

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -AMİLAZİNİN KATI FAZ FERMENTASYON  
TEKNIĞIYLE ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE  
ÇEŞİTLİ ENDÜSTRİYEL ALANLARDAKİ KULLANILABİLİRLİĞİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Ümit UZUN**

**EYLÜL 2017  
TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında  
Ümit UZUN Tarafından Hazırlanan**

***Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -AMİLAZININ KATI FAZ FERMENTASYON  
TEKNİĞİYLE ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE ÇEŞİTLİ  
ENDÜSTRİYEL ALANLARDAKİ KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 08/08/2017 gün ve 1714 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

**Üye : Doç.Dr. Melike YILDIRIM AKATIN**

**Üye : Yrd.Doç.Dr. Melek ÇOL AYVAZ**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının katı faz fermentasyon tekniğiyle üretimi, saflaştırılması, immobilizasyonu ve çeşitli endüstriyel alanlardaki kullanılabilirliğinin incelenmesi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmada bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde yardımcı olan, çalışmam süresince yakın ilgi ve önerileriyle bana yol gösterip beni yönlendiren danışmanım sayın Doç.Dr. Melike YILDIRIM AKATIN’a teşekkür ederim. Biyokimya bilimini tanımamda ve bu alanda eğitim yapmamda büyük katkıları olan değerli hocam sayın Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK ve sayın Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, çalışmada kullandığımız mikroorganizmanın teminini sağlayan değerli hocam Prof.Dr. Erkol DEMİRCİ’ye teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisansım boyunca Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarında beraber çalışıp yardımlarını aldığım bütün hocalarıma özellikle de Dr. Kimyager Ümmühan ÇAKMAK’a ve diğer arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans tez süresince beni anlayışla karşılayan, nazımı çeken canım arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkür ederim.

Sağladığı maddi destekten ötürü TÜBİTAK’a (Proje No: 115Z109) teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da hayatımda bir an bile maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren, zor günlerimde yanımda olan ve beni bu günlere getiren çok değerli AİLEM’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyiki varsınız.

Ümit UZUN  
Trabzon, 2017

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının katı faz fermentasyon tekniğiyle üretimi, saflaştırılması, immobilizasyonu ve çeşitli endüstriyel alanlardaki kullanılabilirliğinin incelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç.Dr. Melike YILDIRIM AKATIN’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 06/09/2017



Ümit UZUN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ÖZET .....	X
SUMMARY .....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XII
TABLOLAR DİZİNİ .....	XIV
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ .....	XV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Nişasta Dönüştürücü Enzimler .....	2
1.2.1. Endoamilazlar .....	2
1.2.2. Ekzoamilazlar .....	2
1.2.3. Dal Kırıcı Enzimler .....	3
1.2.4. Transferazlar.....	3
1.3. $\alpha$ -Amilaz Ailesi .....	4
1.3.1. $\alpha$ -Amilazların Yapısı .....	5
1.3.2. $\alpha$ -Amilazların Üretim Kaynakları.....	7
1.3.2.1. Bakteri $\alpha$ -Amilazları.....	7
1.3.2.2. Fungus ve Maya $\alpha$ -Amilazları.....	7
1.3.3. $\alpha$ -Amilazların Biyokimyasal Özellikleri .....	8
1.3.4. $\alpha$ -Amilazların Katı Faz Fermentasyonu (SSF) ile Üretimi.....	9
1.3.4.1. Katı Faz Fermentasyonunda Fizikokimyasal Parametreler .....	10
1.3.5. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Ölçüm Metotları .....	11
1.3.5.1. Dinitrosalisilik Asit (DNS) Metodu .....	11
1.3.5.2. İyot Renk Şiddetinde Azalma Metodu .....	12
1.4. $\alpha$ -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	12
1.5. Nişasta .....	13
1.6. Enzimlerin Saflaştırılması .....	14
1.7. Enzimlerin İmmobilizasyonu .....	15

1.7.1.	Günümüzde En Çok Tercih Edilen İmmobilizasyon Metotları.....	16
1.7.1.1.	Kovalent Bağlama .....	16
1.7.1.2.	Adsorpsiyon.....	17
1.7.1.3.	Çapraz Bağlama .....	18
1.7.1.4.	Polimer Matrikste Tutuklama.....	19
1.7.1.5.	Mikrokapsülleme.....	20
1.7.2.	İmmobilizasyonda Sık Kullanılan Bazı Taşıyıcılar.....	21
1.7.2.1.	Kitosan.....	21
1.7.2.2.	Alginat .....	22
1.8.	Çalışmanın Kapsamı ve Amacı .....	23
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	24
2.1.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	24
2.2.	Kullanılan Cihazlar.....	25
2.3.	Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler .....	26
2.3.1.	Tampon Çözeltiler .....	26
2.3.2.	Kullanılan Katı Besiyeri.....	27
2.3.3.	Fermentasyon Ortamına İlave Edilen Çözeltiler .....	27
2.3.4.	Protein Tayin Çözeltileri .....	28
2.3.5.	Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler .....	28
2.3.6.	Substrat ve Enzim Aktivitesi Tayin Çözeltileri.....	29
2.3.7.	Diğer Çözeltiler .....	30
2.4.	Mikroorganizma .....	30
2.5.	Petri Testi .....	30
2.6.	Katı Faz Fermentasyon (SSF) Tekniği ile Fungusun Büyütülmesi.....	31
2.7.	Enzimin Fermentasyon Ortamından Ekstraksiyonu.....	31
2.8.	Enzim Aktivite Tayini .....	31
2.9.	Protein Tayini .....	32
2.10.	Katı Faz Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu .....	33
2.10.1.	En Uygun Katı Fazın Belirlenmesi .....	33
2.10.2.	Başlangıç pH'sının Belirlenmesi .....	33
2.10.3.	Nem Miktarının Belirlenmesi.....	34
2.10.4.	Fermentasyon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	34
2.10.5.	Fermentasyon Süresinin Belirlenmesi.....	34

2.10.6.	Çeşitli Kimyasal ve Deterjanların Enzim Üretimine Etkisi .....	34
2.11.	Enzimin Saflaştırılması .....	34
2.11.1.	Ultrafiltrasyon .....	34
2.11.2.	Nişasta Afinite Yöntemi ile Enzimin Saflaştırılması .....	35
2.11.3.	Saflaştırma İşleminin Optimizasyonu .....	35
2.11.4.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	36
2.12.	Serbest Enzimin İmmobilizasyonu.....	37
2.12.1.	Tutuklama Yöntemiyle Kalsiyum Alginata İmmobilizasyon .....	38
2.12.2.	Kovalent Bağlama Yöntemiyle Kitosana İmmobilizasyon .....	38
2.12.3.	İmmobilize Enzimlerde Aktivite Tayini.....	39
2.13.	Saf ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu .....	39
2.13.1.	Substrat Özgünlüğü .....	39
2.13.2.	Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi .....	39
2.13.3.	Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi .....	39
2.13.4.	Serbest Enzim Aktivitesine Protein Konsantrasyonun Etkisi .....	40
2.13.5.	Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	40
2.13.6.	Isıl Kararlılığın İncelenmesi.....	40
2.13.7.	pH Kararlılığının İncelenmesi .....	41
2.13.8.	Enzim Aktivitesine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	41
2.13.9.	Enzimlerin Tuz Toleransı.....	42
2.13.10.	Enzimlerin Proteaz Varlığındaki Kararlılıklarının İncelenmesi.....	42
2.13.11.	İmmobilize Enzimlerin Kullanım Sıklığının Belirlenmesi .....	42
2.14.	Enzimlerin Bazı Endüstriyel Alanlardaki Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	43
2.14.1.	Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Çeşitli Ticari Yıkama Deterjanları ile Uygunluğunun Test Edilmesi.....	43
2.14.2.	Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Yıkama Performansı Analizi .....	43
2.14.3.	Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Haşıl Alma Etkinliğinin Belirlenmesi .....	44
2.14.4.	Serbest ve Alginata İmmobilize Enzimin Meyve Suyu İşlenmesinde Kullanılması .....	45
2.15.	Serbest Enzimin Maltotetroz Üretim Üretmediğinin Belirlenmesi .....	45
3.	BULGULAR .....	46
3.1.	Petri Testi.....	46



3.2.	Katı Faz Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu .....	46
3.2.1.	En Uygun Katı Fazın Belirlenmesi .....	47
3.2.2.	Başlangıç pH'sının Belirlenmesi.....	47
3.2.3.	Nem Miktarının Belirlenmesi.....	48
3.2.4.	Fermentasyon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	49
3.2.5.	Fermentasyon Süresinin Belirlenmesi.....	49
3.2.6.	Çeşitli Kimyasal ve Deterjanların Enzim Üretimi Etkisi .....	50
3.3.	Enzimin Saflaştırılması .....	51
3.3.1.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	52
3.4.	Serbest Enzimin İmmobilizasyonu.....	55
3.5.	Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu .....	55
3.5.1.	Substrat Özgünlüğü .....	55
3.5.2.	Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi .....	56
3.5.3.	Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi .....	56
3.5.4.	Serbest Enzim Aktivitesine Protein Konsantrasyonun Etkisi .....	57
3.5.5.	Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	58
3.5.6.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	60
3.5.7.	pH Kararlılığının İncelenmesi .....	62
3.5.8.	Enzim Aktivitesine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	65
3.5.9.	Enzimlerin Tuz Toleransı.....	72
3.5.10.	Enzimlerin Proteaz Varlığındaki Kararlılıklarının İncelenmesi.....	74
3.5.11.	İmmobilize Enzimlerin Kullanım Sıklığının Belirlenmesi .....	74
3.6.	Enzimlerin Bazı Endüstriyel Alanlardaki Kullanılabilirliğinin İncelenmesi .....	75
3.6.1.	Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Çeşitli Ticari Yıkama Deterjanları ile Uygunluğunun Test Edilmesi .....	75
3.6.2.	Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Yıkama Performansı Analizi .....	76
3.6.3.	Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Haşıl Alma Etkinliğinin Belirlenmesi .....	78
3.6.4.	Serbest ve Alginata İmmobilize Enzimin Meyve Suyu İşlenmesinde Kullanılması .....	79
3.7.	Serbest Enzimin Maltotetroz Üretim Üretmediğinin Belirlenmesi .....	81
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	82
5.	ÖNERİLER .....	96

6.	KAYNAKLAR.....	97
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

*Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -AMİLAZININ KATI FAZ FERMENTASYON TEKNİĞİYLE ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE ÇEŞİTLİ ENDÜSTRİYEL ALANLARDAKİ KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

Ümit UZUN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Melike YILDIRIM AKATIN

2017, 111 Sayfa

Bu çalışmada, *Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34 fungusundan tarımsal bir atık olan mısır kepeği kullanılarak katı faz fermentasyon (SSF) tekniği ile ucuz bir şekilde ve bol miktarda  $\alpha$ -amilaz üretilmiştir. En iyi enzim üretimi için katı faz fermentasyon şartları başlangıç pH'sı 7,00, nem seviyesi %100, 28 °C'de 6 gün inkübasyon ve %1'lik nişasta ilavesi olarak belirlendi. Nişasta afinite tekniğiyle yapılan saflaştırma işlemi, 11,17 kat ve %5,32'lik verimle tek basamakta gerçekleşti. Serbest enzim kitosana %67,9, kalsiyum alginata %59,6 verimle immobilize edildi. Serbest ve immobilize enzimlerin en yüksek aktiviteyi nişasta varlığında gösterdiği tespit edildi. Serbest enzim, kitosana immobilize enzim ve kalsiyum alginata immobilize enzim için optimum değerler sırasıyla pH 5,50 ile 50 °C; pH 4,50 ile 40 °C ve pH 5,50 ile 60 °C olarak belirlendi. Enzimlerin Michaelis-Menten kinetiğini takip etmediği ve sigmoidal substrat doygunluk eğrilerine sahip oldukları tespit edildi. Isıl ve pH kararlılık çalışmalarında immobilize enzimlerin serbest enzime göre daha kararlı oldukları tespit edildi. İnce tabaka kromatografisi ile serbest enzimin 1 dakika reaksiyon sonunda açığa çıkardığı hidroliz ürünleri glukoz ve maltoz olarak belirlendi. Yıkama performansı analizi çalışmasında serbest ve kitosana immobilize  $\alpha$ -amilazların deterjanlarla beraber kullanıldıklarında reçel ve çikolata lekesi içeren kumaş parçalarını daha iyi temizledikleri tespit edildi. Serbest enzimin haşıl alma etkinliğinin kitosana immobilize enzime göre daha iyi olduğu görüldü. Kalsiyum alginata immobilizasyon sonucunda enzimin hem elma hem de portakal suyunu serbest enzime oranla daha fazla berraklaştırdığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34, Katı faz fermentasyonu, Nişasta afinite, Saflaştırma, İmmobilizasyon, Kitosan, Kalsiyum alginat, Karakterizasyon, Endüstriyel uygulamalar, Haşıl alma, Deterjan katkısı, Meyve suyu berraklaştırma

Master Thesis

SUMMARY

$\alpha$ -AMYLASE FROM *Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34: PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION, PURIFICATION, IMMOBILIZATION AND ANALYSIS OF THE USABILITY FOR VARIOUS INDUSTRIAL APPLICATIONS

Ümit UZUN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Melike YILDIRIM AKATIN  
2017, 111 Pages

In this study,  $\alpha$ -amylase from *Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34 fungus was produced cheaply and abundantly by solid substrate fermentation (SSF) technique using an agricultural waste corn bran. SSF conditions for the best enzyme production were determined as pH 7.00, 100% humidity level, 6 days incubation at 28 °C and 1% starch addition. The enzyme was purified by starch affinity technique with 11.17 fold and 5.32% recovery. Purified  $\alpha$ -amylase was immobilized on chitosan and calcium alginate with the efficiency of 67.9% and 59.6%, respectively. It was found that free and immobilized enzymes showed the highest activity in the presence of starch. Optimum values for free, chitosan immobilized and calcium alginate immobilized enzymes were pH 5.50 and 50 °C; pH 4.50 and 40 °C; pH 5.50 and 60 °C, respectively. The enzymes did not follow the Michaelis-Menten kinetics and had sigmoidal substrate saturation curves. It was found that immobilized enzymes were more stable than free enzyme in terms of thermal and pH stabilities. The hydrolysis products of the free enzyme released after 1 minute incubation were identified as glucose and maltose by thin layer chromatography. In the washing performance analysis study, it was found that free and chitosan immobilized enzymes cleaned better the pieces of fabric containing jam and chocolate when used with detergents. It was seen that the desizing activity of free enzyme was better than that of chitosan immobilized enzyme. As a result of calcium alginate immobilization, the enzyme clarified both apple and orange juices more than the free enzyme.

**Key Words:** *Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34, Solid state fermentation, Starch affinity, Purification, Immobilization, Chitosan, Calcium alginate, Characterization, Industrial applications, Desizing, Detergent additive, Juice clarification

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Amilazların üç boyutlu yapısı .....	6
Şekil 2. Amilopektin (a) ve amilozun (b) kimyasal yapısı .....	14
Şekil 3. Kovalent bağlama.....	16
Şekil 4. Adsorpsiyon (iyonik etkileşim) metoduyla immobilizasyon .....	18
Şekil 5. Çapraz bağlama metoduyla immobilizasyon .....	19
Şekil 6. Polimer matrikste tutuklama metoduyla immobilizasyon.....	20
Şekil 7. Mikrokapsülleme metoduyla immobilizasyon .....	21
Şekil 8. Kitosanın kimyasal yapısı .....	21
Şekil 9. Alginatın kimyasal yapısı.....	22
Şekil 10. <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 fungusunun amilolitik aktivitesinin tespiti .....	46
Şekil 11. SSF için en uygun katı fazın belirlenmesi.....	47
Şekil 12. SSF için en uygun başlangıç pH'sının belirlenmesi.....	48
Şekil 13. SSF için en uygun nem miktarının belirlenmesi .....	48
Şekil 14. SSF için en uygun fermentasyon sıcaklığının belirlenmesi .....	49
Şekil 15. SSF için optimum fermentasyon süresinin belirlenmesi.....	50
Şekil 16. SSF ortamına ilave edilen çeşitli kimyasalların enzim üretimine etkisi .....	50
Şekil 17. Doğal PAGE elektroforezi .....	53
Şekil 18. SDS-PAGE elektroforezi .....	54
Şekil 19. $R_f$ -logMA grafiği .....	54
Şekil 20. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	56
Şekil 21. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....	57
Şekil 22. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi .....	58
Şekil 23. <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının substrat doygunluk eğrisi.....	59
Şekil 24. Kitosana immobilize <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının substrat doygunluk eğrisi.....	59

Şekil 25. Kalsiyum alginata immobilize <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının substrat doygunluk eğrisi .....	60
Şekil 26. <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi.....	61
Şekil 27. Kitosana immobilize <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi.....	61
Şekil 28. Kalsiyum alginata immobilize <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi .....	62
Şekil 29. <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının pH kararlılığı eğrisi.....	63
Şekil 30. Kitosana immobilize <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının pH kararlılığı eğrisi .....	64
Şekil 31. Kalsiyum alginata immobilize <i>R. solani</i> AG4 ZB-34 $\alpha$ -amilazının pH kararlılığı eğrisi .....	65
Şekil 32. Bazı metal iyonları ve EDTA'nın serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	66
Şekil 33. Bazı metal iyonları ve EDTA'nın kitosana immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi.....	66
Şekil 34. Bazı metal iyonları ve EDTA'nın kalsiyum alginata immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi.....	67
Şekil 35. Bazı çözücülerin serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	68
Şekil 36. Bazı çözücülerin kitosana immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi .....	69
Şekil 37. Bazı çözücülerin kalsiyum alginata immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi .....	69
Şekil 38. Bazı deterjanların serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	70
Şekil 39. Bazı deterjanların kitosana immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi.....	71
Şekil 40. Bazı deterjanların kalsiyum alginata immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi .....	71
Şekil 41. Serbest enzimin tuz toleransı.....	72
Şekil 42. Kitosana immobilize enzimin tuz tolerans .....	73
Şekil 43. Kalsiyum alginata immobilize enzimin tuz toleransı.....	73
Şekil 44. Enzimlerin proteaz varlığındaki kararlılıklarının incelenmesi.....	74
Şekil 45. İmmobilize enzimlerin kullanım sıklığının belirlenmesi .....	75
Şekil 46. Serbest enzimin yıkama performansı analizi.....	77
Şekil 47. Kitosana immobilize enzimin yıkama performansı analizi.....	78
Şekil 48. Serbest enzimin meyve suyu berraklığına etkisi .....	79
Şekil 49. Kalsiyum alginata immobilize enzimin meyve suyu berraklığına etkisi .....	80
Şekil 50. %1'lik nişastanın serbest enzimle reaksiyonu sonucu açığa çıkan parçalanma ürünleri.....	81

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Glukoz içeren substratlar üzerinde etki gösteren $\alpha$ -amilaz ailesi (GH-13) enzimleri .....	5
Tablo 2. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler .....	24
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazların listesi .....	25
Tablo 4. Bradford yöntemi ile protein tayini pipetleme tablosu.....	32
Tablo 5. Doğal-PAGE bileşenleri.....	36
Tablo 6. SDS-PAGE bileşenleri.....	37
Tablo 7. Nişasta afinite yöntemiyle saflaştırma işlemi için saflaştırma tablosu .....	51
Tablo 8. Saflaştırma işlemi için en uygun nişasta cinsinin belirlenmesi.....	52
Tablo 9. Saflaştırma işlemi için en uygun nişasta miktarının belirlenmesi.....	52
Tablo 10. Serbest ve immobilize enzimlerin substrat özgünlüğü.....	55
Tablo 11. Serbest ve kitosana immobilize enzimin çeşitli ticari yıkama deterjanları ile uygunluğunun test edilmesi .....	76
Tablo 12. Serbest ve kitosana immobilize enzimin haşıl alma etkinliği .....	79
Tablo 13. Serbest ve kalsiyum alginata immobilize enzimin elma suyundaki bazı parametreler üzerine etkisi.....	80
Tablo 14. Serbest ve kalsiyum alginata immobilize enzimin portakal suyundaki bazı parametreler üzerine etkisi.....	81

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
atm	: Atmosfer basıncı birimi
BSA	: Sığır serum albumini
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNS	: Dinitro salisilik asit
EC	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
g	: Gram
$K_{0,5}$	: Allosterik bir enzim tarafından katalizlenen tepkimenin yarı en yüksek hızındaki substrat derişimi
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mA	: Miliamper
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NSS	: Nutrient salt solution
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PDA	: Patates dekstroz agar
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SSF	: Katı faz fermentasyonu
SmF	: Batık fermentasyon
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
U	: Enzim ünitesi



v/v : Hacim/hacim  
 $V_{maks}$  : Maksimum Hız  
w/v : Ağırlık/hacim  
 $\mu\text{M}$  : Mikromolar  
 $\mu\text{L}$  : Mikrolitre



## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Enzimler kimyasal reaksiyonları oldukça yüksek bir seçicilikle katalizleyen ve yüksek verimle ürün elde edilmesini sağlayan biyokatalizörlerdir. Bu reaksiyonlar, bütün canlıların temel metabolik reaksiyonlarıdır. Enzimlerin daha hızlı, daha etkili ve daha ekonomik biyokatalitik dönüştürücüler olmaları endüstriyel açıdan önemlerini artırmaktadır. Enzimler bu özellikleri ile yüzyıllardır yiyecek, tekstil, deterjan, ilaç ve kâğıt gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar (Koç, 2015).

Endüstriyel alanlarda üretimi ve kullanımı giderek önem kazanan enzimler, günümüz koşullarında bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Ancak, daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması gibi etkenlerden dolayı mikroorganizmalar, ticari enzim üretiminde tercih edilen önemli kaynaklar olmuştur. Ticari enzim piyasasında üretilen enzimlerin yaklaşık %17'si deterjan katkısı, %17'si gıda üretimi ve yem katkısı olarak kullanılırken, %17'si deri ve kâğıt endüstrisinde, %8'i tekstil endüstrisinde ve %41'i ilaç sanayisinde kullanılmaktadır (Iyer ve Ananthanarayan, 2008).

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

Biyokatalitik reaksiyonları etkileyen en önemli faktörler arasında sıcaklık ve pH gelir. Enzimlerin çoğu genellikle ılımlı sıcaklıklarda aktif olurken, belirli bir sıcaklığın üzerinde üç boyutlu yapıları bozulduğundan aktivite göstermezler. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği belli bir pH aralığı vardır. Ekstrem pH değerlerinde elektrostatik etkileşimler değiştiğinden aktiviteler değişir. Aktiviteyi değiştiren diğer bazı önemli faktörler de enzim ve substrat konsantrasyonu, inkübasyon zamanı, deterjanlar, metal iyonlarının varlığı ve şelatörler gibi katkı maddeleridir.

Bir hücrede her bir reaksiyon türü için farklı bir enzim grubu görev yapar. Enzimlerin temel özelliği katalitik fonksiyonları olduğundan sınıflandırılması da katalitik

fonksiyona göre yapılır. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) keşfedilen her bir yeni enzimi düzenlemek ve sistematik olarak adlandırmak için, 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonunu (EC) kurmuştur.

## 1.2. Nişasta Dönüştürücü Enzimler

Amilolitik enzimler yani nişastayı dönüştüren enzimler genel olarak endoamilazlar, ekzoamilazlar, dal kırıcı enzimler ve transferazlar olmak üzere dört grup altında incelenirler (Van der Maarel vd., 2002).

### 1.2.1. Endoamilazlar

Endoamilazlar, amiloz veya amilopektin zincirinin iç kısmında bulunan  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz eden enzimlerdir.  $\alpha$ -Amilaz (EC 3.2.1.1) iyi bilinen bir endoamilazdır.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesinin son ürünleri dallanmış oligosakkaritleri de içeren farklı uzunluktaki  $\alpha$ -konfigürasyonuna sahip oligosakkaritler ve  $\alpha$ -limit dekstrinlerdir.

### 1.2.2. Ekzoamilazlar

Ekzoamilazlar, amiloz ve amilopektinin uç kısmındaki glukoz birimleri üzerinde  $\alpha$ -1,4 veya  $\alpha$ -1,6 bağlarını indirgen olmayan uçtan başlayarak hidroliz ederek  $\alpha$ - veya  $\beta$ -anomerik ürünler oluştururlar ( $\beta$ -amilaz, glukoamilaz) (Pandey vd., 2000).

İkinci gruba ait enzimler olan ekzoamilazlar ya  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2) gibi  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağları ya da amiloglukozidaz veya glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ve  $\alpha$ -glukozidaz (EC 3.2.1.20) gibi hem  $\alpha$ -1,4 hem de  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağları parçalamaktadır. Ekzoamilazlar, amiloz veya amilopektinin uç glukoz birimleri üzerinde çalışan ve bu nedenle sadece glukoz (glukoamilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz) veya maltoz ve  $\beta$ -limit dekstrin ( $\beta$ -amilaz) üreten enzimlerdir.  $\beta$ -Amilaz ve glukoamilaz, ayrıca oluşan maltozun anomerik konfigürasyonunu  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya dönüştürür. Glukoamilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz, substrat tercihlerinde farklılık gösterirler:  $\alpha$ -glukozidaz, kısa maltooligosakkaritler üzerinde en iyi

şekilde etki gösterip  $\alpha$ -glukoz üretirken glukoamilaz uzun zincirli polisakkaritleri en iyi şekilde hidroliz eder (Pandey vd., 2000).

Diğer ekzo-etki eden amilolitik enzimler transglikozilasyon aktivitesine sahip olan siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19), maltoz açığa çıkaran maltojenik  $\alpha$ -amilaz (glukan 1,4- $\alpha$ -glukanhidrolaz, EC 3.2.1.133), maltotetroz (EC 3.2.1.60) ve maltoheksoz (EC 3.2.1.98) oluşturan amilazlardır (Diderichsen ve Christiansen, 1988; Robyt ve Ackerman, 1971; Momma, 2000).

### 1.2.3. Dal Kırıcı Enzimler

Nişasta dönüştürücü enzimlerin üçüncü grubu, sadece  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağları hidroliz eden dal kırıcı enzimlerdir: izoamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanaz tip I (EC 3.2.1.41). Pullulanazlar ve izoamilaz arasındaki en büyük fark,  $\alpha$ -1,6 bağı tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşan pullulan polisakkaritini hidroliz etme kabiliyetidir. Pullulanazlar, pullulan ve amilopektin içindeki  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağı hidroliz ederken, izoamilaz sadece amilopektin içindeki  $\alpha$ -1,6 bağını hidroliz edebilir (Bender vd., 1959; Israilides vd., 1999).

Hem  $\alpha$ -1,4 hem de  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağları hidroliz eden grup II pullulanazlar vardır. Bunlar  $\alpha$ -amilaz-pullulanaz veya amilopullulanaz olarak adlandırılır. Ana reaksiyon ürünleri maltoz ve maltotriozdur. Bu pullulanaz grubuna ait özel bir enzim, aynı zamanda yeni bir  $\alpha$ -1,4 veya  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağı oluşturarak transglikozilasyon yapabilen neopullulanazdır (Takata vd., 1992).

### 1.2.4. Transferazlar

Nişasta dönüştürücü enzimlerin dördüncü grubu, verici molekülün bir  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağını parçalayan ve vericinin bir kısmını yeni bir glikozidik bağ oluşturarak bir glikozidik alıcıya transfer eden transferazlardır. Amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19) gibi enzimler yeni bir  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağ oluştururken dallanma enzimi (EC 2.4.1.18) yeni bir  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağ oluşturur.

Siklodekstrin glikoziltransferazlar çok düşük bir hidrolitik aktiviteye sahiptirler ve 6, 7 veya 8 glukoz birimli siklik oligosakkaritler ve oldukça dallanmış yüksek molekül

ağırlıklı dekstrinler olan siklik oligosakkaritler oluştururlar (Takaha ve Smith, 1999; Van der Veen vd., 2000).

Amilomaltazlar enzimatik reaksiyon tipine göre siklodekstrin glikosiltransferazlara çok benzerdir. Aralarındaki en büyük fark, amilomaltazın bir transglikozilasyon reaksiyonu gerçekleştirmesi ve bunun sonucunda lineer bir ürün elde edilmesine, buna karşın siklodekstrin glikoziltransferazın siklik bir ürün vermesidir. Amilomaltazlar, farklı mikroorganizmalarda maltoz kullanımda veya glikojenin parçalanmasında da görev almaktadırlar (Takaha ve Smith, 1999).

### **1.3. $\alpha$ -Amilaz Ailesi**

Niştastayı dönüştüren enzimlerin çoğu amino asit sıra benzerliğine dayanılarak  $\alpha$ -amilaz ailesi veya aile 13 glikozid hidrolazlar (GH-13) grubuna dahil edilmişlerdir (Henrissat, 1991). Bu gruptaki enzimler Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. Glukoz içeren substratlar üzerinde etki gösteren  $\alpha$ -amilaz ailesi (GH-13) enzimleri (Reddy vd., 2003; Mojsov, 2012).

Enzim	EC numarası	Ana substrat
Amilosukraz	EC 2.4.1.4	Sakkaroz
Sukroz fosforilaz	EC 2.4.1.7	Sakkaroz
Glukan dallanma enzimi	EC 2.4.1.18	Nişasta, glikojen
Siklodekstrin glikoziltransferaz	EC 2.4.1.19	Nişasta
Amilomaltaz	EC 2.4.1.25	Nişasta, glikojen
Maltopentoz oluşturucu enzim	EC 3.2.1.-	Nişasta
$\alpha$ -Amilaz	EC 3.2.1.1	Nişasta
Oligo-1,6-glukozidaz	EC 3.2.1.10	Amilopektin
$\alpha$ -Glukozidaz	EC 3.2.1.20	Nişasta
Amilopullulanaz	EC 3.2.1.41	Pullulan
Siklomaltodekstrinaz	EC 3.2.1.54	Siklodekstrinler
İzopullulanaz	EC 3.2.1.57	Pullulan
İzoamilaz	EC 3.2.1.68	Amilopektin
Maltotetroz oluşturucu enzim	EC 3.2.1.60	Nişasta
Glukodekstranaz	EC 3.2.1.70	Nişasta
Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	EC 3.2.1.93	Trehaloz
Maltoheksoz oluşturucu amilaz	EC 3.2.1.98	Nişasta
Maltojenik amilaz	EC 3.2.1.133	Nişasta
Neopullulanaz	EC 3.2.1.135	Pullulan
Malto-oligosil trehalaz hidrolaz	EC 3.2.1.141	Trehaloz
Malto-oligosil trehalaz sentaz	EC 5.4.99.15	Maltoz

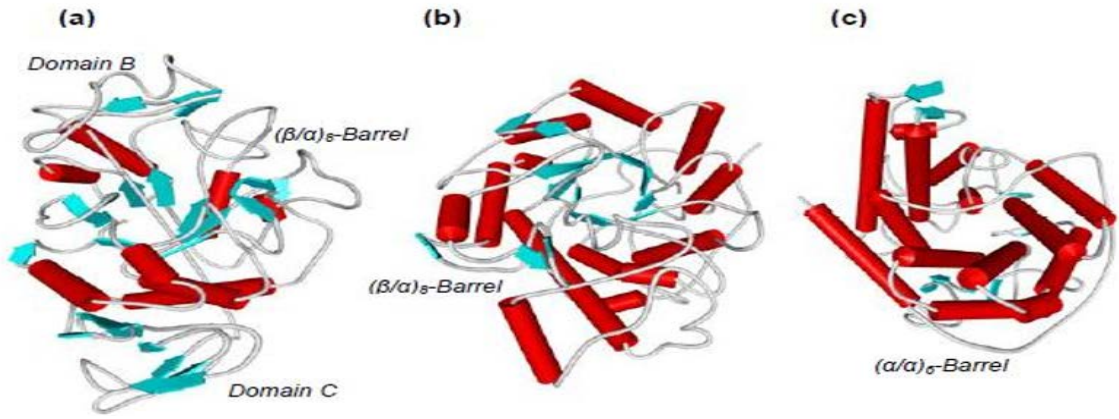
### 1.3.1. $\alpha$ -Amilazların Yapısı

Memeli ve bakteri  $\alpha$ -amilazları üzerinde yapılan X-ışını çalışmaları, bu amilazların A, B ve C olarak isimlendirilen üç farklı domain içerdiklerini göstermiştir.

A bölgesinde molekülün çekirdeği olarak ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> TIM-fiçı formu hakimdir ve üç aktif bölge amino asit birimini içermektedir (Asp231, Glu261 ve Asp328). B ve C bölgeleri

TIM-fiçı bölgesinin karşılıklı yanlarına yerleşmiştir. B bölgesi TIM-fiçı yapısının üçüncü sarmal ve üçüncü tabaka formunun arasında bir çıkıntı oluşturmuştur (Nielsen ve Borchert, 2000; Reddy vd., 2003). B bölgesi, yapısı ve büyüklüğü  $\alpha$ -amilaz ailesinin çeşitli üyeleri arasında değişen oldukça düzensiz ve zengin bir  $\beta$  tabaka yapısına sahiptir. Ayrıca bu bölge substrat bağlanma cebinin büyük bir kısmını içerir ve muhtemelen  $\alpha$ -amilazlar arasındaki substrat özgüllüğünün farklılıklardan sorumludur.

C bölgesi Yunan anahtarı motifini içeren bir  $\beta$ -sandviçtir ve amino asit dizisinin C-terminal ucundan oluşur (Nielsen ve Borchert, 2000). Memeli  $\alpha$ -amilazları birkaç disülfid köprüsü ihtiva ederken, bakteri amilazlarında genellikle bu yoktur.



Şekil 1. Amilazların üç boyutlu yapısı. (a) GH13 *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazı (b) GH14 soya fasulyesi  $\beta$ -amilazı (c) GH15 *Aspergillus awamori* glucoamilazı (Janecek, 2009).

$\alpha$ -Amilazlar  $\text{Ca}^{2+}$  bağımlı metalo enzimlerdir ve her bir amilaz en az bir  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu içermektedir. Bu  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının A ile B bölgesi arasındaki yüzeyde yer aldığı ve ayrıca aktif enzimin stabilitesini sağladığı bilinmektedir.  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin amilazlara bağlanma afinitesi diğer metal katyonlarına oranla daha yüksektir.  $\alpha$ -Amilazlar bir ile on arasında değişen sayılarda bağlı  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu ihtiva etmektedirler (Sivaramakrishnan vd., 2006).

### 1.3.2. $\alpha$ -Amilazların Üretim Kaynakları

$\alpha$ -Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar olmak üzere farklı kaynaklardan elde edilebilmelerinin yanında ticari olarak üretilenlerinin çoğu büyük oranda mikrobiyal kaynaklıdır ve mikrobiyal enzimler, nişasta işleme endüstrisinde tamamen kimyasal hidrolizin yerini almıştır (Koç, 2015).

Mikrobiyal  $\alpha$ -amilazların geniş bir endüstriyel uygulamaya sahip olmasındaki en büyük etken bitki ve hayvan enzimlerinden daha kolay ve ucuz üretilebilmeleri ile daha kararlı olmalarıdır. Mikroorganizmalardan üretilen  $\alpha$ -amilazların tercih edilmesinin en önemli avantajlarından biri ekonomik üretim kapasitesi diğeri ise istenilen özellikteki enzimlerin elde edilebilmesinin kolaylığıdır. Bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinin olması ve en önemlisi alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olması gerekmektedir (Wiseman, 1987).

#### 1.3.2.1. Bakteri $\alpha$ -Amilazları

$\alpha$ -Amilazlar mikroorganizmaların farklı türleri tarafından üretilmektedir. Fakat amilazların endüstriyel uygulamaları için genellikle *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. *Bacillus* türleri, ticari öneme sahip  $\alpha$ -amilazlar ve proteazlar gibi ekstraselüler enzimleri oldukça fazla miktarda üretirler. Başlıca *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* gibi organizmalar iyi  $\alpha$ -amilaz üreticileri olarak kullanılırlar. Bunlardan elde edilen enzimlerin gıda, fermantasyon, tekstil ve kâğıt endüstrilerinde ticari uygulama alanları bulunmaktadır (Souza ve Magalhaes, 2010).

#### 1.3.2.2. Fungus ve Maya $\alpha$ -Amilazları

$\alpha$ -Amilazlar bakteriler dışında fungus ve mayadan da elde edilirler. Fungus ve bakteri kaynaklı enzimlerin endüstriyel işlemlerde uygunluğunun diğeri enzim kaynaklarına göre daha çok olduğu bilinmektedir.  $\alpha$ -Amilaz üreten mezofilik funguslarla yapılan birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda fazla miktarda enzim üreten uygun özellikteki fungusu seçmek ve kültürel üretim koşullarının özelliğini belirlemek amaçlanmıştır (Gupta vd.,



2003). Fungal kaynaklar çoğunlukla *Aspergillus* ve *Penicillium* ile sınırlıdır. *A. oryzae* ve *A. niger* gibi hifli yapıya sahip olan funguslar yaygın olarak kullanılan endüstriyel enzimleri önemli miktarda üretirler. *A. oryzae* ticari olarak  $\alpha$ -amilaz üretiminde kullanılırken sitrik asit ile asetik asit gibi organik asitler hatta soya sosu gibi gıda maddelerinin üretiminde de büyük ölçüde kullanılmaktadır. *A. niger*'in  $\alpha$ -amilaz üretiminde asit toleransları ile bakteri kontaminasyonunu önleme gibi önemli bir özelliğe de vardır (Souza ve Magalhaes, 2010). Enzim üretiminde ayrıca *A. flavus*, *A. tamarie*, *A. fumigatus* ve *A. kawachii* gibi türlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Iftikhar vd., 2013.)

Fungal amilazlar GRAS (Generally Recognized as Safe: Genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde kabul gördüğü için, diğer mikrobiyal kaynaklara göre daha çok tercih edilirler (Gupta vd., 2003; Mobini-Dehkordi ve Javan, 2012). Fungal amilazlar genellikle 40 ile 60 °C arasında etkilidir ve optimum sıcaklıkları 50 °C civarındadır (Kumar vd., 2013). Ökaryotik organizmalar arasında nadir birkaç fungus türü 45 ile 55 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilme yeteneğine sahiptir. En düşük ve en yüksek büyüme sıcaklıkları temel alınarak bu tür funguslar termofilik ve termotolerant türler olarak ikiye ayrılırlar. Termofilik funguslar, en düşük 20 °C, en yüksek 60 °C, en iyi 40-55 °C arasında üreyebilirler. Termotolerant funguslar ise en iyi 25-40 °C arasında büyürken 50 °C'de yavaş üreyebilmektedir (Halil ve Kalkancı, 2008). Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus* iyi bir amilaz üreticisidir (Mobini-Dehkordi ve Javan, 2012).

Amilaz üretiminde kullanılan mayalar ise *Saccharomyces* sp., *Cryptococcus* sp. ve *Filobasidium capsuligenum*'dur (Mojsov, 2012).

### 1.3.3. $\alpha$ -Amilazların Biyokimyasal Özellikleri

$\alpha$ -Amilazların özellikleri, farklı türde mikroorganizmalardan izole edilerek geniş olarak araştırılmıştır (Gupta vd., 2003).  $\alpha$ -Amilazlar geniş bir pH skalasına sahiptir ve optimum pH'ları 2,0 ile 12,0 arasında değişir (Wanderley vd., 2004). En yüksek kararlılığa sahip oldukları pH değerleri ise çoğunlukla pH 4,0 ile 11,0 arasındadır. Ayrıca dar bir pH aralığında kararlılığa sahip olan  $\alpha$ -amilazlarda bildirilmiştir (Gupta vd., 2003; Sharma ve Satyanarayana, 2013).

$\alpha$ -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık ve ısıl kararlılık genellikle elde edildikleri mikroorganizmalara göre değişir. Isıl kararlı amilazlar endüstriyel işlemlerde oldukça fazla avantaja sahiptir; kontaminasyon riskinin azalması, harici soğutma

maliyetinin azalması, substratların daha iyi çözünmesi, pompalama ve karıştırmaya izin veren düşük vizkoziteler gibi (Naidu ve Saranraj, 2013).

$\alpha$ -Amilazların substrat özgünlüğü mikroorganizmalar arasında farklılık gösterir. Ancak, amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz gibi diğer substratlar ile kıyaslandığında, nişastaya karşı daha yüksek bir afinite gösterirler (Sharma ve Satyanarayana, 2013).

Bazı metal katyonları ve ağır metal iyonları, sülfidril grup ajanları, N-bromosüksinimid, p-hidroksilmerkuribenzoik asit, iyodoasetat, EDTA ve EGTA  $\alpha$ -amilazları inhibe eder.  $\alpha$ -Amilazlar, yapılarında en az bir tane  $Ca^{2+}$  iyonu bulundurduklarından dolayı metaloenzimdirler ve kalsiyuma affinitesi diğer iyonlardan daha kuvvetlidir (Gupta vd., 2003).

$\alpha$ -Amilazların moleküler ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında değişmektedir. En küçük molekül ağırlığı *Bacillus caldolyticus*  $\alpha$ -amilazı için 10 kDa, en büyük molekül ağırlığı *Chloroflexus aurantiacus*  $\alpha$ -amilazı için 210 kDa olarak bildirilmiştir (Ratanakhanokchai vd., 1992; Gupta vd., 2003).

#### 1.3.4. $\alpha$ -Amilazların Katı Faz Fermentasyonu (SSF) ile Üretimi

Enzimler binlerce yıldır peynir, yoğurt, bira ve şarap gibi yiyecek ve içeceklerin üretilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Renge vd., 2012). Endüstride enzimlere olan talep arttıkça etkin üretim teknikleri ve ticari uygulamalara uygun daha iyi özelliklere sahip enzimlerin geliştirilmesine olan ilgi git gide artmaktadır.  $\alpha$ -Amilaz üretimine çeşitli fizikokimyasal faktörlerin etkisi, batık veya derin kültür fermentasyonu (SmF; Submerged Fermentation) ile katı faz fermentasyonu (SSF; Solid State Fermentation) kullanılarak araştırılır (Sivaramakrishnan vd., 2006; Souza ve Magalhaes, 2010; Iftikhar vd., 2013). Genellikle batık fermentasyon (SmF) yöntemi sıcaklık ve pH gibi faktörlerin kolay kontrol edilebilmesi sebebi ile çok yaygın kullanılmasına rağmen SSF teknikleri,  $\alpha$ -amilaz üretimi için çok uygundur ve SSF'nin SmF'ye göre oldukça fazla avantajlı noktaları mevcuttur (Facciotti vd., 1989). Bunları şöyle sıralayabiliriz;

- SSF'de mikroorganizmanın büyümesi daha fazla olduğu için daha iyi bir enzim üretimi sağlanmaktadır.

- SmF'de kullanılan sentetik büyüme ortamı bileşenleri oldukça pahalı olduklarından ekonomik değillerdir. SSF'de ise ekonomik değeri olmayan tarımsal sanayi artıkları kullanıldığından büyüme ortamının maliyeti önemli derecede düşürülmüş olur.
- SSF'de kullanılan katı faz yalnızca kültür için besin sağlamaz aynı zamanda mikrobiyal hücrelere barınak hizmeti de verir.
- SSF'de ürün geri kazanımı SmF'ye göre çok daha fazladır.
- SmF'de ciddi problem oluşturan katabolik baskılama ve proteazlar tarafından proteinlerin yıkımı SSF'te çoğunlukla az oranda veya hiç meydana gelmemektedir.

#### 1.3.4.1. Katı Faz Fermentasyonunda Fizikokimyasal Parametreler

SSF'de enzim üretimini etkileyen fizikokimyasal parametrelerin en önemlileri büyüme ortamının içeriği, ortam pH'sı, inokulum yaşı, sıcaklık, havalandırma, karbon ve azot kaynaklarıdır (Sivaramakrishnan vd., 2006).

$\alpha$ -Amilaz üretiminde çoğunlukla fruktoz, glukoz, galaktoz, sakkaroz, dekstroz içeren karbon kaynakları, bazı endüstriyel atıklar (hurma şurubu ve melas) ve tarımsal atıklar (şeker kamışı küspesi, pirinç kabuğu, mısır ve arpa kepeği) kullanılır (Bhutto vd., 2010; Iftikhar vd., 2013). Enzim üretiminde inorganik ve organik azot kaynakları olarak mısır maserasyon sıvısı (corn steep liquor), kazein, maya özütü, tripton, amonyum nitrat, potasyum nitrat, sodyum nitrat ve amonyum klorür gibi maddeler oldukça fazla kullanılır (Souza ve Magalhaes, 2010; Iftikhar vd., 2013).

Büyüme ortamına eklenen bazı metal iyonları mikroorganizmanın daha iyi büyümesini ve daha iyi enzim üretimini sağlamaktadır. Metal iyonlarının  $\alpha$ -amilaz üretimindeki yeri oldukça önemlidir. Bunun nedeni ise amilazların metalloenzim olmaları ve kataliz, yapısal bütünlük ve stabilite için  $Ca^{2+}$  iyonlarına gerek duymalarıdır (Gupta vd., 2003; Sivaramakrishnan vd., 2006; Iftikhar vd., 2013).

Kültür ortamının pH'sı, enzim salgılanması açısından ve organizmanın morfolojik değişmesine neden olduğundan oldukça önemli fizyolojik parametreler arasındadır. Organizmanın büyümesi boyunca değişiklik gösteren pH, ortamda oluşan ürün stabilitesini etkiler. Daha önce yapılan çalışmalar fungusların optimum büyümeleri için hafif asidik pH, bakterilerin optimum büyümesi için nötral pH gerektiği göstermiştir (Sivaramakrishnan vd., 2006). Pek çok fungusun büyümesi ve  $\alpha$ -amilaz üretimi için optimum pH aralığının 5,0-6,0 olduğu bildirilmiştir (Khoo vd., 1994).

Büyüme ortamındaki enzim üretimi, organizmanın hangi sıcaklıkta büyüdüğü ile yakından ilgilidir. Bu nedenle fermentasyon için optimum sıcaklık mikroorganizmanın mezofilik mi yoksa termofilik mi olduğuna bağlıdır (Reddy vd., 2003).

Büyüme ortamındaki nem miktarı  $\alpha$ -amilaz üretimi açısından oldukça önemli bir parametredir. Düşük nem seviyelerinde mikroorganizmanın gelişmesi yeterli olamayacağından enzim üretimi fazla değildir (Balkan ve Ertan, 2010).

Büyüme ortamındaki mikroorganizmanın günlük olarak gelişmesi ortama salınan enzim miktarını değiştirir. İnkübasyon zamanının fazla olması enzim üretimini olumsuz etkiler. Aşırı fazla büyüyen hücreler ortamdaki besinin azalmasına veya zararlı etki yapabilen metabolitlerin oluşumuna neden olurlar (Irfan vd., 2012).

Fungal fermentasyonlarda çalkalama derecesi, oksijen değişim sıklığı ve karıştırma da etkilidir. Çalkalama misel yapısını ve üretim şeklini etkilemektedir. Yüksek çalkalama hızlarında misel büyümesi zarar gördüğü için, enzim üretiminin azalmasına sebep olur (Gupta vd., 2003; Naidu ve Saranraj, 2013).

### **1.3.5. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Ölçüm Metotları**

$\alpha$ -Amilaz aktivitesi genellikle çözünebilir nişasta veya modifiye nişasta substratı varlığında tayin edilir.  $\alpha$ -Amilazlar nişasta moleküllerindeki  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağları hidrolizler ve glukoz, dekstrinler ve limit dekstrinlerin oluşumuna neden olurlar.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi, indirgen şeker miktarındaki artış veya iyotla muamele edilmiş substratın renk şiddetindeki azalış ölçülerek belirlenir (Priest, 1977).

#### **1.3.5.1. Dinitrosalisilik Asit (DNS) Metodu**

Bu metot nişastayla  $\alpha$ -amilaz enziminin etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarındaki artışın belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi fonksiyonel aldehit veya keton gruplarının oksidasyonuna dayanır. Serbest aldehit veya keton grubuna sahip şekerler alkali koşullar altında 3,5-dinitro salisilik asidi, 3-amino-5-nitro salisilik aside indirgeyerek kırmızı, kahverengi renk oluşumuna neden olurlar. Renk şiddetindeki artış indirgen şeker miktarıyla orantılıdır (Bernfeld, 1955).

### 1.3.5.2. İyot Renk Şiddetinde Azalma Metodu

Nişasta, I<sub>2</sub>/KI reaktifi ile koyu mavi renkli bir kompleks oluşturur. Nişastanın  $\alpha$ -amilaz enzimi ile kademeli hidrolizi sonucu koyu mavi renkli kompleksin rengi kırmızı, kahverengine dönüşür. Renk şiddetindeki bu azalma 620 nm'de substrat körüne karşı ölçülür ve %1'lik azalma bir enzim ünitesi olarak tanımlanır (Hollo ve Szeitli, 1968).

### 1.4. $\alpha$ -Amilazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Nişasta veya nişasta kullanılan endüstrilerde hidrolitik enzimler arasında en önemlisi  $\alpha$ -amilazlardır. Amilazlar ticari açıdan ilk olarak 1984 yılında metabolik bozuklukları tedavi edici olarak kullanılmıştır. Günümüz endüstriyel proseslerinde amilazlar, gıdadan tekstile, deterjanlardan kâğıt endüstrisine ve hayvan yemlerinin iyileştirilmesine kadar çok farklı sahalarda kullanım alanına sahiptir. Bunlara ilaveten  $\alpha$ -amilazların ilaç sanayinde ve saf kimyasal üretim endüstrisinde de uygulama olanaklarının olduğu rapor edilmiştir (Gupta vd., 2003). Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi onların substrat özgünlükleri, optimum pH, ısıl kararlılık gibi özellikleri ile alakalıdır (Souza ve Magalhaes, 2010). Literatür verileri incelendiğinde, her bir endüstrinin ihtiyaç duyduğu  $\alpha$ -amilazın biyokimyasal özelliklerinin farklılık gösterdiği görülür. Örneğin gıda endüstrisinde özellikle fırıncılık ve pastacılıkta 40-50 °C sıcaklıklarda kararlı  $\alpha$ -amilazlar tercih edilmektedir.  $\alpha$ -Amilazların asıl ticari pazarı nişasta hidrolizatı üretiminde, özellikle nişastanın glukoz ve fruktoz şuruplarına dönüştürülmesi işlemidir. Bu şuruplar yüksek oranda fruktoz içerirler ve alkolsüz içeceklerin tatlandırılmasında ve pastacılıkta kullanılırlar. Nişasta hidrolizinde oldukça ısıl kararlı  $\alpha$ -amilazların gerekli olduğu rapor edilmiştir (Gupta vd., 2003).

Tekstil endüstrisinde  $\alpha$ -amilazlar haşıl alma süreçlerinde kullanılmaktadır. Kâğıt endüstrisinde, mukavemeti artırmak için kâğıt üretilirken nişasta ile muamele edilir. Nişasta kâğıda presleme esnasında katılır ve bu sayede kâğıt iki pres rulo arasından geçerken nişasta ile muamele edilmiş olur. Bu işlem için 45-60 °C arasında değişen sıcaklıklara ihtiyaç vardır. Ancak işlem esnasında kullanılan doğal nişastanın viskozitesi, kâğıdın kaplanması için oldukça yüksektir. Viskozite doğal nişastanın, sürekli proseslerde veya bir tank içerisinde  $\alpha$ -amilazlar ile muamele edilmesi ile düzenlenir (Kıran ve Çömlekçioğlu Dostbil, 2006).

Deterjan endüstrisinde  $\alpha$ -amilazlar şeker polimerlerinin hidrolizi amacıyla kullanılmaktadır. Enzim içeren deterjanlar içermeyenlere kıyasla daha ılıman koşullarda etkinlik gösterirler. Günümüzde sıvı deterjanların yaklaşık %90'ı  $\alpha$ -amilaz içermektedir ve bulaşık makinesi deterjanları için bu enzime duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır (Gupta vd., 2003). Deterjan formülasyonunda kullanılacak  $\alpha$ -amilaz enziminin nispeten düşük sıcaklıklarda ve alkali pH'larda aktivite göstermesi, oksitleyicilere karşı dayanıklı olması istenilen özelliklerdir (Souza ve Magalhaes, 2010). Daha önce de ifade edildiği gibi farklı endüstriyel proseslerin ihtiyacı tek kaynaktan elde edilen  $\alpha$ -amilazlar tarafından karşılanamaz. Bu sebeple farklı endüstriyel uygulamaların ihtiyaç duyduğu  $\alpha$ -amilazların farklı organizmalardan saflaştırılmasına ve protein mühendisliği uygulamaları ile özelliklerinin değiştirilmesine dönük çalışmalar sürdürülmektedir (Haki ve Rakshit, 2003).

Meyve suyu endüstrisinde  $\alpha$ -amilaz enzimi özellikle armut ve elma sularının üretim aşamasında berraklaştırma işleminde kullanılır. Meyve suları hazırlanırken toplanan meyvelerin tam olgunlaşmamış olanlarındaki nişasta oranı çok yüksektir ve meyve suyunda bulanıklığa neden olur. Bu sorun  $\alpha$ -amilaz kullanılarak giderilir. Meyve suyu endüstrisinde enzimlerin kullanılması, verimin artırılmasının yanında kararlılık ve berraklığın artırılması, acılığın giderilmesi aynı zamanda meyve dehidrasyon hızının artırılması gibi birçok farklı uygulama alanlarına sahiptir (Uludağ, 2000).

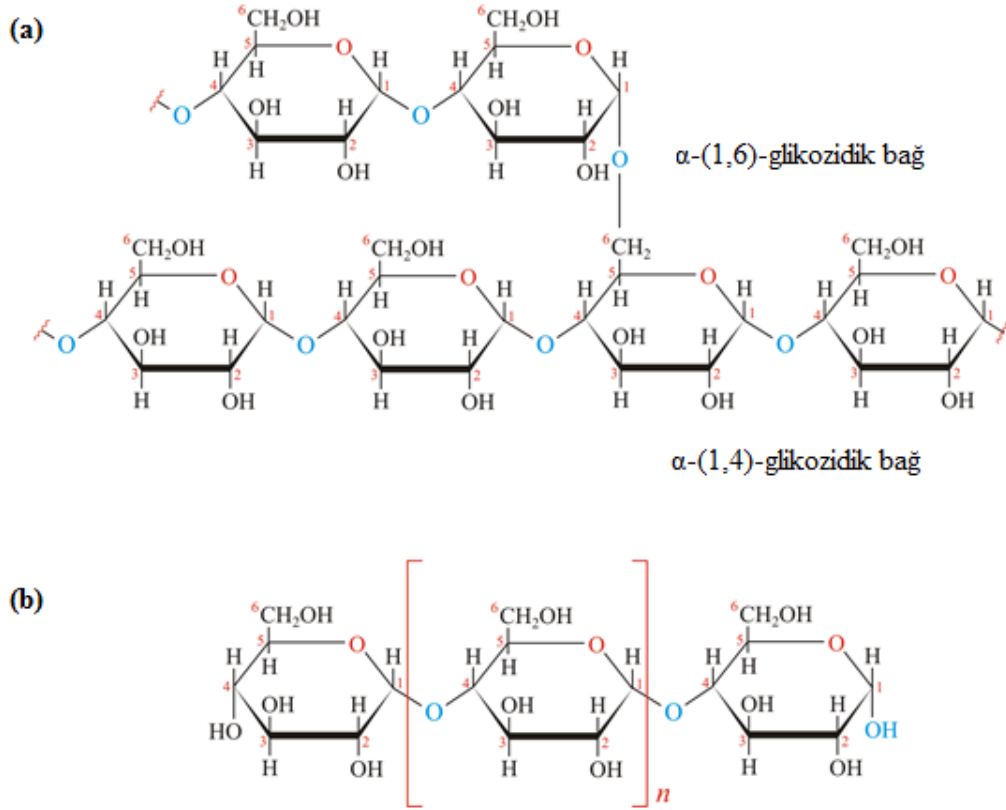
Sıcaklık, tuz konsantrasyonu ve pH gibi ekstrem koşullara toleranslı ve yeni fizyolojik özelliklere sahip  $\alpha$ -amilazlar üreten mikroorganizmaların keşfi günümüzde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bir enzimin tuz toleransının yüksek olması, o enzimin yüksek tuz konsantrasyonu gerektiren endüstriyel işlemlerde de kullanıma uygun olabileceğini göstermiştir (Banerjee vd., 2001; Cordeiro vd., 2002).

### 1.5. Nişasta

Diyette kullanılan karbohidratların ana kaynağı olan nişasta, bitkilerde yumru, bakliyat ve tohumların amiloplastlarında ve kloroplastlarda granül olarak depolanır. Bir depo polisakariti olan nişasta, glukoz moleküllerinin  $\alpha$ -D-(1,4) ve  $\alpha$ -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmuştur (Koç, 2015).

Nişastanın iki yapısal ana bileşeni amilopektin ve amilozdur. Amilopektin glukoz monomerlerinin  $\alpha$ -D-(1,4) ve  $\alpha$ -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan dallanmış yapıya büyük bir moleküldür ve nişastanın ana bileşenidir (Şekil 2a). Amiloz, ise

glukoz monomerlerinin  $\alpha$ -D-(1,4) glikozidik bağıyla bir araya gelmesiyle oluşmuş doğrusal bir polimerdir ve nişastanın %15-20'sini oluşturur (Şekil 2b). Ayrıca amiloz iyotla mavi renkte bir kompleks oluştururken amilopektin menekşe renkli kompleks meydana getirir (Bamforth, 2003).



Şekil 2. Amilopektin (a) ve amilozun (b) kimyasal yapısı (McDowall, 2017).

### 1.6. Enzimlerin Saflaştırılması

Saflaştırma işleminde öncelikle saflaştırılacak enzimin ne için gerekli olduğuna karar verilmelidir. Genel olarak analitik ve ilaç sanayi çalışmaları için az ama saflık derecesi yüksek, sanayide kullanım için ise çok ama saflık derecesi fazla olmayan enzim kullanımı gerekmektedir.

Saflaştırma işlemlerinde enzimin kaynağı (bitki, insan, hayvan veya mikroorganizma) ve yapılacak işlem de önemlidir. Saflaştırma işlemlerinde maliyet çok yüksek olmakta birlikte uzun süre gerektirmektedir. Saflaştırmada malzemenin seçimi çok

iyi planlanıp eldeki imkânlarla göre yapılmaya çalışılmalı, kullanılacak alternatif yollar, araçlar ve kimyasal maddeler belirlenmelidir.

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 teknikler olduğu için saflaştırmanın kısa zamanda, daha az adımda ve ucuz olan metotlarla yapılması tercih edilmektedir (Koç, 2015).

### 1.7. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimlerin endüstride ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim insanlarını bu katalizörleri daha geniş ve daha kullanışlı hale getirme olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilişkin ortaya çıkan pek çok sorunu olumlu yönde çözümleyebilmek ve enzimleri endüstriyel açıdan daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonuna olan ilgi giderek artmaktadır (Telefoncu, 1997). İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

- Reaksiyon sonunda süzme ve santrifüjleme gibi yöntemlerle ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşmaz.
- İmmobilize enzimler çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler.
- Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- Serbest enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda, serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

Enzim immobilizasyonu, ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik olarak kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma

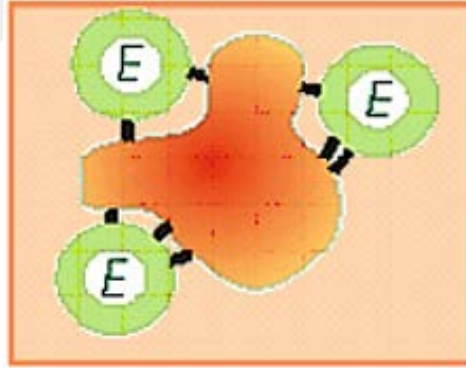


üremesine olanak vermemesine, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997).

### 1.7.1. Günümüzde En Çok Tercih Edilen İmmobilizasyon Metotları

#### 1.7.1.1. Kovalent Bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genelde sulu ortamda gerçekleştirilir ve en çok kullanılan polimer matriksi kitosandır. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Aksi takdirde enzimin konformasyonel yapısı değişebileceğinden aktivite kayıpları olabilmektedir (URL 1 ve 2, 2017). Kovalent bağlama Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Kovalent bağlama (Kasavi, 2006).

Kovalent bağlamada enzim taşıyıcısı aşağıdaki işlemlerin bir tanesi gerçekleştirerek bağlanmaktadır (URL-1, 2017);

- Diazotizasyon: Taşıyıcı-N=N-Enzim
- Amid Bağı Oluşumu: Taşıyıcı-CO-NH-Enzim
- Alkilasyon ve Arilasyon: Taşıyıcı-CH<sub>2</sub>-NH-Enzim, Taşıyıcı-CH<sub>2</sub>-S-Enzim
- Schiff Baz Oluşumu: Taşıyıcı-CH=N-Enzim
- Amidasyon Reaksiyonu: Taşıyıcı-CNH-NH-Enzim

- Tiyol-Disülfit Yer Değiştirmesi: Taşıyıcı-S-S-Enzim
- Ugi Reaksiyonu
- Civa-Enzim Yer Değiştirmesi

### 1.7.1.2. Adsorpsiyon

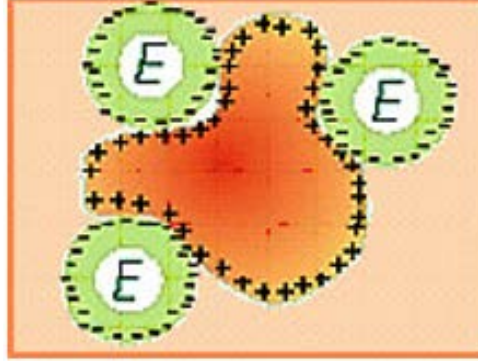
Adsorpsiyon yöntemi, enzim immobilizasyonu için oldukça kolay bir yöntem olup adsorpsiyon için kullanılan materyaller genellikle aktif karbon, alümina ve iyon değiştirici reçinelerdir. Oldukça ucuz ve basit bir yöntem olmasına rağmen enzim ile matriks arasındaki bağlanmanın zayıf olması bir dezavantajdır (Roseveare vd, 1987). Enzim ve matriks yüzeyi arasındaki etkileşimler iyonik etkileşimler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler veya van der Waals etkileşimleri şeklindedir.

Yöntem, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır.

Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıya adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlerle değişebilir. Bu faktörlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorpsiyon mekanizması genellikle çok karışık olup, birçok olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğini önceden saptanması güçtür.

Prensip olarak, bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda tersinir olmayan adsorpsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabiliyorsa, bu tür adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için idealdir. Desorpsiyon, reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine ve aktivitede sürekli bir değişmeye neden olur. Tersinir adsorpsiyonlar enzim immobilizasyonu için pek uygun değildir.

İmmobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyonu gerçekleştirirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlaması adsorpsiyon yönteminin yararları arasında sayılabilir. Ancak her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzimle taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur (Telefoncu, 1997). Adsorpsiyon metoduyla immobilizasyon Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Adsorpsiyon (iyonik etkileşim) metoduyla immobilizasyon (Kasavi, 2006).

### 1.7.1.3. Çapraz Bağlama

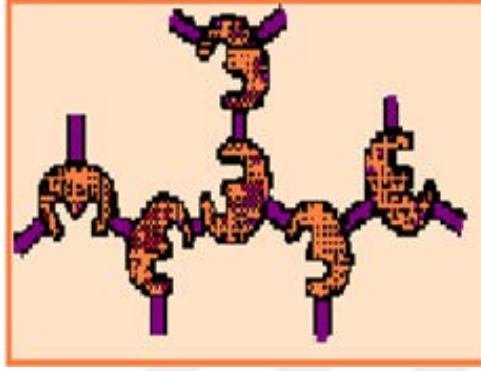
Küçük moleküllü, bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında kovalent bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ya da immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında, intramoleküler bağlanmalar da söz konusu olmaktadır.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleşir;

- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutraldehit, kloroformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, transiyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Çapraz bağlama reaksiyonu çok ılımlı koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Enzimler bu şekilde birbirlerine bağlandıklarında jelatinimsi bir yapı oluştururlar, bu nedenle mekanik bakımdan çok kararsızlardır. Çok sayıda enzimin diğer

enzimler için matriks olarak davranmasından dolayı bu metot iyi bir immobilizasyon metodu değildir (Telefoncu, 1997). Çapraz bağlama metoduyla immobilizasyon Şekil 5'te verilmiştir.



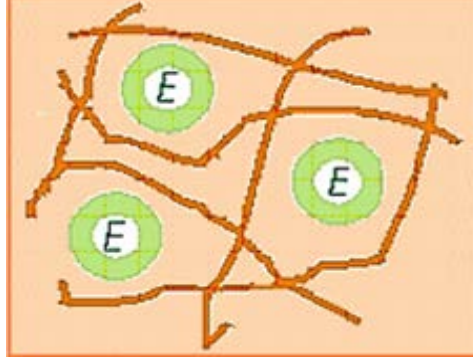
Şekil 5. Çapraz bağlama metoduyla immobilizasyon (Kasavi, 2006).

#### 1.7.1.4. Polimer Matrikste Tutuklama

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekânda durmaya zorlamaktır. Böylelikle enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem, polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik; enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama metoduyla immobilizasyonda substratın içeri girmesine izin verilirken, enzim içeride muhafaza edilmektedir (Bickerstaff, 1997; URL-1, 2017).

Tutuklama metodu; monomer (akrilamid), oligomerik ve polimerik (kolajen, jelatin, kalsiyum alginat) maddelerden elde edilen, suda çözünmeyen polimer jellerde gerçekleşir. Tutuklama sırasında sıcaklık, iyonik kuvvet, pH değişir ve çapraz bağlanma reaksiyonu oluşur (URL-2, 2017). Bu yöntemin en önemli avantajı tekil enzimlerin dışında değişik tipte enzim, organel ve hücrelerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Ayrıca biyokatalizörlerin çeşitli modifikasyonlara uğramamaları ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkisini elimine etmesi de yöntemin avantajları arasında sayılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı substratların

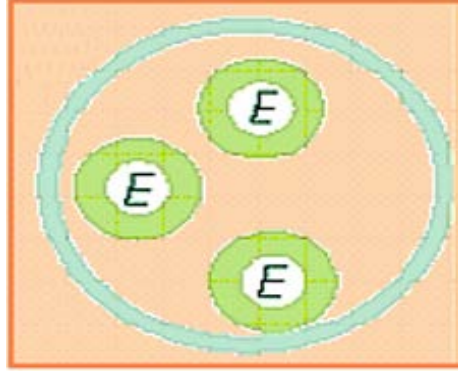
enzime ulaşamaması ise yöntemin dezavantajlarından (Aehle, 2003). Polimer matrikse tutuklama metoduyla immobilizasyon Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Polimer matrikste tutuklama metoduyla immobilizasyon (Kasavi, 2006).

#### 1.7.1.5. Mikrokapsülleme

Mikrokapsülleme enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100  $\mu\text{m}$  arasında değişir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntemle immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır (Bradford, 1976). Mikrokapsülleme metoduyla immobilizasyon Şekil 7'de verilmiştir.

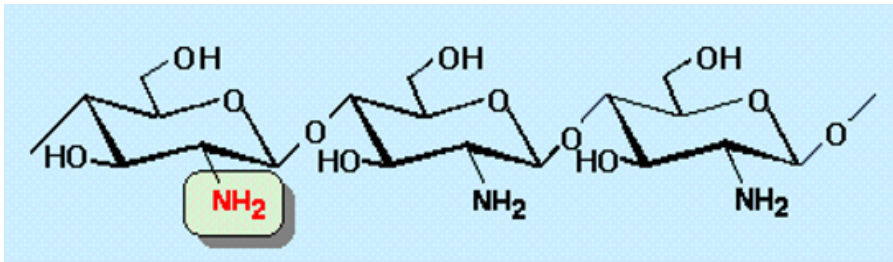


Şekil 7. Mikrokapsülleme metoduyla immobilizasyon (Kasavi, 2006).

## 1.7.2. İmmobilizasyonda Sık Kullanılan Bazı Taşıyıcılar

### 1.7.2.1. Kitosan

Kitosan, kitinden türetilen modifiye bir polisakarittir ve kitinin deasetilizasyonu ile üretilmektedir. Şekil 8’de yapısı görülen kitosan,  $\beta$ -(1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cN) ve  $\beta$ (1→4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cNAc) birimlerinden oluşan lineer bir heteropolisakarittir. Kitosan, 3 çeşit reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. C-3, C-6 pozisyonunda birer hidroksil ve C-2 pozisyonunda ise bir amino grubu bulunmaktadır (Bickerstaff, 1997; Kırkköprü ve Alpaslan, 2004).



Şekil 8. Kitosanın kimyasal yapısı (URL-3, 2017).

Günümüzde kitosanın doğal özelliklerinden dolayı birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Biyouyumluluğu, toksik olmayan yapısı, fizyolojik olarak kararlı olması, antibakteriyel yapısı, hidrofilik olması, kolay jel oluşturma özelliği ve proteinlere karşı

yüksek afinitesinden dolayı da enzim immobilizasyon çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir (Krajewska, 2003).

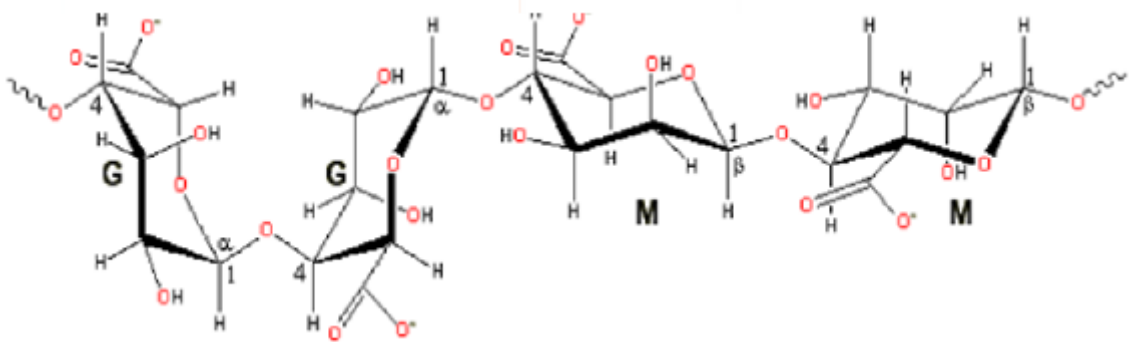
Ancak kitosanın immobilizasyonda kullanımından önce aktive edilmesi gerekir. Kitosanın aktivasyonu çeşitli reaktifler vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bunlar CNBr, epoksit, CDI, sülfonil klorür, periyodat, triazin, diazonyum, glutaraldehid, N-hidroksisüksinimid, divinil sülfon ve nitrofenil kloroformat olarak sıralanabilir (Shukla ve Jajpura, 2005; Esawy vd., 2008).

### 1.7.2.2. Alginat

Alginat deniz yosunlarında bulunan bir polisakkarit olup (Şekil 9), aralarında  $\beta(1-4)$  glikozidik bağları olan D-manuronik (M) asit ve  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağları olan L-guluronik asit (G)'ten meydana gelen organik bir bileşiktir (Kırkköprü ve Alpaslan, 2004).

Alginat iki ve üç değerlikli kanyonlar ile reaksiyona girerek jel oluşturur.  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  gibi kanyonlar, moleküldeki glukronik asitleri birbirlerine bağlayarak jel oluşumuna sebep olurlar. İyonik bağlı jel 0-100 °C arasındaki sıcaklıklarda kararlıdır.

Çözünmeyen kalsiyum alginat jelde tutuklama, enzimlerin immobilizasyonu için hızlı, toksik, pahalı olmayan ve çok yönlü bir metottur.



Şekil 9. Alginatın kimyasal yapısı (Kırkköprü ve Alpaslan, 2004).

### 1.8. Çalışmanın Kapsamı ve Amacı

Çalışmada kullanılacak olan *R. solani* AG4 ZB-34 fungusu 2011 yılında Erzincan ili Üzümlü ilçesinden alınan fasulye baklalarından elde edilmiş (Demirci ve Döken, 1991) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Erkol DEMİRCİ'nin kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Önerilen bu çalışma kapsamındaki amacımız, çoğunlukla yurt dışından ticari olarak tedarik edilen ve birçok endüstriyel alanda çok önemli kullanım alanlarına sahip olan özellikle mezofilik karakterli bir  $\alpha$ -amilazı üretmek ve ticari hale getirebilmek için ilk adımları atmaktır. Bu amaç doğrultusunda hedeflerimiz *R. solani* AG4 ZB-34 fungusundan katı faz fermentasyon tekniğiyle  $\alpha$ -amilazı ucuz bir şekilde bol miktarda üretmek, üretilen enzimi saflaştırıp uygun destek ortamlarına immobilize etmek ve immobilize enzimin özellikle deterjan, tekstil, gıda alanlarındaki uygunluğunu belirlemek için çalışmalar yapmaktır. Bu çalışmalarla, istenilen özelliklere sahip mezofilik fungal bir  $\alpha$ -amilazın üretilmesi ile yurt dışından ticari olarak tedarik edilen enzim miktarının azaltılarak ülke ekonomisine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzemeler	Firma
Streptomisin sülfat tuzu	Sigma-Aldrich
Kimyasal madde ve çözücüler	Fluka, Sigma-Aldrich, Merck, AppliChem
İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri	Sigma-Aldrich
Qubit Protein Assay kiti	Life Technologies
SDS-PAGE Standardı (14,4 kDa-116 kDa)	Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker

## 2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz İsmi	Marka	Model
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Bio-Rad	Mini PROTEAN-Tetra Sistem
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 100 XL
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Santrifüj	Hermle	Z36-HK
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Hava Banyolu Çalkalayıcı	IKA	KS 4000
Su Banyosu	Memmert	WBU 45
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100
Vorteks	Thermolyne	Type 37600
Otoklav	Tomy	SX700E
Terazi	Ohaus	Pioneer
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Derin Dondurucu	Regal	RDD-1280
Steril Kabin	Tezsan	-

### 2.3. Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler

Yapılan deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltilerin, içerikleri ve hazırlanışları aşağıda alt başlıklar halinde verilmiş olup bütün çözeltiler saf su ile hazırlanmıştır.

#### 2.3.1. Tampon Çözeltiler

- 50 mM Glisin-HCl (pH 3,00): 0,3798 g glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 3,00'a ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat (pH 4,00): 0,6804 g NaAc.3H<sub>2</sub>O uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 4,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat (pH 4,50): 0,6804 g NaAc.3H<sub>2</sub>O uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 4,50'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat (pH 5,00): 0,6804 g NaAc.3H<sub>2</sub>O uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 5,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat (pH 5,50): 0,6804 g NaAc.3H<sub>2</sub>O uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 5,50'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat (pH 6,00): 0,6409 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,0505 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> uygun hacimde saf suda çözüldü. pH'sı 6,00'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat (pH 7,00): 0,4180 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,3300 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> uygun hacimde saf suda çözüldü. pH'sı 7,00'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat (pH 8,00): 0,0950 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,7490 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> uygun hacimde saf suda çözüldü. pH'sı 8,00'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,00): 0,6057 g Tris bazı uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 8,00'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Tris-HCl ( pH 9,00): 0,6057 g Tris bazı uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 9,00'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH (pH 9,00): 0,3799 g glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 9,00'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

### 2.3.2. Kullanılan Katı Besiyeri

Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri: 39 g patates dekstroz agar (potato dextrose agar, PDA) ve 0,05 g streptomisin sülfat tuzu uygun hacimde saf suda çözüldü ve hacmi 1 L'ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edilerek petrilere döküldü ve donduktan sonra 4 °C'de saklandı.

### 2.3.3. Fermentasyon Ortamına İlave Edilen Çözeltiler

- pH 3,00 Nutrient Tuz Çözeltisi (NSS): 0,05 g streptomisin sülfat tuzu, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g NaCl, 0,1  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1 g  $\text{CaCl}_2$  uygun hacimde saf suda çözüldü, pH'sı 1 M HCl ile pH 3,00'a ayarlandı ve hacmi 1 L'ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi ve 4 °C'de saklandı.
- pH 5,00 Nutrient Tuz Çözeltisi (NSS): 0,05 g streptomisin sülfat tuzu, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g NaCl, 0,1  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1 g  $\text{CaCl}_2$  uygun hacimde saf suda çözüldü, pH'sı 1 M HCl ile pH 5,00'a ayarlandı ve hacmi 1 L'ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi ve 4 °C'de saklandı.
- pH 7,00 Nutrient Tuz Çözeltisi (NSS): 0,05 g streptomisin sülfat tuzu, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g NaCl, 0,1  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1 g  $\text{CaCl}_2$  uygun hacimde saf suda çözüldü, pH'sı 1 M NaOH ile pH 7,00'a ayarlandı ve hacmi 1 L'ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi ve 4 °C'de saklandı.
- pH 9,00 Nutrient Tuz Çözeltisi (NSS): 0,05 g streptomisin sülfat tuzu, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g NaCl, 0,1  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1 g  $\text{CaCl}_2$  uygun hacimde saf suda çözüldü, pH'sı 1 M NaOH ile pH 9,00'a ayarlandı ve hacmi 1 L'ye tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi ve 4 °C'de saklandı.

### 2.3.4. Protein Tayin Çözeltileri

- Sığır Serum Albümin (1 mg/mL): 5 mg sığır serum albümin (bovine serum albümin, BSA) uygun hacimde saf suda çözüldü, hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve -30 °C'de saklandı. Konsantrasyonu 1 mg/mL olan bu çözelti tayin esnasında ¼ oranında seyreltilerek kullanıldı.
- Coomassie Brilliant Blue G250: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 50 mL metanolde çözüldü. Whatman No 1 süzgeç kâğıdından süzüldü. Üzerine 100 mL fosforik asit ilave edildi ve hacmi steril saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

### 2.3.5. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 9,085 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,80'e ayarlandı, hacmi 50 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 6,057 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,80'e ayarlandı, hacmi 50 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 5 g SDS saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -30 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,80), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptetanol'ün karıştırılması ile hazırlandı, kısımlara ayrılarak -30 °C'de saklandı.

- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,30'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,80), 100µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -30 °C'de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,30'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.
- Lugol Çözeltisi: %7 I<sub>2</sub> ve %3 KI ihtiva etmektedir. Doğal jelde amilaz enzim aktivitesini ortaya koymak amacıyla 25 kat seyreltilerek kullanıldı.

### 2.3.6. Substrat ve Enzim Aktivitesi Tayin Çözeltileri

- Nişasta Çözeltisi (%1): 0,1 g çözünen nişasta uygun hacimde kaynar suda çözüldü, oda sıcaklığına soğutuldu ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- β-Siklodekstrin Çözeltisi (%1): 0,1 g β-siklodekstrin saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Maltoz Çözeltisi (%1): 0,1 g maltoz saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Maltotrioz Çözeltisi (%1): 0,1 g maltotrioz saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Amilopektin Çözeltisi (%1): 0,1 g amilopektin saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Glikojen Çözeltisi (%1): 0,1 g glikojen saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Çözelti A: %1'lik NaOH çözeltisi içinde %10 (v/v) olacak şekilde fenol çözeltisi (Sigma-P4557) ilave edildi.

- Çözelti B: 0,345 g sodyum bisülfid, 3,45 mL Çözelti A içinde çözüldü.
- Çözelti C: 0,44 g dinitrosalisilik asit (DNS) 44 mL saf suda çözüldü. Üzerine 15 mL %4,5 NaOH çözeltisi ilave edildi. Bu çözeltiliye 11,25 g sodyum potasyum tartarat ilave edildi.
- Dinitro salisilik asit (DNS) çözeltisi: Çözelti B ve Çözelti C'nin karıştırılması ile hazırlandı.

### 2.3.7. Diğer Çözeltiler

- Kalsiyum Klorür Çözeltisi (1 M): 14,7 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'ın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- EDTA Çözeltisi (50 mM): 1,86 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  yaklaşık 80 mL saf suda çözüldü ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- %2'lik Na-Alginat çözeltisi: 0,4 g sodyum alginat 15 mL saf suda çözüldü ve hacmi 20 mL'ye tamamlandı.
- Etanol Çözeltisi (%80): 80 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

### 2.4. Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan *R. solani* AG4 ZB-34 fungusu, 50 µg/mL streptomisin sülfat tuzu içeren PDA üzerinde 28 °C'de 3 gün büyütüldü ve 4 °C'de saklandı.

### 2.5. Petri Testi

*R. solani* AG4 ZB-34 fungusunun amilolitik aktivite testi, PDA besiyeri kullanılarak belirlendi. Bunun için %1 nişasta ve 50 µg/mL streptomisin sülfat tuzu içeren besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Besiyeri 40-50 °C'ye soğuduktan sonra petrilere dökülerek donması sağlandı. Stok fungus, PDA besiyeri içeren petrinin tam ortasına inoküle edilerek, 28 °C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrinin üzerine lugol çözeltisi döküldü (Moller vd., 2004).

## 2.6. Katı Faz Fermentasyon (SSF) Tekniği ile Fungusun Büyütülmesi

Deneyleyler ağzı pamukla kapatılmış 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirildi. Erlen içine 5 g katı faz ve pH'sı 7,00 olan 5 mL nutrient tuz özeltisi (NSS) koyulup iyice karıştırıldıktan sonra 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 40 dakika steril edildi. İçerik, soğduktan sonra, her biri 5 mm çapında olan 2 adet fungal disk ile inoküle edildi. Bunu takiben 28 °C sıcaklıkta 6 gün inkübe edilerek fungusun büyümesi sağlandı.

## 2.7. Enzimin Fermentasyon Ortamından Ekstraksiyonu

SSF ortamından  $\alpha$ -amilazın ekstraksiyonu için büyümiş fungusu içeren fermente substrata 50 mL 50 mM pH 7,00 fosfat tamponu ilave edilip 200 rpm'de 45 dakika çalkalandı. Materyal, No. 1 filtre kağıdından süzöldü ve filtrat 4 °C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice alındı ve ham enzim özütü olarak kullanıldı.

## 2.8. Enzim Aktivite Tayini

Yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, indirgen şeker miktarındaki artışın dinitro salisilik asit (DNS) metodu ile spektrofotometrik olarak belirlenmesi ile tayin edildi.

Enzim aktivitesini belirlemek için kör, kontrol ve örnek tüpleri hazırlandı.

Kör tüpü; 650  $\mu$ L tampon + 50  $\mu$ L substrat + 700  $\mu$ L DNS

Kontrol tüpü; 650  $\mu$ L tampon + 50  $\mu$ L enzim + 700  $\mu$ L DNS

Örnek tüpü; 600  $\mu$ L tampon + 50  $\mu$ L enzim + 50  $\mu$ L substrat + 700  $\mu$ L DNS

Substrat olarak uygun tamponda hazırlanmış %1'lik çözünür nişasta kullanıldı. Substrat ve enzim çözeltilerinin karıştırılması ile elde edilen karışım 25 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözeltiye çözeltinin hacmi kadar DNS reaktifini ilave edilerek vortekslendi ve renk oluşumu için 10 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Oda sıcaklığına getirilen reaksiyon karışımlarının absorbansı, 540 nm'de köre karşı okundu. Kontrol tüpünün absorbans değerini örnek tüplerinin absorbans değerlerinden çıkartıldı.



Böylece enzim tarafından açığa çıkarılan indirgen şekerlerin absorbands değerleri belirlenmiş oldu. Bir enzim ünitesi, dakikada 1  $\mu\text{mol}$  glukozu eşdeğer miktarda indirgen şeker açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı (Miller, 1959).

## 2.9. Protein Tayini

Protein tayini Bradford yöntemiyle ve standart olarak BSA (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kullanılarak yapıldı (Bradford, 1976). Tablo 4'teki pipetlemeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri elde edildi. Bu çözeltiler üzerine 1/5 oranında seyreltilmiş Commassie Brilliant Blue G250 boyasından 1000'er  $\mu\text{L}$  ilave edildi. 5 dakika karanlıkta bekletilen tüplerin absorbandsları BSA yerine steril saf su içeren köre karşı 595 nm'de ölçüldü.

Tablo 4. Bradford yöntemi ile protein tayini pipetleme tablosu

	Kör	Standart 1	Standart 2	Standart 3	Standart 4	Standart 5	Standart 6	Standart 7
BSA (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	-	4	8	16	32	48	64	80
Saf su ( $\mu\text{L}$ )	200	196	192	184	168	152	136	120
Commassie Brillant Blue G250 ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Elde edilen absorbandslar kullanılarak standart çalışma grafiği çizildi ve numunelerdeki protein miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandı.

Ayrıca bazı çalışmalarda protein tayini Qubit Protein Assay Kiti kullanılarak yapıldı.

Qubit çalışma çözeltisi; 1  $\mu\text{L}$  Qubit reaktifi ile 199  $\mu\text{L}$  Qubit tamponunun karıştırılmasıyla hazırlandı.

- Qubit protein standartları (standart 1 (0 ng/ $\mu$ L), standart 2 (200 ng/ $\mu$ L) ve standart 3 (400 ng/ $\mu$ L) kullanılarak her birinden ayrı ayrı 10  $\mu$ L alındı, üzerlerine 190  $\mu$ L Qubit çalışma çözeltisi koyuldu ve tüpler 2-3 saniye karıştırıldı.
- Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve Qubit 2.0 Fluoremeter cihazında okutularak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.
- Daha sonra 1  $\mu$ L enzim çözeltisi ile 199  $\mu$ L Qubit çalışma çözeltisi tüpte 2-3 saniye karıştırıldı.
- Karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve Qubit 2.0 Fluoremeter cihazında okutulup protein miktarı tayin edildi.

## 2.10. Katı Faz Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu

*R. solani* AG4 ZB-34'den  $\alpha$ -amilaz üretimini maksimum seviyeye çıkarılabilmek için fermentasyon şartları değiştirilerek denemeler yapıldı. Bu amaçla, katı faz, başlangıç pH'sı, nem miktarı, fermentasyon sıcaklığı, fermentasyon zamanı ve çeşitli kimyasalların enzim üretimine etkisi incelendi.

### 2.10.1. En Uygun Katı Fazın Belirlenmesi

*R. solani* AG4 ZB-34'den  $\alpha$ -amilaz üretiminde en uygun katı fazı belirlemek için katı faz olarak mısır kepeği, buğday kepeği ve arpa kepeği kullanıldı. Ekim ve büyütme işlemleri "2.6 Katı Faz Fermentasyon (SSF) Tekniği İle Fungusun Büyütülmesi" kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Enzimler ekstrakte edildikten sonra protein ve aktivite tayinleri yapıldı (Ikram-Ul-Haq vd., 2012).

### 2.10.2. Başlangıç pH'sının Belirlenmesi

Başlangıç pH'sının enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla nemlendirici olarak kullanılan NSS'nin pH'sı 1 M NaOH/HCl ile 3,00; 5,00; 7,00 ve 9,00 olarak ayarlandı. Diğer şartlar değiştirilmeden fermentasyon işlemleri tekrarlandı. Enzimler ekstrakte edildikten sonra protein ve aktivite tayinleri yapıldı (Irfan vd., 2012).

### **2.10.3. Nem Miktarının Belirlenmesi**

Nem miktarının etkisi gram mısır kepeği başına kullanılan NSS hacmi değiştirilerek yapıldı. Bu amaçla ayrı ayrı erlenlerdeki 5'er gramlık mısır kepekleri üzerine 2 mL (%40), 3 mL (%60), 4 mL (%80), 5 mL (%100) ve 6 mL (%120) pH'sı 7,00 olan NSS çözeltisi ilave edildi ve 28 °C'de 6 gün fermentasyon yapıldı (Balkan ve Ertan, 2010).

### **2.10.4. Fermentasyon Sıcaklığının Belirlenmesi**

Fermentasyon sıcaklığının enzim üretimine etkisini incelemek için 20, 28 ve 35 °C'de büyütme işlemleri gerçekleştirildi. 5 g mısır kepeğine, pH'sı 7,00 olan, 5 mL NSS çözeltisi ilave edilerek 6 gün fermentasyon yapıldı (Deb vd., 2013; Gautam vd., 2013).

### **2.10.5. Fermentasyon Süresinin Belirlenmesi**

SSF'de büyütülen funguslardan 8 gün boyunca 2'şer gün aralıklarla enzim ekstrakte edildi ve aktiviteleri bakılarak optimum büyüme zamanı belirlendi (Irfan vd., 2012).

### **2.10.6. Çeşitli Kimyasal ve Deterjanların Enzim Üretimine Etkisi**

Çeşitli kimyasal ve deterjanların enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla fermentasyon ortamına %1 (w/w, v/w) olacak şekilde maya ekstrağı, pepton, üre, sakkaroz, nişasta, SDS, Triton X-100 ve Tween 20 ilave edildi ve optimum şartlarda fermentasyon yapılarak aktivite tayini yapıldı (Kunamneni vd., 2005; Tsegaye ve Gessesse, 2014).

## **2.11. Enzimin Saflaştırılması**

### **2.11.1. Ultrafiltrasyon**

Ham enzim özütünü konsantre etmek için ultrafiltrasyon yapıldı. Ham enzim özütü 30000 MWCO Milipore ile 4 °C'de 7000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi birkaç kez tekrarlandı.

### 2.11.2. Nişasta Afinite Yöntemi ile Enzimin Saflaştırılması

Nişasta afinite yöntemiyle *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazını saflaştırmak için 50 mL ham özüt üzerine 2 g mısır nişastası ilave edildi ve 4 °C'de 140 rpm'de 1 saat karıştırılarak enzimin nişastaya tutunması sağlandı. Sürenin sonunda 4 °C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Çökelek, bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için 50 mM pH 7,00 fosfat tamponu ile yıkandı. Bunun için çökeleğin üzerine 4 °C'de bekletilmiş olan 50 mL, 50 mM pH 7,00 fosfat tamponu ilave edildi ve 4 °C'de 140 rpm'de 5 dakika karıştırıldı. Bunun ardından 4 °C 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıp süpernatant atıldı. Çökelek önceden 40 °C'de bekletilmiş olan 50 mL 50 mM pH 7,00 fosfat tamponu ile 40 °C'de 140 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılarak enzimin nişastadan ayrılması sağlandı. Elüsyonun sonunda karışım 4 °C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, çökelek atıldı ve üstte kalan sıvı kısım ultrafiltrasyonla deriştirilerek saf enzim kaynağı olarak kullanıldı ve 4 °C'de saklandı (Najafi ve Kembhavi, 2005).

### 2.11.3. Saflaştırma İşleminin Optimizasyonu

Saflaştırma işleminin hangi nişasta ile daha etkili olduğunu belirleyebilmek için ev tipi mısır nişastası (Güneş), buğday nişastası (Dr. Oetker) ve patates nişastası (Migros) kullanılarak saflaştırma işlemleri yapıldı.

Afinite saflaştırması için en uygun elüsyon zamanının belirlenmesi amacıyla 50 mL ham özüt ve 2 g mısır nişastası kullanılarak aynı şekilde saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi. Saf enzimin nişastadan ayrılabilmesi için yapılan 40 °C'deki elüsyon işlemi 1 saat ve 2 saat olacak şekilde gerçekleştirildi.

Afinite saflaştırması için en uygun nişasta miktarının belirlenmesi amacıyla 50 mL ham enzim özütlerine ayrı ayrı %2, %4, %6 ve %8 (w/v)'lik olacak şekilde mısır nişastası ilave edilip saflaştırma işlemleri yapıldı. Sonrasında her bir durumda saf enzimlerin spesifik aktiviteleri tayin edildi.

#### 2.11.4. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Doğal PAGE %5'lik yığma jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 5) (Maniatis vd., 1989).

Tablo 5. Doğal-PAGE bileşenleri

Bileşenler	%5'lik Yığma Jeli	%8'lik Ayırma Jeli
Saf Su	2,74 mL	4,61 mL
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67 mL	2,7 mL
1,5 M Tris Tamponu (pH 8,80)	--	2,5 mL
1,5 M Tris Tamponu (pH 6,80)	0,5 mL	--
%10'luk Amonyum persülfat	0,04 mL	0,1 mL
SDS (%10 w/v)	--	--
TEMED	0,004 mL	0,006 mL

Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler kuyucuklara doldurulduktan sonra yığma jeli boyunca 25 mA ve ayırma jeli boyunca 30 mA akım sisteme verilerek proteinlerin ayrılması sağlandı. Yürütme işlemi boyunca elektroforez tankı bir buz banyosu ile soğutuldu. Elektroforezin bitiminde jelle hem zimogram analizi hem de Coomassie Brilliant Blue R250 boyama işlemi uygulandı. Zimogram analizi için jelin yarısı, yürütme işlemi sonunda oda sıcaklığında %1'lik nişasta çözeltisi ile 45 dakika muamele edildi. Nişastanın aşırısını uzaklaştırmak amacıyla jel birkaç kez tamponla yıkandı ve 15 dakika pH 7,00 fosfat tamponunda bekletilip lugol çözeltisi ile muamele edildi. Diğer yarısına Coomassie Brilliant Blue R250 boyama çözeltisi ilave edildi ve yavaş bir şekilde 10 dakika sallanarak bekletildi. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ise, %5'lik yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 6) (Maniatis vd., 1989).

Tablo 6. SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	%5'lik Yığma Jeli	%10'luk Ayırma Jeli
Saf Su	2,7 mL	4 mL
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67 mL	3,3mL
1,5 M Tris Tamponu (pH 8,80)	--	2,5 mL
1,5 M Tris Tamponu (pH 6,80)	0,5 mL	--
% 10'luk Amonyum persülfat	0,04 mL	0,1 mL
SDS (% 10 w/v)	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 40 µg saf protein içeren enzim çözeltisi SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Bu şekilde denatüre olan proteinler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yığma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektroforez uygulamasından sonra tanktan çıkarılan jel Coomassie Brilliant Blue R250 ile yukarıda belirtildiği şekilde boyandı. Moleküler ağırlık standartları kullanılarak  $R_f$  değerleri vasıtasıyla enzimin alt birimlerinin molekül ağırlıkları tayin edildi.

## 2.12. Serbest Enzimin İmmobilizasyonu

*R. solani* AG4 ZB-34 fungusundan elde edilen  $\alpha$ -amilaz için yapılan immobilizasyon çalışmalarında enzim tutuklama metoduyla kalsiyum-alginata, kovalent bağlama metoduyla kitosana immobilize edildi.

### 2.12.1. Tutuklama Yöntemiyle Kalsiyum Alginata İmmobilizasyon

%2'lik (w/v) sodyum alginat çözeltisinin 5 mL'si 50 °C'ye kadar ısıtıldı ve sodyum alginatın çözünmesi sağlandı. Oda sıcaklığına kadar soğuyan çözeltiliye uygun hacimde serbest enzim çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Hava kabarcıkları gidene kadar bekletildi. Bu karışım bir şırınga yardımı ile 1 M kalsiyum klorür üzerine yavaşça damlatıldı, 4 °C'de 1 saat hafifçe karıştırılarak kalsiyum alginat-enzim boncukların oluşması sağlandı ve boncuklar 4 °C'de 24 saat olgunlaşmaya bırakıldı. Olgunlaşan boncuklar Materyal, No. 1 filtre kâğıdından süzülüp 1 saat açık havaya maruz bırakıldı. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için boncuklar art arda ve her defasında 5 mL saf su ile yıkandı. Yıkama işlemine süzüntülerde protein tespit edilmeyinceye kadar devam edildi (Talekar ve Chavare, 2012).

### 2.12.2. Kovalent Bağlama Yöntemiyle Kitosana İmmobilizasyon

Bir gram kitosana %2,5 (v/v) glutaraldehit içeren 100 mL 0,1 M HCl çözeltisi ilave edilip oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda 2 saat yavaşça karıştırıldı. Üzerine 10 mL 0,1 M NaOH ilave edilip oluşan partiküller filtre kâğıdından süzüldü. Saf su ile yıkama işlemi yapılarak reaksiyona girmeyen glutaraldehitin uzaklaşması sağlandı. Islak kitosana enzim çözeltisinin uygun hacmi ilave edilerek magnetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için birkaç defa 5'er mL saf su kullanılarak yıkama işlemleri yapıldı. Yıkama işlemine süzüntülerde protein tespit edilmeyinceye kadar devam edildi. Filtrattaki toplam protein konsantrasyonu belirlendi ve enzimin %immobilizasyon verimi hesaplandı.

Yapılan immobilizasyon çalışmalarındaki tüm verim hesapları aşağıdaki eşitlik vasıtasıyla belirlendi (Kumari ve Kayastha, 2011).

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = (C_1 - C_0) / C_1 * 100$$

$C_1$ : İmmobilizasyondan önce çözeltilideki protein miktarı

$C_0$ : İmmobilizasyondan sonra çözeltilide kalan protein miktarı

### **2.12.3. İmmobilize Enzimlerde Aktivite Tayini**

Bu çalışmada bir mikrosantrifüj tüpte 0,1 g nemli immobilize enzim tartıldı ve üzerine 100 µL %1'lik çözünür nişasta ile 700 µL 50 mM pH 7,00 fosfat tampon ilave edildi. 50 °C'de 15 dakika reaksiyon gerçekleştirildikten sonra immobilize enzim mini santrifüjde hızlı santrifüjleme ile ayrıldı. Reaksiyon karışımından 0,7 mL alınarak bir mikrosantrifüj tüp içinde eşit hacimde DNS reaktifi ile karıştırıldı. 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilen tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra 540 nm'de immobilize enzim yerine boş katı destek maddesi içeren köre karşı absorbansları ölçüldü ve aktiviteler hesaplandı.

### **2.13. Saf ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu**

#### **2.13.1. Substrat Özgünlüğü**

Serbest ve immobilize enzimlerin substrat özgünlüğünü belirleyebilmek amacıyla nişasta, glikojen, amilopektin, maltoz, maltotrioz ve β-siklodekstrin substratları kullanılarak aktivite tayini gerçekleştirildi ve en yüksek aktiviteye sahip substrat belirlendi.

#### **2.13.2. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi**

Serbest ve immobilize enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek amacıyla 50 mM konsantrasyonda Glisin-HCl (pH 3,00), sodyum asetat (pH 4,00, 4,50, 5,00, 5,50), fosfat (pH 6,00, 7,00, 8,00) ve Glisin-NaOH (pH 9,00) tamponları kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı (Yildirim Akatin, 2013). En yüksek aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktiviteler hesaplandı ve pH-bağıl aktivite (%) grafiği çizildi. Belirlenen optimum pH değeri, daha sonra yapılmış olan çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

#### **2.13.3. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi**

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için 10-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 10 °C'lik artışlarla aktivite tayinleri yapıldı. En



yüksek aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktiviteler hesaplandı ve sıcaklık (°C)-bağıl aktivite (%) grafiği çizildi. Belirlenen optimum sıcaklık değeri, daha sonra yapılacak olan çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

#### **2.13.4. Serbest Enzim Aktivitesine Protein Konsantrasyonunun Etkisi**

Bu çalışmada substrat konsantrasyonu sabit tutularak reaksiyon karışımındaki son protein konsantrasyonu 0,028-7,142 µg/mL olacak şekilde optimum pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlarla protein miktarına karşı aktivite grafiği çizildi.

#### **2.13.5. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla serbest enzim için %0,0008-%0,1700, kitosana immobilize enzim için %0,0045-%0,3500 ve kalsiyum alginata immobilize enzim için %0,0019-%0,1977 aralığında değişen nişasta konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Aktivite tayinleri daha önce belirlenen optimum şartlarda ve üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize enzimlere ait substrat doygunluk eğrileri elde edildi ve sonrasında  $K_{0,5}$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı (Nelson ve Cox, 2004).

#### **2.13.6. Isıl Kararlılığın İncelenmesi**

Serbest ve immobilize enzimlerin bazı sıcaklıklardaki ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla, enzim 4 °C (depolama sıcaklığı), 28 °C (fermentasyon sıcaklığı), 40, 50 ve 60 °C'lerde (optimum sıcaklıklar) 120 dakika bekletildi. Bu süre zarfında 15., 30., 60., 90. ve 120. dakikalar sonunda optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. %Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış serbest ve immobilize enzimlerin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı ve zaman-%kalan aktivite grafiği çizildi.

### 2.13.7. pH Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılığını incelemek amacıyla, serbest enzim çözeltisi reaksiyon karışımındaki protein miktarı 0,725 µg/mL olacak şekilde pH 5,50 asetat, pH 7,00 ve 8,00 fosfat tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Elde edilen karışım 4 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilerek belirli aralıklarda optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Aynı şekilde hazırlanmış fakat hiç inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının da optimum şartlar altında aktiviteleri belirlendi ve bu değerler %100 olarak kabul edildi. Böylelikle inkübasyona maruz bırakılan enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı.

İmmobilize enzimler için pH kararlılığı aynı şekilde incelendi. Bunun için immobilize enzimlerden 0,1 g alınarak üzerine 100 µL tampon ilave edildi ve 4 °C belli sürelerde bekletilerek aktivite tayini gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış immobilize enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı ve zamana karşı kalan aktivite (%) grafiği oluşturuldu.

### 2.13.8. Enzim Aktivitesine Bazı Kimyasalların Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve kimyasalların etkisini incelemek amacı ile Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonlarının klorür tuzlarının ve EDTA'nın reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM, organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla metanol, etanol, aseton, DMSO, 2-propanol ve asetonitrilin reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları %1 ve %5, Tween 20, SDS, Triton X-100 ve Triton X-114 deterjanlarının reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları %1 olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu ve kimyasal içermeyen reaksiyon karışımının aktivitesi %100 olarak kabul edilip %kalan aktiviteler hesaplandı.

### **2.13.9. Enzimlerin Tuz Toleransı**

Enzimlerin tuz toleransını belirlemek amacıyla, reaksiyon ortamında son konsantrasyon 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 M NaCl olacak şekilde optimum deney koşullarında enzim aktiviteleri belirlendi.

### **2.13.10. Enzimlerin Proteaz Varlığındaki Kararlılıklarının İncelenmesi**

Ticari proteinaz K varlığında serbest ve immobilize enzimlerin kararlılığını incelemek için, proteaz ile ön inkübasyon işlemine tabi tutulan enzimlerle optimum şartlarda aktivite tayini yapıldı ve %kalan aktiviteler hesaplandı. Ön inkübasyon işlemi, 0,1 mg/mL'lik serbest enzim çözeltisi ile yine aynı konsantrasyondaki proteaz çözeltisinin 1:1 (v/v) oranında karıştırılmasıyla gerçekleştirildi. Immobilize enzimler için ise 0,1 g immobilize enzim tartılıp üzerine 100 µL (0,1 mg/mL) proteaz ilave edilerek oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun başlangıcında, 5., 15., 30., 60., 90., 120. ve 150. dakikalarında optimum şartlarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Hiç inkübe edilmemiş enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilip %kalan aktiviteler hesaplandı (Mukherjee vd., 2009).

### **2.13.11. İmmobilize Enzimlerin Kullanım Sıklığının Belirlenmesi**

Kitosan ve kalsiyum alginata immobilize edilen enzimlerin kullanım sıklığını belirlemek amacıyla immobilize enzimler kullanılarak art arda 7'şer kez aktivite tayini gerçekleştirildi. Bu amaçla bir mikrosantrifüj tüpte 0,1 g immobilize enzim tartıldı, üzerine 500 µL %1'lik nişasta ve 500 µL uygun tampon ilave edildi. 15 dakika reaksiyon gerçekleştirildikten sonra immobilize enzim mini santrifüjde hızlı santrifüjleme ile ayrıldı. Reaksiyon karışımından 0,7 mL alınarak ayrı bir mikrosantrifüj tüpü içinde üzerine eşit hacimde DNS reaktifi ilave edildi. 10 dakika kaynar su banyosunda kaynatılan tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra 540 nm'de immobilize enzim yerine boş katı destek maddesi içeren köre karşı absorbanları ölçüldü. Her aktivite denemesinden sonra katı destek yeteri kadar saf su ile yıkandı ve tekrar aktivite tayini gerçekleştirildi. İlk ölçümde elde edilen aktivite sonucu %100 kabul edilerek sonuçlar hesaplandı.

## **2.14. Enzimlerin Bazı Endüstriyel Alanlardaki Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**

### **2.14.1. Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Çeşitli Ticari Yıkama Deterjanları ile Uygunluğunun Test Edilmesi**

Serbest ve kitosana immobilize enzimlerin bir deterjan katkısı olarak kullanılabilme potansiyelini incelemek için enzimlerin marketlerde satılan Omo, Ariel, Persil, Alo, Etimatik (katı çamaşır deterjanı), Perwol, Woolite (sıvı çamaşır deterjanı), Finish (katı bulaşık deterjanı), Fairy (sıvı bulaşık deterjanı) gibi mevcut bazı ticari deterjanlar varlığında aktivitelerindeki değişiklikler incelendi. Deney öncesinde 7 mg/mL'lik (katı) ve %10'luk (v/v) sıvı deterjan çözeltileri mevcut olan enzim aktivitelerini yok etmek amacıyla 100 °C'de 60 dakika bekletildi ve deterjan çözeltilerinde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi olup olmadığı kontrol edildi. Hazırlanan bu deterjan örneklerinden, son konsantrasyonları 1 mg/mL (katı) ve %1 (sıvı) olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlandı ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Deterjan yokluğunda elde edilen aktivite %100 kabul edilerek %kalan aktiviteler hesaplandı (Hmidet vd., 2009).

### **2.14.2. Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Yıkama Performansı Analizi**

Yıkama performansı deneyi için çikolata (Ülker) ve bir ev yapımı reçel örneği 70 °C'de ısıtılarak sıvılaştırıldı ve bundan alınan 300  $\mu$ L'lik bir kısım 5 cm x 5 cm pamuk kumaş parçasına tatbik edildi. Pamuk kumaş sıcak hava akımı altında bir gece kurutuldu. Yıkama performansını belirlemek için %1 (v/v) konsantrasyonda olacak şekilde deterjan örneği (Persil) hazırlandı ve her bir lekeli kumaş parçası aşağıdaki bileşenleri içeren erlenlere koyuldu.

Serbest enzim için;

- a) 25 mL musluk suyu (kontrol)
- b) 20 mL musluk suyu ve 5 mL 1 mg/mL'lik serbest enzim
- c) 20 mL musluk suyu ve 5 mL %1'lik deterjan
- d) 20 mL musluk suyu, 1 mg/mL'lik serbest enzim içeren 5 mL %1'lik deterjan

Kitosana immobilize enzim için;

- a) 25 mL musluk suyu (kontrol)
- b) 25 mL musluk suyu ve 1 g immobilize enzim
- c) 20 mL musluk suyu ve 5 mL %1'lik deterjan
- d) 20 mL musluk suyu, 1 g immobilize enzim içeren 5 mL %1'lik deterjan

Erlenler enzimlerin optimum sıcaklığında (serbest enzim 50 °C, kitosana immobilize enzim 40 °C) 200 rpm'de 1 saat çalkalandı. Bu sürenin sonunda kumaş parçaları su ile yıkanıp kurutuldu ve lekelerin durumu kontrol edilerek karşılaştırıldı (Hmidet vd., 2009; Roy vd., 2012).

### **2.14.3. Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Haşıl Alma Etkinliğinin Belirlenmesi**

Boyutları 5 cm x 5 cm olan pamuk kumaş parçası tartıldıktan sonra %1'lik çözünür nişasta çözeltisinin 25 mL'si ile oda sıcaklığında 10 dakika muamele edildi. Kurutulup tartılan kumaş parçaları 1 mL (1 mg/mL) serbest enzim içeren 25 mL 50 mM pH 5,50 asetat tamponu veya musluk suyu içine alındı. Ardından 40 ve 50 °C'lerde ayrı ayrı 1'er saat 200 rpm'de çalkalandı.

Kitosana immobilize enzim için ise kurutulup tartılan kumaş parçası 1 g immobilize enzim içeren 25 mL'lik 50 mM pH 4,50 asetat tamponu veya musluk suyu içine alındı ve yine aynı şekilde 40 ve 50 °C'lerde ayrı ayrı 1'er saat 200 rpm'de çalkalandı.

Enzimle muamele edilen kumaş parçaları yıkanıp kurutulduktan sonra tekrar tartıldı. Uzaklaştırılan %nişasta miktarı aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı. Kontrol grubu enzim içermeyen tampon ve musluk suyundan hazırlandı (Singh vd., 2014b; Haq vd., 2010).

$$\% \text{Haşıl alma} = \left[ \frac{\text{enzim tarafından uzaklaştırılan nişasta miktarı (g)}}{\text{kumaş parçasındaki toplam nişasta miktarı (g)}} \right] * 100$$

#### **2.14.4. Serbest ve Alginata İmmobilize Enzimin Meyve Suyu İşlenmesinde Kullanılması**

Serbest ve alginata immobilize enzimlerin meyve suyu işlenmesinde kullanılabilirliğini incelemek amacıyla taze sıkılmış elma (Golden) ve portakal sularından 100 mL'lik kısımlar alınarak içerisine nihai konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde  $\text{CaCl}_2$  ilave edildi ve 90 °C'de 5 dakika pastörize edilerek hemen soğutuldu. Enzimlerin, elma ve portakal suyundaki bazı parametreleri (indirgen şeker, A440 nm ve pH değişimi) değiştirmesi ve meyve suyunu berraklaştırma potansiyeli incelendi. Bu amaçla 4900 µL elma ve portakal suyuna 100 µL (1 mg/mL) serbest enzim veya 5000 µL elma ve portakal suyuna 1 g alginata immobilize enzim katılarak enzimlerin optimum sıcaklıklarında 1 ve 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda numuneler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Berrak kısımda hemen pH ve 440 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Ayrıca DNS yöntemiyle indirgen şeker miktarları tayin edildi. Elde edilen sonuçlar, enzimle muamele edilmemiş meyve suyunun indirgen şeker, pH ve A440 nm değerleriyle kıyaslandı (Dey ve Banerjee, 2014).

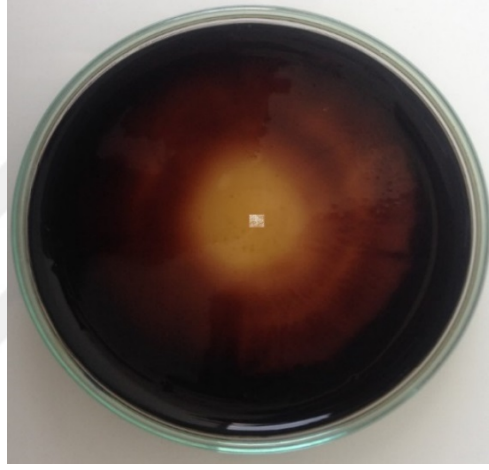
#### **2.15. Serbest Enzimin Maltotetroz Üretim Üretmediğinin Belirlenmesi**

İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile serbest enzimin nişastayı parçalama ürünleri belirlendi. Bunun için 1 mL serbest enzim çözeltisi 1 mL %1'lik nişasta çözeltisi ile optimum şartlarda reaksiyona bırakıldı. Belirli sürelerde reaksiyon ortamından belirli miktar alınarak kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilip reaksiyon durduruldu. Glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetroz standartları eşliğinde reaksiyon karışımları, önceden aktifleştirilmiş olan TLC (Kieselgel-Silica gel/TLC-cards) plakaya ayrı ayrı spotlandı. Yürütme işlemi 3:1:1 (v/v/v) oranlarında hazırlanan 2-propanol/etilasetat/su çözücü sisteminde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. TLC kartı kurutulduktan sonra üzerine metanol içerisinde hazırlanmış %20'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  çözeltisi püskürtüldü. 110 °C'de 10 dakika bekletildi. Standartların yürüdüğü mesafe ile örneğin yürüdüğü mesafe karşılaştırılarak enzimin aktivitesi sonucu açığa çıkan son ürün belirlendi (Maalej vd., 2014).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Petri Testi

Bu alışmada *R. solani* AG4 ZB-34 fungusunun amilolitik etkinliği petri testi ile belirlendi. Lugol özeltisi ile muamele sonucunda açık renkli bir zon oluşması ortamdaki amilolitik aktivitenin varlığını göstermektedir (şekil 10).



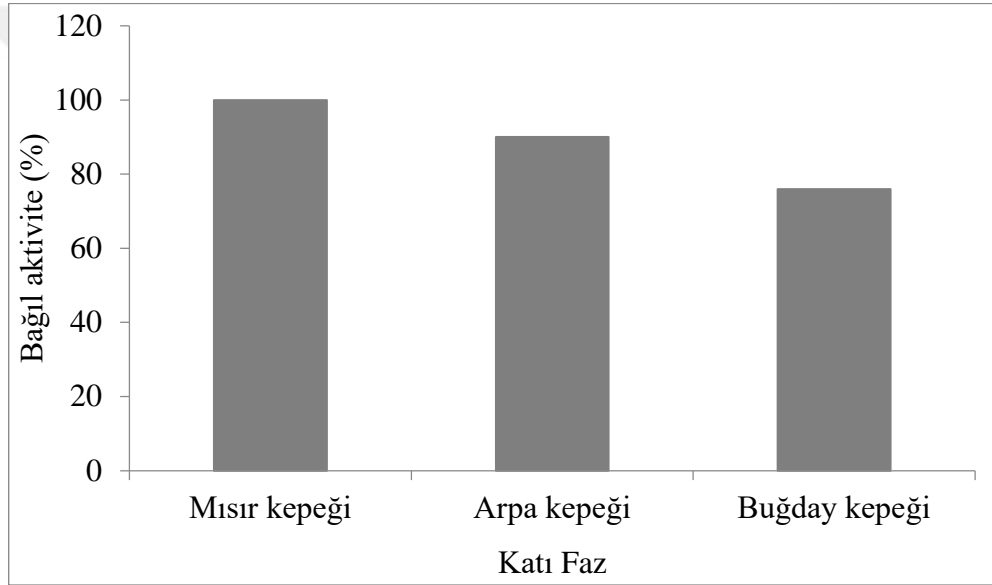
şekil 10. *R. solani* AG4 ZB-34 fungusunun amilolitik aktivitesinin tespiti

#### 3.2. Katı Faz Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu

*R. solani* AG4 ZB-34'den  $\alpha$ -amilaz üretimini maksimum seviyeye ıkarılabilmek için fermentasyon şartları değiştirilerek denemeler yapıldı. Bu amaçla, katı faz, başlangıç pH'sı, nem miktarı, fermentasyon sıcaklığı, fermentasyon zamanı ve çeşitli kimyasalların enzim üretimine etkisi incelendi.

### 3.2.1. En Uygun Katı Fazın Belirlenmesi

*R. solani* AG4 ZB-34'den  $\alpha$ -amilaz üretiminde en uygun katı fazı belirlemek için mısır kepeği, buğday kepeği ve arpa kepeği katı faz olarak kullanıldı. Ekim ve büyütme işlemleri "2.6 Katı Faz Fermentasyon (SSF) Tekniği ile Fungusun Büyütülmesi" kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Enzimler ekstrakte edildikten sonra protein ve aktivite tayinleri yapıldı. En yüksek enzim üretiminin mısır kepeği ile yapılan fermentasyon sonucunda gerçekleştiği bulundu (Şekil 11). Bundan sonraki çalışmalarda katı faz olarak mısır kepeği kullanılmasına karar verildi.

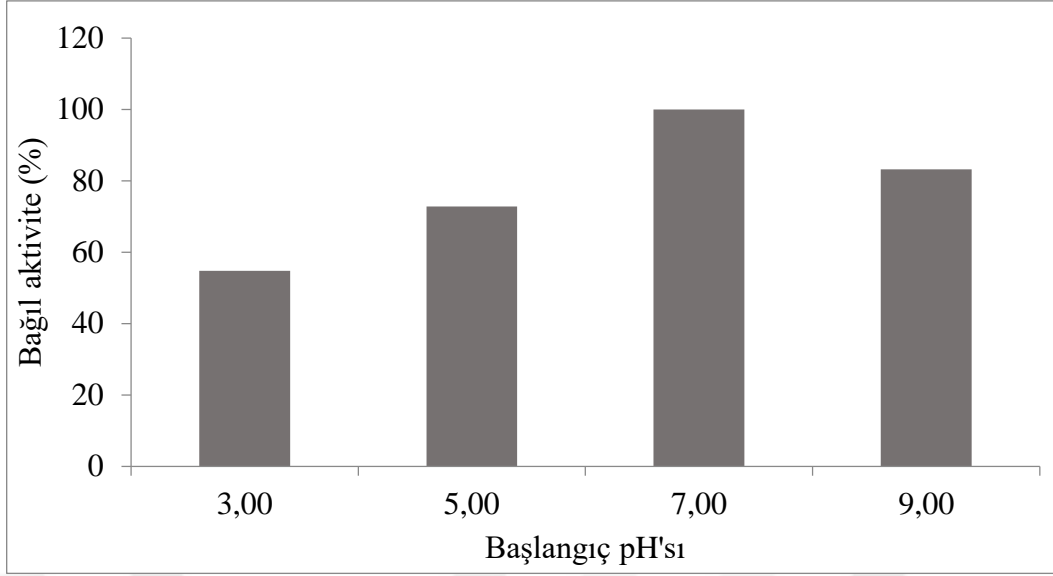


Şekil 11. SSF için en uygun katı fazın belirlenmesi

### 3.2.2. Başlangıç pH'sının Belirlenmesi

Başlangıç pH'sının enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla nemlendirici olarak kullanılan NSS'nin pH'sı 1 M NaOH/HCl ile 3,00; 5,00; 7,00 ve 9,00 olarak ayarlandı. Diğer şartlar değiştirilmeden fermentasyon işlemleri tekrarlandı. En yüksek enzim üretimi, pH'sı 7,00 olan NSS çözeltisi kullanıldığı durumda elde edildi (Şekil 12). Bundan sonraki çalışmalarda pH 7,00 NSS çözeltisi kullanılmasına karar verildi.

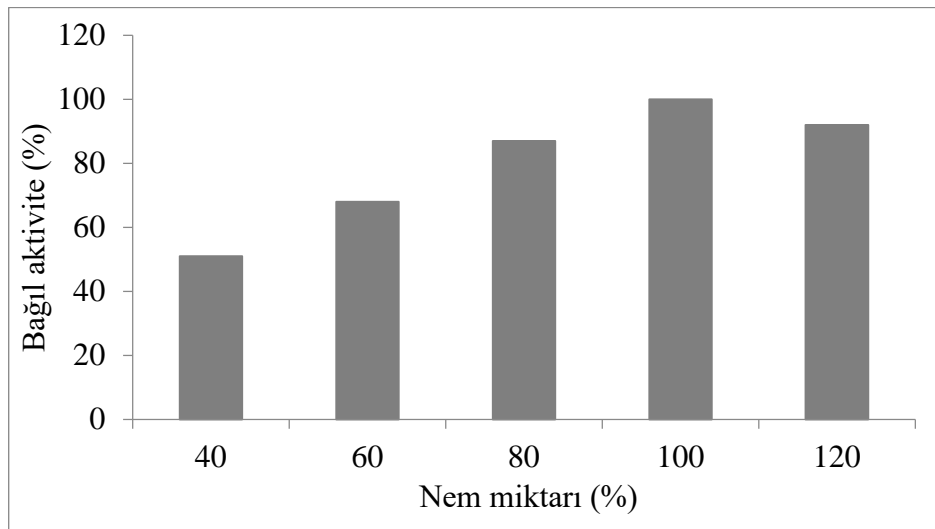




Şekil 12. SSF için en uygun başlangıç pH'sının belirlenmesi

### 3.2.3. Nem Miktarının Belirlenmesi

Nem miktarının etkisi gram mısır kepeği başına kullanılan NSS hacmi değiştirilerek yapıldı. Bu amaçla ayrı ayrı 5'er gramlık mısır kepekleri üzerine 2 mL (%40), 3 mL (%60), 4 mL (%80), 5 mL (%100) ve 6 mL (%120) pH'sı 7,00 olan NSS çözeltisi ilave edildi ve 28 °C'de 6 gün fermentasyon yapıldı.

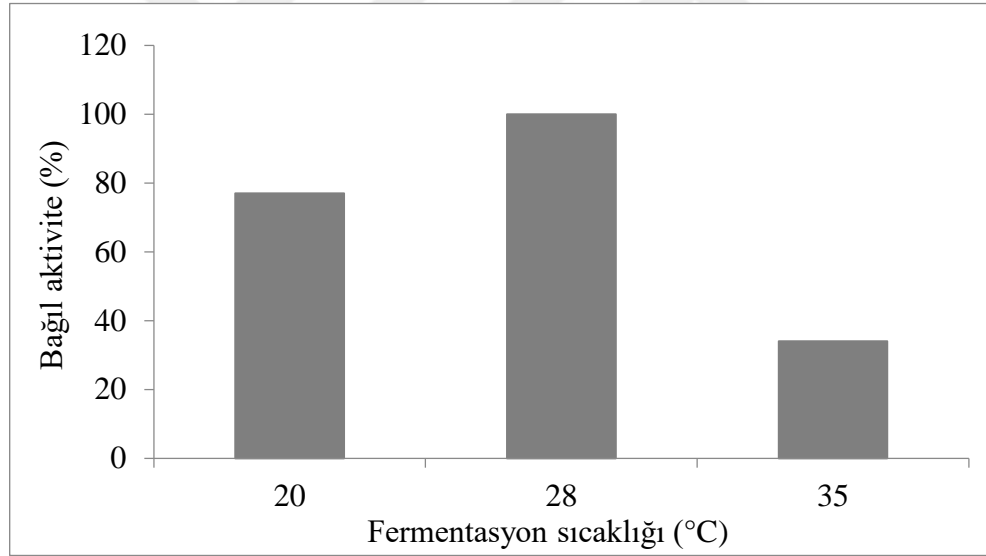


Şekil 13. SSF için en uygun nem miktarının belirlenmesi

En yüksek enzim üretiminin, 5 mL (%100) NSS çözeltisi içeren SSF ortamında gerçekleştiği belirlendi (Şekil 13). Bundan sonraki çalışmalarda, 5 g mısır kepeği için 5 mL pH 7,00 NSS çözeltisi kullanılmasına karar verildi.

### 3.2.4. Fermentasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

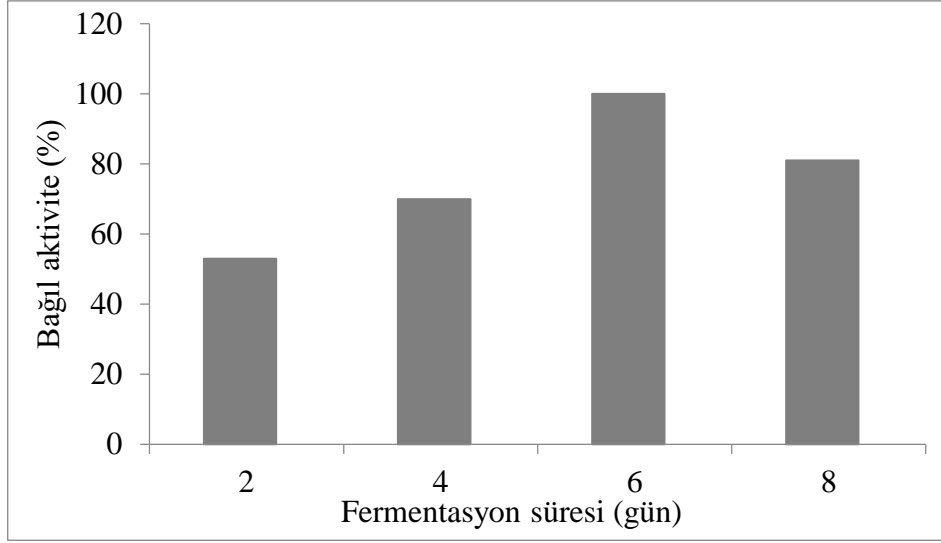
Fermentasyon sıcaklığının enzim üretimine etkisini incelemek için 20, 28 ve 35 °C’de büyüme işlemleri gerçekleştirildi. 5 g mısır kepeğine, pH’sı 7,00 olan, 5 mL NSS çözeltisi ilave edilerek 6 gün fermentasyon yapıldı. En yüksek enzim üretiminin aynı zamanda *R. solani* AG4 ZB-34 fungusunun optimum büyüme sıcaklığı da olan 28 °C’de gerçekleştiği belirlendi (Şekil 14). Bundan sonraki çalışmalarda, büyüme işlemlerinin yine 28 °C’de yapılmasına karar verildi.



Şekil 14. SSF için en uygun fermentasyon sıcaklığının belirlenmesi

### 3.2.5. Fermentasyon Süresinin Belirlenmesi

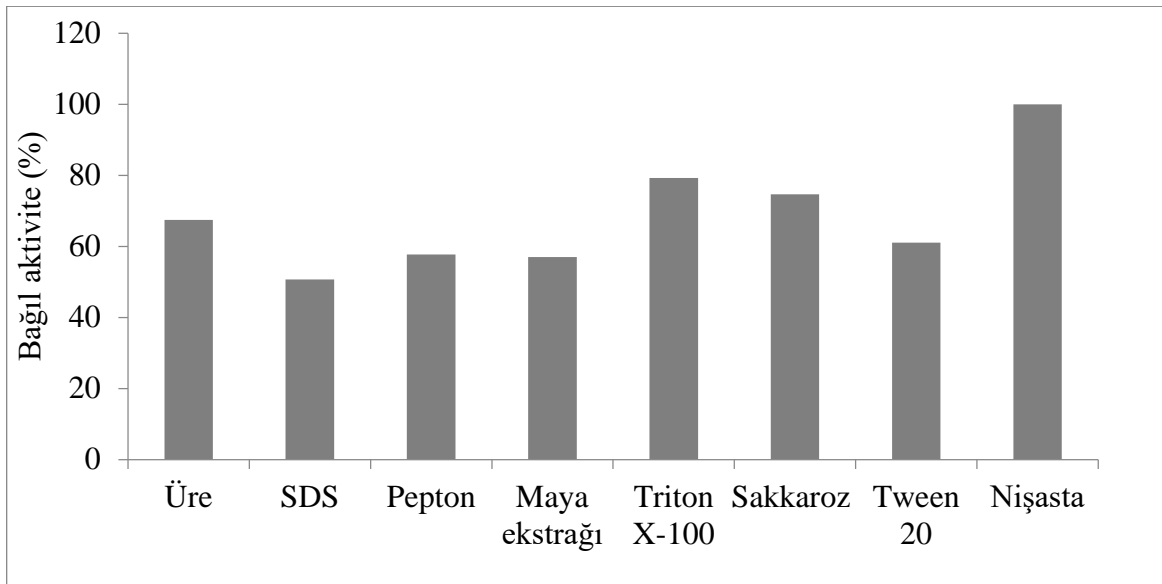
*R. solani* AG4 ZB-34’ün en fazla enzim ürettiği süreyi bulmak için 2, 4, 6 ve 8 günlük büyüme işlemlerinden sonra enzim aktiviteleri hesaplandı. En yüksek enzim üretiminin, 6 günlük fermentasyondan sonra olduğu tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15. SSF için optimum fermentasyon süresinin belirlenmesi

### 3.2.6. Çeşitli Kimyasal ve Deterjanların Enzim Üretimine Etkisi

Çeşitli kimyasalların enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla fermentasyon ortamına %1 olacak şekilde maya ekstrağı, pepton, üre, sakkaroz, nişasta, SDS, Triton X-100 ve Tween 20 ilave edilip optimum şartlarda fermentasyon yapıldı.



Şekil 16. SSF ortamına ilave edilen çeşitli kimyasalların enzim üretimine etkisi

En yüksek enzim üretiminin %1'lik nişasta ilave edilen SSF ortamında gerçekleştiği belirlendi (Şekil 16). Bundan sonraki çalışmalarda, kültür ortamına %1 oranında nişasta katılmasına karar verildi.

### 3.3. Enzimin Saflaştırılması

Nişasta afinite yöntemiyle yapılan saflaştırma işlemi için bir saflaştırma tablosu oluşturuldu (Tablo 7). Elde edilen sonuçlara göre  $\alpha$ -amilazın %5,32 verimle 11,17 kat saflaştırıldığı görüldü.

Tablo 7. Nişasta afinite yöntemiyle saflaştırma işlemi için saflaştırma tablosu

Saflaştırma adımı	Hacim (mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham özüt	50	17,850	56,94	3,19	100	1
Nişasta afinite	1,25	0,085	3,03	35,64	5,32	11,17

Saflaştırma işleminin hangi nişasta ile daha etkili olduğunu belirleyebilmek için ev tipi mısır nişastası (Güneş marka), buğday nişastası (Dr. Oetker marka) ve patates nişastası (Migros marka) kullanılarak saflaştırma işlemleri yapıldı ve her bir durumda spesifik aktiviteler belirlendi (Tablo 8). Elde edilen sonuçlara göre her bir nişasta ile enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığı ancak en yüksek spesifik aktivitenin mısır nişastası ile elde edildiği belirlendi. Bundan sonraki saflaştırma işlemleri için mısır nişastasının kullanılmasına karar verildi.

Tablo 8. Saflaştırma işlemi için en uygun nişasta cinsinin belirlenmesi

Nişastanın cinsi	Spesifik aktivite (U/mg protein)
Patates	21,33
Mısır	33,33
Buğday	24,61

Saflaştırmada en uygun elüsyon zamanını belirlemek amacıyla 40 °C'de yapılan elüsyon işlemi 1 saat ve 2 saat olacak şekilde gerçekleştirildi. Daha sonra yapılan aktivite tayinleri sonucunda 1 saat inkübasyonla saflaştırılan enzimin 34,44 U/mg protein, 2 saat inkübasyonla saflaştırılan enzimin ise 32,87 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip olduğu hesaplandı. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda elüsyon süresi 1 saat ile sınırlı tutuldu.

Saflaştırmada en uygun nişasta miktarını belirleyebilmek için 50 mL ham enzim özütlerine ayrı ayrı %2, %4, %6 ve %8 (w/v)'lik olacak şekilde mısır nişastası ilave edilip saflaştırma işlemleri yapıldı. Sonrasında her bir durumda saf enzimlerin aktiviteleri tayin edildi (Tablo 9). En yüksek spesifik aktivite %2'lik nişasta varlığında elde edildiği için bundan sonraki saflaştırma işlemlerinde bu konsantrasyonda nişasta kullanıldı.

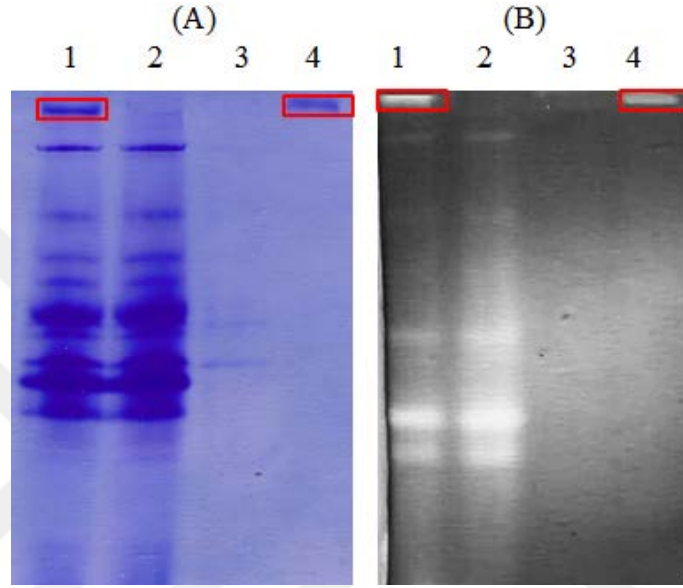
Tablo 9. Saflaştırma işlemi için en uygun nişasta miktarının belirlenmesi

Nişasta miktarı (% w/v)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
2	37,98
4	35,71
6	29,43
8	22,14

### 3.3.1. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

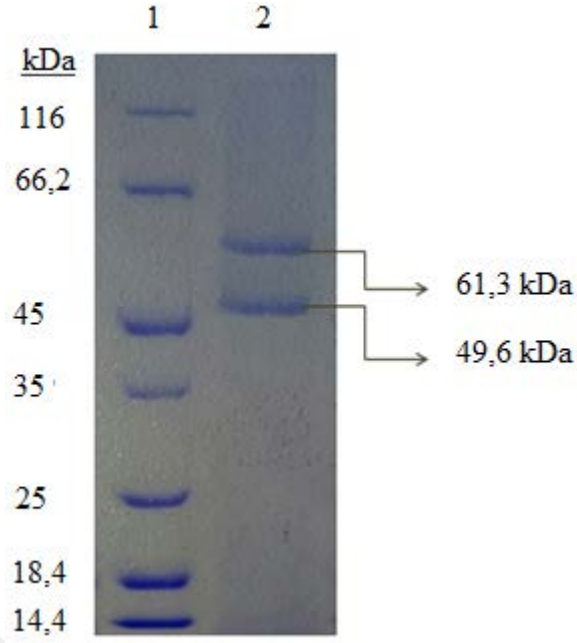
Saflaştırma işleminden sonra doğal poliakrilamid jel elektrofrez yapıldı ve jelin yarısı protein bantlarını görmek için Coomassie Brilliant Blue R250 boyamasına

(Şekil 17a) diğer yarısı ise aktif amilolitik aktiviteye sahip enzimleri görmek için zimogram (substrat) boyamasına (Şekil 17b) tabi tutuldu. Saflaştırılmış enzim çözeltisinde amilolitik aktiviteden sorumlu tek bir bandın varlığı gözlemlendi. Dolayısıyla nişasta afinite yöntemiyle *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının başarılı bir şekilde aktif olarak saflaştırıldığı görüldü.



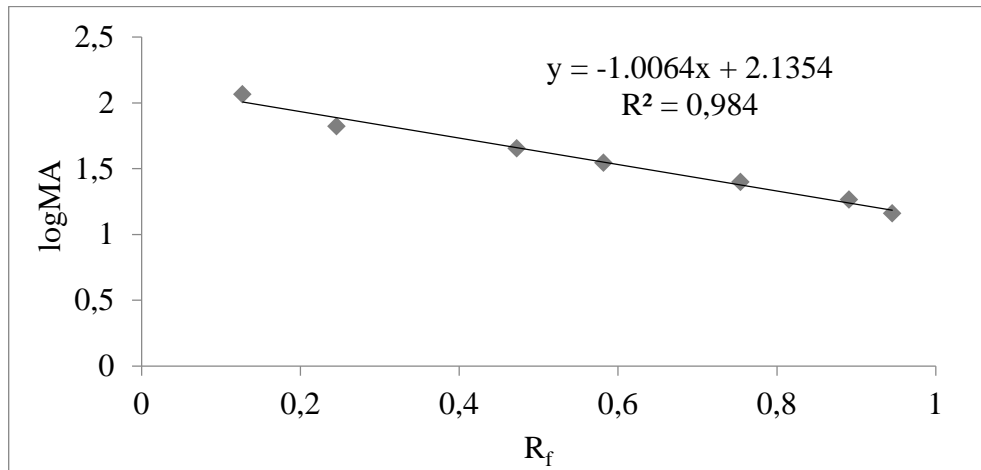
Şekil 17. Doğal PAGE elektroforezi, A) Coomassie Brilliant Blue R250 boyaması (1- Deriştirilmiş ham özüt, 2- Nişasta muamelesinden sonra santrifüj yapılarak elde edilen süpernatant, 3- Yıkama çözeltisi, 4-Saf enzim), B) Zimogram- Substrat boyaması (1- Deriştirilmiş ham özüt, 2- Nişasta muamelesinden sonra santrifüj yapılarak elde edilen süpernatant, 3- Yıkama çözeltisi, 4-Saf enzim).

Saflaştırılan enzimin kaç çeşit alt birimden oluştuğunu ve bu alt birimlerin yaklaşık molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Elektroforez uygulamasından sonra tanktan çıkarılan jel Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyandı ve boyanın fazlası uzaklaştırılıp protein bantları görünür hale getirildi (Şekil 18). Şekilden de görüldüğü gibi saf protein 2 farklı çeşit alt birimden oluşmaktadır.



Şekil 18. SDS-PAGE elektroforezi, 1- Moleküler ağırlık markerleri (Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker), 2-Saf enzim

Saf enzimin alt birimlerinin molekül ağırlıklarını belirlemek için protein standartlarının  $R_f$  değerlerine karşı molekül ağırlıklarının logaritması grafiğe geçirilerek bir grafik hazırlandı. Elde edilen grafikten faydalanılarak saf proteinin alt birimlerinin molekül ağırlıklarının yaklaşık olarak 61,3 kDa ve 49,6 kDa olduğu görüldü (Şekil 19).



Şekil 19.  $R_f$ -logMA grafiği

### 3.4. Serbest Enzimin İmmobilizasyonu

*R. solani* AG4 ZB-34 fungusundan elde edilen  $\alpha$ -amilaz için yapılan immobilizasyon çalışmalarında enzim kitosana kovalent bağlama metoduyla, kalsiyum-alginata tutuklama metoduyla immobilize edildi.

Kitosana immobilizasyonda %bağlanma verimi %67,9, kalsiyum alginat ile immobilizasyonda ise %bağlanma verimi %59,6 olarak hesaplandı.

### 3.5. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

#### 3.5.1. Substrat Özgünlüğü

Substrat özgünlüğünü tespit etmek amacıyla nişasta, glikojen, amilopektin, maltoz, maltotrioz ve  $\beta$ -siklodekstrin substratları kullanılarak serbest ve immobilize enzimler için aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak spesifik aktivite değerleri hesaplandı ve en yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edildi. Serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin nişasta varlığında en iyi aktivite gösterdiği belirlendi (Tablo 10).

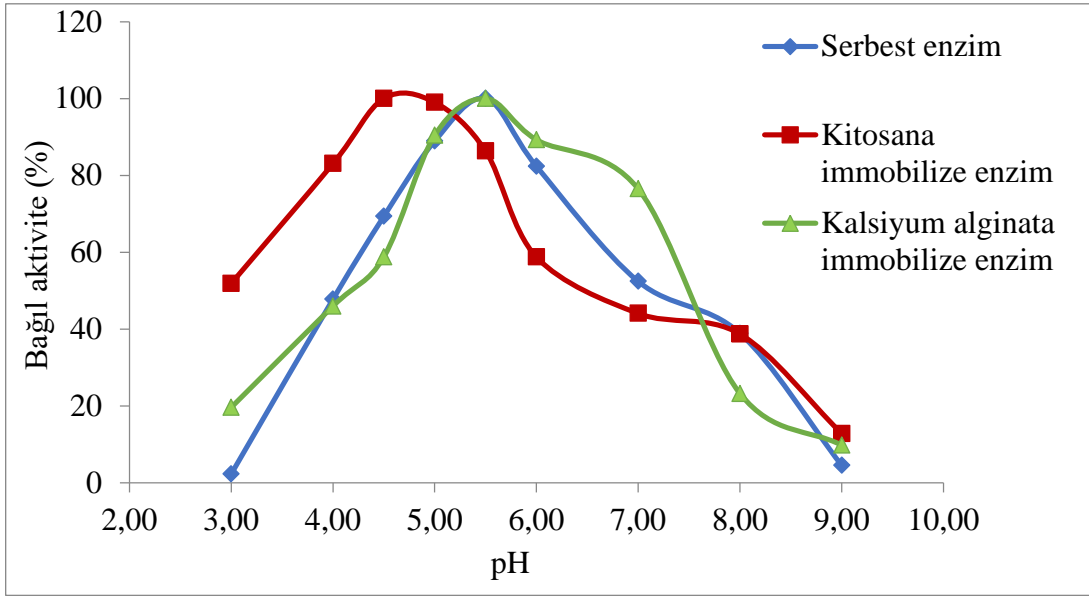
Tablo 10. Serbest ve immobilize enzimlerin substrat özgünlüğü

Substratlar	Serbest enzim		Kitosana immobilize enzim		Alginata immobilize enzim	
	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Bağlı aktivite (%)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Bağlı aktivite (%)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Bağlı aktivite (%)
Nişasta	56,04	100	12,10	100	50,50	100
Glikojen	39,12	69,81	7,46	61,69	21,47	42,52
Amilopektin	48,49	86,53	11,00	90,94	18,73	37,10
Maltoz	38,48	68,67	7,80	64,51	37,96	75,17
Maltotrioz	28,36	50,62	4,70	38,90	28,01	55,47
$\beta$ -siklodekstrin	0	0	0	0	0	0



### 3.5.2. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek amacıyla farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. En yüksek aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktivitelere hesaplandı ve pH-bağıl aktivite (%) grafiği çizildi (Şekil 20).

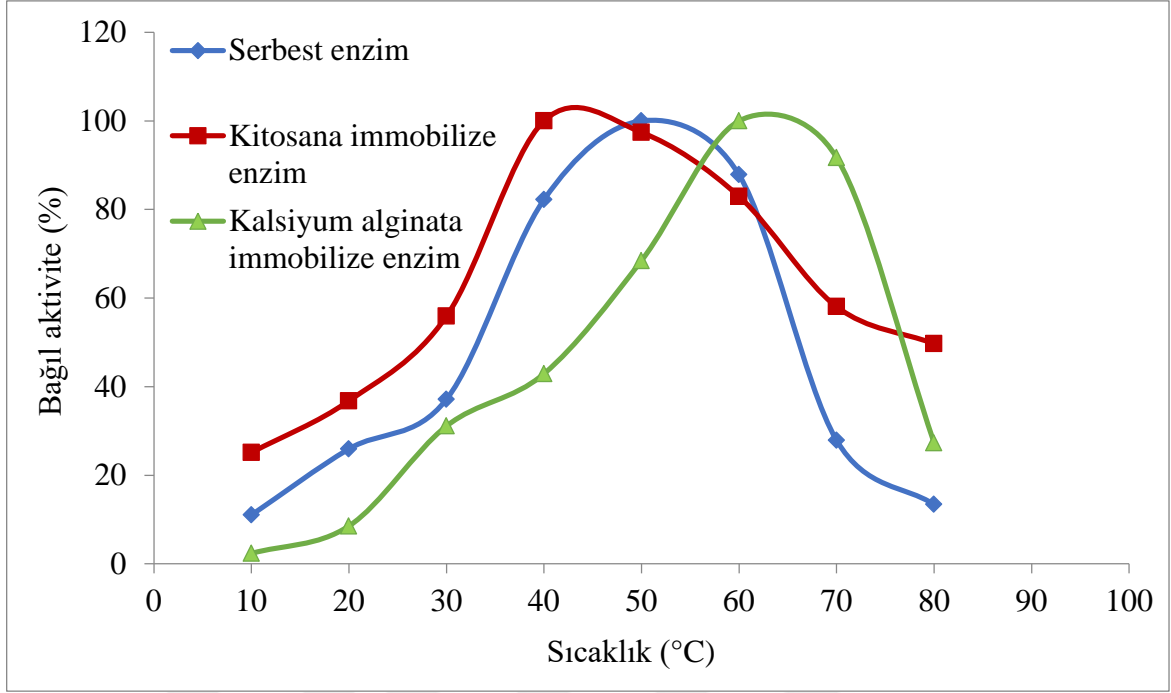


Şekil 20. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Serbest enzim ve kalsiyum alginata immobilize enzim için optimum pH değeri 5,50 olarak kitosana immobilize enzim için 4,50 olarak belirlendi. Serbest enzim pH 4,00-7,00 arasında %50 ve üzerinde aktivite gösterirken, kitosana immobilize enzimde optimum pH'nın 5,50'den 4,50'ye düştüğü görüldü.

### 3.5.3. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 10-80 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapıldı. En yüksek aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktivitelere hesaplandı ve sonuçlar grafiğe geçirildi (Şekil 21).

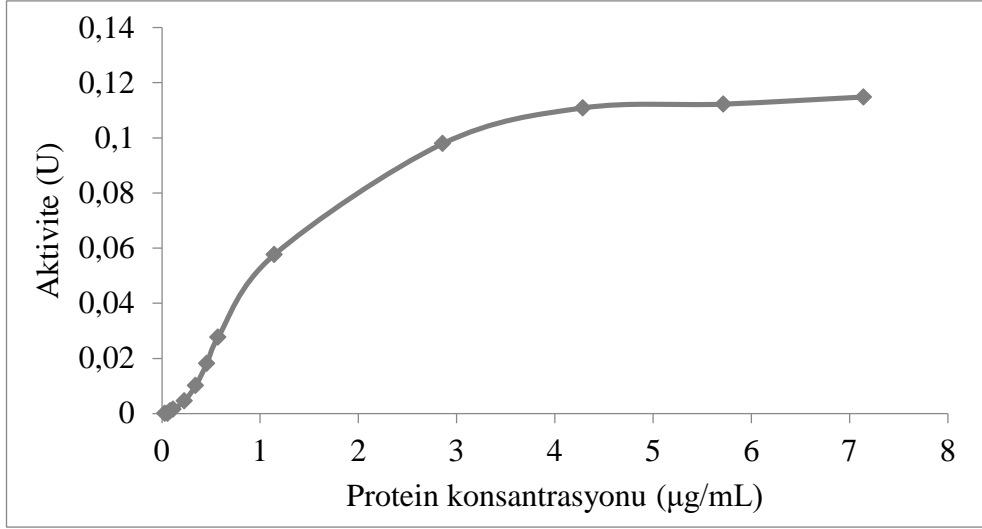


Şekil 21. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Serbest *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının optimum sıcaklığı 50 °C iken kitosana immobilize enzimin 40 °C'lik bir optimum sıcaklığa sahip olduğu belirlendi. Kalsiyum alginata immobilize enzimde ise optimum sıcaklığın 50 °C'den 60 °C'ye çıktığı görüldü.

#### 3.5.4. Serbest Enzim Aktivitesine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

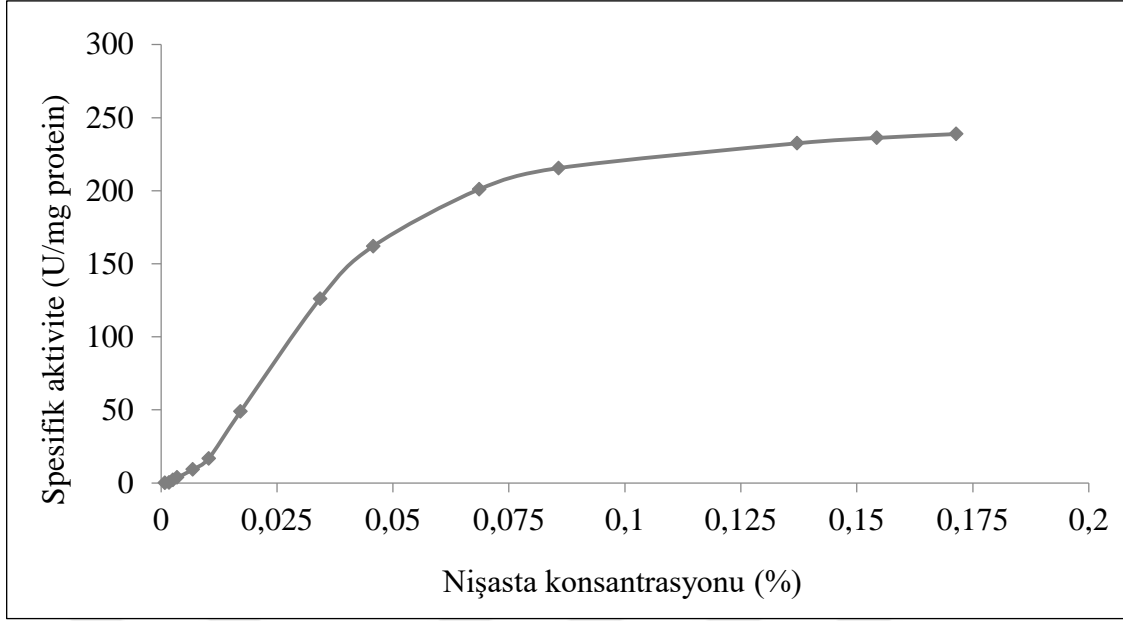
Enzim aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla reaksiyon karışımında ayrı ayrı 0,028-7,142  $\mu\text{g/mL}$  arasındaki değerlerde nihai protein konsantrasyonuna sahip olacak şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildiğinde, optimum enzim konsantrasyonun 0,725  $\mu\text{g/mL}$  olduğu belirlendi (Şekil 22). Bundan sonraki aşamalarda reaksiyon ortamına 0,725  $\mu\text{g/mL}$  protein içerecek şekilde enzim çözeltisi ilave edildi.



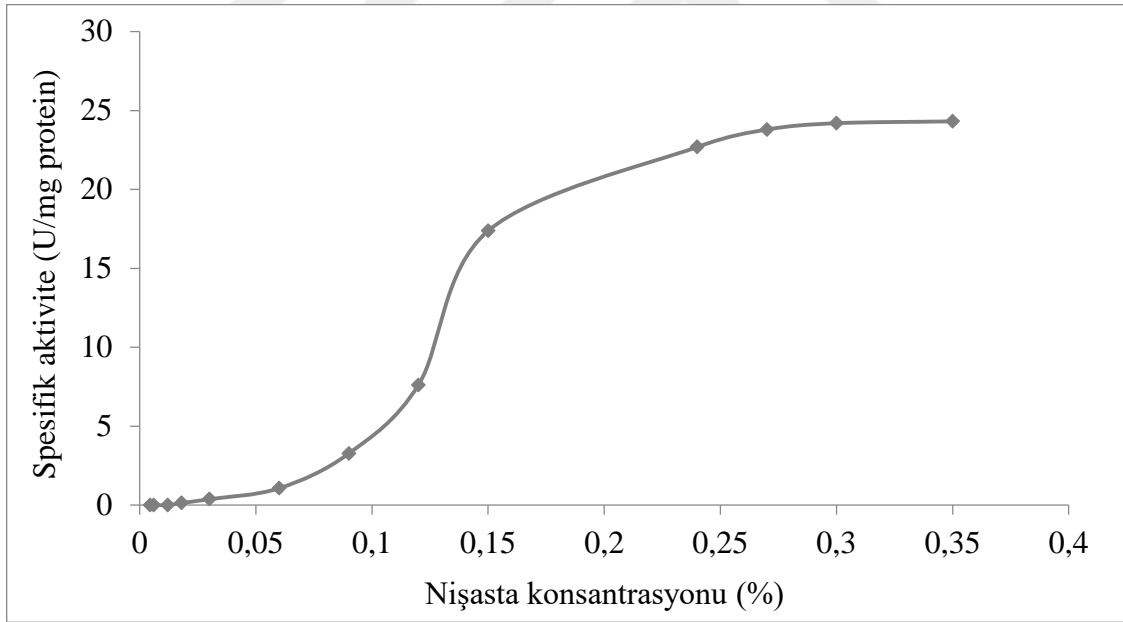
Şekil 22. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

### 3.5.5. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

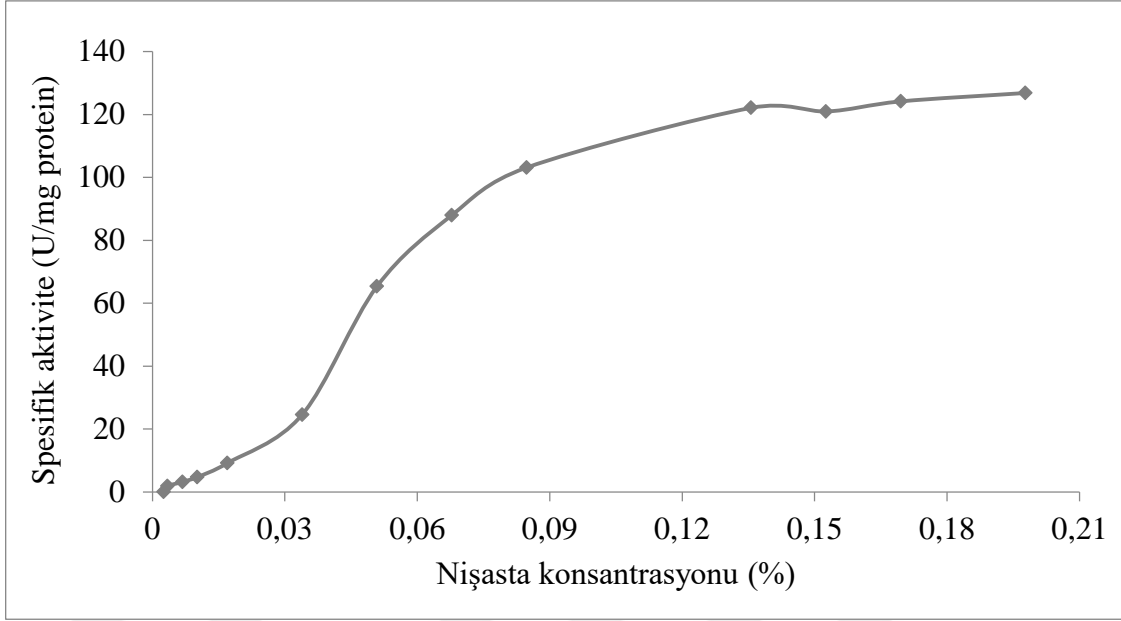
Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla değişen çözünür nişasta konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Aktivite tayinleri daha önce belirlenen optimum şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize enzimlere ait substrat doygunluk eğrileri elde edildi. Substrat doygunluk eğrilerinin (Şekil 23,24,25) sigmoidal çıkmasından dolayı Lineweaver-Burk grafiği çizilemedi. Her ne kadar sigmoidal doygunluk eğrisinden  $V_0$ 'ın yarı maksimum olduğu bir substrat değeri bulunsa da, enzim hiperbolik Michaelis-Menten ilişkisini izlemediği için bu  $K_m$  değeri yerine  $[S]_{0,5}$  veya  $K_{0,5}$  değeri kullanılmaktadır.  $[S]_{0,5}$  veya  $K_{0,5}$  değeri, allosterik bir enzim tarafından katalizlenen tepkimenin yarı en yüksek hızındaki substrat derişimini temsil etmektedir (Nelson ve Cox, 2004). Elde edilen veriler kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin  $V_{maks}$  ve  $K_{0,5}$  değerleri hesaplandı.  $V_{maks}$  değerleri serbest enzim, kitosana immobilize enzim ve kalsiyum alginata immobilize enzim için sırasıyla  $238,8 \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ,  $24,3 \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  ve  $126,8 \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  olarak hesaplandı.  $K_{0,5}$  değerleri ise yine aynı sırayla %0,03, %0,135 ve %0,05 olarak bulundu.



Şekil 23. *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının substrat doygunluk eğrisi



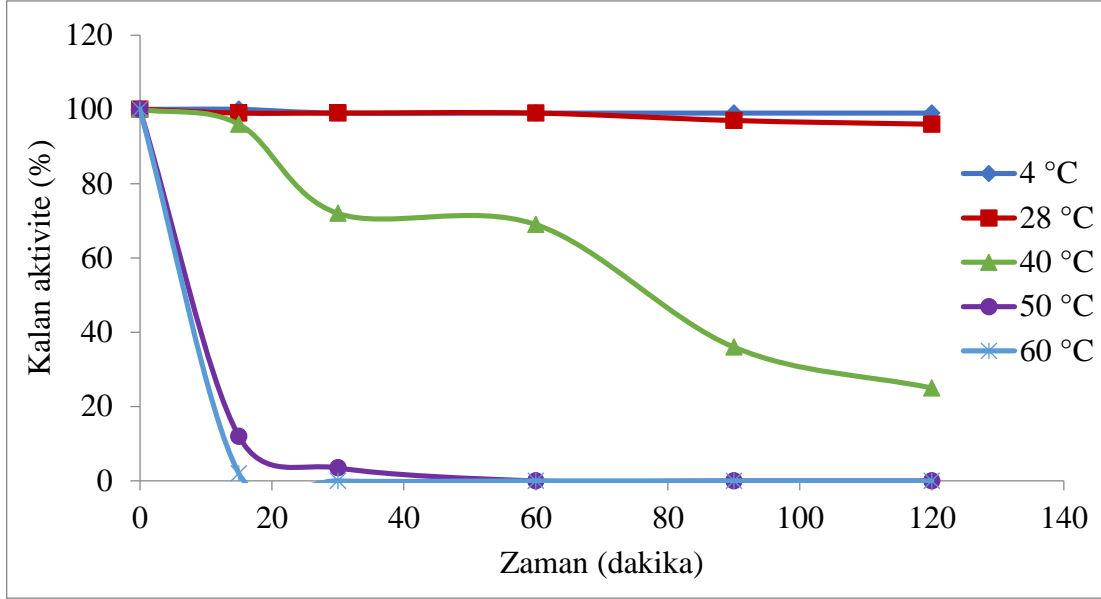
Şekil 24. Kitosana immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının substrat doygunluk eğrisi



şekil 25. Kalsiyum alginata immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının substrat doygunluk eğrisi

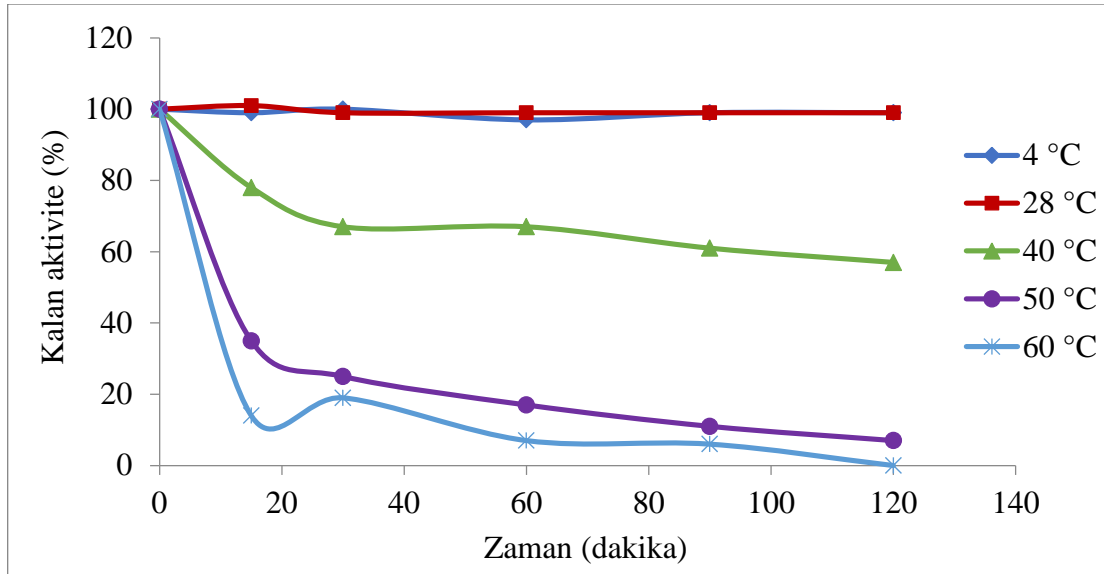
### 3.5.6. Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin bazı sıcaklıklardaki ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla, enzim 4 °C (depolama sıcaklığı), 28 °C (fermentasyon sıcaklığı), 40, 50 ve 60 °C'lerde (optimum sıcaklıklar) 120 dakika bekletildi. Bu süre zarfında 15., 30., 60., 90. ve 120. dakikalar sonunda optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. %Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış serbest ve immobilize enzimlerin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı ve zaman-%kalan aktivite grafiği çizildi (şekil 26,27,28).



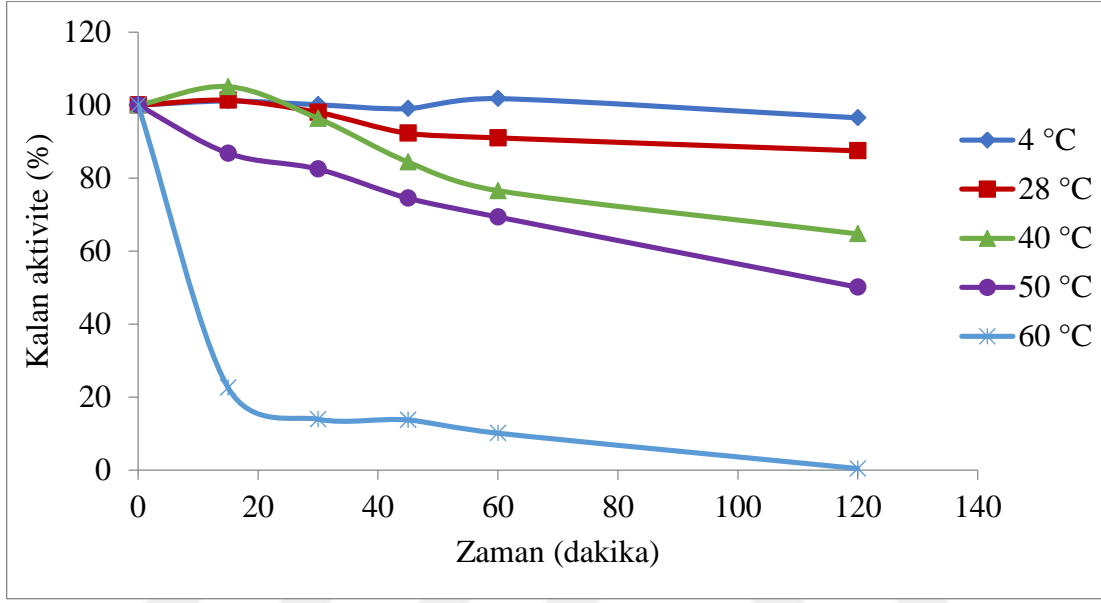
Şekil 26. *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi

Serbest enzim depolama sıcaklığı olan 4 °C'de ve fungusun büyüme sıcaklığı olan 28 °C'de 120 dakika boyunca aktivitesini tamamen korumaktadır (Şekil 26). 40 °C'de 60 dakika sonunda enzim aktivitesi yaklaşık %70 oranında korunurken, 50 ve 60 °C'de 15 dakika sonunda aktivite neredeyse ortadan kalkmaktadır.



Şekil 27. Kitosana immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi

Kitosana immobilize  $\alpha$ -amilaz, depolama sıcaklığı olan 4 °C’de ve fungusun büyüme sıcaklığı olan 28 °C’de 120 dakika boyunca aktivitesinin serbest enzimde olduğu gibi tamamına sahiptir (Şekil 27). Enzim, optimum sıcaklığı olan 40 °C’de ise 120 dakika sonunda aktivitesini yaklaşık %60 oranında korumaktadır.



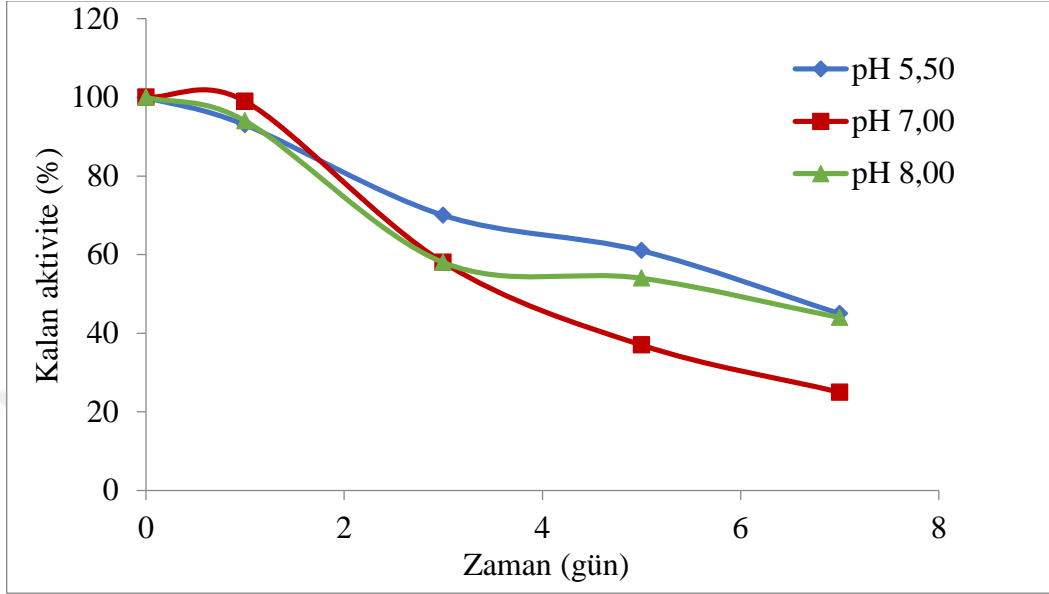
Şekil 28. Kalsiyum alginata immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi

Kalsiyum alginata immobilize enzimin ısı kararlılık eğrisine bakıldığında 4 °C ile 50 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivitesini serbest enzime ve kitosana immobilize enzime göre çok daha fazla koruduğu görülmektedir (Şekil 28). Enzim, 60 °C’de 60 dakika süre sonunda bile aktivitesinin yaklaşık %10’undan fazlasına sahip olmaktadır.

### 3.5.7. pH Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılıklarını incelemek amacıyla farklı tamponlar içindeki enzimler 4 °C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu esnada belirli aralıklarda optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Aynı şekilde hazırlanmış fakat hiç inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının da optimum şartlar altında aktiviteleri

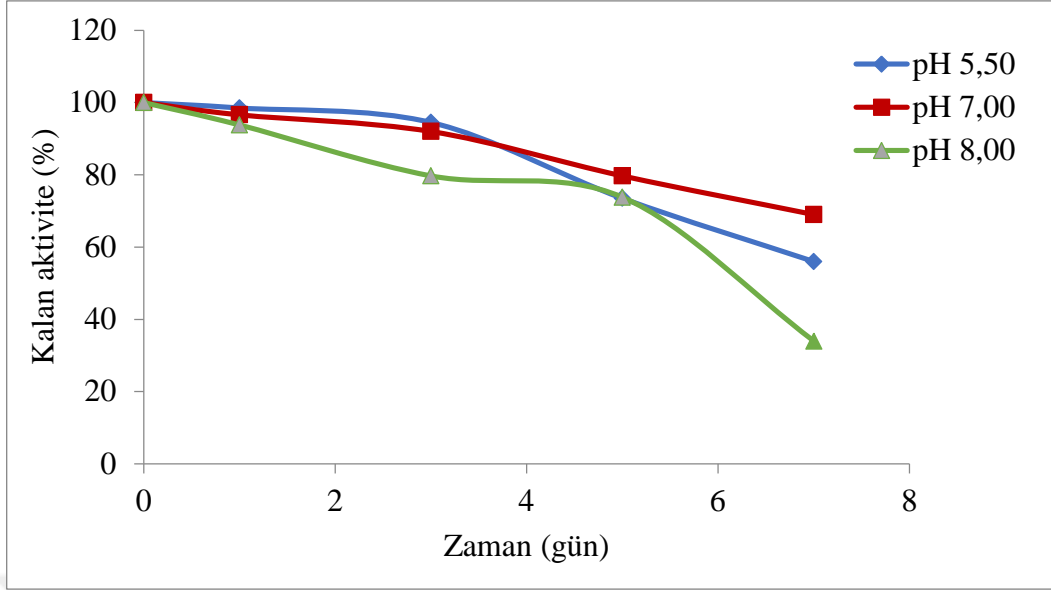
belirlendi ve bu değerler %100 olarak kabul edildi. Böylelikle inkübasyona maruz bırakılan enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Şekil 29,30,31).



Şekil 29. *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının pH kararlılığı eğrisi

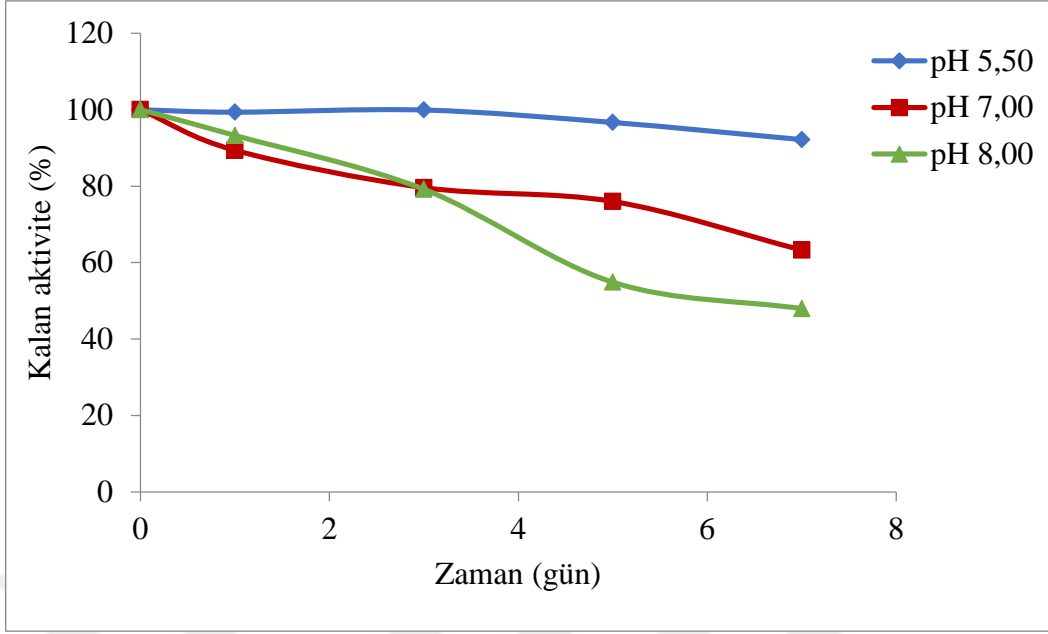
Bir günlük inkübasyonun sonunda denenen pH'ların hepsinde serbest enzimin aktivitesi yaklaşık %100 oranında korunmuŐtur. 3 günün sonunda ise aktivitelerin yaklaşık %60-70'inin korunduğu görülmektedir (Şekil 29).





Şekil 30. Kitosana immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının pH kararlılığı eğrisi

Şekil 30'dan da görüldüğü gibi kitosana immobilize enzim denen pH'larda 1 gün sonunda aktivitesinin tamamına yakınına korudu. 5 gün sonunda ise yaklaşık %80'lik bir aktivitenin hala mevcut olduğu görüldü. Bu sonuçlara göre enzimin 4 °C'de oldukça kararlı olduğu rahatlıkla ifade edilebilir. Ayrıca serbest enzimin pH kararlılığı ile kitosana immobilize enzimin pH kararlılığı karşılaştırıldığında immobilizasyonla beraber kararlılığının arttığı da kolaylıkla görülebilmektedir.

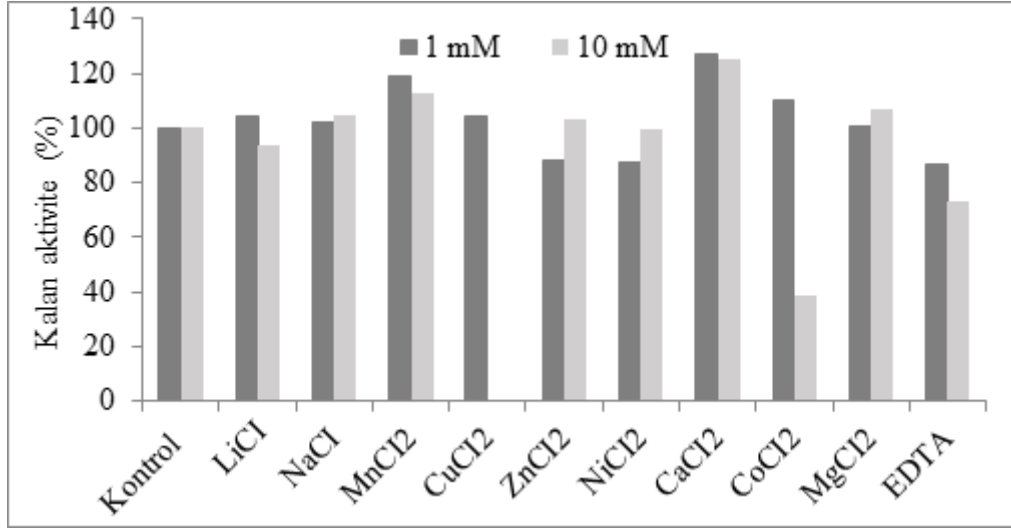


Şekil 31. Kalsiyum alginata immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının pH kararlılığı eğrisi

Kalsiyum alginata immobilize enzimin pH 5,50'de 7 gün sonunda aktivitesinin neredeyse tamamının korunduğu görüldü (Şekil 31). pH 7,00 ve 8,00'de ise yine 7 gün sonunda aktivitenin sırasıyla %70 ve %50 kadar korunduğu tespit edildi. Dolayısıyla kalsiyum alginata immobilizasyonla serbest enzim ve kitosana immobilize enzime nazaran daha yüksek bir pH kararlılığı elde edildi.

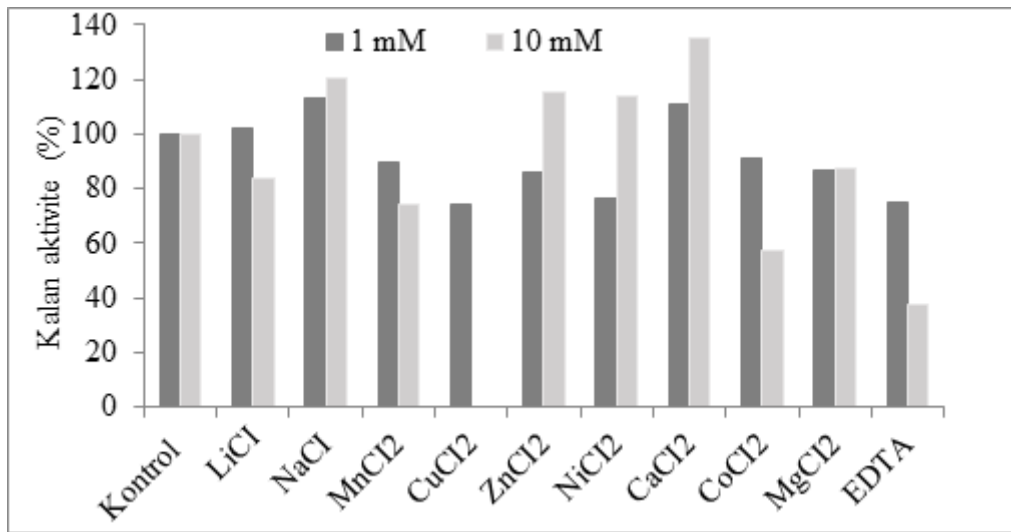
### 3.5.8. Enzim Aktivitesine Bazı Kimyasalların Etkisi

Serbest enzimin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve kimyasalların etkisi incelendiğinde 1 mM konsantrasyondaki  $Mn^{2+}$  ile yaklaşık %20, aynı konsantrasyondaki  $Ca^{2+}$  ile yaklaşık %27 oranında artış olduğu görüldü. 10 mM  $Cu^{2+}$ 'nin enzimi tamamen, 1 mM ve 10 mM EDTA'nın ise sırasıyla %15 ve %25 oranında inhibe ettiği görüldü (Şekil 32).



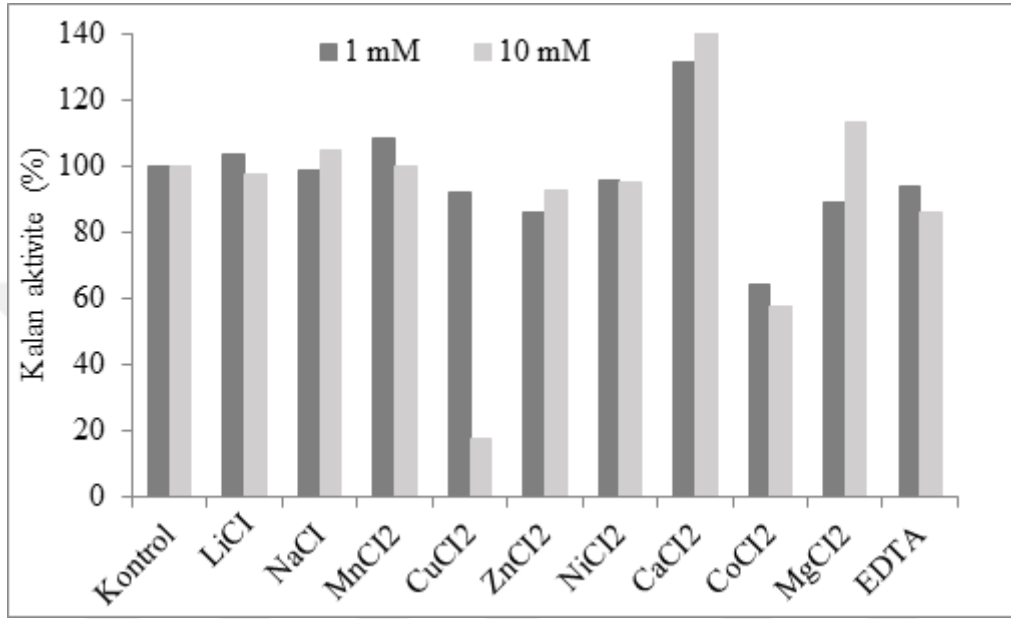
Şekil 32. Bazı metal iyonları ve EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kitosana immobilize  $\alpha$ -amilazın metal iyonları varlığındaki aktivitesi incelendiğinde bazı metal iyonları durumunda serbest enzime göre farklılıkların olduğu dikkat çekmektedir.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Ni}^{2+}$  varlığında serbest enzimin aktivitesinde çok fazla bir değişiklik olmazken immobilize enzimin aktivitesinde %20-40 arasında değişen oranlarda aktivasyonlar görüldü. EDTA varlığında ise immobilize enzimde serbest enzime göre daha yüksek aktivite kayıplarının olduğu tespit edildi (Şekil 33).



Şekil 33. Bazı metal iyonları ve EDTA'nın kitosana immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi

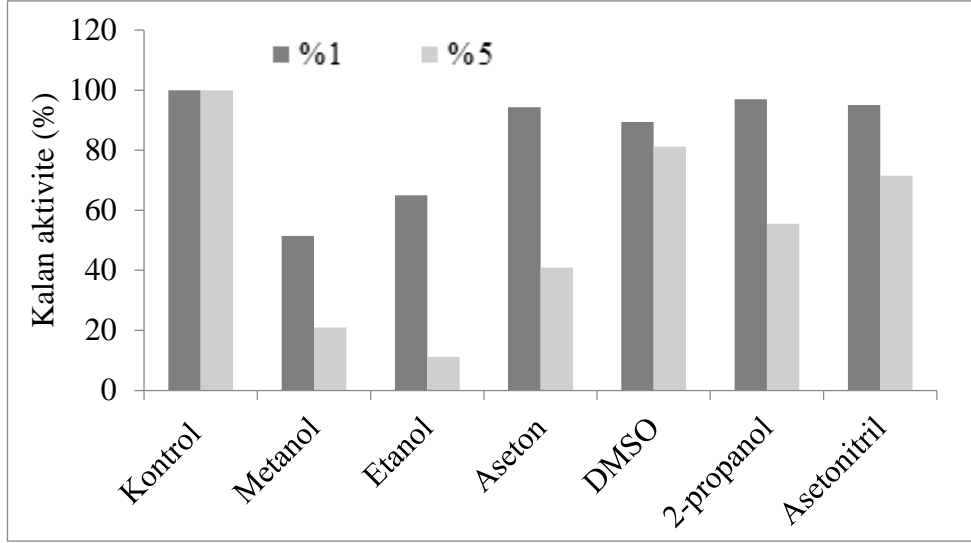
Hem serbest enzimde hem de kitosana immobilize enzimde EDTA varlığında görülen inhibisyon olayı kalsiyum alginata immobilize enzimde azalmıştır (Şekil 34). Ayrıca 10 mM  $\text{Cu}^{2+}$  durumunda serbest ve kitosana immobilize enzimde hiç aktivite görülmezken alginata immobilize enzimde yaklaşık %15'lik bir aktivite elde edildi.



Şekil 34. Bazı metal iyonları ve EDTA'nın kalsiyum alginata immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi

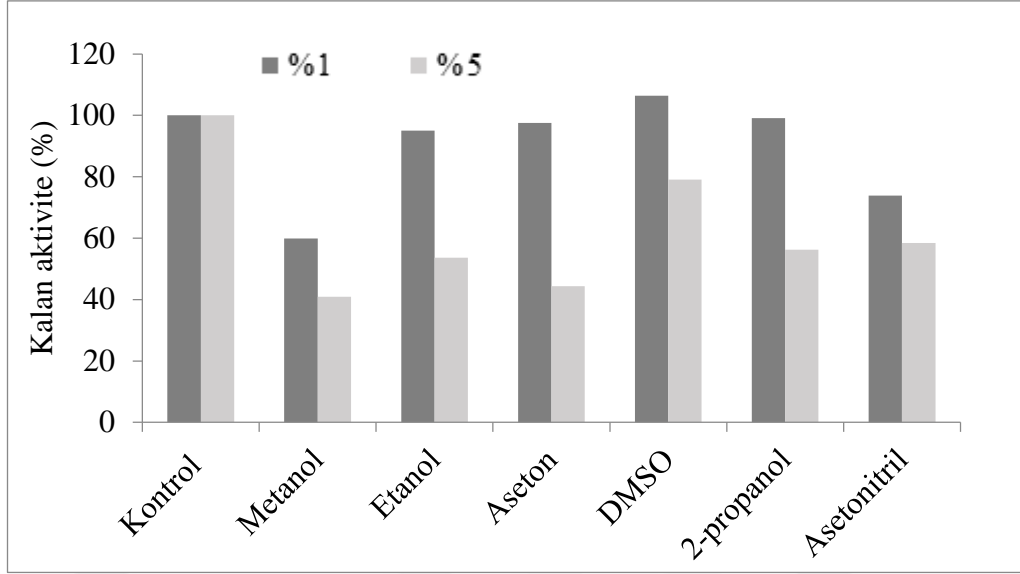
Enzim aktivitesi üzerine çeşitli organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla metanol, etanol, aseton, DMSO, 2-propanol ve asetonitrilin reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları %1 ve %5 olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen durumda elde edilen aktivite %100 olarak kabul edilip her bir çözücü için %kalan aktiviteler hesaplandı.

Denenen organik çözücülerden özellikle %5 konsantrasyondaki metanol ve etanol varlığında serbest enzimde %80-90'lara varan oranda inhibisyonlarla karşılaşıldı. %1'lik aseton, DMSO, 2-propanol ve asetonitril aktivite üzerinde çok fazla bir değişiklik yaratmazken konsantrasyon %5'e çıkarıldığında enzimi değişik oranlarda inhibe ettikleri görüldü. Dolayısıyla *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının bazı organik çözücüler varlığında yüksek bir aktivite gösterdiği söylenebilir (Şekil 35).



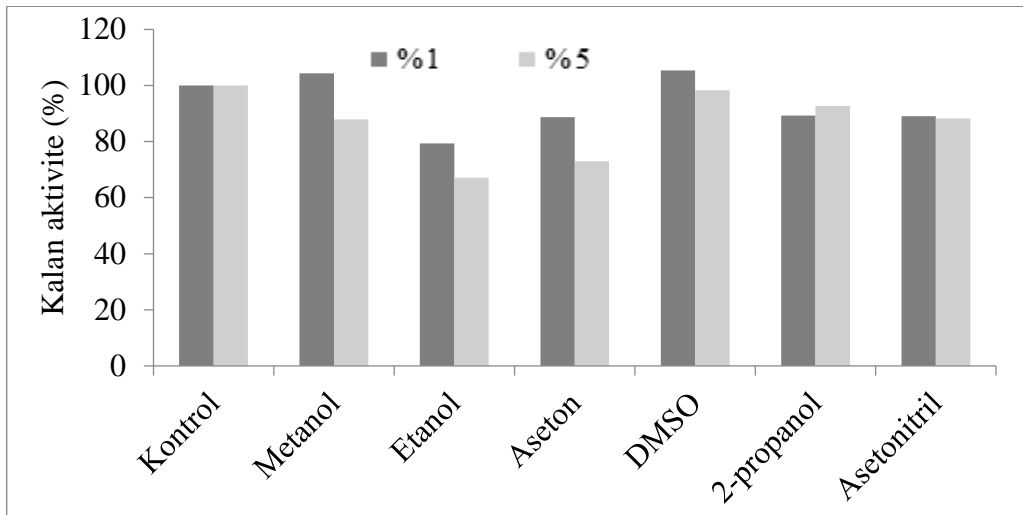
Şekil 35. Bazı çözücülerin serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kitosana immobilize enzimin organik çözücüler varlığındaki aktivitesi incelendiğinde özellikle metanol ve etanol varlığında farklılıklar görülmektedir (Şekil 36). Serbest enzim bu çözücüler varlığında aktivitesini büyük oranda kaybederken immobilize enzim durumunda bu kaybın azaldığı görülmektedir. Serbest enzimde %1 DMSO ile yaklaşık %10'luk bir aktivite kaybı görülürken immobilize enzimde böyle bir aktivite kaybının olmadığı görülmektedir. Denenen diğer çözücüler varlığında ise çok fazla bir değişiklik gözlenmemektedir. Dolayısıyla kitosana immobilizasyonla bazı organik çözücülere karşı direncin arttığı söylenebilir.



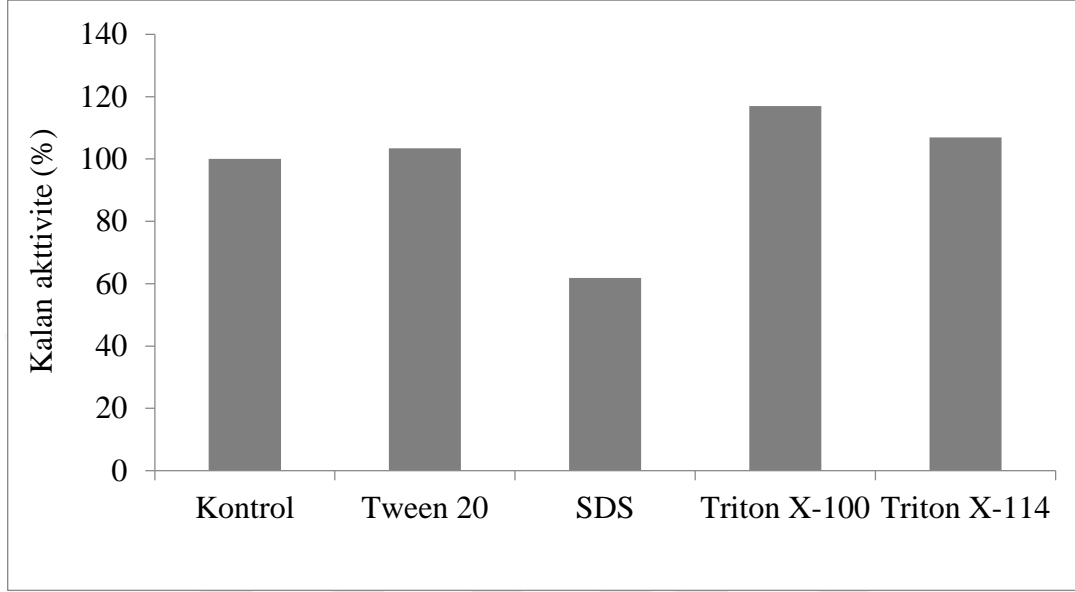
Şekil 36. Bazı çözücülerin kitosana immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 37'den de görüldüğü üzere %5 konsantrasyonda metanol, etanol ve aseton varlığında serbest enzimde ve kitosana immobilize enzimde %50'nin üzerinde inhibisyon varken kalsiyum alginata immobilize enzimde bu inhibisyon oranı yaklaşık %10-%30'lara kadar düştü. Ayrıca enzim kalsiyum alginata immobilize edildiğinde diğer çözücüler durumunda da kısmen iyileşmeler görüldü.



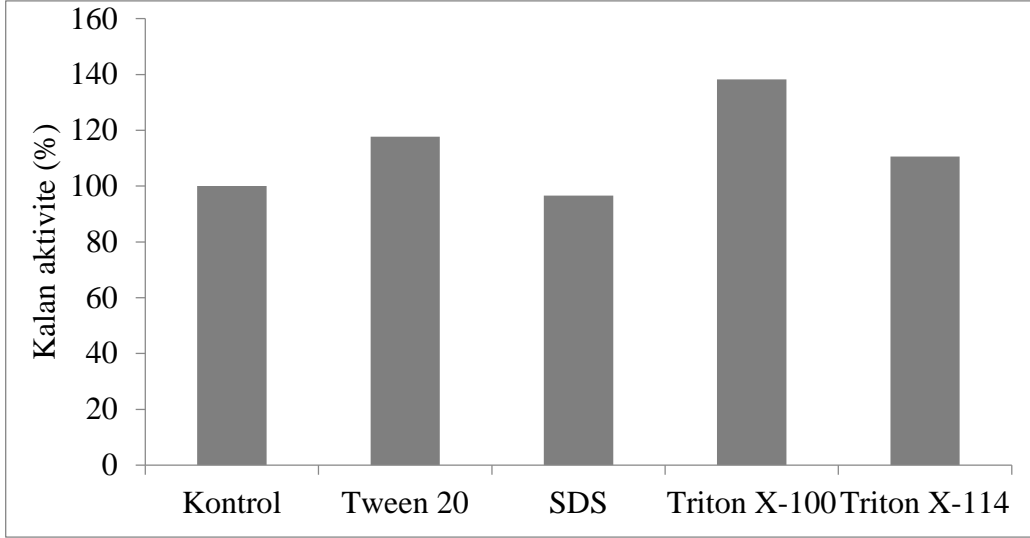
Şekil 37. Bazı çözücülerin kalsiyum alginata immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi

Serbest enzimin bulunduğu reaksiyon ortamına %1 konsantrasyonda ilave edilen Tween 20, Triton X-100 ve Triton X-114 enzim aktivitesinde az miktarda artışa neden olurken SDS varlığında aktivitede yaklaşık %40'lık bir azalma meydana geldi (Şekil 38).



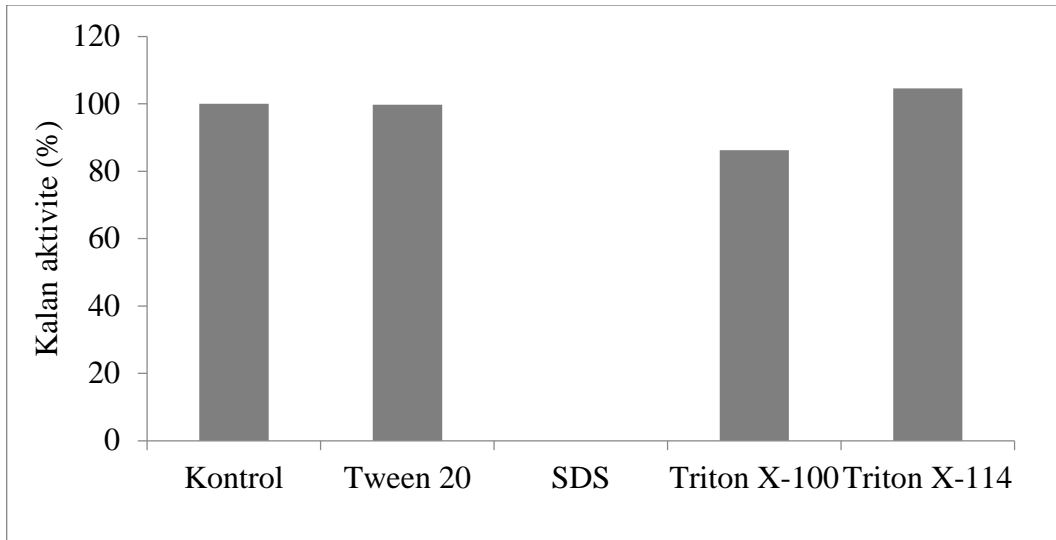
Şekil 38. Bazı deterjanların serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi

Serbest enzimde %1 konsantrasyonda denenen Tween 20 ile aktivite değişmezken kitosana immobilize enzimin aktivitesinde yaklaşık %20'lik bir artış meydana geldi (Şekil 39). Serbest enzimde Triton X-100 varlığındaki yaklaşık %15'lik aktivasyon, immobilize enzim durumunda yaklaşık %40'a çıktı. Serbest enzimde SDS varlığında yaklaşık %40'a varan inhibisyon ise kitosana immobilizasyonla ortadan kalkmıştır. Dolayısıyla kitosana immobilizasyonun enzimin bazı deterjanlar varlığındaki kullanılabilirliğine olumlu yönde katkı yaptığı kolaylıkla ifade edilebilir.



Şekil 39. Bazı deterjanların kitosana immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi

Triton X-100, serbest enzimi ve kitosana immobilize enzimi sırasıyla yaklaşık %15 ve %40 oranında aktive ederken kalsiyum alginata immobilize enzimi yaklaşık olarak %15 kadar inhibe etti (Şekil 40). SDS varlığında kalsiyum alginat boncukları parçalandığı için enzim aktivitesi bakılamadı.



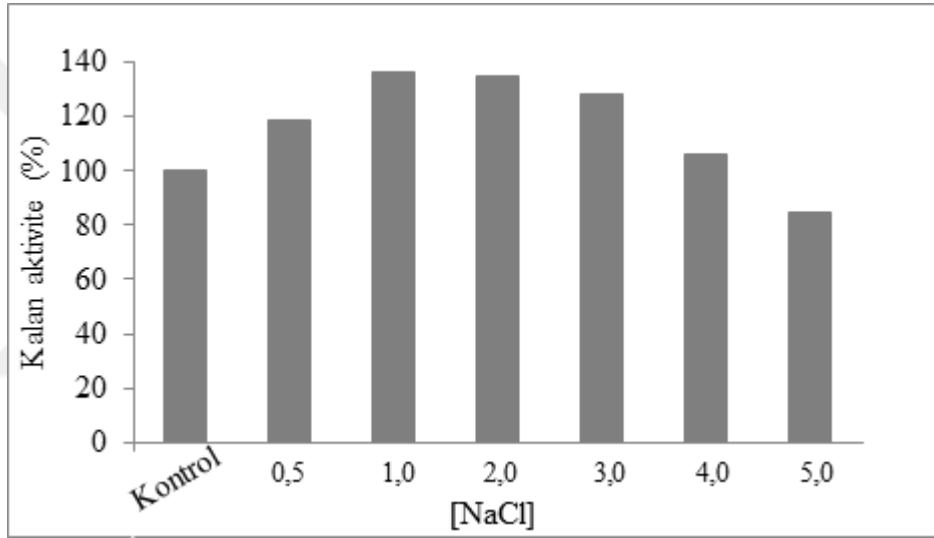
Şekil 40. Bazı deterjanların kalsiyum alginata immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi



### 3.5.9. Enzimlerin Tuz Toleransı

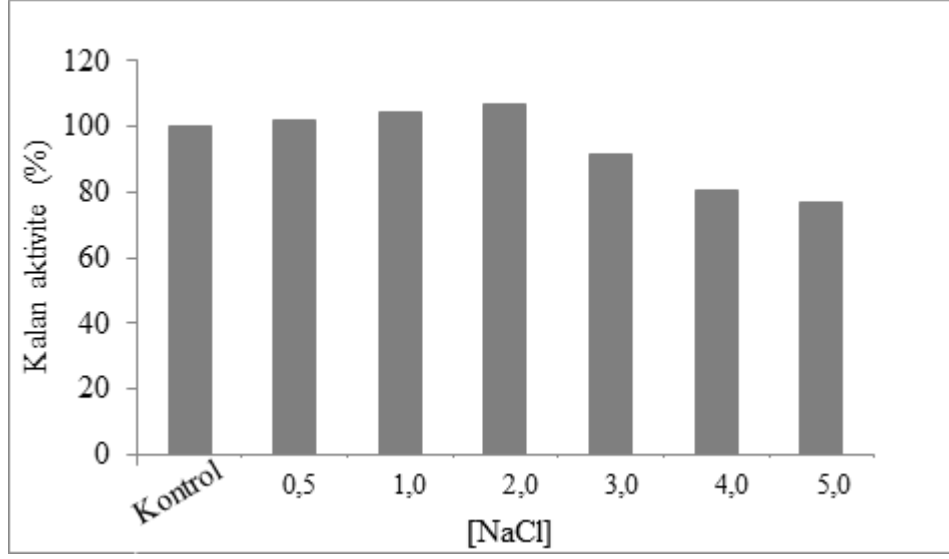
Serbest ve immobilize enzimlerin tuz toleransını belirlemek için, son konsantrasyon 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 M NaCl olacak şekilde deney tüpleri hazırlandı ve standart deney koşullarında enzim aktivitesi tayini yapıldıktan sonra tuz konsantrasyonu-%kalan aktivite grafikleri çizildi.

Serbest ve immobilize enzimlerin tuz toleransı incelendiğinde, serbest enzimin 1,0 ve 2,0 M'lık tuz konsantrasyonlarında yaklaşık %35-36 civarında aktive olurken 5,0 M'lık tuz konsantrasyonunda yaklaşık %16 kadar inhibe olduğu belirlendi (Şekil 41).



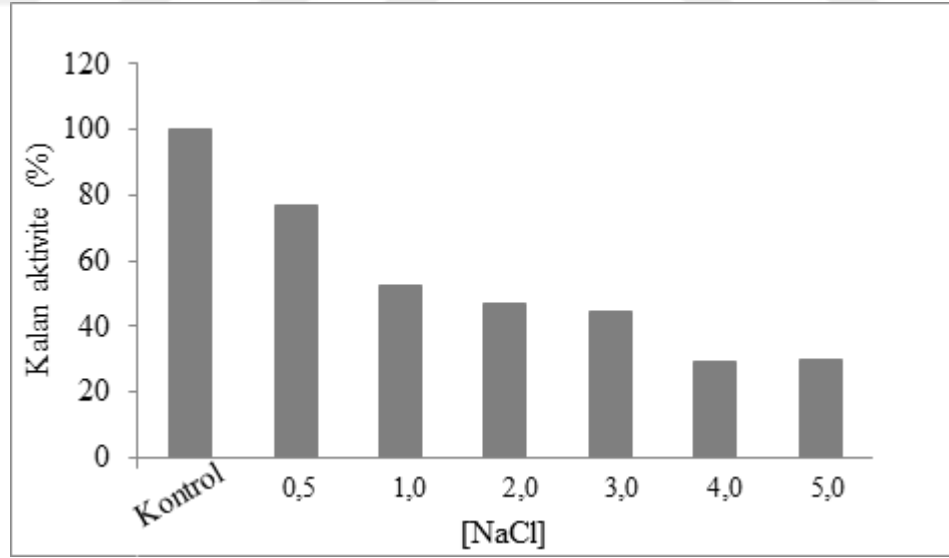
Şekil 41. Serbest enzimin tuz toleransı

Kitosana immobilize enzimde 0,5, 1,0 ve 2,0 M tuz konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde fazla bir değişiklik olmadığı, 4,0 ve 5,0 M'lık tuz konsantrasyonlarında ise enzimin yaklaşık %20-24 arasında inhibe olduğu tespit edildi (Şekil 42).



Şekil 42. Kitosana immobilize enzimin tuz toleransı

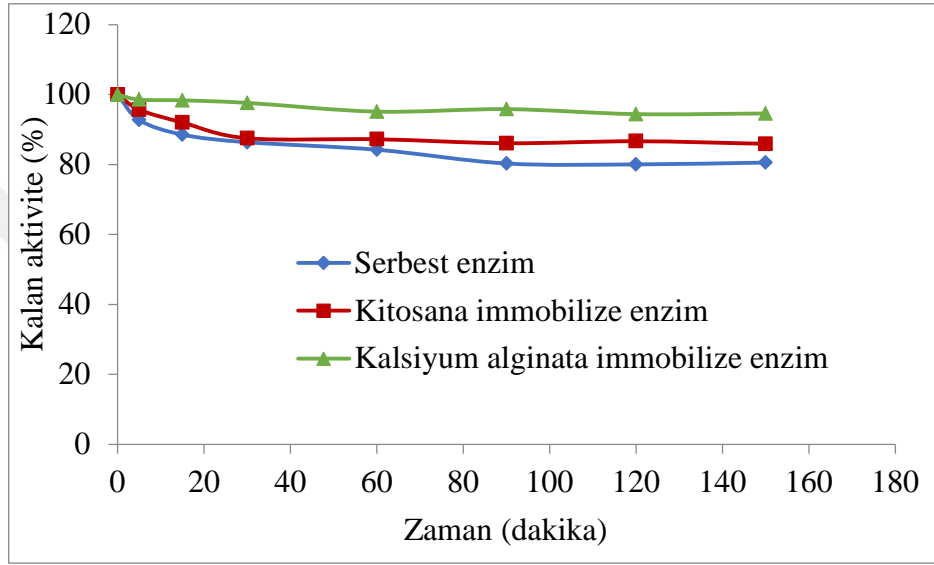
Alginata immobilize enzimde 1,0 M'dan fazla olan tüm tuz konsantrasyonlarında enzimin oldukça fazla miktarda inhibe olduğu görüldü (Şekil 43).



Şekil 43. Kalsiyum alginata immobilize enzimin tuz toleransı

### 3.5.10. Enzimlerin Proteaz Varlığındaki Kararlılıklarının İncelenmesi

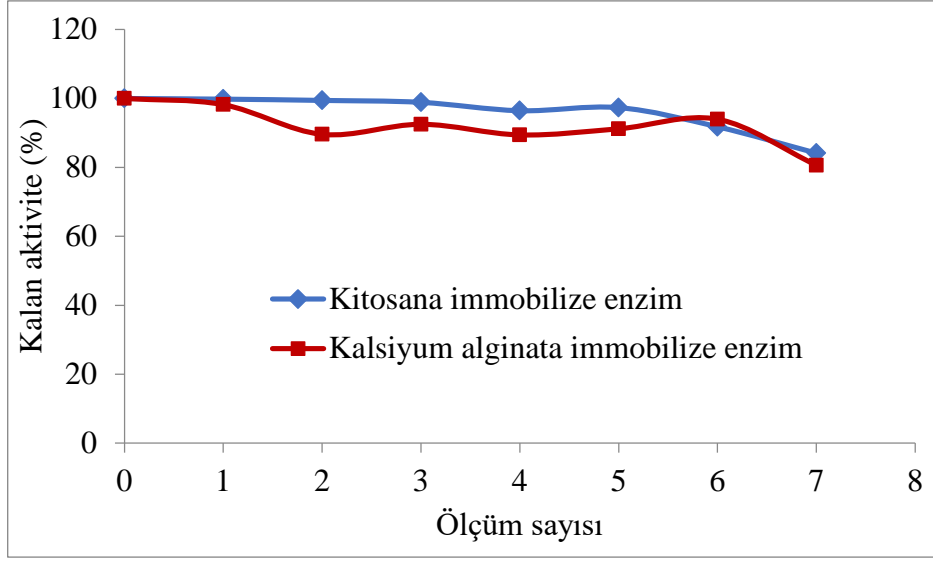
Serbest enzimin ve immobilize enzimlerin proteaz varlığındaki kararlılıkları incelendiğinde 150 dakika sonunda serbest enzimde yaklaşık olarak %20'lik bir kayıp görülürken, bu oranın kitosana immobilize enzimde yaklaşık %15'e, alginata immobilize enzimde ise %6'ya düştüğü görüldü (Şekil 44).



Şekil 44. Enzimlerin proteaz varlığındaki kararlılıklarının incelenmesi

### 3.5.11. İmmobilize Enzimlerin Kullanım Sıklığının Belirlenmesi

İmmobilize enzimlerin kullanım sıklığı 7'şer tekrar yapılarak belirlendi. Hem kitosana hem de kalsiyum alginata immobilize enzim için 7 ölçüm sonunda aktivitede sadece yaklaşık %20'lik kayıplar gerçekleşti (Şekil 45).



Şekil 45. İmmobilize enzimlerin kullanım sıklığının belirlenmesi

### 3.6. Enzimlerin Bazı Endüstriyel Alanlardaki Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

#### 3.6.1. Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Çeşitli Ticari Yıkama Deterjanları ile Uygunluğunun Test Edilmesi

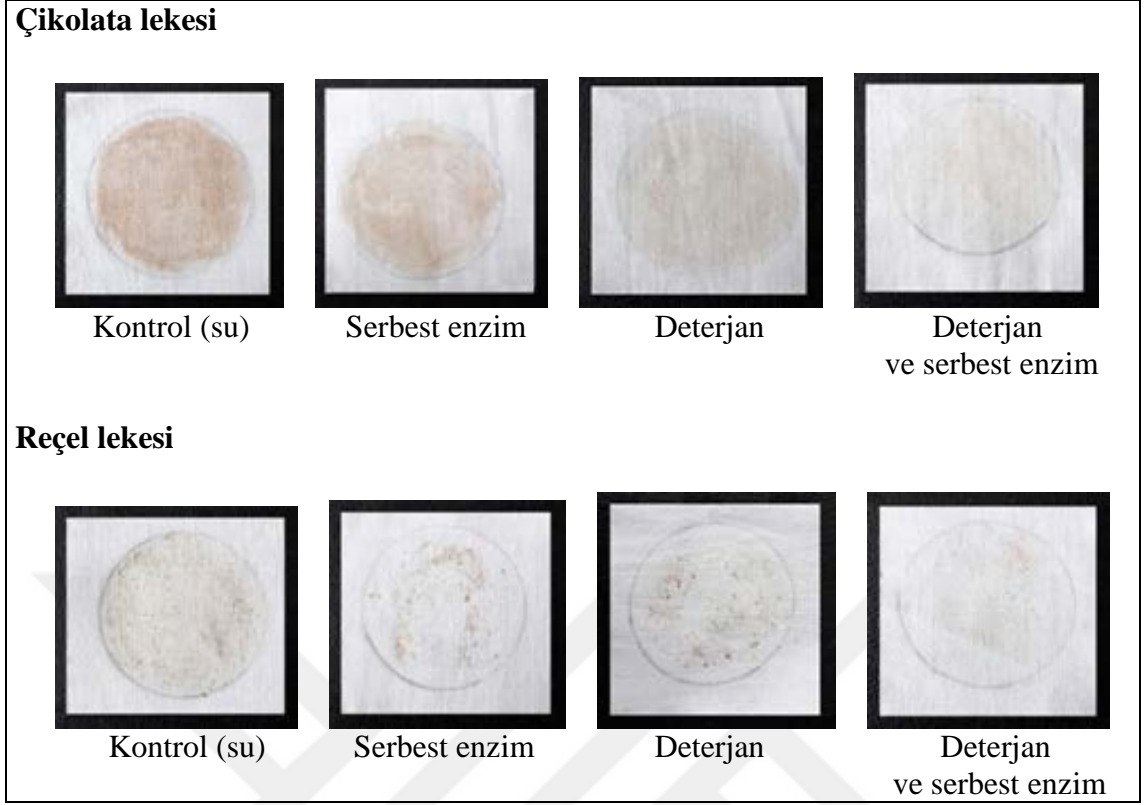
Serbest ve kitosana immobilize enzimin bir ticari deterjan katkısı olarak kullanılabilme potansiyeli incelendi. Yapılan çalışmalarda standart deney koşullarında enzim aktivite tayinleri yapıldı ve hem serbest hem de kitosana immobilize enzimin en yüksek aktiviteyi Persil marka deterjan varlığında gösterdiği tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 11. Serbest ve kitosana immobilize enzimin çeşitli ticari yıkama deterjanları ile uygunluğunun test edilmesi

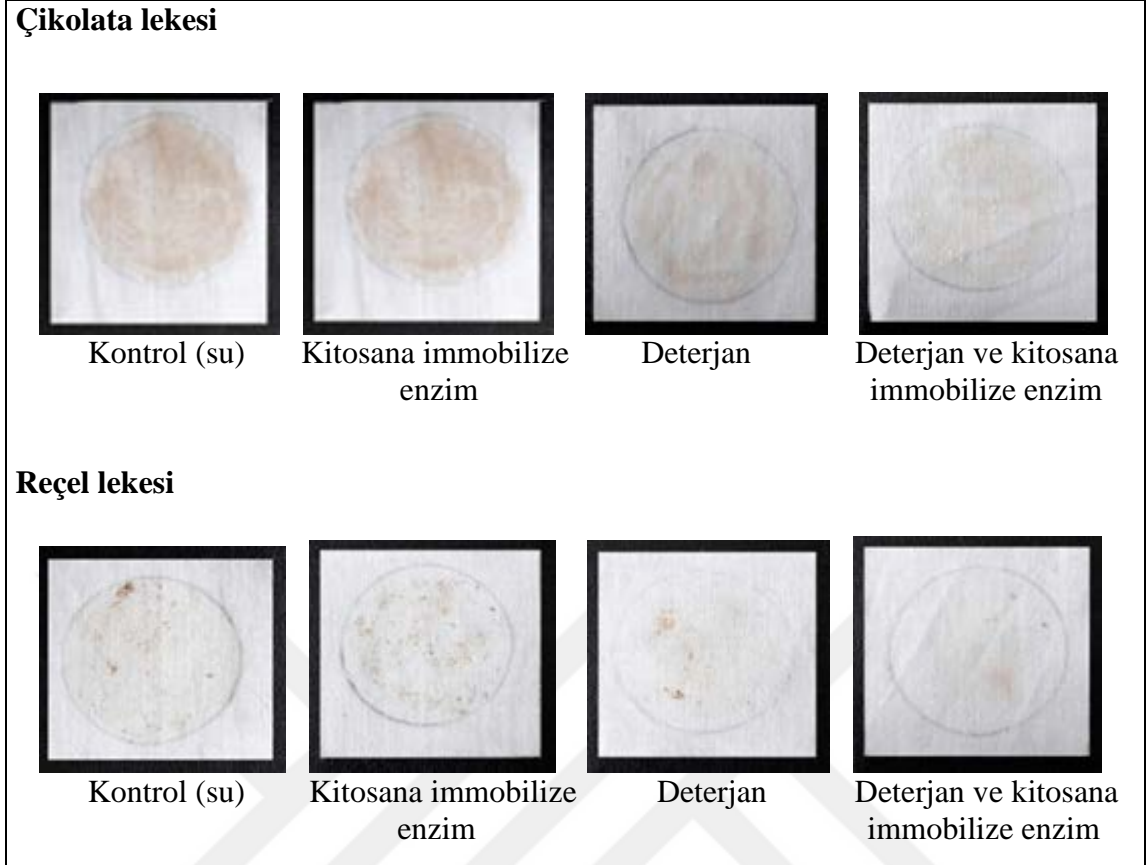
Deterjanlar	Kalan aktivite (%)	
	Serbest enzim	Kitosana immobilize enzim
Omo (Katı çamaşır deterjanı)	90,63	76,88
Ariel (Katı çamaşır deterjanı)	89,52	74,15
Persil (Katı çamaşır deterjanı)	92,18	81,05
Alo (Katı çamaşır deterjanı)	77,10	73,43
Etimatik (Katı çamaşır deterjanı)	59,44	51,04
Perwol (Sıvı çamaşır deterjanı)	66,07	66,07
Woolite (Sıvı çamaşır deterjanı)	59,07	58,98
Finish (Katı bulaşık deterjanı)	88,42	67,97
Fairy (Sıvı bulaşık deterjanı)	59,80	65,08

### 3.6.2. Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Yıkama Performansı Analizi

Yıkama performansı analizi çalışmasında serbest ve kitosana immobilize enzimin deterjan katı maddesi olarak kullanılabilirliği görsel olarak test edildi. Bu amaçla, üzerinde çikolata ve reçel lekesi oluşturulan kumaş parçaları, içerisinde ayrı ayrı musluk suyu, enzim, deterjan, deterjan ile enzim içeren erlenlerde yıkamaya tabi tutuldu. Yıkama işlemi sonunda deterjan ve enzimi birlikte içeren erlendeki kumaş parçasının sadece deterjan içeren erlendeki kumaş parçasından daha temiz olduğu görüldü (Şekil 46 ve 47).



Şekil 46. Serbest enzimin yıkama performansı analizi



Şekil 47. Kitosana immobilize enzimin yıkama performansı analizi

### 3.6.3. Serbest ve Kitosana İmmobilize Enzimin Haşıl Alma Etkinliğinin Belirlenmesi

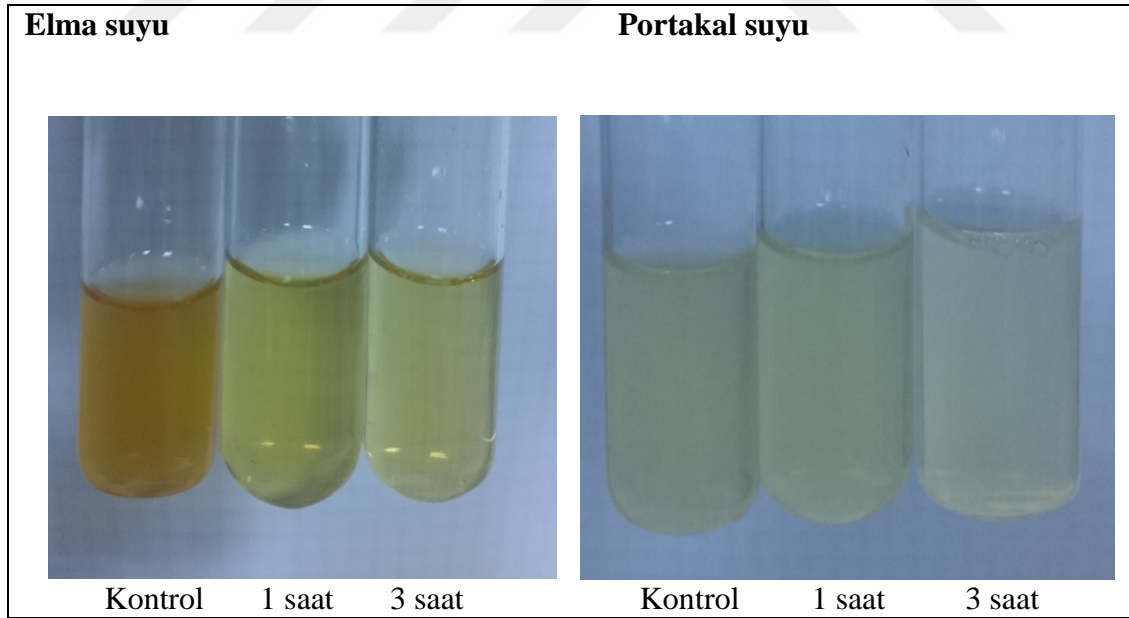
Serbest ve kitosana immobilize enzimin haşıl alma etkinliği farklı pH'daki tamponlar ve musluk suyu kullanılarak 40 ve 50 °C'lerde belirlendi. Serbest enzimin haşıl alma etkinliğinin 50 °C'de ve pH 5,50'de daha yüksek olduğu tespit edildi. Kitosana immobilize enzimin haşıl alma etkinliğinin ise serbest enzime kıyasla daha düşük olduğu görüldü (Tablo 12).

Tablo 12. Serbest ve kitosana immobilize enzimin haşıl alma etkinliği

Sıcaklık (°C)	Haşıl alma (%)			
	Serbest enzim		Kitosana immobilize enzim	
	pH 5,50	Musluk suyu	pH 4,50	Musluk suyu
40	77,6	62,7	31,0	23,6
50	86,2	73,2	20,9	16,7

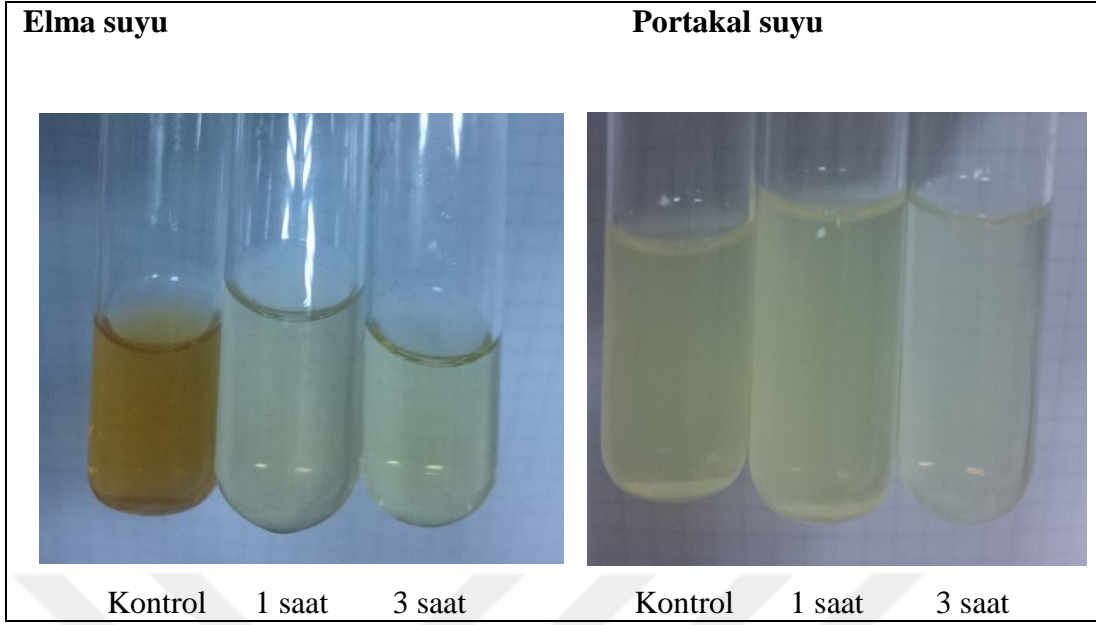
### 3.6.4. Serbest ve Alginata İmmobilize Enzimin Meyve Suyu İşlenmesinde Kullanılması

Meyve suyu işlenmesinde serbest ve alginata immobilize enzimin kullanılabilirliği incelendi ve meyve suyunun bazı parametrelerinde değişim gözlemlendi. Berraklaştırma işleminde kalsiyum alginata immobilize enzimin serbest enzime oranla daha iyi sonuç verdiği (Şekil 48 ve 49) ve ilgili parametrelerinin değişimini olumlu yönde etkilediği (Tablo 13 ve 14) tespit edildi.



Şekil 48. Serbest enzimin meyve suyu berraklığına etkisi





Şekil 49. Kalsiyum alginata immobilize enzimin meyve suyu berraklığına etkisi

Tablo 13. Serbest ve kalsiyum alginata immobilize enzimin elma suyundaki bazı parametreler üzerine etkisi

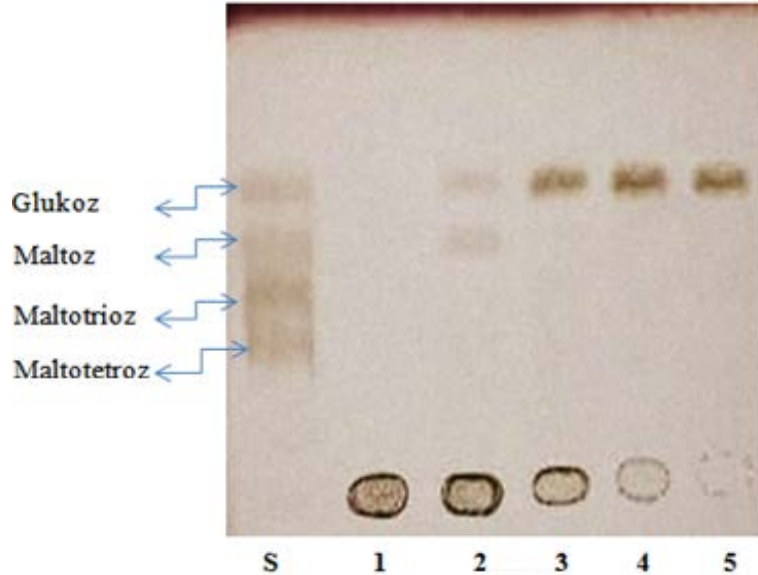
Parametreler	Kontrol	Serbest enzim		Kalsiyum alginata immobilize enzim	
		1 saat inkübasyon	3 saat inkübasyon	1 saat inkübasyon	3 saat inkübasyon
pH	4,58	4,46	4,41	4,38	4,32
Absorbans (440 nm)	1,537	0,742	0,443	0,542	0,343
İndirgen şeker (µg/mL)	27,74	28,01	28,84	28,57	29,12

Tablo 14. Serbest ve kalsiyum alginata immobilize enzimin portakal suyundaki bazı parametreler üzerine etkisi

Parametreler	Kontrol	Serbest enzim		Kalsiyum alginata immobilize enzim	
		1 saat inkübasyon	3 saat inkübasyon	1 saat inkübasyon	3 saat inkübasyon
pH	4,27	4,25	4,15	4,21	4,07
Absorbans (440 nm)	1,291	1,209	1,031	1,149	0,898
İndirgen şeker (µg/mL)	2,44	2,52	2,52	2,54	2,64

### 3.7. Serbest Enzimin Maltotetroz Üretim Üretmediğinin Belirlenmesi

*R. solani* AG4 ZB-34'ten saflaştırılan enzimin %1 nişasta ile 2 saat reaksiyona sokulması sonucu açığa çıkan parçalanma ürünlerini tespit etmek amacıyla TLC yapıldı ve enzim aktivitesi sonucu başlıca glukoz açığa çıktığı görüldü (Şekil 50).



Şekil 50. %1'lik nişastanın serbest enzimle reaksiyonu sonucu açığa çıkan parçalanma ürünleri, S: Standartlar, 1: 0 dakika, 2: 1 dakika, 3: 5 dakika, 4: 15 dakika, 5: 120 dakika inkübasyon

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Literatür verileri incelendiğinde  $\alpha$ -amilaz üreten fungal kaynakların çoğunlukla *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerini içerdiği görülmektedir (Kathiresan ve Manivannan, 2006). Özellikle *Aspergillus* türleri çok çeşitli hücre dışı enzimler üretirler ve amilazlar bunlar arasında en fazla endüstriyel öneme sahip olanlardır (Hmidet vd., 2009). *A. oryzae*  $\alpha$ -amilazı satış için üretilen ilk ticari mikrobiyal enzimdir (Pedersen ve Nielson, 2000).

*R. solani* AG4 ZB-34, 20-30 °C'ler arasında oldukça iyi büyüeyebilen ve 25 °C'de optimum büyüme sıcaklığına sahip olan mezofilik bir fungustur (Demirci ve Döken, 1991). Daha önceden yapılan çalışmalarda *R. solani*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Colletotrichum capsici* funguslarının kültür filtratlarındaki amilolitik aktivitenin *in vitro* nişasta parçalanmasını sağladığı bildirilmiştir (Charya vd., 1983). Singh ve arkadaşları *R. solani*'den elde edilen ham glukoamilaz preparasyonunu ham ve pişmiş nişastayı sakkarifiye etmekte kullandıklarını rapor etmişlerdir (Singh vd., 1995). Ayrıca, *R. solani* AG4 2B-12'nin dedekte edilebilir miktarda amilaz salgıladığı bildirilmiştir (Bertagnolli vd., 1996).

Bu çalışma kapsamında *R. solani* AG4 ZB-34'ten  $\alpha$ -amilaz üretimi için en iyi katkı fazın mısır kepeği olduğu belirlendi. Yapılan bir çalışmada *Aspergillus fumigatus*'dan  $\alpha$ -amilaz üretmek için mısır kepeği kullanılmıştır (Ratnasri vd., 2014). Bazı diğer çalışmalarda ise buğday kepeğinin daha iyi bir  $\alpha$ -amilaz üretimine sebep olduğu bildirilmiştir. 2006 yılında buğday kepeği kullanılarak *Aspergillus* sp. glukoamilazı üretilmiştir. En yüksek enzim üretimi buğday kepeği ile 28 °C'de pH 5,0'de inkübasyon sonucu elde edilmiştir (Anto vd., 2006). 2007 yılında Türkiye'de yapılan bir çalışmada *Penicillium chrysogenum* fungusundan sığır yemi olarak kullanılan mısır koçanı lifi, buğday samanı ve buğday kepeğinin kullanıldığı SSF tekniğiyle  $\alpha$ -amilaz üretilmiş ve buğday kepeğinin maksimum enzim aktivitesi (160 U/mL) verdiği bulunmuştur (Balkan ve Ertan, 2007).

*R. solani* AG4 ZB-34'ten en iyi  $\alpha$ -amilaz üretimi, nemlendirici çözelti olarak pH'sı 7,00 olan NSS kullanıldığı durumda elde edildi. *A. niger* SH-2'den SSF tekniği ile 37 °C ve pH 6,0'da maksimum aktivite gösteren bir  $\alpha$ -amilaz üretilmiştir (Singh vd., 2014b). 2014 yılında yapılan bazı çalışmalarda  $\alpha$ -amilaz üretilirken farklı başlangıç pH'ları kullanılmıştır. Shah ve arkadaşları *A. oryzae*'den pH 7,0'de, Abdullah ve arkadaşları

*A. niger* (BTM-26)'den pH 5,0'de, Mishra ve grubu *Bacillus* sp'den pH 7,5'da maksimum enzim üretimini gerçekleştirmiştir (Shah vd., 2014; Abdullah vd., 2014; Mishra vd., 2014). Dolayısıyla organizma değişikçe en uygun katı fazın da değiştiği görülmektedir.

Çalışmamızda gram mısır kepeği başına %100 (w/v) oranında NSS çözeltisi kullanıldığında enzim üretiminin en fazla olduğu görüldü. *P. brevicompactum*'dan SSF tekniği  $\alpha$ -amilaz üretiminde nem miktarının etkisini incelemek amacıyla bir inceleme yapılmış ve optimum nem miktarının buğday kepeği başına %55 (w/v) olduğu bulunmuştur (Balkan ve Ertan, 2010).

Yapılan çalışmalarda *R. solani* AG4 ZB-34'ten en iyi  $\alpha$ -amilaz üretiminin fungusun optimum büyüme sıcaklığı olan 28 °C'de 6 gün inkübasyon sonunda ve %1 nişasta varlığında olduğu belirlendi. Literatürde, kullanılan organizmanın çeşidine göre farklı sonuçlarla karşılaşılabilir ki bu da beklenen oldukça normal bir sonuçtur.

*A. fumigatus* NTCC1222, 55 °C'de pH 6,0'da nemlendirici ajan olarak nutrient tuz çözeltisi, azot kaynağı olarak et ekstraktı ve katı faz olarak buğday kepeği kullanılarak 6 gün büyütüldüğünde 341,7 U/mL  $\alpha$ -amilaz üretmiştir (Singh vd., 2014a). *A. niger*'den pH 7,0 nemlendirici ajan kullanılarak 28 °C'de inkübasyon ile fazla miktarda  $\alpha$ -amilaz üretilmiştir (Sundar vd., 2012). *A. niger* (BTM-26)'den enzim üretimi için pH 5,0 nemlendirici ajan kullanılmış ve 30 °C'de 3 gün inkübasyon yapılarak  $\alpha$ -amilaz üretilmiştir (Abdullah vd., 2014). *A. japonicus* ve *Aspergillus spp*'den  $\alpha$ -amilaz üretiminde inkübasyon sıcaklığı 25 °C, *A. flavus*'dan  $\alpha$ -amilaz üretiminde ise 30 °C olarak belirlenmiştir (Fadahansi ve Garuba, 2012; Gautam vd., 2013; Pasin vd., 2014).

*A. niger* BAN 3E'den  $\alpha$ -amilaz üretimi için farklı katı fazlar kullanılmış ve her bir katı faz için maksimum enzim üretiminin farklı inkübasyon sürelerinde olduğu belirlenmiştir. Susam tohumu küspesinde inkübasyonun 4. gününde (22,5 U/mg), yerfıstığı küspesinde inkübasyonun 6. gününde (311 U/mg) ve siyah gram kepeğinde inkübasyonun 5. gününde (86 U/mg) maksimum enzim üretimi gerçekleşmiştir (Suganthi vd., 2011). *P. fellutanum* için inkübasyon zamanı 4 gün ve *P. rugulosum* için ise 3 gün olarak bulunmuştur (Kathiresan ve Manivannan, 2006; Tiwari vd., 2007). Ray ve arkadaşları *Bacillus brevis* MTTC 75212'den 1,5 gün, Shah ve arkadaşları *Aspergillus oryzae*'ı kullanarak 3 gün, Pasin ve arkadaşları ise *A. japonicus*'dan 4 gün inkübasyon ile  $\alpha$ -amilaz üretmiştir. Ayrıca Fungal izolat 6'dan  $\alpha$ -amilaz üretimi için inkübasyon süresinin 10 gün olması gerektiği bildirilmiştir (Ray vd., 2008; Tripathy vd., 2011; Shah vd., 2014; Pasin

vd., 2014). Dolayısıyla katı faz fermentasyonu için yeterli sürenin mikroorganizmaya göre farklılıklar gösterdiği rahatlıkla söylenebilir.

*A. niger* ML-17 ve *Rhizopus oligosporus* ML-10 funguslarından  $\alpha$ -amilaz üretebilmek için SSF'de buğday kepeği ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi, başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve fermentasyon ortamına bazı karbon ve azot kaynakları ile bazı kimyasalların ilave edilmesiyle enzim aktivitesinin değişimi izlenmiştir. *A. niger* ML-17 için 96 saat inkübasyon süresi, çözücünün başlangıç pH'sı olarak 5,0 ve 30 °C inkübasyon sıcaklığı maksimum  $\alpha$ -amilaz üretimine neden olmuştur.  $\alpha$ -Amilaz üretimi, fermentasyon ortamına maltoz (%0,25), maya özütü (%0,25), NaNO<sub>3</sub> (%0,25), MgSO<sub>4</sub> (%0,2), NaCl (%0,5), Tween-80 (%0,001) ve asparagin (%0,0001) eklenmesiyle 2,3 ± 0,014 IU'dan 4,4 ± 0,042 IU'ya artmıştır. *R. oligosporus* ML-10 için ise; 2,5 ± 0,023 IU üretim için optimize edilen kültür koşulları başlangıç pH'sı 5,0, inkübasyon sıcaklığı 35 °C ve inkübasyon süresi 96 saat olacak şekildedir. Besiyerine maltoz (25%), maya özütü (0,25%), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0,25%), MgSO<sub>4</sub> (0,2%), NaCl (0,75%), çözücür nişasta (0,001%) ve asparaginin (0.0001%) eklenmesi enzim üretimini önemli ölçüde artırarak 3,2 ± 0,027 IU seviyesine ulaştırmıştır (Irfan vd., 2012).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarla *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazı nişasta afinite tekniği kullanılarak tek basamakta %5,32 verimle 11,17 kat saflaştırıldı. *P. brevicompactum*'dan SSF tekniği ile bir fungal  $\alpha$ -amilaz üretilmiş, nişasta-afinite tekniği ile saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Balkan ve Ertan, 2010). *Thermus* sp.  $\alpha$ -amilazı, amonyum sülfat çöktürmesi, FPLC-hidrofobik etkileşim kromatografisi ve mısır nişastası afinite adsorbsiyonundan oluşan saflaştırma adımlarıyla %2,6'lık verimle 399 kat saflaştırılmıştır (Shaw vd., 1995). *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazının saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, nişasta afinite metodu kullanılmış %51 verimle 230 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir (Mendu vd., 2005). *B. subtilis* AX20  $\alpha$ -amilazı amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi, nişasta afinite adsorbsiyon metodu ve tekrar jel filtrasyon yapılarak %24,2 verimle 32,5 kat saflaştırılmıştır (Najafi vd., 2005). Yeni izole edilen bir fungus olan *A. oryzae* strain S2'den  $\alpha$ -amilazın saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi teknikleri uygulanarak 16,1 katlık bir saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Sahnoun vd., 2012). *Bacillus methylotrophicus* P11-2  $\alpha$ -amilazı amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri ile 13,1 kat ve %7 verimle saflaştırılmıştır (Xie vd., 2014).

Filamentli bir fungus olan bir *Penicillium* türünün ürettiği soğuğa adapte bir  $\alpha$ -amilaz, amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından DEAE-sefaroze ile Sefadex G-100 kolon kromatografileri ile saflaştırılmıştır (Tian-hong vd., 2004). *B. licheniformis* AS08E suşundan hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri ile  $\alpha$ -amilaz 14,5 kat saflaştırılmıştır (Jetendra ve Ashis, 2013). *A. flavus*  $\alpha$ -amilazı DEAE-selüloz ve Sefadex G-50 kolon kromatografileriyle saflaştırılmış ve pH 7,0 ve 60 °C optimum özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Bhardwaj vd., 2012). Najafi ve Kembhavi yaptıkları bir çalışmada mısır nişastasını kullanarak nişasta affinite metoduyla *Vibrio* sp.  $\alpha$ -amilazını tek basamakta saflaştırmışlardır (Najafi ve Kembhavi, 2005). 2010 yılında yapılan bir çalışmada ise yine nişasta affinite yöntemiyle, adsorban olarak mısır nişastası kullanarak *A. flavus* HBF34 glukoamilazı %25 verimle 120 kat saflaştırılmıştır (Koç ve Metin, 2010).

Saflaştırılan *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazı kitosana %67,9, kalsiyum alginata ise %59,6 verimle immobilize edildi. Gupta ve arkadaşları tarafından,  $\alpha$ -amilazın Dowex MAC-3 iyon değiştiriciye %88 verimle immobilize edildiği bildirildi (Gupta vd., 2013). *B. subtilis* I'den aseton çöktürmesi ile kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın kitin yüzeyine %15,4 ve Dowex 1X4 Cl<sup>-</sup> formuna %5,3 verimle immobilize edildiği bildirildi (Abdel-Naby vd., 1998). Fluka (Neu-Ulm, Germany)'dan temin edilen ticari  $\alpha$ -amilaz enziminin biyosensör dizaynı için kitin yüzeyine %62,9 verimle immobilize edildiği rapor edilmiştir (Reiss vd., 1998). Bir immobilizasyon çalışmasında *A. niger* kültür ortamındaki  $\alpha$ -amilazın glutaraldehid ile aktive edilmiş polianilin desteğe %42 verimle immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve serbest enzimle kıyaslandığında nişasta hidrolizi açısından katalitik etkinliğinde önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir (Pascoal vd., 2011). Tanyolaç ve arkadaşları gerçekleştirdikleri bir çalışmada ısı kararlı bir  $\alpha$ -amilazın immobilizasyonu için oldukça fazla gözenekli nitroselüloz membranlar hazırlamışlar ve bu membranlara bir affinite boyası olan Cibacron Blue (CB) takmışlardır. CB bağlı nitroselüloz membranlara ticari Termamyl enzimini immobilize ettikten sonra enzimin aktivitesinin 2,5 kat arttığını belirtmişlerdir (Tanyolaç vd., 1998).

Serbest haldeki *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazı ve kalsiyum alginata immobilize enzim için optimum pH değeri 5,50 olarak, kitosana immobilize enzim için 4,50 olarak belirlendi. Yapılan bazı çalışmalarda *A. tamarii*, *A. flavus*, *Mucor* sp. ve *Streptomyces* sp. No.4 fungal  $\alpha$ -amilazlarının optimum pH'larının genellikle asidik bölgelerde (pH 4,5-6,5) olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994; Mohapatra vd., 1998; Primarini ve Ohta, 2000; Moreira vd., 2004).  $\alpha$ -Amilaz üreten *A. niger* izolatının büyüme ortamı bileşiminin

optimizasyonu, enzim üretimi ve enzimin kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve 4,0-6,0 arasında pH optimumuna sahip olduğu bulunmuştur (Gupta vd., 2013). *Aspergillus niger* SH-2'den SSF tekniği ile üretilen  $\alpha$ -amilaz 37 °C ve pH 6,0'da maksimum aktivite göstermiştir (Singh vd., 2014b). Optimum sıcaklık ve pH değerleri *A. niger*  $\alpha$ -amilazı için 40 °C ve pH 5,0, *A. flavus*  $\alpha$ -amilazı için 40 °C ve pH 4,5 olarak belirlenmiştir (Dalvi ve Anthappan, 2007; Sreelakshmi vd., 2014). *P. brevicompactum*'dan SSF tekniği ile bir fungal  $\alpha$ -amilaz üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin 30-50 °C arasında ve pH 5,0'de maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Balkan ve Ertan, 2010).

Literatür verileri incelendiğinde immobilizasyonla birlikte enzimlerin optimum pH'sında değişiklik olabileceğine dair birçok kaynağa rastlanmaktadır. El-Benna ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *B. subtilis*'ten kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın Dowex ve kitin partiküllerine immobilize edildiği bildirildi. Dowex'e immobilize enzimin optimum pH değerinin pH 7,0'den pH 6,0'ya düştüğü, kitin partiküllerine immobilize enzimin optimum pH değerinin ise değişmediği rapor edildi (El-Banna., 2007). *B. subtilis*'ten kısmi saflaştırılarak kitine immobilize edilen  $\alpha$ -amilazın optimum pH değerinin ise pH 6,0'dan pH 5,25'e kaydığı tespit edildi (Abdel-Naby vd., 1998). pH, reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesini değiştirme kabiliyetine sahip en önemli parametrelerden bir tanesidir. İmmobilizasyon, enzim üzerinde konformasyonel değişikliklere sebep olduğundan optimum pH'nın kaymasına neden olabilir. Bu kayma, enzimin aktif bölgesi etrafındaki mikroçevrede bulunan asidik ve bazik amino asit yan gruplarının iyonizasyonunun değişmesiyle meydana gelir.

Bulgular kısmında da belirtildiği gibi serbest *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının optimum sıcaklığı 50 °C iken kitosana immobilize enzimin 40 °C'lik bir optimum sıcaklığa sahip olduğu belirlendi. Optimum sıcaklığın bu şekilde kayması immobilize enzimin düşük sıcaklıklarda gerçekleşen endüstriyel prosesler veya çeşitli uygulamalar için uygunluğunun araştırılması gerektiğinin yolunu açmaktadır. Kalsiyum alginata immobilize enzimde ise optimum sıcaklığın 50 °C'den 60 °C'ye çıktığı görüldü. Literatürde *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının pH 7,0 ile 60 °C optimum özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Bhardwaj vd., 2012). *A. tamarii*'den elde edilen  $\alpha$ -amilazların maksimum aktivitesini 50-55 °C, maya *Cryptococcus flavus*'dan elde edilen  $\alpha$ -amilazın maksimum aktivitesini ise 50 °C'de gösterdiği bildirilmiştir (Moreira vd., 2004; Wanderley vd., 2004). Yapılan diğer bazı çalışmalarda *Penicillium* türü, *P. brevicompactum*, *A. flavus*, *A. niger* ve *Fusarium solani*  $\alpha$ -amilazlarının sırasıyla 40 °C, 30-50 °C, 60 °C, 30-40 °C ve 30 °C'lik optimum

sıcaklıklara sahip oldukları belirlenmiştir (Tian-hong vd., 2004; Balkan ve Ertan, 2010; Bhardwaj vd., 2012; Kumar vd., 2012; Gupta vd., 2013). Kahraman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ticari domuz pankreas  $\alpha$ -amilazının cam boncuklara kovalent olarak immobilize edildiği ve enzimin optimum sıcaklığının 30 °C'den 50 °C'ye kaydığı bildirilmiştir (Kahraman vd., 2007). *B. subtilis*'ten kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi kitin yüzeyine immobilize edildiğinde optimum sıcaklık değerinin 20 °C'lik bir artışla 65 °C'ye çıktığı görülmüştür (Abdel-Naby vd., 1998).

Literatür verileri incelendiğinde çok farklı  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerine rastlanmaktadır. *Geobacillus sp.*LH8 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın çözünür nişasta substratı varlığında  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin sırasıyla 3 mg/mL ve 6  $\mu$ mol/min olduğu bildirilmiştir (Mollania vd., 2010). *B. subtilis* KIBGE HAS mikroorganizmasından saflaştırılmış  $\alpha$ -amilazın optimum koşullar altında çözünür nişasta substratı ile  $K_m$  değeri 2,68 mg/mL ve  $V_{maks}$  değeri ise 1773 U/mL olarak hesaplanmıştır (Bano vd., 2011). *B. licheniformis* AI20  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  değeri 0,709 mg/mL ve  $V_{maks}$  değeri ise 454 mU/mg olarak hesaplanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013). *Anoxybacillus flavithermus*'tan saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin ise sırasıyla 0,005 mM ve 3,5  $\mu$ mol/min olduğu bildirilmiştir (Fincan vd., 2014). *P. Brevicompactum*  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri çözünür nişasta substratı varlığında sırasıyla 5,71 mg/mL ve 666,6U/mL olarak bulunmuştur (Balkan ve Ertan, 2010). *B. subtilis* ve onun mutant türevleri tarafından üretilen  $\alpha$ -amilazın  $K_m$  değerleri sırası ile 1,08 ve 1,43 (mg/mL),  $V_{maks}$  değerleri ise 100 ve 151 (U/mL) olarak bulunmuştur (Demirkan, 2010). *Alicyclobacillus acidocaldarius*  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  değeri 2,9 mg/mL ve  $V_{maks}$  7936 U/mL olarak hesaplanmıştır (Satheesh Kumar vd., 2010).

*R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının kitosana ve kalsiyum alginata immobilizasyonu ile  $V_{maks}$  değerinde bir azalma  $K_{0,5}$  değerinde ise artma meydana gelmiştir. Bu durum muhtemelen enzim konformasyonunun immobilizasyondan olumsuz şekilde etkilenmesiyle açıklanabilir. Buna benzer sonuçlarla literatürde karşılaşılabilir. Örneğin, *Vigna radiata*'dan saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 1,63 U/mg, 1,66 mg/mL, Amberlite MB 150 ve kitosan boncuklara immobilize edilen enzimin  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin ise sırasıyla 0,76 U/mg, 2,77 mg/mL ve 0,83 U/mg, 5,0 mg/mL olduğu bildirilmiştir (Tripathi vd., 2007). *B. subtilis*'ten kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin serbest enzim, dowex ve kitin'e ayrı ayrı immobilize edilen enzimler için sırasıyla 10 U/mg ve 8,3 mg/mL; 25 U/mg, 16,66 mg/mL ve 11,11 U/mg ve 9,09 mg/mL olduğu bildirildi (El-Banna vd., 2007).



*B. licheniformis* 44MB82-A'dan elde edilen  $\alpha$ -amilaz Dowex iyon değiştiriciye immobilize edildiğinde enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 0,46 mM/s.g, 6,7 mg/mL olarak belirlendiği rapor edildi (Ivanova, 1998). Başka bir çalışmada NOVO (Bagsvaerd, Denmark) firmasından temin edilen *B. licheniformis* ticari  $\alpha$ -amilazının dowex MAC 3 iyon değiştiriciye immobilize edildiği ve immobilize enzimin kinetik parametreleri  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 4373 U/mg ve %0,14 olduğu bildirilmiştir (Gupta vd., 2013).

Çeşitli kaynaklardan elde edilen  $\alpha$ -amilazların tıpkı diğer özellikleri gibi ısıl kararlılıkları da farklı olabilmektedir. Yapılan alışmalar incelendiğinde *A. flavithermus*'dan saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın 40 ve 45 °C'de 2 saat kararlı olduğu, 55 °C'de 2 saat sonunda aktivitesini %50 oranında kaybettiği görülmüştür (Fincan vd., 2014). *B. licheniformis* AI20 izolatından saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz, 70 °C'de 90 dakika sonunda aktivitesinin %75'ini korumuştur (Abdel-Fattah vd., 2013). *A. niger* JGI 24  $\alpha$ -amilazı en yüksek kararlılığı 30 °C'de göstermiş ve 50 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık %80'ine sahip olmuştur (Varalakshmi vd., 2009). Katı faz fermentasyon tekniği kullanılarak üretilen *P. digitatum*'dan elde edilen  $\alpha$ -amilaz, 10-37 °C aralığındaki sıcaklıklarda 30 dakikada aktivitesinin tamamını korurken 45 °C'de enzim aktivitesinde çok büyük bir oranda düşme meydana gelmiştir (Onofre vd., 2016). *Scytalidium thermophilum*  $\alpha$ -amilazının 50 °C'de 1 saat stabil olduğu, enzimin yarı ömrünün 55 °C'de 25 dakika ve 60 °C'de 12 dakika olduğu, %1'lik nişasta varlığında 60 °C'de 1 saat tamamen stabil olduğu bulunmuştur (Aquino vd., 2003). *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının 50 °C'de 1 saat stabil olduğu bulunmuştur (Khoo vd., 1994). *A. carbonarius* amilazının 20 dakika inkübasyondan sonra 30 °C ile 80 °C arasında aktivitesinin %85'ini, 90 °C'de ise %65'ine sahip olduğu belirlenmiştir (Okolo vd., 2000). *P. brevicompactum* fungal  $\alpha$ -amilazın 30 °C'de 45 dakika inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesini %100 koruduğu belirlenmiştir (Balkan ve Ertan, 2010). *A. tamarii*  $\alpha$ -amilazının 65 °C'de birkaç saat tamamen aktif olduğu, enzimin yarı ömrünün 70 °C'de 30 dakika olduğu ve 75 °C'de ise stabil olmadığı bulunmuştur. %1'lik nişasta ile inkübe edildiğinde enzimin yarılanma ömrünün 70 °C'de 70 dakika ve 75 °C'de 40 dakika olduğu bildirmiştir (Moreira vd., 2004).

Ticari olarak temin edilip çapraz bağlı selüloz boncuklar (CELBEADS)'a immobilize edilen *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazının 55 °C'de 24 saat inkübasyonu sonucu aktivitesinin değişmediği ancak serbest enzimde %25'lik bir aktivite kaybı olduğu

bildirildi (Shewale ve Pandit, 2007). *B. subtilis* I'den aseton çöktürmesi ile kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin DEAE-selüloz ve kitine immobilize edildiği, immobilize enzimlerin 60 °C'de 1 saat sonunda aktivitelerini büyük oranda koruduğu bildirildi (Abdel-Naby vd., 1998). Yapılan başka bir çalışmada *B. subtilis* (ITBCCB148) bakterisinden elde edilen  $\alpha$ -amilaz 60 °C'de 1 saat bekletildiğinde aktivitesini neredeyse tamamen kaybetmiştir. Alginata immobilize edilen enzimin ısıl kararlılığında ise serbest enzime nazaran yaklaşık 10,5 katlık bir artış meydana gelmiştir (Yandri Amalia vd., 2013). Sigma (St Louis, MO, USA) firmasından temin edilen ticari *Bacillus sp.*  $\alpha$ -amilazının, N-izopropilakrilamit (NIPAAm) polimer matrikse immobilize edildiği, serbest ve immobilize enzimin 70 °C'de 35 dakika inkübasyon sonucu sırasıyla %33 ve %46 kalan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Chen vd., 1997). *A. sclerotiorum*'dan elde edilen  $\alpha$ -amilazın Ca-alginat boncuklara immobilize edildiği, immobilize enzimin 60 °C'de yarılanma ömrünün 164 dakika olduğu rapor edildi (Yagar vd., 2008). D. Fine-Chem Ltd. (Mumbai, India) firmasından temin edilen *A. oryzae* ticari  $\alpha$ -amilazının Ca-agar mikrokapsüllere immobilize edildiği ve immobilize enzimin 75 °C'de yarılanma ömrünün 17 dakika olduğu bildirildi (Sharma vd., 2014).

Genel olarak bakıldığında *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının ısıl kararlılık açısından bazı diğer  $\alpha$ -amilazlara göre daha avantajlı bazılarına göre ise dezavantajlı olabildiği görülebilmektedir. Ancak burada en önemli husus enzimin hangi endüstriyel alanda kullanılacağıdır ve dolayısıyla değerlendirmenin buna göre yapılması gerekmektedir. İmmobilizasyonla birlikte enzimin özellikle 50 °C'ye kadar olan kısmen düşük sıcaklıklardaki kararlılığında belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu artışın immobilize enzimlerin düşük sıcaklıklarda gerçekleşen endüstriyel işlemlerdeki kullanılabilirliğine katkı sağlayacağı açıktır.

İmmobilizasyon, enzimlerin ekstrem şartlarda ki kararlılıklarını artırmada en çok tercih edilen yollardan bir tanesidir. Genel olarak bakıldığında immobilizasyon işlemi düzgün bir şekilde yapılırsa enzimin özellikle kararlılık, aktivite, spesifite ve inhibisyonun azalması gibi birçok özelliğinde iyileşmeler meydana gelir (Mateo vd., 2007). Bunun en önemli sebebi immobilizasyonla, enzim aktivitesinin azalmasına sebep olan protein katlarının açılmasının engellenmesidir. Böylelikle enzimlerin kararlılığında ve diğer özelliklerinde olumlu gelişmeler açığa çıkmaktadır (Yandri ve Amalia, 2013). *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının yapılan immobilizasyon sonucu ısıl kararlılığının serbest enzime kıyasla daha yüksek olması bu gerçeklerle örtüşmektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarla *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının çalışılan pH'larda oldukça kararlı olduğu, immobilizasyon sonucunda da mevcut olan bu kararlılığın arttığı görülmektedir. Bu durumun enzimin endüstriyel alanlardaki kullanılabilirliğine olumlu katkılar yapacağı açıktır. Yapılan bazı çalışmada *B. subtilis* JS-2004'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın pH 5,0 ile pH 10,0 aralığında farklı tamponlarda 24 saat inkübasyonu sonucu aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirildi (Asgher vd., 2007). *A. flavithermus*'tan saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın pH 6,0, pH 7,0 ve pH 8,0'lik tamponlar içinde bir saat inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğu, 3 saat sonunda pH 6,0'da %80, pH 7,0 ve pH 8,0'de ise %60 civarında kalan aktiviteye sahip olduğu rapor edildi (Fincan vd., 2014). *G. thermoleovorans*  $\alpha$ -amilazının, pH 5,0'de 20 saat inkübasyon sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu, 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinde %50'ye yakın bir azalma olduğu ve daha ileri inkübasyon sürelerinde aktivitesini büyük oranda kaybettiği bildirildi (Mehta ve Satyanarayana, 2013). *A. fumigatus* NTCC1222'den saflaştırılan enzim pH 8,0'de maksimum aktivitesinin %90'ını ve 75 °C'de %50'sini koruduğundan termoalkali kararlı bir enzim olarak ifade edilmiştir (Singh vd., 2014a). *A. flavus*  $\alpha$ -amilazının pH 5,0 ile 8,5 aralığında stabil olduğu (Khoo vd., 1994), ektomikorizal fungus *Tricholoma matsutake*  $\alpha$ -amilazının geniş pH aralığında (4,0 ile 10,0) stabil olduğu (Kusuda vd., 2003) ve maya *Candida antarctica* CBS 6678 glukoamilazının asidik pH'larda stabil olduğu bildirilmiştir (De Mot ve Verachtert, 1987). *B. subtilis* ZJ-1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz pH 3,0 ile 9,0 arasında farklı tamponlarda 40 °C'de bir saat bekletildiğinde, pH 3,0 ve pH 4,0'da aktivitesini büyük oranda kaybettiği, pH 5,0'de aktivitesini %80 oranında koruduğu, diğer pH'larda ise aktivitesinde ciddi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Liu vd., 2014). *Bacillus sp.* YX-1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz, pH 4,5 ile pH 11,0 arasında farklı tamponlarda 40 °C'de bir saat bekletildiğinde pH 5,0'de %80 ve diğer pH'larda farklı oranlarda aktivitesini koruduğu rapor edildi (Liu ve Xu, 2008). Sigma (USA) firmasından temin edilen ticari *Bacillus sp.*  $\alpha$ -amilazının akrilik katı destek materyallerine immobilize edildiği ve immobilize enzimin pH 3,5-8,0 aralığında 1 saat süreyle kararlı olduğu bildirilmiştir (Bryjak, 2003). Cam boncuklara kovalent olarak immobilize edilen domuz pankreas  $\alpha$ -amilazının pH 6,9'da 4 °C'de 5 gün kararlı olduğu tespit edilmiştir (Kahraman vd., 2007).

*R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının 1 mM konsantrasyondaki  $Mn^{2+}$  ile yaklaşık %20, aynı konsantrasyondaki  $Ca^{2+}$  ile yaklaşık %27 oranında aktive olduğu görüldü. 10 mM  $Cu^{2+}$ 'nin enzimi tamamen, 1 mM ve 10 mM EDTA'nın ise sırasıyla %15 ve %25 oranında

inhibe ettiği belirlendi. Literatür araştırıldığında buna benzer sonuçlarla karşılaşılabildiği görülmektedir. *B. subtilis* JS-2004'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonları tarafından farklı oranlarda inhibe olduğu ve  $Ca^{2+}$  ile aktive olduğu rapor edilmiştir (Asgher vd., 2007). *Bacillus sp.* KSM-1378'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları tarafından sırasıyla %88, %91, %100 ve %100 oranlarında inhibe edildiği bildirilmiştir (Igarashi vd., 1988). *Geobacillus sp.* LH8'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve EDTA tarafından farklı oranlarda inhibe edildiği, 10 mM konsantrasyonda  $Ca^{2+}$ 'nın ise enzim aktivitesini yaklaşık iki kat artırdığı bildirildi (Mollania vd., 2010). *Bacilli* izolatlarından elde edilen ve poliglisidil metakrilat boncuklara immobilize edilen  $\alpha$ -amilazın da  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonları ile farklı oranlarda inhibe olduğu tespit edilmiştir (Akkaya vd., 2012). *A. niger*'den elde edilen  $\alpha$ -amilazın glutaraldehit modifiye polianiline immobilize edildiği ve immobilize enzimin  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonları tarafından farklı oranlarda inhibe edildiği bildirilmiştir (Pascoal vd., 2011).

Kitosana immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının metal iyonları varlığındaki aktivitesi incelendiğinde bazı metal iyonları durumunda serbest enzime göre farklılıkların olduğu dikkat çekmektedir.  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  varlığında serbest enzimin aktivitesinde çok fazla bir değişiklik olmazken immobilize enzimin aktivitesinde %20-40 arasında değişen oranlarda aktivasyonlar görüldü. EDTA varlığında ise immobilize enzimde serbest enzime göre daha yüksek aktivite kayıplarının olduğu tespit edildi. Hem serbest enzimde hem de kitosana immobilize enzimde EDTA varlığında görülen inhibisyon olayı kalsiyum alginata immobilize enzimde azalmıştır. Ayrıca 10 mM  $Cu^{2+}$  durumunda serbest ve kitosana immobilize enzimde hiç aktivite görülmezken alginata immobilize enzimde yaklaşık %15'lik bir aktivite elde edilmiştir. Neredeyse bütün amilazlarda yapısal bütünlük ve enzimatik aktivite için en az bir tane korunmuş  $Ca^{2+}$  bulunmaktadır (Aghajari vd., 2002). Reaksiyon ortamına bu metal iyonunun ilavesi ile aktivitenin artması bu durumdan kaynaklanabilir.

Metal iyonları koordinasyon bileşiklerinde değişik koordinasyon sayılarına ve geometriye sahip olabileceklerinden Lewis asidi olarak davranabilmektedirler. Bunun sonucunda, protein ligandlarına karşı davranışları farklı olmaktadır. Bu farklılıklar protein üzerindeki farklı bölgelere bağlanmalarıyla sonuçlanabilir ve bu nedenle enzim yapısı farklı yollarla değişikliğe uğrayabilir (DiTusa vd., 2001). Bazı metal iyonları durumunda enzim aktivitesinin artması bazı durumlarda ise azalması buna atfedilebilir. Ancak her bir

metal iyonunun aktiviteyi hangi mekanizma ile değiştirdiğini bulmak için daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

*R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının aktivitesinde denenen organik çözücülerden özellikle %5 konsantrasyondaki metanol ve etanol varlığında %80-90'lara varan oranda inhibisyonlarla karşılaşıldı. %1'lik aseton, DMSO, 2-propanol ve asetonitril aktivite üzerinde çok fazla bir değişiklik yaratmazken konsantrasyon %5'e çıkarıldığında enzimi değişik oranlarda inhibe ettikleri görüldü. Dolayısıyla *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının bazı organik çözücüler varlığında yüksek bir aktivite gösterdiği söylenebilir. Serbest enzim metanol ve etanol varlığında aktivitesini büyük oranda kaybederken kitosana immobilize enzim durumunda bu kaybın azaldığı görülmektedir. Ayrıca %5 konsantrasyonda metanol, etanol ve aseton varlığında serbest enzimde ve kitosana immobilize enzimde %50'nin üzerinde inhibisyon varken kalsiyum alginata immobilize enzimde bu inhibisyon oranı yaklaşık %10-%30'lara kadar düşmektedir. Ayrıca enzim kalsiyum alginata immobilize edildiğinde diğer çözücüler durumunda da kısmen iyileşmeler görülmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda *B. licheniformis* AI20 tarafından üretilen  $\alpha$ -amilazı %10 oranında etanol, metanol, isopropanol, aseton gibi çözücülere karşı büyük bir kararlılık göstermiş, %20 konsantrasyonda ise bazı çözücüler (etanol, metanol, isopropanol) enzim aktivitesinde hafif bir düşüşe neden olmuştur (Abdel-Fattah vd., 2013). *Nesterenkonia* sp. amilolitik enzim aktivitesinin ise %20 oranında aseton ve etanol ile %9 aktive olduğu bulunmuştur (Shafiei vd., 2012). Yapılan buna benzer bir çalışmada soya fasulyesinden elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin bazı organik çözücüler varlığındaki aktivitesi incelenmiş ve enzimin denenen organik çözücülerden birkaçına karşı dirençli olduğu bazı organik çözücüler durumunda ise inhibisyon gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ancak, enzimin immobilize edilmesiyle bu inhibitör etkisinin azaldığı belirlenmiştir (Jaiswal ve Prakash, 2013).

Enzimlerin organik çözücüler varlığında aktif kalma kabiliyetleri geçtiğimiz birkaç on yıldır oldukça fazla ilgi çekmektedir. Suda bulunmalarının aksine, organik çözücülerde veya organik çözücü içeren sulu çözeltilerde enzim kullanımının birçok avantajı bulunmaktadır. Örneğin bu durumlarda hem nonpolar substratların çözünürlüğü artmakta hem de bakteriyal kontaminasyon elimine edilmektedir (Ogino ve Ishikawa, 2001). Bütün bu avantajlara rağmen genellikle enzimler organik çözücüler varlığında denatüre olabilmektedir. Bu aktivite kaybına difüzyon problemi, protein esnekliğinin kısıtlanması, enzim-substrat ara ürününün düşük stabilizasyonu ve enzimin uygun olmayan hidrasyonu

gibi birçok faktör sebep olabilmektedir (Secundo ve Carrea, 2003). Ayrıca, konformasyonel değişimlerin, organik çözücü içeren ortamlarda enzim aktivitesini azaltan en önemli faktörlerden bir tanesi olduğu da dünya genelinde kabul edilen bir açıklamadır (Klibanov, 1997). Bütün bu nedenlerden dolayı özellikle çözücüler varlığında kararlılığını koruyabilen enzimler çözücü kullanılan biyoteknolojik uygulamalar için çok önemli avantajlar sağlamaktadır (Shafiei vd., 2012).

*R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazın özellikle kitosana immobilizasyonun enzim bazı deterjanlar varlığındaki kullanılabilirliğine olumlu yönde katkı yaptığı kolaylıkla ifade edilebilir. *Marinobacter sp.* EMB8'den saflaştırılan enzimin, %0,1 konsantrasyonda SDS ve Triton X-100 deterjanları ile 1 saat muamele edilmesi sonucunda aktivitesini %75 oranında koruduğu bildirildi (Kumar ve Khare, 2012). *B. licheniformis* AI20 tarafından üretilen  $\alpha$ -amilazın aktivitesi üzerine Triton X-100 ve Tween-20 gibi deterjanların ve SDS gibi sürfaktanların etkisi çalışılmış, %0,25 konsantrasyonda denenen deterjanların enzim aktivitesini değiştirmediği bulunmuştur. %1 konsantrasyondaki anyonik sürfaktan SDS'in enzim aktivitesinde %35'lik bir azalmaya sebebiyet verdiği saptanmıştır (Abdel-Fattah vd., 2013). *B. licheniformis* NH1  $\alpha$ -amilazının 1 saat 40 °C'da %1 konsantrasyonda Tween-20 ve Triton X-100 ile muamele edildiği ve bu süre sonunda aktivitede herhangi bir kayıp olmadığı bildirilmiştir (Hmidet vd., 2010). *A. acidocaldarius*  $\alpha$ -amilazının SDS, Triton X-100 ve Tween-20 tarafından etkilenmediği ve stabil olduğu belirlenmiştir (Satheesh Kumar vd., 2010). *Bacilli* izolatlarından elde edilen ve poliglisidil metakrilat boncuklara immobilize edilen  $\alpha$ -amilazın, %5 konsantrasyondaki SDS ve Triton X-100 varlığında aktivitesinde 6 kat artış olduğu tespit edilmiştir (Akkaya vd., 2012).

Amilaz aktivitesinin bazı deterjanlar varlığında artması hem bu deterjanların enzim konformasyonu üzerinde hem de protein molekülünün tersiyer yapısının kararlı kılınmasında görev alan hidrofobik etkileşimler üzerinde olumlu etkilere neden olabildiğini göstermektedir (Vita ve Dalzoppo, 1985; Creighton, 1989). Bazı deterjanlar varlığında enzim aktivitesinin azalması da protein konformasyonunun muhtemel bozulması ile bağdaştırılabilir.

Nişastanın şekerleştirme işlemlerinde ve endüstrideki farklı uygulamalarda kullanılan amilazlar için, yüksek tuz toleransına sahip olmanın yararlı bir özellik olduğu bildirilmiştir (Mohapatra vd., 1998). Tuz tolerans testinin, kirlilik kontrol mekanizmalarında, selüloz, nişasta ve yüksek oranda tuz içeren atık suların işlenmesinde önemli olduğu belirtilmiştir (Banerjee vd., 2001; Cordeiro vd., 2002). Yaptığımız çalışmada serbest enzimin tuz

toleransının yüksek olması bu endüstriyel uygulamalarda rahatlıkla kullanılabilceğini göstermektedir.

Kitosana ve kalsiyum alginata immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazlarının 7'şer tekrardan sonra aktivitelerinde sadece yaklaşık %20'lik kayıplar gerçekleşti. Ticari olarak satın alınan  $\alpha$ -amilazın polianilin-polivinil alkol filme immobilize edildiği ve immobilize enzimin 30 ölçüm sonunda %60 aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Singh vd., 2013). Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada N-izopropilakrilamit (NIPAAm) polimere immobilize edilen  $\alpha$ -amilazın peş peşe 12 ölçüm sonucunda %54 oranında aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Chen vd., 1997). 2014 yılında yapılan bir çalışmada Ca-agar mikrokapsüllere immobilize edilen  $\alpha$ -amilazın 6 ölçüm sonucu aktivitesini %22 oranında kaybettiği rapor edilmiştir (Sharma vd., 2014). *Aspergillus sclerotiorum*'dan SSF ile üretilen  $\alpha$ -amilaz kalsiyum alginat boncuklarına immobilize edilmiştir. Optimum immobilizasyon şartlarında hazırlanan boncuklar başlangıç aktivitelerini sadece %35 oranında kaybederek 7 defaya kadar kullanılabilmiştir (Yagar vd., 2008).

Yıkama performansı analizi çalışmasında serbest ve kitosana immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazlarının deterjanlarla beraber kullanıldıklarında reçel ve çikolata lekesi içeren kumaş parçalarını daha iyi temizledikleri tespit edildi. Hmidet ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *B. licheniformis* NH1'den elde edilen proteaz-amilaz enzim çözeltisinin ticari deterjan olan Ariel (5 mg/mL) varlığında kan lekesi, barbekü sosu ve çikolata lekesi üzerindeki yıkama performansını incelemiş ve oldukça etkili olduğu görülmüştür (Hmidet vd., 2009). Başka bir çalışmada  $\alpha$ -amilaz, silika nanopartiküllere immobilize edilmiş ve nişasta lekelerini uzaklaştırmasına yardımcı olmak için toz deterjan formülasyonunda kullanılmıştır. Immobilize enzim içeren deterjan kullanımı ile nişasta lekelerinin daha iyi uzaklaştığı tespit edilmiştir. (Soleimani vd., 2012). *B. subtilis* [MAFE 118079] ham ekstraktının ticari bir deterjan varlığında çikolata, ekmek reçeli ve salça üzerindeki yıkama performans analiz yapılmış ve ekstraktın potansiyel bir deterjan biyokatki maddesi olabileceğini bildirilmiştir (Rameshkumar ve Sivasudha, 2011). Roy ve arkadaşları *B. subtilis* strain AS-S01a'dan alkali bir  $\alpha$ -amilazı saflaştırmış, enzimin ticari bir deterjan (7 mg/mL) varlığında, çikolata lekesi üzerinde yıkama performans analizini gerçekleştirmiş ve işlem sonunda enzim ilavesi yapılan yıkama işleminin daha etkili olduğunu bildirmiştir (Roy vd., 2012).

Serbest ve kitosana immobilize *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazlarının haşıl alma etkinlikleri incelenmiş serbest enzimin haşıl alma etkinliğinin 50 °C’de ve pH 5,50’de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kitosana immobilize enzimin haşıl alma etkinliğinin ise serbest enzime kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. *A. niger* ve *A. flavus*’dan iki farklı  $\alpha$ -amilaz saflaştırılmış ve bu iki enzimin karıştırılıp kullanılması sonucu pamuk kumaşlarda 40 °C’de pH 5,0’de 1 saat sonunda %90 oranında haşıl alma kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir (Sreelakshmi vd., 2014; Dalvi ve Anthappan, 2007).

Tez kapsamında yapılan çalışmada kalsiyum alginata immobilizasyon sonucunda enzimin hem elma hem de portakal suyunu serbest enzime oranla daha fazla berraklaştırdığı tespit edilmiştir. Dey ve Banerjee yaptıkları bir çalışmada  $\alpha$ -amilazı elma suyu berraklaştırmasında kullanmışlar ve 440 nm’deki absorbans değerinin berraklaştırma sonucunda 1,427’den 0,280’e düştüğünü, pH değerinin 3,4’den 3,2’ye azaldığını ve indirgen şeker miktarının 0,92 kat arttığını bildirmişlerdir (Dey ve Banerjee, 2014). Yaptığımız çalışmada elma suyunun içerisindeki şeker miktarının, serbest enzim ve kitosana immobilize enzimde sırasıyla 3 saat sonunda 1,039 ve 1,049 kat arttığı, 440 nm’deki absorbans değerlerinin sırasıyla 1,537’den 0,443 ve 0,343’e düştüğü görüldü. Bu sonuçlar da enzimin meyve suyu endüstrisinde kullanılabileceğini desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmada *R. solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının nişastayı hidrolizi sonucunda temel ürün olarak glukoz ürettiğini belirledik. Literatürde farklı zincir uzunluğuna sahip oligo sakkarit açığa çıkaran birçok  $\alpha$ -amilaz olduğu yapılan çalışmada bildirilmiştir (Kumar ve Khare, 2012). Aref ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Ficus carica*  $\alpha$ -amilazının reaksiyon ürünlerini belirlemek amacıyla TLC yapmışlar ve 5 dakikalık reaksiyon sonucunda maltotrioz ve maltotetroz, maltopentoz oluştuğunu görmüşler ve 60 dakika sonunda ise bu ürünlere ilaveten maltozun da açığa çıktığını bildirmişler (Aref vd., 2011). Koç ve Metin *A. flavus* HBF34’den saflaştırdıkları bir glukoamilazın çözümlü nişasta varlığındaki hidroliz ürünlerini incelemişler ve 2 saatlik reaksiyon sonunda glukoz açığa çıktığını bildirmişler (Koç ve Metin, 2010). Başka bir çalışmada *Bacillus* strain GM8901’den saflaştırılan  $\alpha$ -amilazın çözümlü nişasta ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan ürünleri belirlemek amacıyla TLC yapılmış ve 2 dakikalık reaksiyon sonucunda sadece maltoheksoz, 15 saatlik reaksiyon sonucunda ise maltoz ve maltotetroz açığa çıktığı bildirilmiştir (Kim vd., 1995).



## 5. ÖNERİLER

Sonuç olarak bakıldığında yapılan çalışmalar kapsamında *Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34 fungusundan mısır kepeği kullanılarak SSF ile  $\alpha$ -amilaz üretilmiş, üretilen enzim nişasta afinite tekniğiyle tek basamakta saflaştırılmış, saflaştırılan enzim ayrı ayrı kitosana ve kalsiyum alginata immobilize edilmiş ve enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Üretilen enzimin 50 °C'de optimum aktivite göstermesi ve bu sıcaklık değerinin kitosana immobilizasyonla 40 °C'ye düşmesi, kalsiyum alginata immobilizasyonla 60 °C'ye çıkması enzimin farklı immobilizasyonlar sonucunda geniş bir sıcaklık aralığında farklı endüstriyel işlemler için kullanılabilmesi gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.

*R. solani* AG4 ZB-34'den elde edilen serbest ve immobilize enzimlerin farklı sıcaklık aralıklarındaki ısıl ve pH kararlılıkları, tuz toleranslarının iyi olması ile birçok deterjan, metal iyonu ve organik çözücü içinde aktivitelerini korumaları onların farklı endüstriyel uygulamalar için cazip hale gelmelerinde önemli faktörlerdir.

Yaptığımız çalışmalarda bu enzimlerin özellikle çamaşır yıkama, haşıl alma ve meyve suyu berraklaştırma gibi bazı işlemlerde kullanılabilir olabileceklerini tespit ettik. Ancak bu çalışmalarla elde edilen sonuçlar bu enzimlerin endüstrideki kullanılabilirliklerine sadece bir ışık tutmaktadır. Tam anlamıyla endüstride kullanımının hayata geçirilebilmesi için yeni ve daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir. Bu kapsamlı çalışmalar yanında, enzimlerin kâğıt ve kâğıt hamuru üretiminde, kâğıt endüstrisinde, kâğıdın uygun şekilde kaplanması, nişastanın viskozitesinin azaltılmasında ve nişasta içeren atık suların temizlenmesi gibi alanlardaki kullanılabilirlikleri de incelenebilir.

Tez kapsamında saflaştırılan enzimin alt birimlerinin sayısı ve tam molekül ağırlığı daha ileri çalışmalarla belirlenebilir.

Ayrıca daha ileri çalışmalarla enzimin klonlanarak daha fazla miktarda elde edilmesi ve bazı özelliklerinin mutasyonlarla geliştirilmesi de sağlanabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., El-Toukhy, N.M., El-Gendi, H. ve Ahmed, R.S., 2013. Production, Purification, and Characterization of Thermostable  $\alpha$ -amylase Produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20, Journal of Chemistry, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/673173>.
- Abdel-Naby, M.A., Hashem, A.M., Esawy, M.A. ve Abdel-Fattah, A.F., 1998. Immobilization of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase and Characterization of Its Enzymatic Properties, Microbiology Research, 153, 319-325.
- Abdullah, R., Shaheen, N., Iqtedar, M., Naz, S. ve Iftikhar, T., 2014. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Alpha Amylase by *Aspergillus niger* (BTM-26) in Solid State Fermentation, Pakistan Journal of Botany, 46, 3, 1071-1078.
- Aehle, W., Bott, R., De Nobel, H. ve Jones, B., 2003. Discovery and Development of Enzymes, in *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Aehle W., Wiley VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, FRG, No. 2, doi: 10.1002/3527602135.ch4.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. ve Haser, R., 2002. Structural Basis of  $\alpha$ -amylase Activation by Chloride, Protein Science, 11, 1435-1441.
- Akkaya, B., Yenidunya, A.F. ve Akkaya, R., 2012. Production and Immobilization of A Novel Thermo Alkalophilic Extracellular Amylase from *Bacilli* Isolate, International Journal of Biological Macromolecules, 50, 991-995.
- Anto, H., Trivedi, U. ve Patel, K., 2006. Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid State Fermentation, Food Technology and Biotechnology, 44, 241-245.
- Aref, H.L., Mosbah, H., Louati, H., Said, K. ve Selmi, B., 2011. Partial Characterization of A Novel Amylase Activity Isolated from *Tunisian Ficus carica* Latex, Pharmaceutical Biology, 49, 11, 1158-116.
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U. ve Legge, R.L., 2007. A Thermostable  $\alpha$ -amylase from A Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain for Starch Processing, Journal of Food Engineering, 79, 950-955.
- Aquino, A.C.M.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F. ve Polizeli, M.L.T.M., 2003. Studies on A Thermostable  $\alpha$ -amylase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 61, 323-328.

- Balkan, B. ve Ertan, F., 2007. Production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium chrysogenum* Under Solid State Fermentation by Using Some Agricultural By Products, Food Technology and Biotechnology, 45, 439-442.
- Balkan, B. ve Ertan, F., 2010. The Production of A New Fungal  $\alpha$ -amylase Segraded the Raw Starch by Means of Solid-State Fermentation, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 40, 213-228.
- Bamforth, C.W., 2003. Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review, The Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly, 40, 2, 89-97.
- Banerjee, D., Mondal, K.C. ve Patı, B.R., 2001. Production and Characterization of Extracellular and Intracellular Tannase from Newly Isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9, Journal of Basic Microbiology, 41, 313-318.
- Bano, S., Ul Qader, S.A., Aman, A., Syed, M.N. ve Azhar, A., 2011. Purification and Characterization of Novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, American Association of Pharmaceutical Scientists, 12, 1, 255-61.
- Bender, H., Lehmann, J. ve Wallenfels, K., 1959. Pullulan, Ein Extracellulares Glucan Von *Pullularia Pullulans*, Biochimica et Biophysica Acta, 36, 2, 309-316.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ , Methods in Enzymology, 1, 149-158.
- Bertagnolli, B.L., Dal Soglio, F.K. ve Sinclair, J.B., 1996. Extracellular Enzyme Profiles of the Fungal Pathogen *Rhizoctonia solani* Isolate 2B-12 and of Two Antagonists, *Bacillus megaterium* Strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* Isolate Th008. I. Possible Correlations with Inhibition of Growth and Biocontrol, Physiological and Molecular Plant Pathology, 48, 145-160.
- Bhardwaj, S., Vedamurthy, A.B., Bhattacharya, S. ve Das, A., 2012. Effect of Inorganic Salts and Surfactants on the Production of  $\alpha$ -amylase by A Mangrove Isolate of *Aspergillus flavus* Using Solid State Fermentation, Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 2, 1390-1397.
- Bhutto, M.A., Umar, D. ve Umar, M., 2010. Effect of Alternative Carbon and Nitrogen Sources on Production of Alpha-amylase by *Bacillus megaterium*, World Applied Sciences Journal, 8, 85-90.
- Bickerstaff, G.F., 1997. Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Pres, New Jersey, Totowa, NJ.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding, Analitical Biochemistry, 72, 248-254.

- Bryjak, J., 2003. Glucoamylase,  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase Immobilisation on Acrylic Carriers, Biochemical Engineering Journal, 16, 347-355.
- Charya, M., Reddy, S. ve Kumar, B., 1983.  $\alpha$ -Amylase Production in Relation to Assimilation of Starch by Three Fungi, Proceedings of the National Academy of Sciences of India, 53, 19-25.
- Chen, J-P., Chu, D-H. ve Sun, Y-M., 1997. Immobilization of  $\alpha$ -amylase to Temperature-Responsive Polymers by Single or Multiple Point Attachments, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 69, 421-428.
- Çetin, E.T., 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Bayda Yayını, No. 1, İstanbul, 418 s.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. ve Luciano, A.B., 2002. Production and Properties of  $\alpha$ -amylase from Thermophilic *Bacillus* sp., Brazilian Journal of Microbiology, 33, 57-61.
- Creighton, T.E., 1989. Protein functions: A Practical Approach, Oxford University, IRL Press, No. 2, New York, 306 s.
- Dalvi, P. ve Anthappan, P., 2007. Amylase and Pectinase from Single Source for Simultaneous Desizing and Scouring, Indian Journal of Fibre and Textile Research, 32, 459-465.
- De Mot, R. ve Verachtert, H., 1987. Purification and Characterization of Extracellular  $\alpha$ -amylase and Glucoamylase from the Yeast *Candida antarctica* CBS 6678, European Journal of Biochemistry, 164, 643-654.
- Deb, P., Talukdar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K. ve Abu Sayem, S.M., 2013. Production and Partial Characterization of Extracellular Amylase Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001, Springer Plus, 2, 154.
- Demirci, E. ve Döken, T., 1991. Erzurum ve Yöresinde Patateslerden İzole Edilen *Rhizoctonia solani* Kühn'nin Anastomosis Gruplarının Kültürel ve Morfolojik Özellikleri, Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları, 6, 97-100.
- Demirkan, E., 2010. Production, Purification, and Characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* and Its Mutant Derivates, Turkish Journal of Biology, 35, 705-712.
- Dey, T.B. ve Banerjee, R., 2014. Application of Decolourized and Partially Purified Polygalacturonase and  $\alpha$ -amylase in Apple Juice Clarification, Brazilian Journal of Microbiology, 45, 1, 97-104.

- Diderichsen, B. ve Christiansen, L., 1988. Cloning of A Maltogenic Alpha-amylase from *Bacillus Stearothermophilus*, Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 56, 1, 53-59.
- DiTusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding.1. Metal Ion Binding by Wild Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- El-Banna, T.E., Abd-Aziz, A.A., Abou-Dobara, M.I. ve Ibrahim, R.I., 2007. Production and Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*, Pakistan Journal of Biological Sciences, 10, 12, 2039-2047.
- Esawy, M.A., Mahmoud, D.A.R. ve Fattah, A.F.A., 2008. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a Levansucrase and Some Studies on Its Properties, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 25, 2, 237-246.
- Facciotti, M.C.R., Kilikian, B.V., Schmidell, W. ve Fachini, E.R., 1989. Glucoamylase Synthesis in Batch Process by *Aspergillus awamori*, Reviews in Microbiology, 20, 108-114.
- Fadahunsi, I.F. ve Garuba, O.E., 2012. Amylase Production by *Aspergillus flavus* Associated with the Bio-deterioration of Starch Based Fermented Foods, New York Science Journal, 5, 1.
- Fincan, S.A., Enez, B., Özdemir, S. ve Bekler, F.M., 2014. Purification and Characterization of Thermostable  $\alpha$ -amylase from Thermophilic *Anoxybacillus flavithermum*, Carbohydrate Polymers, 102, 144-150.
- Gautam, B., Karki, T.B. ve Panta, O.P., 2013. Optimization of Cultural Conditions for Solid State Fermentation of Amylase Production by *Aspergillus* Species, Nepal Journal of Science and Technology, 14, 1, 67-74.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. ve Chauhan, B., 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: A Biotechnological Perspective, Process Biochemistry, 38, 1599-1616.
- Gupta, K., Jana, A.K., Kumar, S. ve Maiti, M., 2013. Immobilization of  $\alpha$ -amylase and Amyloglucosidase Onto Ion Exchange Resin Beads and Hydrolysis of Natural Starch at High Concentration, Bioprocess Biosystems Engineering, 36, 1715-1724.
- Haki, G.D. ve Rakshit, S.K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review, Bioresource Technology, 89, 1715-1724.

- Halil, E. ve Kalkancı, A., 2008. Termofilik Mantarlar, Turkish Journal of Infection, 22, 2, 117-122.
- Haq, I., Ali, S., Javed, M.M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F. ve Qadeer, M.A., 2010. Production of Alpha Amylase from A Randomly Induced Mutant Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and Its Application as A Desizer in Textile Industry, Pakistan Journal of Botany, 42, 1, 473-484.
- Henrissat, B., 1991. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities, Biochemical Journal, 280, 309-316.
- Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. ve Nasri, M., 2009. Alkaline Proteases and Thermostable  $\alpha$ -amylase Co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and Potential Application as Detergent Additive, Biochemical Engineering Journal, 47, 71-79.
- Hmidet, N., Nedra, E.H.A., Nahed, Z.F., Anissa, H., Moncef, N. ve Alya, S.K., 2010. Chicken Feathers: A Complex Substrate for the Co-production of  $\alpha$ -amylase and Proteases by *Bacillus licheniformis* NH1, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 37, 983-990.
- Hollo, J. ve Szeitli, J., 1968. The Reaction of Starch with Iodine, Rodley, J.A., Starch and its derivatives, No. 4, Chapman and Hall, 203-246.
- Iftikhar, H., Faisal, S., Muhammad Shahid, M. ve Saiyed, I.A., 2013. A review of the Microbiological Aspect of  $\alpha$ -amylase Production, International Journal of Agriculture and Biology, 15, 1029-1034.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M. ve Uemura, T., 1988. Enzymatic Properties of A Novel Liquefying  $\alpha$ -amylase from An Alkaliphilic *Bacillus* Isolate and Entire Nucleotide and Amino Acid Sequences, Applied and Environmental Microbiology, 64, 3282-3289.
- Ikram-Ul-Haq, U.H., Mahmood, Z. ve Javed, M.M., 2012. Solid State Fermentation for the Production of  $\alpha$ -amylase by *Paenibacillus amylolyticus*, Pakistan Journal of Botany, 44, 341-346.
- Irfan, M., Nadeem, M. ve Syed, Q., 2012. Media Optimization for Amylase Production in Solid State Fermentation of Wheat Bran by Fungal Strains, Journal of Cell and Molecular Biology, 10, 55-64.
- Israilides, C., Smith, A., Scanlon, B. ve Barnett, C., 1999. Pullulan from Agro Industrial Wastes, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 16, 1, 309-324.

- Ivanova, V., Dobрева, E. ve Legoy, M.D., 1998. Characteristics of Immobilized Thermostable Amylases from Two *Bacillus licheniformis* Strains, Acta Biotechnology, 18, 339-351.
- Iyer, P.V. ve Ananthanarayan, L., 2008. Enzyme Stability and Stabilization Aqueous and Non Aqueous Environment, Process Biochemistry, 43, 1019-1032.
- Jaiswal, N. ve Prakash, O., 2013. An Organic Solvent and Surfactant Stable  $\alpha$ -amylase from Soybean Seeds, Acta Biochimica Polonica, 60, 387-393.
- Janecek, S., 2009. Amylolytic Enzymes Focus on the Alpha Amylases from Archaea and Plants, Nova Biotechnologica, 9-1.
- Jetendra, K.R. ve Ashis, K.M., 2013. Applications of A High Maltose Forming, Thermo-Stable  $\alpha$ -amylase from An Extremely Alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in Food and Laundry Detergent Industries, Biochemical Engineering Journal, 77, 220-230.
- Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman, A.N. ve Gungör, A., 2007.  $\alpha$ -Amylase Immobilization on Functionalized Glass Beads by Covalent Attachment, Food Chemistry, 104, 1385-1392.
- Kasavi, C., 2006. Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorbsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kathiresan, K. ve Manivannan, S., 2006.  $\alpha$ -Amylase Production by *Penicillium fellutanum* Isolated from Mangrove Rhizosphere Soil, African Journal of Biotechnology, 5, 829-832.
- Khoo, S.L., Amirul, A.A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N. ve Azizan, M.N., 1994. Purification and Characterization of Alpha-amylase from *Aspergillus flavus*, Folia Microbiologica, 39, 5, 392-398.
- Kıran, Ö.E. ve Çömlekçioğlu Dostbil, U.N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, K.S.Ü., Fen ve Mühendislik Dergisi, 9, 1.
- Kırkköprü, İ. ve Alpaslan, S.C., 2004. Proteaz Enziminin Değişik Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu, Bitirme Tezi, İ.T.Ü., Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- Kim, T.U., Gu, B.G., Jeong, J.Y., Byun, S.M. ve Shin, Y.C., 1995. Purification and Characterization of A Maltotetraose-forming Alkaline  $\alpha$ -amylase from An Alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901, Applied and Environmental Microbiology, 61, 3105-3112.

- Klibanov, A.M., 1997. Why Are Enzymes Less Active in Organic Solvents Than in Water? Trends Biotechnology, 15, 97-101.
- Koç, Ö., 2015. *Aspergillus fumigatus* HBF125 Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz'ının Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Koç, Ö. ve Metin, K., 2010. Purification and Characterization of A Thermostable Glucoamylase Produced by *Aspergillus flavus* HBF342, African Journal of Biotechnology, 9, 23, 3414-3424.
- Krajewska, B., 2003. Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, Enzyme and Microbial Technology, 35, 126-139.
- Kumar, D., Muthukumar, M. ve Garg, N., 2012. Kinetics of Fungal Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Fusarium solani* Immobilized in Calcium Alginate Beads, Journal of Environmental Biology, 33, 1021-1025.
- Kumar, D., Yadav, K.K., Muthukumar, M. ve Garg, N., 2013. Production and Characterization of  $\alpha$ -amylase from Mango Kernel by *Fusarium solani* NAMCC-F-02956 Using Submerged Fermentation, Journal of Environmental Biology, 34, 1053-1058.
- Kumar, S. ve Khare, S.K., 2012. Purification and Characterization of Malto Oligosaccharide forming  $\alpha$ -amylase from Moderately Halophilic *Marinobacter sp.* EMB8, Bioresource Technology, 116, 247-251.
- Kumari, A. ve Kayastha, A.M., 2011. Immobilization of Soybean (Glycine max)  $\alpha$ -amylase Onto Chitosan and Amberlite MB-150 Beads: Optimization and Characterization, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 69, 8-14.
- Kunamneni, A., Permaul, K. ve Singh, S., 2005. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 100, 168-171.
- Kusuda, M., Nagai, M., Hur, T.C., Ueda, M. ve Terashita, T., 2003. Purification and Some Properties of  $\alpha$ -amylase from An Ectomycorrhizal Fungus *Tricholoma matsutake*, Mycoscience, 44, 311-317.
- Liu, J., Xia, W., Abdullahi, A.Y., Wu, F., Feng, Q.A.D. ve Zuo, J., 2014. Purification and Partial Characterization of An Acidic  $\alpha$ -amylase from A Newly Isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 That May Be Applied to Feed Enzyme, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 45, 3, 259-267.



- Liu, X.D. ve Xu, Y.A., 2008. Novel Raw Starch Digesting  $\alpha$ -amylase From A Newly Isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and Characterization, Bioresource Technology, 99, 4315-4320.
- Maalej, H., Ayed, H.B., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, M. ve Hmidet, N., 2014. Production and Biochemical Characterization of A High Maltotetraose (G4) Producing Amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22, BioMed Research International, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/156438>.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, No. 2, New York, 1626 s.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. ve Fernandez Lafuente, R., 2007. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques, Enzyme and Microbial Technology, 40, 6, 1451-1463.
- McDowall, J., Protein of the Month Alpha Amylase. [http://www.ebi.ac.uk/interpro//potm/2006\\_2/Page1.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro//potm/2006_2/Page1.htm), 1 Ocak 2017.
- Mehta, D. ve Satyanarayana, T., 2013. Biochemical and Molecular Characterization of Recombinant Acidic and Thermostable Raw-Starch Hydrolysing Amylase from An Extreme Thermophile *Geobacillus thermoleovorans*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 86, 229-238.
- Mendu, D.R., Ratnam, B.V.V., Purnima, A. ve Ayyanna, C., 2005. Affinity Chromatography of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, Enzyme and Microbial Technology, 37, 712-717.
- Mishra, T., Ahluwalia, S. ve Joshi, M., 2014. Isolation and Medium Optimization for Amylase Producing Bacterial Strain Isolated from Potato Field of Bhatinda, Punjab, India, European Journal of Experimental Biology, 4, 3, 588-594.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, 31, 426-429.
- Mobini-Dehkordi, M. ve Javan, F.A., 2012. Application of Alpha Amylase in Biotechnology: Review Article, Journal of Biology and Today's World, 1, 1, 39-50.
- Mohapatra, B.R., Banerjee, U.C. ve Bapuji, M., 1998. Characterization of A Fungal Amylase from *Mucor* sp. Associated with the Marine Sponge *Spirastrella* sp., Journal of Biotechnology, 60, 113-117.

- Mojsov, K., 2012. Microbial  $\alpha$ -amylases and Their Industrial Applications: A Review, International Journal of Management, IT and Engineering, 2, 10, 583-609.
- Mollania, N., Khajeh, K., Hosseinkhani, S. ve Dabirmanesh, B., 2010. Purification and Characterization of A Thermostable Phytate Resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. LH8, International Journal of Biological Macromolecules, 46, 27-36.
- Moller, K., Sharif, M.Z. ve Olsson, L., 2004. Production of Fungal  $\alpha$ -amylase by *Saccharomyces Kluyveri* in Glucose Limited Cultivations, Journal of Biotechnology, 111, 311-318.
- Momma, M., 2000. Cloning and Sequencing of the Maltohexaose Producing Amylase Gene of *Klebsiella pneumoniae*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 64, 428-431.
- Moreira, F.G., Lenartovicz, V. ve Peralta, R.M., 2004. A Thermostable Maltosetolerant  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus tamari*, Journal of Basic Microbiology, 44, 1, 2935.
- Mukherjee, A.K., Borah, M. ve Rai, S.K., 2009. To Study the Influence of Different Components of Fermentable Substrates on Induction of Extracellular  $\alpha$ -amylase Synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in Solid State Fermentation and Exploration of Feasibility for Inclusion of  $\alpha$ -amylase in Laundry Detergent Formulations, Biochemical Engineering Journal, 43, 149-156.
- Najafi, M.F. ve Kembhavi, A., 2005. One Step Purification and Characterization of An Extracellular  $\alpha$ -amylase from Marine *Vibrio* sp., Enzyme and Microbial Technology, 36, 535-539.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D. ve Deobagkar, D., 2005. Purification and Characterization of An Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20, Protein Expression and Purification, 41, 349-354.
- Naidu, M.A. ve Saranraj, P., 2013. Bacterial Amylase: A Review, International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive, 4, 2, 274-287.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Freeman, No. 4, W.H., New York, 190-249.
- Nielsen, J.E. ve Borchert, T.V., 2000. Protein Engineering of Bacterial  $\alpha$ -amylases, Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 253-274.

- Ogino, H. ve Ishikawa, H., 2001. Enzymes Which Are Stable in the Presence of Organic Solvents, Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 109-116.
- Okolo, B.N., Ire, F.S., Ezeogu, L.I., Anyanwu, C.U. ve Odibo, F.J.C., 2000. Purification and Some Properties of A Novel Raw Starch-digesting Amylase from *Aspergillus carbonarius*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 329-336.
- Onofre, S.B., Abatti, D., Refosco, D., Tessaro, A.A., Onofre, J.A.B. ve Tessaro, A.B., 2016. Characterization of  $\alpha$ -amylase Produced by the Endophytic Strain of *Penicillium digitatum* in Solid State Fermentation (SSF) and Submerged Fermentation (SMF), African Journal of Biotechnology, 15, 1511-1519.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. ve Mohan, R., 2000. Advances in Microbial Amylases; A Review, Biotechnology and Applied Biochemistry, 31, 135-152.
- Pascoal, A.M., Mitidieri, S. ve Fernandes, K.F., 2011. Immobilisation of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* Onto Polyaniline, Food and Bioproducts Processing, 89, 300-306.
- Pasin, T.M., Benassi, V.M., Moreira, E.A., Jorge, J.A. ve Polizeli, M.L.T.M., 2014. Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions, British Biotechnology Journal, 4, 4, 482-498.
- Pedersen, H. ve Nielson, J., 2000. The Influence of Nitrogen Sources on Amylase Productivity of *Aspergillus oryzae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 53, 278-281.
- Priest, F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*, Bacteriology Reviews, 41, 711-753.
- Rameshkumar, A. ve Sivasudha, T., 2011. Optimization of Nutritional Constitute for Enhanced Alpha Amylase Production Using by Solid State Fermentation Technology, International Journal of Microbiological Research, 2, 2, 143-148.
- Primarini, D. ve Ohta, Y., 2000. Some Enzyme Properties of Raw Starch Digesting Amylases from *Streptomyces* sp. No. 4., Starch, 52, 1, 28-32.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y. ve Izaki, K., 1992. Purification and Properties of A Maltotetraose and Maltotriose Producing Amylase from

- Chloroflexus aurantiacus*, Applied Environmental Microbiology, 58, 2490-2494.
- Ratnasri, P.V., Lakshmi, B.K.M., Ambika Devi, K. ve Hemalatha, K.P.J., 2014. Isolation Characterization of *Aspergillus fumigatus* and Optimization of Cultural Conditions for Amylase Production, IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology, eISSN: 2319-1163.
- Ray, R.C., Kar, S., Nayak, S. ve Swain, M.R., 2008. Extracellular  $\alpha$ -amylase Production by *Bacillus brevis* MTCC 7521, Food Biotechnology, 22, 3, 234-246.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A. ve Sambasiva, R.K.R.S., 2003. An Overview of the Microbial  $\alpha$ -amylase Family, African Journal of Biotechnology, 2, 12, 645-648.
- Reiss, M., Heibge, A., Metzger, J. ve Hartmeier, W., 1998. Determination of BOD-values of Starch Containing Waste Water by A BOD-biosensor, Biosensors and Bioelectronics, 13, 1083-1090.
- Renge, V.C., Khedkar, S.N.V. ve Nandurkar, R., 2012. Enzyme Synthesis by Fermentation Method: A Review, Scientific Reviews and Chemical Communications, 2, 4, 585-590.
- Robyt, J.F. ve Ackerman, R.J., 1971. Isolation, Purification and Characterization of A Maltotetraose Producing Amylase from *Pseudomonas Stutzeri*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 145, 1, 105-114.
- Roseveare, A., Kennedy, J.F. ve Cabral, J.M.S., 1987. Immobilized Enzyme and Cells, CRC Press, Adam Hilger, Philadelphia, PA, USA.
- Roy, J.K., Rai, S.K. ve Mukherjee, A.K., 2012. Characterization and Application of A Detergent-stable Alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* Strain AS-S01a, International Journal of Biological Macromolecules, 50, 219-229.
- Sahnoun, M., Bejar, S., Sayari, A., Triki, M.A., Kriaa, M. ve Kammoun, R., 2012. Production, Purification and Characterization of Two  $\alpha$ -amylase Isoforms from A Newly Isolated *Aspergillus Oryzae* Strain S2, Process Biochemistry, 47, 18-25.
- Satheesh Kumar, G., Subhosh Chandra, M., Mallaiah, K.V., Sreenivasulu, P. ve Choi, Y., 2010. Purification and Characterization of Highly Thermostable  $\alpha$ -amylase from Thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 15, 000-000.
- Secundo, F. ve Carrea, G., 2003. Optimization of Hydrolase Efficiency in Organic Solvents, Chemistry A: European Journal, 9, 3194-3199.

- Shafiei, M., Ziaee, A. ve Amoozegar, M.A., 2012. Purification and Characterization of A Halophilic  $\alpha$ -amylase with Increased Activity in the Presence of Organic Solvents from the Moderately Halophilic *Nesterenkonia* sp. Strain F., Extremophiles, 16, 627-635.
- Shah, I.J., Gami, P.N., Shukla, R.M. ve Acharya, D.K., 2014. Optimization for  $\alpha$ -amylase Production by *Aspergillus oryzae* Using Submerged Fermentation Technology, Basic Research Journal of Microbiology, 1, 4, 1-10.
- Sharma, A. ve Satyanarayana, T., 2013. Microbial Acid Stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, Genetic Engineering and Applications, Process Biochemistry, 48, 201-211.
- Sharma, M., Sharma, V. ve Majumdar, K.D., 2014. Entrapment of  $\alpha$ -amylase in Agar Beads for Biocatalysis of Macromolecular Substrate, International Scholarly Research Notices, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/936129>.
- Shaw, J.F., Lin, F.P., Chen, S.C. ve Chen, H.C., 1995. Purification and Properties of An Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus* sp., Botanical Bulletin of Academia Sinic, 36, 195-200.
- Shewale, S.D. ve Pandit, A.B., 2007. Hydrolysis of Soluble Starch Using *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase Immobilized on Superporous CELBEADS, Carbohydrate Research, 342, 997-1008.
- Shukla, R.S. ve Jajpura, L., 2005. Immobilisation of Amylase by Various Techniques, Indian Journal of Fibre and Textile Research, 29, 75-81.
- Singh, D., Dahiya, J.S. ve Nigam, P., 1995. Simultaneous Raw Starch Hydrolysis and Ethanol Fermentation by Glucoamylase from *Rhizoctonia solani* and *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Basic Microbiology, 35, 117-121.
- Singh, S., Prasad, S.J. ve Buragohain, A.K., 2013. A Novel Reusable Pani PVA Amylase Film: Activity and Analysis, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 106, 46-50.
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L. ve Mangla, J., 2014a. Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry, BioMed Research International, 9, 1-9.
- Singh, S., Sharma, S., Kaur, C. ve Dutt, D., 2014b. Potential of Cheap Cellulosic Residue as Carbon Source in Amylase Production by *Aspergillus niger* SH-2 for Application in Enzymatic Desizing at High Temperatures, Cellulose Chemistry and Technology, 48, 521-527.

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R. ve Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments, Food Technology and Biotechnology, 44, 2, 173-184.
- Soleimani, M., Khani, A. ve Najafzadeh, K., 2012. Alpha Amylase Immobilisation on the Silica Nanoparticles for Cleaning Performance Towards Starch Soils in Laundry Detergents, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74, 1-5.
- Souza, P.M. ve Magalhaes, P.D.O., 2010. Application of Microbial  $\alpha$ -amylase in Industry: A Review, Brazilian Journal of Microbiology, 41, 4, 850-861.
- Sreelakshmi, S.N., Paul, A., Vasanthi, N.S. ve Saravanan, D., 2014. Low Temperature Acidic Amylases from *Aspergillus* for Desizing of Cotton Fabrics, The Journal of The Textile Institute, 105, 59-66.
- Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi, R., Ramesh Kumar, V., Hari, A., Meenakshi, N., Nidhiya, K.A., Kavitha, G. ve Lakshmi, R., 2011. Amylase Production by *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation Using Agroindustrial Wastes, International Journal of Engineering Science and Technology, 3, 1756-1763.
- Sundar, R., Liji, T., Rajila, C. ve Suganyadevi, P., 2012. Amylase Production by *Aspergillus niger* Under Submerged Fermentation Using Ipomoea Batatas, International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 3, 2, 175-182.
- Takaha, T. ve Smith, M.S., 1999. The Functions of 4- $\alpha$ -glucanotransferases and Their Use for the Production of Cyclic Glucans, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 16, 1, 257-280.
- Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Lizuka, M., Minamiura, N. ve Imanaka, T., 1992. Action of Neopullulanase. Neopullulanase Catalyzes both Hydrolysis and Transglycosylation at Alpha-(1,4) and Alpha-(1,6) Glucosidic Linkages, The Journal of Biological Chemistry, 267, 26, 18447-18452.
- Talekar, S. ve Chavare, S., 2012. Optimization of Immobilization of  $\alpha$ -amylase in Alginate Gel and Its Comparative Biochemical Studies with Free  $\alpha$ -amylase, Recent Research in Science and Technology, 4, 1-5.
- Tanyolaç, D., Yürüksoy, B.I. ve Özdural, A.R., 1998. Immobilization of A Thermostable Alpha Amylase, Termamyl, Onto Nitrocellulose Membrane by Cibacron Blue F3GA Dye Binding, Biochemical Engineering Journal, 2, 179-186.

- Telefoncu, A., 1997. İmmobilize Enzimler, Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası, Aydın, 193-247.
- Tian-hong, W., Gang, Z. ve Yun-hua, H., 2004. Purification and Characterization of Cold-Active  $\alpha$ -amylase Excreted by A Strain of Marine Cold Adaptive *Penicillia*, Chemical Research in Chinese Universities, 20, 60-64.
- Tiwari, K.L., Jadhav, S.K. ve Fatıma, A., 2007. Culture Condition for the Production of Thermostable Amylase by *Penicillium rugulosum*, Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 2, 1, 21-24.
- Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P. ve Kayastha, A.M., 2007. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from Mung Beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and Chitosan Beads: A Comparative Study, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49, 69-74.
- Tripathy, S.S., Dash, S. ve Gupta, N., 2011. Screening and Selection of Some Fungi for Production of Extracellular Amylase, Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 1, 4, 131-136.
- Tsegaye, K.N. ve Gessesse, A., 2014. Amylase Production Under Solid State Fermentation by A Bacterial Isolate W74, African Journal of Biotechnology, 13, 2145-2153.
- Uludağ, Y.B., 2000. İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- URL-1, [http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/IMMOB/Immobilized Enzymes](http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/IMMOB/Immobilized%20Enzymes), 1 Ocak 2017.
- URL-2, <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immobilization.html>. Enzyme Immobilization, 1 Ocak 2017.
- URL-3, <http://dalwoo.com/chitosan/preparation.htm>. Preparation of Chitin and Chitosan, 1 Ocak 2017.
- Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uidehaag, J.C.M., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and Applications of Starch Converting Enzymes of the  $\alpha$ -amylase Family, Journal of Biotechnology, 94, 137-155.
- Van Der Veen, B.A., Uitdehaag, J.C.M., Dijkstra, B.W. ve Dijkhuizen, L., 2000. Engineering of Cyclodextrin Glycosyltransferase Reaction and Product Specificity, Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 336-360.

- Varalakshmi, K.N., Kumudini, B.S., Nandini, B.N., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B. ve Kavitha, A.P., 2009. Production and Characterization of Alpha-Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore, Polish Journal of Microbiology, 58, 1, 29-36.
- Vita, C.D.D. ve Dalzoppo, D.E., 1985. Limited Proteolysis of Thermolysin by Subtilisin, Isolation and Characterization of A Partially Active Enzyme Derivative, Biochemistry, 24, 1798-1806.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P. ve Ulhoa, C.J., 2004. Biochemical Characterization of  $\alpha$ -amylase from the Yeast *Cryptococcus flavus*, FEMS Microbiology Letters, 231, 165-169.
- Wiseman, A. 1987. The Application of Enzymes in Industry. Handbook of Enzyme Biotechnology, Sons, J. W., New York, 274-373.
- Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F. ve Chen, G., 2014. Purification and Characterization of A Novel  $\alpha$ -amylase from A Newly Isolated *Bacillus methylotrophicus* Strain P11-2, Process Biochemistry, 49, 47-53.
- Yagar, H., Ertan, F. ve Balkan, B., 2008. Comparison of Some Properties of Free and Immobilized  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus sclerotiorum* in Calcium Alginate Gel Beads, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 38, 13-23.
- Yandri Amalia, P., Suhartati, T. ve Hadi, S., 2013. Effect of Immobilization Towards Thermal Stability of  $\alpha$ -amylase Isolated from Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Calcium Alginate, Asian Journal of Chemistry, 25, 6897-6899.
- Yildirim Akatin, M., 2013. Characterization of A  $\beta$ -glucosidase from An Edible Mushroom, *Lycoperdon pyriforme*, International Journal of Food Properties, 16, 1565-1577.



## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Trabzon'da doğdu. Lise öğrenimini Trabzon Yunus Emre Lisesi'nde tamamladı. 2009-2014 yılları arasında KTÜ, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimi gördü. 2014 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans eğitimini başladı. Ayrıca 2012-2013 yılı yaz döneminde Özel İmperial Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı'nda Stajyer olarak çalıştı. 2015-2017 yılları arasında TÜBİTAK 115Z109 nolu “*Rhizoctonia solani* AG4 ZB-34  $\alpha$ -amilazının katı faz fermentasyon tekniğiyle üretimi, saflaştırılması, immobilizasyonu ve çeşitli endüstriyel alanlardaki kullanılabilirliğinin incelenmesi” adlı projede Yüksek Lisans Öğrencisi Bursiyer olarak çalıştı ve yüksek lisans tezini bu konu üzerinde yaptı. Aynı anda 2016-2018 yılları arasında “Doğu Karadeniz Bölgesindeki Bazı Mağaralardan Bakteri ve Mikroalg İzolasyonu ve Bu Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Madde Üretimi Yönünden Araştırılması” adlı, KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen FBA-2016-5481 nolu projede araştırmacı olarak görev yaptı ve bu projenin çalışmalarını Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirdi. Yabancı dili İngilizcedir.