Glucose oxidase: an ideal enzyme", **Biosensors & Bioelectronics**, 7:165-185 (1992)

Wiseman, A., "Chapter 3: The application of enzymes in industry", **Handbook of enzyme biotechnology**, 2:274-373 (1987).

Wolhfarht, G., Trivic, S., Kandrak, J., Pericin, G., Leskovak, V., "Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* :The Mechanism of Action With Molecular Oxygen, Quinones, and one-Electron Acceptors ", **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** , 37: 731-750 (2005).

Wong, C.M., Wong, K.H. and Chen, X.D., "Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications", **Appl Microbiol Biotechnol** 78:927-938 (2008).

Zhao, H., Chockalingam, K., Chene, Z., "Directed Evolution of Enzymes and Pathways for Industrial biocatalysis ", **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 104-110 (2002).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GÜREL, Neslihan
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07.01.1981 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 544 789 35 38
e-mail : neslihan.grl@gmail.com

Eğitim Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet Tarihi

Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	2012
Tezsiz YL	Selçuk Üniversitesi / Kimya Bölümü	2005
Lisans	Selçuk Üniversitesi / Kimya Bölümü	2004

İş Deneyimi Yıl

Yer

Görev

2006-2010	TÜBİTAK-ATAL	Kimyager
2010-2011	LÖSEV-GIDA LAB	Kimyager

Yabancı Dil

İngilizce