

Hipersalin Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların α -amilaz Enzimi Açısından
Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Derin Kültür Fermentör Uygulaması

Ercan Özbiçen

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Kasım 2020

Screening of Microfungi Isolated From Hypersaline Environments for α -amylase
Enzyme, Optimization of Production Conditions and Application of Submerged
Fermentor

Ercan Özbiçen

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

November 2020

Hipersalin Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların α -amilaz Enzimi Açısından
Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Derin Kültür Fermentör Uygulaması

Ercan Özbiçen

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Semra İLHAN

Kasım 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım klavuzuna göre, Prof. Dr. Semra İLHAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Hipersalin Ortamlardan İzole Edilen Mikrofungusların α -amilaz Enzimi Açısından Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Derin Kültür Fermentör Uygulaması” başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallarına göre sunduğumu beyan ederim. 19.11.2020

Ercan ÖZBİÇEN

ÖZET

Filamentli funguslar çeşitli enzimleri yüksek miktarlarda üretim yetenekleri ile ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte, halotolerant/halofilik fungusların enzimleri sahip oldukları özellikler bakımından çeşitli avantajlar sunmaktadır.

Bu çalışmada hipersalin ortamlardan izole edilen mikrofungus izolatlarının α -amilaz enzimi aktivitelerine göre taranması, üretim koşullarının optimizasyonu, elde edilen enzimin kısmi karakterizasyonu ve derin kültür fermentör uygulamasıyla üretimi amaçlanmıştır.

Hipersalin ortamdan izole edilen kırk adet mikrofungus izolatu amilolitik aktivitelerine göre kalitatif olarak belirlenmiştir. %5, %7, ve %12 ve %17 tuz konsantrasyonu içeren nişasta agar besiyerinde en iyi aktivite gösteren fungusların *Aspergillus clavatus*, *A. tamarisii* ve *A. sydowii* olduğu gözlemlenmiştir. Bu üç mikrofungus türünden *A. tamarisii* α -amilaz üreticisi olarak seçilmiştir. Üretim koşullarının optimizasyonunda, tuz, pH ve inokulum biyokütle miktarını etkileyen faktörler olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda gerçekleştirilen derin kültür fermentör uygulaması ile enzim aktivitesi 403 U/ml olarak bulunmuştur. Üretilen α -amilaz'ın kısmi karakterizasyonu ile, 55 °C - 60 °C sıcaklık aralığında 30 dakika inkübasyon süresince 1,40 – 1,60 mg /ml nişasta konsantrasyonunda, pH 6.0' da ve 2 M tuz konsantrasyonunda optimum aktivite göstermiştir.

Bu çalışma hipersalin çevrelerdeki fungal çeşitliliğin amilolitik aktiviteye sahip üretici mikrofungusları içerdiğini ve bu ortama adapte olan funguslar tarafından üretilen amilazların tuza toleranslarının yüksek olduğunu göstermektedir. α -amilaz üreticisi olarak *A. tamarisii* pellet morfolojisinin üretim için uygun olması, tuz varlığında gelişim ve enzimatik aktivite göstermesi ile öne çıkan fungustur.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus tamarisii*, hipersalin, enzim, fungal α amilaz, biyoproses

SUMMARY

Filamentous fungi stand out with their ability to produce various enzymes in high amounts. However, the enzymes of halotolerant / halophilic fungi offer various advantages in terms of their properties.

In this study, it was aimed to screen microfungus isolates isolated from hypersaline environments according to α -amylase enzyme activities, optimization of production conditions, partial characterization of the enzyme and production by submerged fermenter application.

Forty microfungus isolates isolated from hypersaline media were qualitatively determined according to their amylolytic activity. *Aspergillus clavatus*, *A. tamaraii* and *A. sydowii* were the fungi that showed the best activity on starch agar medium containing 5%, 7%, 12% and 17% salt concentrations. From these three microfungus species, *A. tamaraii* was chosen as the α -amylase producer. In optimization of production conditions, salt, pH and inoculum were found to be factors affecting the amount of biomass. Enzyme activity was found to be 403 U / ml with submerged culture fermenter application performed under optimum conditions. With the partial characterization of the α -amylase produced, it showed optimum activity at 1,40 – 1,60 mg/ml starch concentration, pH 6.0 and 2 M salt concentration during 30 minutes incubation between 55 °C- 60 °C temperature.

This study shows that fungal diversity in hypersaline environments includes productive microfungi with amylolytic activity and amylases produced by fungi that adapt to this environment have high salt tolerance. As a producer of α -amylase, *A. tamaraii* is a prominent fungus with its pellet morphology suitable for production, growth in the presence of salt, and enzymatic activity.

Keywords: *Aspergillus tamaraii*, hypersaline, enzyme, α - amylase, fungal amylase, bioprocess

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Enzim Tanımı ve Sınıflandırılması	4
2.2. Amilazlar.....	6
2.2.1. α -amilazlar	6
2.2.2. Fungal amilazlar	7
2.3. Nişastanın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	7
2.4. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımı	10
2.4.1. Gıda endüstrisi	12
2.4.2. Unlu mamüller endüstrisi	12
2.4.3. Nişasta işleme endüstrisi	13
2.4.4. Deterjan endüstrisi	13
2.4.5. Biyoetanol üretimi	14
2.4.6. Tekstil endüstrisi.....	14
2.4.7. Kağıt işleme endüstrisi	15
2.5. Ekstremofiller ve Ekstrem Çevreler.....	15
2.6. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimlerin Ekonomik Önemi.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1. Materyal	20
3.1.1. Mikrofungus izolatları	20
3.1.2. Besiyerleri.....	20
3.1.3 Kimyasallar ve çözeltiler	23
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. İzolatların saklanma koşulları ve takibi.....	25
3.2.2. Amilolitik aktivenin belirlenmesi.....	25
3.2.3. Tuza toleransın belirlenmesi.....	26
3.2.4. Spor süspansiyonunun hazırlanması.....	26
3.2.5. Maltoz standart eğri grafiğinin oluşturulması	27
3.2.6. Fermentasyon sıvısında indirgen şeker miktarının belirlenmesi	28
3.2.7. Enzim aktivitesinin belirlenmesi	29
3.2.8. Büyüme eğrisi ve enzim üretimi.....	31
3.2.9. İstatistiksel deney tasarımı ile amilaz üretiminin optimizasyonu.....	31
3.2.10. Derin kültür fermentör uygulaması	33
3.2.11. Enzim kısmi karakterizasyonu.....	36
3.2.11.1. <u>İnce tabaka kromatografisi</u>	36
3.2.11.2. <u>Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi</u>	38
3.2.11.3. <u>Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi</u>	38
3.2.11.4. <u>Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi</u>	39
3.2.11.5. <u>Enzim aktivitesi üzerine pH' ın etkisi</u>	40
3.2.11.6. <u>Enzimin tuza toleransının belirlenmesi</u>	40
3.2.12. Verilerin Değerlendirilmesi	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1. Amilolitik Aktivenin Belirlenmesi ve Tuz Testi	42
4.2. Maltoz Standart Eğrisi	46
4.3. Büyüme Eğrisi ve Enzim Aktivitesi	46
4.4. İstatistiksel Deney Tasarımı ile Amilaz Üretimi Optimizasyonu	50

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.5. Derin Kültür Fermentör Uygulaması	59
4.6. Derin Kültür Fermentör Uygulaması (Optimum Koşullar)	61
4.7. İnce Tabaka Kromatografisi	65
4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	68
4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	69
4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	70
4.11. Enzim Aktivitesi Üzerin pH' ın etkisi	72
4.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Tuz Etkisi	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Amilaz tipleri.....	7
2.2. Monosakkarit D-glukozun açık zincir ve piranoz halka yapısı.....	9
2.3. Nişastadaki α -1,4 ve α -1-1,6 glikozidik bağları.....	10
3.1. Nişasta agar besiyerine paralel kesikler atılarak gerçekleştirilen amilaz testi.....	27
3.2. Laboratuvar ölçekli fermentör (Bioflo 110, New Brunswick).....	35
3.3. Laminar flow kabin içerisinde inokülasyon.....	36
4.1. <i>Aspergillus clavatus</i> 4 günlük, 28 °C' de, farklı tuz konsantrasyonu ile hazırlanan nişasta agar besiyerindeki koloni görüntüsü ve amilaz aktivitesi.....	46
4.2. <i>Aspergillus sydowi</i> 4 günlük, 28 °C' de, farklı tuz konsantrasyonu ile hazırlanan nişasta agar besiyerindeki koloni görüntüsü ve amilaz aktivitesi.....	46
4.3. <i>Aspergillus tamarii</i> 4 günlük, 28 °C' de, farklı tuz konsantrasyonu ile hazırlanan nişasta agar besiyerindeki koloni görüntüsü ve amilaz aktivitesi.....	46
4.4. Maltoz standart eğrisi.....	47
4.5. <i>A. tamarii</i> , 28 °C' de, 12 günlük inkübasyon süresince amilaz aktivitesinin zamana bağlı değişim grafiği.....	49
4.6. <i>A. tamarii</i> , 28 °C' de, 12 günlük inkübasyon süresince maltoz miktarının zamana bağlı değişim grafiği.....	50
4.7. <i>A. tamarii</i> , 28 °C' de, 12 günlük inkübasyon süresince biyokütle miktarının zamana bağlı değişim grafiği.....	50
4.8. <i>A. tamarii</i> , 28 °C' de, 12 günlük inkübasyon süresince pH değerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	51
4.9. Enzim aktivitesi optimizasyonu Plot grafiği.....	54
4.10. Enzim aktivitesi optimizasyonu Pareto grafiği.....	55
4.11. Enzim aktivitesi optimizasyonu Normallik Testi Plot grafiği.....	55
4.12. Biyokütle optimizasyonu Plot grafiği.....	58
4.13. Biyokütle optimizasyonu Pareto grafiği.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. Biyokütle optimizasyonu normallik testi Plot grafiği.....	59
4.15. <i>A. tamarii</i> optimize olmayan ve optimize koşullardaki enzim aktiviteleri.....	63
4.16. <i>A. tamarii</i> optimize olmayan ve optimize koşullardaki maltoz miktarları.....	64
4.17. <i>A. tamarii</i> optimize olmayan ve optimize koşullardaki pH değeri.....	64
4.18. <i>A. tamarii</i> optimize olmayan ve optimize koşullardaki DO değeri.....	65
4.19. İnce Tabaka Kromatografisi görüntüsü (Ticari amilaz).....	66
4.20. İnce Tabaka Kromatografisi görüntüsü (<i>A. tamarii</i>).....	67
4.21. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	69
4.22. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	70
4.23. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	71
4.24. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	73
4.25. Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisi.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	6
2.2. Enzimler ve endüstriyel uygulamaları.....	11
3.1. Amilolitik aktivite açısından taranan mikrofungus izolatları.....	22
3.2. Standart bir maltoz eğrisi içeren grafiği oluşturma basamakları.....	29
3.3. İndirgen şeker miktarının belirlenme basamakları.....	30
3.4. Enzim aktivitesinin belirlenme basamakları.....	31
3.5. Plackett-Burman DeneY Tasarımı ile etkisi araştırılan besiyeri bileşenleri.....	33
3.6. Plackett-Burman DeneY Tasarımı matrisi.....	34
3.7. Ticari amilaz ve filtrat ile İTK yöntemi.....	38
3.8. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi deneY ortamı.....	39
3.9. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresini belirlenmesi deneY ortamı.....	40
3.10. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun belirlenmesi deneY ortamı.....	40
3.11. Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi deneY ortamı.....	41
3.12. Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisinin belirlenmesi deneY ortamı.....	42
4.1. Mikrofungusları nişasta agar besiyerindeki koloni çapları ve amilaz aktiviteleri.....	45
4.2. <i>A. tamarii</i> , indirgen şeker, enzim aktivitesi, pH ve biyokütle değerleri.....	48
4.3. PB deneY tasarımı ile biyokütle, amilaz aktivitesi ve indirgen şeker sonuçları.....	52
4.5. <i>A. tamarii</i> enzim aktivitesi optimizasyonu katsayı değerleri.....	53
4.6. Enzim aktivitesi optimizasyonu model özeti, R ² değeri.....	53
4.7. Enzim aktivitesi optimizasyonuna ait varyans analizi.....	54
4.8. Enzim aktivitesi optimizasyonu regresyon denklemi.....	54
4.9. Biyokütle optimizasyonu katsayı değerleri.....	57
4.10. Biyokütle optimizasyonu model özeti, R ² değeri.....	57
4.11. Biyokütle optimizasyonu varyans analizi.....	57
4.12. Biyokütle optimizasyonu regresyon eşitliği denklemi.....	58
4.13. <i>A.tamarii</i> fermentördeki indirgen şeker, enzim aktivitesi, pH, DO değerleri.....	61
4.14. <i>A.tamarii</i> fermentördeki optimum indirgen şeker, enzim aktivitesi, pH,DO değerleri	63

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	68
4.16. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	70
4.17. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	71
4.18. Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	72
4.19. Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisi.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Acıklama</u>
PB	Plackett – Burman
PDA	Potato Dekstroz Agar
mg	Miligram
μ M	Mikromolar
M	Molar
U/ml	Hacimsel Enzim Aktivitesi
μ g	Mikrogram
ml	Mililitre
DO	Çözünmüş Oksijen
HCl	Hidroklorik asit
NaNO ₃	Sodyum Nitrat
KCl	Potasyum Klorür
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Demir Sülfat Heptahidrat
KH ₂ PO ₄	Potasyum Fosfat Monobazik

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler ekonomik ve verimli olmaları, ekstrem koşullardaki stabilite ve katalitik etkinlik göstermeleri bunun yanı sıra toksik moleküller üretmemeleri, çevre dostu olmaları nedeniyle son yıllarda artan bir talep ile endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanlarında ön plana çıkmaktadırlar. Mikrobiyal kaynaklı olan ve çoğunlukla *Aspergillus* ve *Bacillus* türlerinden üretilen α -amilazlar ise nişasta işleme endüstrisi, fırın ürünleri, biracılık, deterjan, kağıt ve tekstil gibi endüstri kollarının yanı sıra, eczacılık ve tıp gibi birçok biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel kullanımında beklentiler, birçok sektörün hızla büyüyen nüfusun taleplerini karşılaması ve doğal kaynakların tükenmesi ile başa çıkması için önemli bir potansiyele sahip olduğu için sürekli olarak yaşadığımız bu yüzyılda artmaktadır (Singh vd., 2016).

Ekonomik açıdan bakıldığında, hidrolitik enzimler toplam endüstriyel enzimlerin %85'ini oluşturmaktadır. Market büyüklüğü 2002 yılı verilerine göre yaklaşık olarak 1,6 milyar dolara ulaşmaktadır. 2014 yılı verilene göre ise endüstriyel enzimlerin global market büyüklüğü 4,2 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir ve bu rakamın 2015'ten 2020'ye kadar yıllık büyüme oranında %7 artış göstermesi beklenmiştir (Singh vd., 2016). Enzimlerin geniş uygulama potansiyeli sayesinde enzim pazarının büyüklüğünün değeri 2020 yılında 10,6 milyar dolardır bu rakamın 2027 yılında 14,9 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir. (*Enzymes Market Size, Share | Global Industry Report, 2020-2027*). Amilaz, dünya enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Ana uygulama alanı gıda endüstrisidir (Mojsov, 2012). Küresel alfa-amilaz fırıncılık (Ekmek, pasta vb endüstri kolları) pazar büyüklüğü 2015 yılında 255,1 milyon ABD dolardır. 2021'de 6,3 milyar dolara ulaşacağı ve biyoyakıt, ilaç, kağıt hamuru ve kağıt uygulamalarında en hızlı büyümenin gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (Freedonia, 2008) (Reiss vd., 2007). Nişasta proseslerine dayalı enzimlerin global market büyüklüğü ise 156 milyon dolardır. Sıvılaştırma proseslerinde kullanılan enzimlerin maliyeti ise toplam proses maliyetinin %24'ünü oluşturmaktadır. Mikrobiyal amilazlar uygun bir şekilde üretilebilirse eczacılık ve ince kimyasal endüstrilerinde de

potansiyel olarak kullanılabilir. Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ile birlikte amilaz enzimi klinik, medikal ve analitik kimya, tekstil, kağıt endüstrisi, biracılık ve distilasyon endüstrilerinde de nişasta işleme proseslerinde olduğu kadar kullanılabilir (Gouda & Elbahloul, 2008). Ar-Ge, daha etkili enzimler ve üretim süreçleri geliştirmeye ve seçmeye odaklanmaya devam edecektir. Avantajlar arasında, düşük enerji tüketimi ve zararlı yan ürünlerin ortadan kaldırılması yoluyla maliyet tasarrufu ve bazı endüstriyel üretim süreçleri için daha küçük bir çevresel ayak izi sağlanabilecektir (*The Bioeconomy to 2030 OECD*).

Ekstremofilik mikroorganizmalardan üretilen enzimler ise, yüksek ve düşük sıcaklıklardaki stabiliteleri, pH aralığı, iyonik güçleri, tuzlulukları ve diğer birçok enzimi denatüre edecek organik çözücülerde işlev görebilmeleri nedeniyle farklı biyoteknolojik fırsatlar sunmaktadır (Adrio & Demain, 2014). Ekstremofilik mikroorganizmalar, ekstrem koşullarda hayatta kalmak için çeşitli moleküler stratejiler geliştirmişlerdir. Bu organizmalar tarafından izole edilen biyokatalizörler ekstremozimler olarak adlandırılır ve tuza tolerans, termostabilite ve soğuk adaptasyonu gibi olağanüstü özelliklere sahip olabilirler. Ekstremozimler, sağlam yapıları nedeniyle ekstrem koşullara karşı çok dirençlidirler ve uygulamaları yoluyla ekonominin ve yeni araştırmaların gelişmesinin yanı sıra biyokataliz ve biyotransformasyonlar için yeni fırsatlar sunmaktadır (Dumorne vd., 2017). Ekstremozimlerin tekrar üretilebilirlikleri, yüksek performansları ve ekonomik canlılıkları gibi çeşitliliği ve istisnai özellikleri, farklı endüstriyel süreçlere biyoteknolojik uygulamalarını arttırmıştır (Gurung vd., 2013).

Funguslar, dünyadaki hipersalin ortamlarda yaygın olarak bulunabilmektedirler. Tuza adapte (halofilik) veya tuza toleranslı (halotolerant) funguslar, hipersalin ortamda gelişen, tuz seven organizmalardır. İdeal büyüme ve metabolizma için tuzlara ihtiyaç duyan heterojen bir grup organizmayı içerirler (Białkowska & Turkiewicz, 2014). Halofilik mikroorganizmalardan meydana gelen ekstremozimler, gıda, biyoremediasyon ve biyosentetik proses endüstrileri için büyük fırsatlar sunmaktadır. Halofilik enzimlerin aktiviteleri, enzim inhibisyonu üretmemek için tuz gereksinimlerine göre, esasen enzimatik aktivite için optimal kültür koşulları çok önemlidir (Dumorne vd., 2017).

Enzim üretiminde, 2015 yılında küresel hacminin %83,2'sini oluşturan bakteriler en çok kullanılan kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda ise artan bir ilgiyle, *Aspergillus* türleri, alfa-amilaz gibi çok miktarda yüksek enzim salgılama kabiliyeti nedeniyle dikkat çekmiştir. Fungal alfa-amilazlar, GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınır) statüsü aldıkları için diğer mikrobiyal kaynaklara göre ön plana çıkmaktadır. (*Alpha-Amylase Baking Enzyme Market Size & Share Report, 2024*). Fungal amilazların avantajı hücre dışı olarak üretilmeleridir. Amilaz, yüksek sıcaklıklarda üretilen biyokimyasal reaksiyonlara dahil edilir ve yüksek maliyetli reaktanlar yerine kullanılabilir (Chang vd., 2004). Buna ek olarak funguslar sert substratlara penetre bir şekilde bağlanabilmektedir. Funguslar katı faz fermentasyon uygulamaları için de elverişlidir.

Ekstrem çevreler ve bu çevrelere adapte olmuş organizmalardan elde edilen metabolitlerin biyoteknolojik önemi anlaşılmış durumdadır. Ülkemiz coğrafyasında ekstrem çevrelerin bulunması ve bu ekstrem çevrelerde yapılan izolasyon ve tanımlama çalışmaları biyoçeşitliliğin aydınlatılmasına yaptığı katkı yanında elde edilen izolatlar biyoteknolojik ürünlerin potansiyel kaynaklarını oluşturmaktadır. Bu çevrelerden gerçekleştirilen araştırmaların katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi, ülkemiz bilim insanlarının sahip olduğu bilimsel bilgi ve birikim açısından mümkündür. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin dünya enzim pazarındaki durumu göz önünde bulundurulduğunda, ülkemiz ekonomisi açısından böyle bir pazarda bulunmamız önemlidir. Bu hedefler doğrultusunda, bu çalışmada çalışmada ise hipersalin ortamlardan izole edilen mikrofunguslardan α -amilazlar enzimi üretimi amaçlanmıştır. Seçilen halotolerant/halofilik bir mikrofungus ile α -amilaz enzimi üretim koşulları ve laboratuvar ölçekli fermentörde bu koşullar sağlanarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzim karakterize edilerek tuza toleransın belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Enzim Tanımı ve Sınıflandırılması

Enzimler, biyolojik tepkimeleri hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Termodinamik açıdan ele alındığında, tepkime ortamında bulunan katalizör bir tepkimenin hızını, tepkimenin denge sabitini değiştirmeden 10^{11} kat veya daha fazla arttırabilmektedir. Enzimler, hücre içerisinde gerçekleşen birçok tepkimenin hızını ve özgülüğünü kendisi değişikliğe uğramadan düzenleyebilir.

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanmaktadır;

- Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır.
- Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
- Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
- Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
- Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun hızlı bir şekilde dengeye ulaşmasını sağlarlar.
- Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev yapmaktadırlar.

Enzimler etki ettikleri substrat tipine ve gerçekleştirdikleri reaksiyonlara son derece spesifik moleküllerdir. Bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tipteki benzer reaksiyonları katalizlerler. Enzimlerin substratlarına olan spesifik etkinlikleri çok yüksektir. Bazı enzimlerin substrat spesifiteleri mutlaktır.

Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından enzimler sistematik olarak sınıflandırılmıştır. Enzimler bu sınıflandırılmaya göre katalitik fonksiyonları ve reaksiyon mekanizmalarına göre 6 gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.1). Buna göre;

Oksidoredüktazlar: Redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.

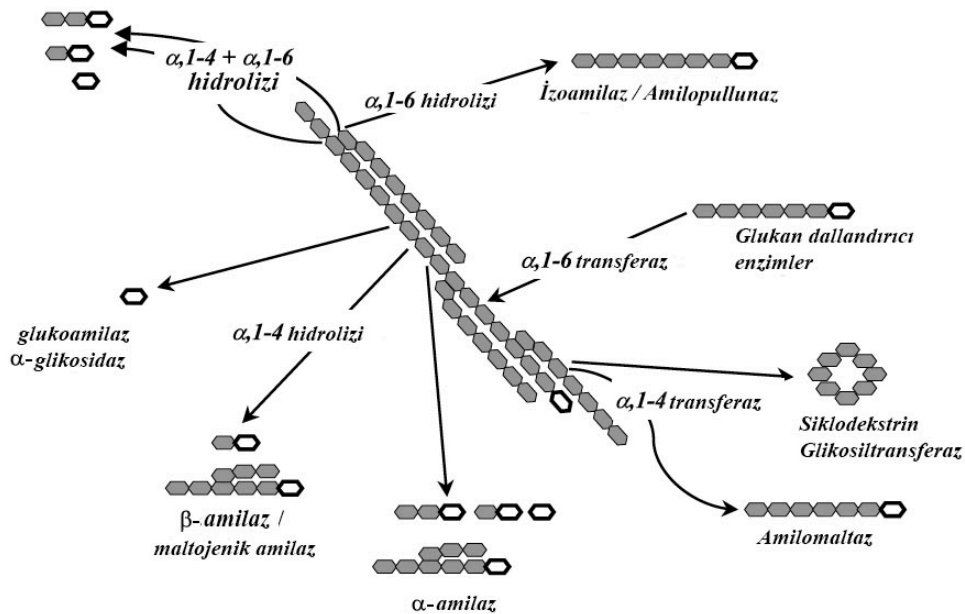
1. **Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir.
2. **Hidrolazlar:** Suyun katılmasıyla bağların parçaladığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
3. **Liyazlar:** Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizlerler.
4. **İzomerazlar:** Molekül içindeki değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.
5. **Ligazlar:** Enerjice zengib bir bağın kopmasıyla ortaya çıkan enerji yardımı ile iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Çizelge 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Sınıf	Reaksiyon	Enzimler
Oksidoredüktazlar	Moleküller arası hidrojen, oksijen, elektron transferi	Dehidrojenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, peroksidazlar
Transferazlar	Atom gruplarını bir molekülden diğerine transferi	Fruktosiltransferazlar, transketolazlar, açiltransferazlar, transaminazlar
Hidrolazlar	Bağların hidrolitik yıkımı	Proteazlar, amilazlar, açilazlar, lipazlar, fosfatazlar, kütinazlar
Liyazlar	Eliminasyon veya katılma reaksiyonları ile hidrolitik olmayan yıkım	Pektat liyazlar, hidratazlar, dehidratazlar, dekarboksilazlar, fumaraz, argino succinase
İzomerazlar	Grubun bir molekül içindeki bir konumdan diğerine transferi.	İzomerazlar, epimeraz, racemases

2.2. Amilazlar

Amilazlar endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanma kırıcı enzimler ve transferazlar olarak dört grupta incelenmektedir (Şekil 2.1). Endoamilazlar nişasta içerisindeki α -1,4 bağlarını hidrolize etmektedir. Ekzoamilazlar, nişastadaki α -1,4 veya α -1,6 bağlarını hidrolize ederler. Dallanma kırıcı enzimler ise sadece α -1,6 bağlarını hidrolize ederek uzun doğrusal ürünler oluştururlar. Transferazlar, α -1,4 glikozidik bağları ayırarak yeni bir glikozidik bağ oluşumu için transferi sağlarlar.



Şekil 2.1. Amilaz tipleri

2.2.1. α -amilazlar

Gerçekleştirdikleri reaksiyon tipine göre hidrolazlar sınıfından olan mikrobiyal α -amilazlar bakteriler, fungus ve mayalardan endüstri sektörlerinde ve bilimsel araştırmalarda sıklıkla elde edilmektedir. Amilaz üretim miktarı mikroorganizmadan mikroorganizmaya hatta cins, tür ve suşa göre değişmektedir. Ayrıca amilaz üretim miktarı mikroorganizmanın kökenine yani doğal olarak amilaz üretebildiği, nişasta ya da amiloz bakımından zengin

ortamdan izole edilen suşa göre de değişmektedir. pH, sıcaklık, karbon ve nitrojen kaynakları da amilaz üretimi bakımından özellikle fermentasyon prosesinde önemlidir. Mikroorganizmalar genetik mühendisliğe elverişli olduğundan, daha yüksek amilaz verimi elde etmek için suşlar geliştirilebilir. Mikroorganizmalar ayrıca etkili bir şekilde, termostabil ve sert koşullarda stabil, dayanıklı amilaz üretebilmeleri için modifiye edilebilmektedir. Bu tip gelişmeler ayrıca arkaplan proteinlerinin neden olduğu kontaminasyonu azaltmakta, enzimin reaksiyon süresini minimize etmekte ve amilaz reaksiyonunda daha az enerji harcamasına neden olmaktadır. (Sundarram & Murthy, 2014) (Gopinath vd., 2017)

2.2.2. Fungal amilazlar

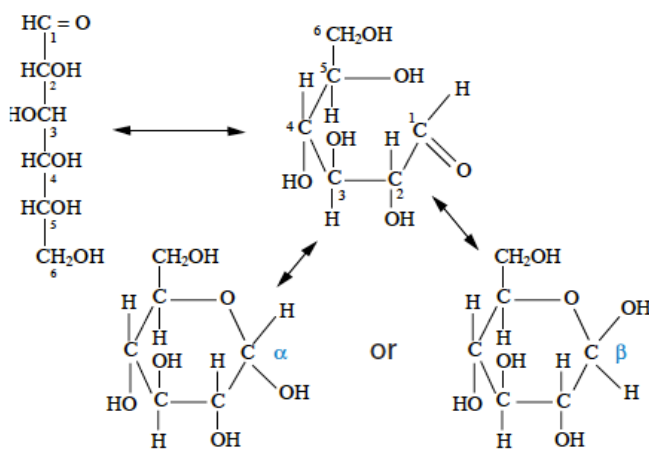
Fungal amilazların avantajı ise hücre dışı olarak üretilibilmeleridir. Buna ek olarak funguslar sert substratlara penetre bir şekilde bağlanabilmektedir. Funguslar katı faz fermentasyon uygulamaları için de elverişlidir. İlk olarak funguslardan elde edilen amilazlar yakın bir tarihte tanımlanmıştır. Etkili bir şekilde amilaz üreten *Aspergillus* cinsleri (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. kawachii*, and *A. flavus*) ve *Penicillium* cinsleri (*P. brunneum*, *P. fellutanum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. janthinellum*, *P. camemberti*, and *P. olsonii*), *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Cryptococcus flavus*, *Thermomonospora curvata*, and *Mucor* sp. Olarak tanımlanmıştır. (Gopinath vd., 2017)

2.3. Nişastanın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Nişasta taneli yapıda olan tahıllarda bulunan biricil depolanmış enerji kaynağıdır. Tahılların farklı çeşitlerinde nişasta miktarı 60% ile 75% arasında değişmektedir. Besin değerine ek olarak nişasta ve modifiye edilmiş nişasta, birçok yiyeceğin fiziksel özelliğini etkilemektedir. Örnek olarak, mısır, buğday, pirinç ve patatesten üretilen ticari nişasta jelleştirici, kıvam arttırıcı, yapıştırıcı, nem tutucu, düzenleyici, yoğunlaştırıcı ve bayatlamayı önleyici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca nişasta ve nişastanın farklılaşmasıyla elde edilen ürünler kağıt ve tekstil endüstrilerinde önemlidir. Nişasta özgün kimyasal ve fiziksel karakteristik yapısı ile diğer karbonhidratlardan ayrılmaktadır.

Bitkiler, güneş ışığından gelen enerjinin kimyasal enerjiye dönüştürüldüğü süreç olan fotosentez sonucunda nişastayı sentezler. Nişasta bir depolama bileşiği olarak yapraklarda bulunan plastidlerde solunum için sentezlenmektedir. Ayrıca yumru köklerde, tohumlarda ve köklerde bulunan amiloplastlarda uzun süreli depolama bileşiği olarak sentezlenir. Bu ikincil organellerde, suda çözünmeyen granüller olarak büyük miktarlarda nişasta birikir. Bu granüllerin şekli ve çapı botanik kökenine bağlıdır. Ticari olarak önemli nişasta kaynakları, granül boyutları 2-30 μm (mısır nişastası) ve 5-100 μm (patates nişastası) arasında değişmektedir (Robyt, 2012).

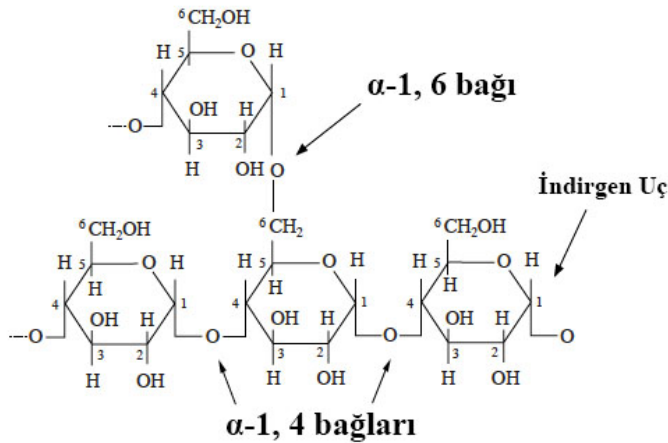
Bitkisel yapısından farklı olarak nişasta, yapı blokları olarak da tanımlanan altı karbonlu D-glukoz moleküllerinden oluşan bir polimerdir. Monosakkarit D-glukozun yapısı açık zincir ya da halka form olarak tanımlanabilir (Şekil 2.2). Halka formu piranoz olarak isimlendirilir (D-glikopiranoz gibi). Piranoz halkası termodinamik olarak kararlı bir yapıdadır. D-glukoz üzerindeki bir numaralı karbona bağlı yüksek oranda reaktif aldehit grubu ise molekülü indirgen şeker yapmaktadır. Biyolojik sistemlerde, D-glikopiranoz diğer çeşitli disakkarit ve polisakkaritlere göre küçük miktarlarda bulunmaktadır.



Şekil 2.2. Monosakkarit D-glukozun açık zincir ve piranoz halka yapısı

Nişasta esasen α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları ile birbirine bağlanan D-glikopiranoz polimerlerinden oluşmaktadır. Bu bağları oluştururken, bir D-glukopiranoz molekülü

üzerindeki karbon numarası 1 olan (C1), bitişik bir D-glukopiranoz molekülünden karbon numarası 4 (C4) veya karbon numarası 6 olan molekül ile (C6) ile reaksiyona girer. Çünkü nişasta polimerinin bir ucundaki aldehit grubu her zaman serbesttir ve her zaman bir adet indirge uç bulunmaktadır (Şekil 2.3.). Polimer diğer ucu ise indirgenmeyen uç olarak tanımlanır. Nişasta molekülünü polimerik dallarının sayısına bağlı olarak birçok indirgenmeyen uç bulunabilir. Nişastada glikozidik bağlar alfa (α) konfigürasyonundadır. Alfa bağlarının yapısı piranoz halkasının C1 karbonu üzerindeki hidroksil grubunun (-OH) oryantasyonu ile belirlenir. Bazı nişasta polimerleri α bağları ile helikal yapı kazanmaktadır.



Şekil 2.3. Nişastadaki α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağları

Alfa bağlarının önemini ortaya koymak için nişasta, β -1,4 bağları içeren glukoz polimeri olan selüloz ile karşılaştırılmaktadır. Görünüşte önemsiz olan bu fark selüloz ve nişasta polimerleri arasında büyük bir farka dönüşmektedir. Yapısal konfigürasyon farklılığı, fiziksel ve kimyasal farklılık ve belli enzimlere duyarlı olmaları gibi farklılıklar bu iki polimer arasındaki göze çarpan farklılıklardır. Çünkü β konfigürasyonu selüloza düz, şerit benzeri yapısını kazandırmaktadır. Nişasta polimeri ise genel olarak sarmal yapıdadır. Nişastanın sarmal geometrisi ve alfa konfigürasyonu nişastaya özgül özelliklerini vermekte ve enzim tarafından parçalanabilmesini sağlamaktadır.

Nişasta polimerleri amilaz enzimi tarafından parçalanabilmektedir. Selülozda bulunan β -1,4 bağları amilaz enzimine duyarlı değildir. Selüloz birçok hayvan tarafından da

sindirilmektedir. Nişastadaki glikoz polimerizasyonu amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tip polimer ile sonuçlanır. Amiloz esasen doğrusal bir polimerdir, oysa amilopektin molekülü çok daha büyüktür ve dallıdır. Bu iki polimer arasındaki yapısal farklılıklar, nişasta özellikleri ve işlevselliğinde önemli farklılıklara katkıda bulunur.

2.4. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımı

Enzimler birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. Nişasta işleme, gıda endüstrisi, biracılık, tekstil gibi birçok endüstri kolun uygulama alanları mevcuttur. Bu uygulama alanları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Enzimler ve Endüstriyel Uygulamaları (Singhania vd., 2015)

Endüstri Alanı	Endüstriyel Enzimler	Kullanımı
Nişasta İşleme	α ve β amilaz, pullunaz, invertaz, glikoizomeraz	Nişasta ve sakarozdan çeşitli şurup türleri üretimi
	Glikozoksidaz	Gıda maddelerinden oksijen ve glikozu uzaklaştırarak gıdaların depolanabilirliğini artırır
	Transglutaminaz	Transglutaminaz Proteinlerin çapraz bağlanmasının ürünlerin viskoelastik özelliklerinin iyileştirildiği sosis ve eriştelere işlenmesinde tekstüre edici ajan.
Un ve Unlu Ürünler	Alfa amilaz	Somun hacmi, raf ömrü
	Glikoz oksidaz	Hamur kalitesi ve iyileştirilmesi,

Çizelge 2.2. (Devam) Enzimler ve Endüstriyel Uygulamaları

Biraçılık	Glukanaz	Filtre yardımcısı
	Papain	Bulanıklık kontrolü
MeyveSuyu Endüstrisi	Selülaz, ksilinaz, pektinaz	Berraklaştırma
Tekstil	Selülaz	Kot taşlama, parlatma
	Katalaz	Kastarlama
Deterjan	Selülaz	Kir ve rengi kolayca gidermek için selüloz liflerinin gevşemesi, parlatıcı
	Lipaz	Yağ degradasyonu
	Proteaz	Protein degradasyonu
	Amilaz	Nişasta degradasyonu
Kağıt ve Kağıt İşleme	Ksilinaz	Beyazlatma
	Selülaz Lakkaz, peroksidaz	Geri dönüşüm kağıtlarında mürekkep giderimi Polimerizasyon
Yemcilik	Fitaz	Fosfat serbestlenmesi
	Ksilinaz	Lif çözünürlülüğü
Biyoyakıt	Selülaz	Etanol üretimi için selülozik biyokütlenin hidrolizi ile glikoz elde edesi
Kişisel Bakım Ürünleri	Proteinaz, lipaz	Kontakt lens temizliği

2.4.1. Gıda endüstrisi

Niştayı parçalayan enzimlerin kullanımı, gıda endüstrisinde mikrobiyal enzimlerin ilk büyük ölçekli uygulamasıdır (Couto & Sanromán, 2006). Amilazlar fırıncılık ve unlu mamüllerin üretiminde, biracılık, sindirim yardımcılarının hazırlanması, kek üretimi, meyve suları ve nişasta şurupları gibi işlenmiş gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Esas olarak iki enzim nişastanın glikoza dönüşümünü gerçekleştirir bunlar α -amilaz ve glukoamilazdır. Bazen glikoz verimini arttırmak için ek parçalayıcı enzimler, örneğin pullulanaz eklenir. β -amilaz ticari olarak arpa tanelerinden üretilir ve disakkarid maltozun üretiminde kullanılmaktadır. Amilazlar ayrıca bira veya meyve sularının artırılması veya lifin sindirilebilirliğini arttırmak için hayvan yemi ön işleminde kullanılır (Gupta vd., 2003; Singhania vd., 2015).

2.4.2. Unlu mamüller endüstrisi

Amilazlar fırıncılık endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. α -amilazlar, daha iyi ekmek kalitesi ve artan raf ömrü ile bağlantılı olarak en yaygın şekilde incelenmiştir. Bakteriler ve funguslardan elde edilmektedir. Bu enzimler, undaki niştayı daha sonra maya tarafından fermente edilen daha küçük dekstrinlere ayrıştırmak için ekmek hamuruna eklenebilir. Hamura amilaz eklenmesi, fermantasyon oranının artırılmasına ve hamurun viskozitesinin azalmasına neden olarak ürünün hacminde ve dokusunda iyileşmelere neden olur. Aşırı doz yapışkan hamurun oluşmasına neden olabileceğinden, eklenen miktarın dikkatlice kontrol edilmesi gerekmektedir. Ekmeğin tadını, kabuk rengini ve kızarma özelliklerini geliştiren hamurda ek şeker üretir. Fermente edilebilir bileşikler üretmenin yanı sıra, bayatlamaya karşı etkiye sahiptir ve pişmiş ürünlerin yumuşak tutulmasını geliştirir ve bu da ürünlerin raf ömrünü uzatır. Şu anda, *Bacillus stearothermophilus*'un termostabil bir maltojenik amilazı, ticari olarak fırıncılık endüstrisinde kullanılmaktadır. Amilazlar ayrıca bira veya meyve sularının artırılması veya lifin sindirilebilirliğini arttırmak için hayvan yemi ön işleminde kullanılır (Gupta vd., 2003; Van Der Maarel vd., 2002) .

2.4.3. Nişasta işleme endüstrisi

Amilazların en yaygın uygulamaları nişastayı fruktoza ve glikoz şuruplarına dönüştürülmesini sağlayan ve nişasta sıvılaştırma işleminde nişasta hidrolizi için kullanılan nişasta endüstrisinde (Nielsen & Borchert, 2000). Tüm nişastanın enzimatik dönüşümü, nişasta granüllerinin çözünmesini içeren jelatinleştirme, böylece yapışkan bir süspansiyon oluşturur; kısmi hidroliz ve viskozite kaybını içeren sıvılaştırma; ve daha fazla hidroliz yoluyla glikoz ve maltoz üretimini içeren sakarifikasyon basamaklarını içermektedir. (Gupta vd., 2003)

2.4.4. Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrileri hem hacim hem de değer açısından enzimlerin birincil tüketicileridir. Deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanılması, deterjanların sert lekeleri çıkarma ve deterjanı çevre açısından güvenli hale getirme kabiliyetini artırır. Amilazlar, enzimatik deterjan formülasyonunda kullanılan ikinci tip enzimlerdir ve tüm sıvı deterjanların %90'ı bu enzimleri içermektedir (Gupta vd., 2003) (Hmidet vd., 2009) (Mitidieri vd., 2006). Bu enzimler, çamaşır deterjanlarında ve patates, sos, muhallebi, çikolata gibi nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinlere ve diğer küçük oligosakkaritlere indirmek için otomatik bulaşık yıkamada kullanılır (Mukherjee vd., 2009) (Olsen & Falholt, 1998). Amilazlar düşük sıcaklıklarda ve alkalik pH'da aktiviteye sahiptir, deterjan koşulları altında gerekli stabiliteyi korur ve amilazların oksidatif stabilitesi, yıkama ortamının çok oksitleyici olduğu deterjanlarda kullanımları için en önemli kriterlerden biridir. Nişastanın yüzeylerden uzaklaştırılması da bir beyazlık yararı sağlamak açısından önemlidir, çünkü nişasta birçok partikül tipi toprak için çekici olabilir. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilazların örnekleri *Bacillus* veya *Aspergillus* türlerinden üretilmektedir (Mitidieri vd., 2006).

2.4.5. Biyoetanol üretimi

Etanol en çok kullanılan sıvı biyoyakıttır. Etanol üretimi için, nişasta düşük fiyatı ve dünyanın birçok bölgesinde kolayca bulunabilen hammaddesi nedeniyle en çok kullanılan substrattır (Chi vd., 2009). Bu üretimde, nişasta çözündürülmeli ve daha sonra fermente edilebilir şekerler elde etmek için iki enzimatik aşamaya tabi tutulmalıdır. Nişastanın etanole biyo-dönüşümü sınıvlaşmayı ve sakrifikasyonu içerir, burada nişasta bir amilolitik mikroorganizma veya -amilaz gibi enzimler kullanılarak şekere dönüştürülür, bunu takiben şeker *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak etanole dönüştürülür (de Moraes vd., 1999) (Mukherjee vd., 2009). Aynı bir sakrifikasyon işlemine gerek olmadan doğrudan nişastadan etanol üretebilen yeni bir maya suşu elde etmek için, amilolitik maya *Saccharomyces fibuligera* ve *S. cerevisiae* arasında protoplast füzyonu gerçekleştirilmiştir (Chi vd., 2009). Bakteriler arasında, nişasta süspansiyonlarının hidrolizinin ilk adımı sırasında *Bacillus licheniformis* gibi termo-dirençli bakterilerden veya tasarlanmış *Escherichia coli* veya *Bacillus subtilis* suşlarından elde edilen amilaz kullanılır (Sanchez & Cardona, 2008).

2.4.6. Tekstil endüstrisi

Amilazlar haşıl sökme işlemi için tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Hızlı ve güvenli bir dokuma işlemi sağlamak için kumaş üretiminden önce ipliğe nişasta gibi haşıl maddeleri uygulanır. Nişasta hacmen büyüktür, çünkü ucuzdur, dünyanın birçok bölgesinde kolayca bulunur ve oldukça kolay bir şekilde çıkarılabilir. Nişasta daha sonra tekstil terbiye endüstrisinde ıslak bir işlemle dokuma kumaştan çıkarılır. Haşıl sökme işlemi, dokuma işlemi sırasında çözgü ipliğinin kırılmasını önlemek için güçlendirici madde olarak işlev gören kumaştan nişastanın çıkarılmasını içerir. Amilazlar seçici olarak kütleyi uzaklaştırır ve liflere saldırmaz. *Bacillus* suşundan elde edilen amilazlar, tekstil endüstrisinde uzun bir süredir kullanılmaktadır (Ahlawat vd., 2009; Feitkenhauer, 2003; Gupta vd., 2003).

2.4.7. Kağıt işleme endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde amilazların kullanılması, kaplanmış kağıdın nişastasının modifikasyonu, yani düşük viskoziteli, yüksek moleküler ağırlıklı nişasta üretimi içindir (Gupta vd., 2003; Van Der Maarel vd., 2002). Kaplama işlemi, kağıdın yazı kalitesini artırmak için kağıdın yüzeyini yeterince pürüzsüz ve güçlü hale getirmeye yarar. Bu uygulamada, doğal nişastanın viskozitesi kağıt boyutlandırması için çok yüksektir ve bu, polimerin bir parti veya sürekli işlemlerde amilazlarla kısmen parçalanmasıyla değiştirilebilir. Nişasta, kağıdın bitirilmesi için iyi bir haşılama maddesidir, kağıt için iyi bir kaplama olmasının yanı sıra kaliteyi ve silinebilirliği de artırır. Boyut, kağıttaki sertliği ve mukavemeti arttırmaktadır. (Bruinenberg vd., 1996; Gupta vd., 2003)

2.5. Ekstremofiller ve Ekstrem Çevreler

Ekstremofilik mikroorganizmalar, ekstrem koşullarda hayatta kalmak için çeşitli moleküler stratejiler geliştirmişlerdir. Bu organizmalar tarafından izole edilen biyokatalizörler ekstremozimler olarak adlandırılır ve tuza tolerans, termostabilite ve soğuk adaptasyonu gibi olağanüstü özelliklere sahip olabilirler. Ekstremomlar, sağlam yapıları nedeniyle ekstrem koşullara karşı çok dirençlidirler ve uygulamaları yoluyla ekonominin ve yeni araştırmaların gelişmesinin yanı sıra biyokataliz ve biyotransformasyonlar için yeni de fırsatlar sunmaktadırlar. Termofilik proteinler, piezofilik proteinler, asidofilik proteinler ve halofilik proteinler son birkaç yıldır incelenen konular arasındadır. Amilazlar, proteazlar, lipazlar, pullulanazlar, selülazlar, kitinazlar, ksilanazlar, pektinazlar, izomerazlar, esterazlar ve dehidrojenazlar gibi enzim grupları tarımsal, kimyasal, biyomedikal ve biyoteknolojik işlemlerde olduğu gibi biyoteknoloji için de büyük bir potansiyel uygulama alanlarına sahiptir. Ekstremomlar ve ana uygulamaları çalışmaları son yıllarda ortaya çıkmıştır. (Dumorne vd., 2017)

Halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarında (en az 1 M NaCl) yaşayabilir ve fizikokimyasal özelliklere sahip proteinlerin seçiciliğini ve stabilitesini sağlayan farklı kimyasal, yapısal ve fizyolojik modifikasyonlara sahiptirler. Halofilik

mikroorganizmalar optimum tuz konsantrasyonuna göre üç kategoride sınıflandırılabilir: (i) 2.500-5.200 mM NaCl'de gelişebilen aşırı halofiller; (ii) 500-2.500 mM NaCl'de gelişen orta halofiller ve (iii) 200-500 mM NaCl'de gelişebilen hafif halofilik (Pikuta vd., 2007). Halofillerden gelen enzimler farklı adaptasyon mekanizmaları kullanılır ve düşük su aktivitesinde ve organik çözücülerin varlığında çok kararlı yapıdadırlar. Halofilik enzimler, halofilik olmayan mikroorganizmalara kıyasla serin ve treonin gibi asit amino kalıntılarının büyük bir yüzdesini gösterir; bunlar ksilan ve nişasta için polisakarit hidrolize edici enzimleri içermektedir (Raddadi vd., 2013). *Acinetobacter*, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Halorhabdus*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Natronococcus*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halobacillus* ve *Halothermothrix* tarafından üretilen halofillerden, ksilanazlar, amilazlar, proteazlar ve lipazlar gibi ekstremomlar önceki çalışmalarda bilirmişdir. Lipazlar ve esterazlar, özellikle çoklu doymamış yağ asitleri, gıda ve biyodizel üretiminde büyük potansiyeli olan endüstriyel uygulamalara sahiptir (Litchfield, 2011) (Schreck & Grunden, 2014). *Haloferax volcanii* 'den ligaz N durumunda, enzimatik aktivitelerini arttırmak için KCl gereklidir; aksi takdirde, NaCl varlığında faaliyetleri çok düşüktür (Ortega vd., 2011).

Halofilik enzimler sulu / organik ve susuz ortamlarda düşük çözünürlüğe sahiptir (Serour & Antranikian, 2002) Şimdiye kadar sıvı olmayan ortamlarda bulunan halofilik enzimlerin özellikleri yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bunlar, *Halobacterium halobium* (Kim & Dordick, 1997), *Saliniovibrio sp.* soy AF-2004 (Karbalaei-Heidari vd., 2007) ve *Natrialba magadii* [80]; *Haloarcula sp.* S-1 suşu (Fukushima vd., 2005), *Nesterenkonia sp.* suşu ve *Salimicrobium halophilum* suşu LY20 (Karbalaei-Heidari vd., 2007); ve *Halobacterium salinarum* suşu NRC-36014'ten glutamat dehidrojenaz (Munawar & Engel, 2012). Çeşitli araştırmalar, bu koşulların enzimlere göre değiştiğini bildirmiştir. Örneğin, *Halogeometricum sp.* TSS 101, %10 ila %15 NaCl arasında değişken üretim gösterirken, maksimum biyokütle üretimi için optimal konsantrasyon %20 NaCl'dir. Halofilik mikroorganizmalardan meydana gelen ekstremomlar, gıda, biyoremediasyon ve biyosentetik proses endüstrileri için büyük fırsatlar sunmaktadır. Halofilik enzimlerin biyoteknolojik kullanımları, yüksek sıcaklıklara toleranslı oldukları ve organik çözücülerin varlığında stabil oldukları için yüksek tuz konsantrasyonlarındaki stabiliteyi ile sınırlı değildir Düşük su aktivitesine sahip ortamlarda aktif ve stabildirler, çünkü enzim

konformasyonunu koruyarak aktif bölgede uygun yük dağılımını sağlamak için yeterli suya sahiptirler. Halofilik enzimler, yüksek sodyum klorür ve potasyum klorür konsantrasyonlarına, organik çözücülerle bu tür etkileşimlere ve üç boyutlu enzim yapısına karşı farklı stabilite ve çözünürlük mekanizmalarında rol oynarlar [88, 89]. Halofilik enzimlerin aktiviteleri, enzim inhibisyonu üretmemek için tuz gereksinimlerine göre, esasen enzimatik aktivite için optimal kültür koşullarında çok önemlidir (Dumorne vd., 2017).

Ekstremofilik mikroorganizmalardan gelen enzimler, yüksek ve düşük sıcaklıklardaki stabiliteleri, pH aralığı, iyonik güçleri, tuzlulukları ve diğer birçok enzimi denatüre edecek organik çözücülerde işlev görebilmeleri nedeniyle biyokataliz ve biyotransformasyonlar için farklı biyoteknolojik fırsatlar sunmaktadır. Enzimler birçok ticari üründe ve birçok endüstriyel işlemden kullanılmaktadır (Adrio & Demain, 2014). 3.000'den fazla enzim tanımlanmaktadır ve deterjan, tekstil, kağıt hamuru, kağıt ve nişasta endüstrilerinde bu enzimlerin yaklaşık % 65'i kullanılmaktadır ve % 25'i gıda işleme için kullanılmaktadır (Birgisson vd., 2003). Amilaz, yüksek sıcaklıklarda üretilen biyokimyasal reaksiyonlara dahil edilir ve yüksek maliyetli reaktanlar yerine kullanılabilir. [94, 106] Proteazlar, lipazlar, selülozlar ve amilazlar gibi ekzozimler endüstride, özellikle deterjanlarda kullanılan ticari enzimlerdir (Chang vd., 2004). Enzimlerden deterjan üretimi, büyük ölçekli işlemeden daha küçük ölçekli yüksek katma değerli ürünlere kadar, küresel olarak üretilen toplam enzimlerin yaklaşık % 40 'ını oluşturan büyük bir pazardır (Ma vd., 2004). Selülozlar ve amilazlar haşıl sökme işlemleri, yüzey fibrilleri ve toplarının giderilmesinde ve taş yıkama işlemlerinde kullanılır. Ekstremozların tekrar üretilebilirlikleri, yüksek performansları ve ekonomik canlılıkları gibi çeşitliliği ve istisnai özellikleri, farklı endüstriyel süreçlere biyoteknolojik uygulamalarını arttırmıştır (Gurung vd., 2013).

2.6. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimlerin Ekonomik Önemi

2008 yılında küresel endüstriyel enzimler pazarı, yiyecek ve içeceklerden deterjanlar, teşhis, hayvan yemi, yenilenebilir biyoyakıtlara, daha yeşil lastik ve yapıştırıcı üretimine kadar çok çeşitli ürün uygulamalarını kapsamakta ve 2,1 milyar ABD Doları'nı aşması beklenmektedir (Singhania vd., 2015). Enzimlerin geniş uygulama potansiyeli sayesinde

küresel pazarlarının 2015 yılında 4,9 milyar dolar olacağı ve 2021'de 6,3 milyar dolara ulaşacağı ve biyoyakıt, ilaç, kağıt hamuru ve kağıt uygulamalarında en hızlı büyümenin gerçekleşeceği tahmin edilmiştir (Freedonia, 2008) (Reiss vd., 2007). Ar-Ge, daha etkili enzimler ve üretim süreçleri geliştirmeye ve seçmeye odaklanmaya devam edecektir. Avantajlar arasında, düşük enerji tüketimi ve zararlı yan ürünlerin ortadan kaldırılması yoluyla maliyet tasarrufu ve bazı endüstriyel üretim süreçleri için daha küçük bir çevresel ayak izi sağlanabilecektir (*The Bioeconomy to 2030 OECD*).

Enzim pazarının büyüklüğünün değeri 2020 yılında 10.6 milyar dolardır bu rakamın 2027 yılında 14.9 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir. Novozymes; DuPont; DSM; Amano Enzyme Inc.; Lonza Group enzim üreten şirketler dünyada önde gelen üretici şirketlerdir. Enzim üreticisi olan ülkelerden Kuzey Amerika Ülkeleri; Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Meksika. Avrupa Ülkeleri; İngiltere, Almanya, Fransa, İspanya, İtalyadır. Asya Ülkeleri; Çin, Japonya, Hindistan, Güney Kore, Endonezya, Avustralya. Güney Amerika Ülkeleri; Brezilya ve Arjantin. Orta Doğu ve Afrika Ülkeleri; Suudi Arabistan ve Türkiyedir (*Enzymes Market Size, Share | Global Industry Report, 2020-2027*). Amilazlar ilk ticarileştirilen enzimdir ve ilk olarak sindirim sistemi bozukluklarının tedavisinde farmasötik bir yardımcı olarak 1984'te kullanılmıştır. Amilaz, dünya enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Ana uygulama alanı gıda endüstrisidir (Mojsov, 2012). Küresel alfa-amilaz fırıncılık (Ekmek, pasta vb endüstri kolları) pazar büyüklüğü 2015 yılında 255.1 milyon ABD dolardır. Mükemmel renk dokusu, hamur iyileştirme ve sürekli yumuşaklık gibi sayısız özellik sağlamak için enzimlerin ekmek yapımındaki artan öneminin önümüzdeki sekiz yıl içinde olumlu bir faktör olarak kalması beklenmektedir. ABD ve Kanada'nın gelişmiş pazarlarında Kellogg Company ve Grupo Bimbo'nun yeni ürün lansmanları ışığında büyüyen unlu mamuller pazarının önümüzdeki sekiz yıl boyunca önemli bir itici güç olmaya devam etmesi beklenmektedir. Marka reklamında McDonalds da dahil olmak üzere fast food üreticileri tarafından artan harcamalar nedeniyle Çin ve Hindistan'ın gelişmekte olan pazarlarındaki hazır gıdalara yönelik artan talebin, pişmiş ürünlerdeki üretim uygulamalarını teşvik etmesi beklenmektedir. Sonuç olarak, protein hidroliz enzimlerinin, özellikle alfa-amilazın, yukarıda belirtilen ülkelerin fırıncılık endüstrisinde uygulama bulması beklenmektedir. Alfa-amilaza benzer özellikler sergileyen

ksilanaz, lipaz ve proteazlar dahil olmak üzere diğer protein hidroliz enzimlerine artan talebin endüstri için güvenilir bir tehdit oluşturması beklenmektedir. Ayrıca, biyoyakıt ve deterjan endüstrilerinde katalizör olarak alfa-amilazın öneminin, ürün verimini arttırmak ve teslim süresini azaltmak ışığında yakın gelecekte ilgili bir faktör olarak kalması beklenmektedir. 2015 yılında küresel hacminin %83,2'sini oluşturan bakteriler en çok kullanılan kaynaktı ve diğer kaynaklara kıyasla yüksek termal stabilitesi nedeniyle trendin öngörülen dönemde devam etmesi beklenmektedir. Maltojenik kaynaklar ekmek ve kekler için raf ömrünü uzatabilir. Bu tür alfa-amilaz kaynakları, ekmek pişirme işlemleri sırasında optimum kırıntı yumuşaklığı elde etmek için ksilanaz, fungal ve lipaz gibi diğer enzimlerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Son birkaç yıldır, *Aspergillus oryzae*, alfa-amilaz gibi çok miktarda yüksek enzim salgılama kabiliyeti nedeniyle heterolog protein üretimi için uygun bir üretici olarak dikkat çekmiştir. Fungal alfa-amilazlar, GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınır) statüsü aldıkları için diğer mikrobiyal kaynaklara göre tercih edilmektedir. 2015 yılında 27.799,7 ton olan Kuzey Amerika en büyük pazardı. Sara Lee Corporation, Private Label ve Nature's Own gibi ekmek işleyicilerinin yüksek yaygınlığının endüstri üzerinde önemli bir etkisi olması beklenmektedir. Buna ek olarak, ABD ve Kanada'daki dondurulmuş ekmek segmentinde yeni ürün lansmanlarının önümüzdeki sekiz yıl boyunca enzimlerin kullanımını artırması muhtemeldir. Avrupa alfa-amilaz pazar geliri 2015 yılında 82,7 milyon ABD doları olmuştur. Almanya ve İngiltere'nin olgun pazarlarındaki artan üretim harcamaları ışığında gıda ve içecek sektörünün yavaş büyümesinin olumsuz bir etkisi olması beklenmektedir. Asya Pasifik'in, yabancı yatırımlar için düzenleyici desteğin yanı sıra yerel düzeyde ekmek ürünleri tüketiminin artmasıyla birlikte unlu mamullerde artan imalat uygulamaları ışığında %5,9'luk bir yıllık büyüme oranı ile en yüksek hacim kazanımlarına tanık olması beklenmektedir. Önemli endüstri katılımcıları arasında Novozymes A / S, DuPont, Royal DSM N.V., Puratos N.V. ve AB Enzimler bulunmaktadır. Fırıncılık endüstrisindeki enzimlerin yüksek nüfuz etmesinin yanı sıra Avrupa'nın ekipman ve sarf malzemelerine kolay erişim, üreticilerin stratejik iş birimlerini yakınlarda kurmasını beklemektedir (*Alpha-Amylase Baking Enzyme Market Size & Share Report, 2024*)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikrofungus izolatları

Çalışmada kullanılan mikrofungus izolatları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı stok kültürlerinden temin edilmiştir. Bu fungal izolatlar 357314 (Ulusal Tez Merkezi) no'lu “Tuz Gölü mikrofungus çeşitliliğinin belirlenmesi” başlıklı doktra tezi ve 367574 (Ulusal Tez Merkezi) no'lu “İzmir Çamata Tuzlası Mikobiyotasının Belirlenmesi (Moniliaceae ve Telomorfları)” başlıklı yüksek lisans tezinde izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Amilolitik aktivite açısından yapılan taramada 25 *Aspergillus* ve 15 *Penicillium* izolatı kullanılmıştır. (Çizelge 3.1.)

3.1.2. Besiyerleri

Besiyeri 1. Nişasta Agar Besiyeri

Çözülebilir Nişasta	5,0 g
Yeast Extract	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Agar	15,0 g
pH	6,5 (25 °C)

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Besiyeri içeriği ısıtılıp çözüldürüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Besiyeri otoklavdan sonra 50 °C 'ye kadar soğutularak steril petrilere dökülmüştür (Hall vd., 1970)

Çizelge 3.1. Amilolitik aktivite açısından taranan mikrofungus izolatları

İzolat No	Mikrofungus adı	İzole Edildiği Yer	İzolat No	Mikrofungus adı	İzole Edildiği Yer
CT.14.4	<i>Aspergillus sydowii</i>	Çamaltı Tuzlası	2S.146	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü
CT.10.15	<i>Aspergillus terreus</i>	Çamaltı Tuzlası	3S.144	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü
CT.12.3	<i>Aspergillus tamarii</i>	Çamaltı Tuzlası	2S.145	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü
CT.4.24	<i>Aspergillus clavatus</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.7.2	<i>Penicillium camemberti</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.9.23	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.10.1	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.11.4	<i>Aspergillus amstelodami</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.10.25	<i>Penicillium polonicum</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.10.2	<i>Aspergillus sp.</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.9.25	<i>Penicillium raistrickii</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.21.4	<i>Aspergillus flavus</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.20.22	<i>Penicillium citrinum</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.20.23	<i>Aspergillus versicolor</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.20.30	<i>Penicillium olsooni</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.13.22	<i>Aspergillus niger</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.10.12	<i>Penicillium spinulosum</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.10.2	<i>Aspergillus sclerotium</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.20.15	<i>Penicillium sp.</i>	Çamaltı Tuzlası
CT.4.32	<i>Aspergillus oryzae</i>	Çamaltı Tuzlası	CT.24.2	<i>Penicillium sp.</i>	Çamaltı Tuzlası
2S.436	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü	CT:23.2	<i>Penicillium sp.</i>	Çamaltı Tuzlası
2S.144	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü	CT.30.4	<i>Penicillium sp.</i>	Çamaltı Tuzlası
3S421	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü	CT.23.10	<i>Penicillium sp.</i>	Çamaltı Tuzlası
2S.401	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü	CT.8.3	<i>Penicillium nalgiovense</i>	Çamaltı Tuzlası
2S.350	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü	CT.11.1	<i>Penicillium oxalicum</i>	Çamaltı Tuzlası
3S.355	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü	CT.10.16	<i>Penicillium commune</i>	Çamaltı Tuzlası
2S.378	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü			
2S.333	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü			
3S.331	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü			
2S.325	<i>Aspergillus sp.</i>	Tuz Gölü			

Besiyeri 2. Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck)

Patates Ekstraktı	4,0 g
Dekstroz	20,0 g
Yeast Extract	5,0 g
Agar	15,0 g
pH	6,5(25°C)

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Besiyeri içeriği ısıtılıp çözüldürüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Besiyer otoklavdan sonra 50 °C'ye kadar soğutulularak steril petrilere dökülmüştür.

Besiyeri 3. Fermentasyon Ortamı

NaNO ₃	3,00 g
KCl	0,50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
Pepton	10,00 g
Çözünür Patates Nişastası	20,00 g
pH	6,5 (25°C)

Amilaz üretimi için sıvı besiyeri olarak hazırlanmıştır. Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Besiyeri içeriği karıştırılıp homojen bir çözelti elde edildikten sonra 100 ml' lik hacimdeki erlenlere paylaştırılmıştır. Besiyeri 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Otoklavlandıktan sonra soğutulularak inokülasyon gerçekleştirilmiştir.

3.1.3 Kimyasallar ve çözeltiler

Çözelti 1. 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Çözeltisi

3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS veya DNSA, IUPAC adı 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit)

Çözelti A: 1.00 g DNS 20 ml NaOH (2 M) içinde çözüldürülmüştür.

Çözelti B: 30 g sodyum ve potasyum tartarat tetrahidratı 50 ml distile suda çözüldürülmüştür. Elde edilen çözelti tamamen çözülene kadar karıştırılmıştır.

B çözeltisinin A çözeltisine ilave edilmesiyle oluşan homojen bir çözelti deiyoniz su ile 100 ml 'ye tamamlanmıştır. Koyu renkli bir şişede 4 °C' de saklanmıştır (Miller, 1959).

Çözelti 2. Sitrata Fosfat Tamponu (50 mM, pH 3,0 – 6,0)

Enzim aktivitesi testlerinde ortamın pH değerinin sabit tutulması ve enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanmıştır.

Sodyum fostat (Na_2HPO_4 , ma: 141.96 g/mol) 0.05 molar 7,1 g

Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, ma: 192.12 g/mol) 0.0599 molar 11.5 g

Uygun bir kapta 800 ml distile su üzerine 7.1 g sodyum fostat ve 7.1 g sitrik asit ilave edilmiştir. İlave edildikten sonra tampon çözeltisi 200 ml distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Tamponun pH değeri 1 N HCl ile istenilen değere ayarlanmıştır.

Çözelti 3. Potasyum Fosfat Tamponu (1 M pH 7,0 – 7,5)

Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanmıştır. 13,6 g (0.1 mol) potasyum fosfat 80 ml saf su içerisinde çözüldürerek 1 M HCl ile istenilen pH değerine ayarlandıktan sonra 100 ml' ye tamamlanmıştır

Çözelti 4. Tris HCl (50 mM, pH 8,0 – 8,5)

Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanmıştır. 6,055 g Tris ve 6,248g Na_2SO_4 950 ml distile suda çözdürülerek 1 N HCl ile istenilen pH değerine ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Çözelti 4. İyodür Çözeltisi

Çözelti %0,3 I₂, %0,6 KI olacak şekilde 100 ml hacminde hazırlanmıştır. Amilolitik aktivitenin belirlenmesine kullanılmıştır.

Çözelti 5. Çözünür Patates Nişastası (%1)

1 g çözünebilir nişasta (Sisco), distile su ile 100 ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Enzim aktivite testlerinde substrat olarak kullanılmıştır.

Çözelti 6. Tween® 80 çözeltisi (%0,5)

0,5 ml Tween 80, distile su ile 100 ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Spor süspansiyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 7. Serum Fizyolojik (%0,85)

0,85 g NaCl, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Spor süspansiyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır

3.2. Yöntem

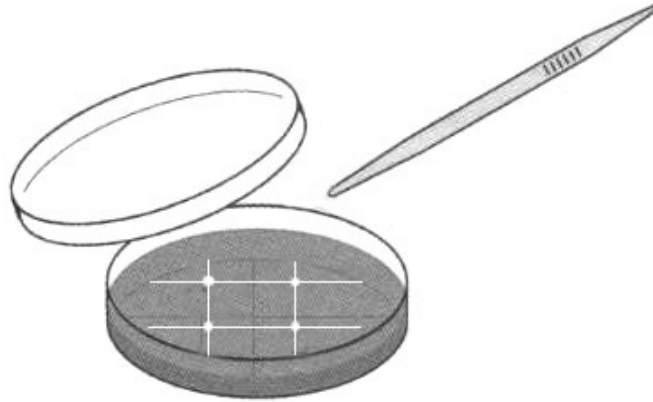
3.2.1. İzolatların saklanma koşulları ve takibi

Çalışma süresince funguslar yatık PDA tüplerinde +4 °C 'de saklanmıştır. 3 aylık periyodlar içerisinde izolatlara ait kültürler tazelenerek takibi yapılmıştır. Aksi belirtilmedikçe tüm uygulamalarda izolatlar +4 °C stoktan alınarak PDA içeren katı besiyerinde steril petrilerde aktiflenmiş ve 7 günlük taze kültür kullanılmıştır. Tüm çalışmalar aksi belirtilmedikçe aseptik şartlar altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Amilolitik aktivenin belirlenmesi

Fungal izolatların amilolitik aktiviteleri ilk olarak nişastayı hidroliz edebilme yeteneklerine göre iki yöntem kullanılarak kalitatif olarak belirlenmiştir (Arikan, 2008). Birinci yöntemde aktif kültürler nişasta agar besiyeri plaklarına (Besiyeri 1) tek nokta şeklinde inoküle edilmiştir.

İkinci yöntemde ise nişasta agarlı besiyeri plakları üzerine aseptik şartlar altında steril bistirü yardımı ile petri üzerinde birbirine iki paralel kesik atılmış ve paralel kesiklerin kesişim noktalarına hazırlanan spor süspansiyonunda 10 µl pipetlenmiştir (Şekil 3.1.). Petriler 4 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında petrilere iyodür çözeltisi (Çözelti 4) ilave edilmiştir. Amilaz aktivitesinin derecesi koloni etrafında oluşan şeffaf zon çapı boyutunun + işareti ile dört kademe olarak derecelendirilmiştir.



Şekil 3.1. Nişasta agar besiyerine paralel kesikler atılarak gerçekleştirilen amilaz testi

3.2.3. Tuza toleransın belirlenmesi

Hipersalin çevrelerden izole edilen ve kalitatif amilaz testinde amilaz üreticisi olabilecek fungal izolatların farklı tuz konsantrasyonları içeren katı besiyerindeki büyümeleri değerlendirilmiştir. Buna göre sırasıyla % 0, % 5 % 7 % 12 ve % 15 oranlarında tuz içeren nişasta agarlı besiyerine (Besiyeri 1) inoküle edilen mikrofungus izolatları 28 °C sıcaklıkta 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikrofungusların amilaz aktiviteleri oluşturdukları zon ölçülerek, tuza toleransları ise farklı tuz konsantrasyonlarındaki koloni çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Amilaz üreticisi fungus izolatlarının seçilmesinde onların farklı tuz konsantrasyonlarındaki büyümeleri de dikkate alınmıştır.

3.2.4. Spor süspansiyonunun hazırlanması

PDA besiyerinde üç nokta ekimi yapılarak aktiflenen izolatların sporları aseptik koşullarda steril Tween® 80 (çözelti 6) ile süspansiyon edilmiştir. Fungus kolonilerinin yüzeyi steril öze yardımıyla kazıyarak sporların çözeltiye geçmesi sağlanmıştır.

Çözeltiye geçen sporlar 1 ml olacak şekilde 9 ml steril serum fizyolojik çözeltilisine (Çözelti 7) ilave edilmiştir. Uygun spor konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 10^{-1} lik konsantrasyon kullanılarak uygun konsantrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Her

seyreltmede Thoma lamı kullanılarak milimetredeki spor sayımı gerçekleştirilmiştir. Buna göre spor süspansiyonundaki milimetredeki spor sayısı $A \times SF \times 10^4$ ($A = 0,1 \text{ mm}^3$ hacminde sayılan spor, $SF =$ Seyreltme faktörü, $10^4 =$ Mililitreye çevirme çarpanı) formülüne göre belirlenmiştir.

Aksi belirtilmedikçe tüm inokülasyonlar, mililitredeki spor sayısı $\sim 10^7$ spor/ml olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Maltoz standart eğri grafiğinin oluşturulması

Maltoz indirgen bir şekerdir. Bu karbonhidratlar serbest bir aldehit veya keto grubuna sahiptir fehling ve benedict gibi reaktifleri indirgerler. Bilinmeyen bir örnekteki maltoz konsantrasyonu standart eğri oluşturularak belirlenebilir. Maltoz için standart bir eğri/grafik oluşturarak, bilinmeyen bir örnekte bulunan indirgen şekerlerin konsantrasyonunu tahmin etmemize ve örnekteki maltoz miktarı ve amilaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Maltoz için standart eğri genellikle reaktif olarak 3,5-Dinitro salisilik asit (DNS) kullanılarak oluşturulur. Maltoz, soluk sarı renkli alkali 3,5-Dinitro salisilik asidi (DNS) turuncu-kırmızı renkli, 3 amino, 5 nitro salisilik aside indirgemektedir. Rengin yoğunluğu, çözeltide bulunan maltoz konsantrasyonu ile orantılıdır. Renkteki bu yoğunluk değişikliği, 530-540 nm dalga boyunda absorbans olarak bir kolorimetre kullanılarak ölçülmektedir (Hall vd., 1970)

Standart bir maltoz eğrisi içeren grafik oluşturabilmek için öncelikle test tüplerinde farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 ve 5000 μM) maltoz içeren bir dizi çözelti hazırlanmıştır. 400 μl maltoz çözeltisi ve 100 μl DNS eklenerek toplam 500 μl hacimdeki deney tüpleri soğuk su banyosunda 2 dk, sıcak su banyosunda 5 dk ve sonrasında soğuk su banyosunda 3 dk bekletilmiştir. Takiben her konsantrasyona 1000 μl distile su eklenerek optik yoğunlukları köre karşı spektrofotometre kullanılarak 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Çizelge 3.2). Elde edilen spektrofotometrik ölçüm değerleri seyreltme faktörü ile çarpılarak X ekseninde maltoz miktarı ve Y ekseninde gözlenen optik yoğunluk ile standart maltoz grafiği çizilmiştir.

Çizelge 3.2. Standart bir maltoz eğrisi içeren grafiği oluşturma basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
Maltoz Çözeltisi	400 µl	-
Distile Su		400 µl
DNS	100 µl	100 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000 µl
Dalga Boyu	530 nm	530 nm
Maltoz çözeltileri (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ve 5000 µM)		

3.2.6. Fermentasyon sıvısında indirgen şeker miktarının belirlenmesi

Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi, çözeltideki toplam indirgeyici şeker miktarını ölçerek şekerlenme derecesinin hızlı ve basit bir tahminini vermektedir. İnkübasyon sonunda elde edilen fermentasyon sıvısındaki maltoz miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Bernfeld, 1955). Bilinmeyen maltoz konsantrasyonu maltoz standart eğrisi ile oluşturulan formüle göre hesaplanmıştır.

400 µl 50 mM sitrat fosfat tamponu ve 400 µl fermentasyon sıvısına 200 µl DNS ilave edilmiştir. Kör olarak ise 400 µl sitrat fosfat tamponu ve 400 µl distile suya 200 µl DNS reaktifi ilave edilmiştir. Sırasıyla, örnek ve kör soğuk su banyosunda 2 dakika, sıcak su banyosunda 5 dakika ve soğuk su banyosunda 3 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 1000 µl çalışma hacmine 1000 µl distile su ilave edilerek, köre karşı örnek optik yoğunlukları 530 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Deney ortamının bileşenleri ve basamakları sırasıyla Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. İndirgen Şeker Miktarının Belirlenme Basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
50 mM pH 6.0 Sitrat Fosfat Tamponu	400 µl	400 µl
Fermentasyon Sıvısı	400 µl	-
Distile Su	-	400 µl
DNS	200 µl	200 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.7. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzim üretimi için 100 ml amilaz fermentasyon ortamı (Besiyeri 3) içeren 500 ml'lik erlene 2 ml spor süspansiyonu ($\sim 2 \times 10^7$ spor/ml) inoküle edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızı ve 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda fermentasyon sıvısı whatman filtre kağıdı yardımıyla süzümüştür. Fermentasyon sıvısında indirgen şeker, enzim aktivitesi, biyokütle ölçümleri yapılmıştır. Biyokütle ölçümü için filtre kağıdında kalan miselyal kütle distile su ile yıkanmıştır ve 50 °C' de 24 saat süresince kurutulmuştur. Kurutulan miselyal kütlenin ağırlığı hassas terazide tartıldı. Darası alınan filtre kağıdının ağırlığı çıkarılarak kuru biyokütle miktarı (g/100 ml) olarak hesaplanmıştır.

Enzim aktivitesi belirlemek için, 400 µl 50 mM sitrat fosfat tamponu ve 400 µl fermentasyon sıvısına 200 µl DNS ilave edilmiştir. Kör olarak ise 400 µl sitrat fosfat tamponu ve 400 µl distile suya 200 µl DNS reaktifi ilave edilmiştir.

400 µl %1'lik çözünebilir patates nişastası (Çözelti 5) 400 µl enzim içeren filtrat ile 55 °C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda örnek ve köre 200 µl DNS ilave edilmiştir. Kör enzim içeren filtrat ile inkübe edilmemiş, filtrat DNS ilave edildikten sonra deney tüpüne ilave edilmiştir. Sonrasında örnek ve kör soğuk su banyosunda

2 dakika, sıcak su banyosunda 5 dakika ve soğuk su banyosunda 3 dakika bekletilmiştir. 1000 µl çalışma hacmine 1000 µl distile su ilave edilerek, köre karşı örnek optik yoğunlukları 530 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Deney ortamının bileşenleri ve basamakları sırasıyla Çizelge 3.4.' de verilmiştir.

Üretilen ham amilaz enzim aktivitesi DNS yöntemi ile spektrofotometrik yöntem kullanılarak volümetrik aktivite cinsinden U/ml olarak hesaplanmıştır. Oluşan indirgen şeker miktarı standart maltoz eğrisinden hesaplanmıştır.

Bir enzim ünitesi (IU) volümetrik aktivite cinsinden, 55 °C' de, pH 6.0' da 1 dakikada çözünür patates nişastasından 1 µmol maltozun serbest kalmasını sağlayan enzim miktarını ifade etmektedir.

$$\text{Volümetrik Aktivite (U/ml)} : \frac{\text{Maltoz } (\mu\text{M})}{\text{İnkübasyon Süresi (dk)} \times \text{Enzim Miktarı (ml)}}$$

Çizelge 3.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenme Basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür patatesi nişastası (%1)	400 µl	400 µl
Enzim içeren filtrat	400 µl	-
İnkübasyon (55 °C)	30 dk	30 dk
DNS	200 µl	200 µl
Enzim içeren filtrat	-	400 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.8. Büyüme eğrisi ve enzim üretimi

Fungal büyüme grafiği 100 ml amilaz üretim ortamı (Besiyeri 3) içeren 500 ml'lik erlenlerde takip edilmiştir. Besiyeri, mililitresinde yaklaşık olarak $\sim 2 \times 10^7$ spor içeren spor süspansiyonundan 2 ml ilave edilerek inoküle edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 28 °C sıcaklıkta, 150 rpm çalkalama hızında ve 12 gün süresince inkübe edilmiştir. Biyokütle, pH, enzim aktivitesi ve indirgen şeker 24 saat aralığı ile ölçülerek büyüme eğrisi verileri elde edilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel Deney Tasarımı ile amilaz üretiminin optimizasyonu

Enzim üreticisi olarak seçilen mikrofungus izolatının amilaz üretimi için optimum üretim koşullarını belirlemek amacıyla Plackett-Burman (PB) deney tasarımı kullanılmıştır (Plackett & Burman, 1946). Buna göre, fermentasyon ortamında bulunan bileşenlerin hepsinin metabolit üretimine etkisi yoktur. Bu nedenle etkisi bulunmayan faktörlerin elemine edilmesi gerekmektedir. PB deney tasarımında, metabolit üretimine etki eden ana faktörler hızlı ve yüksek bir tahmin ile belirlenebilmektedir. PB deney tasarımı her bir değişkenin iki seviyesinin (Yüksek ve düşük) bulunduğu deney tasarımıdır. Tasarım, "n" sayıda faktör "n+1" deney sayısı ile faktörler arasındaki etkileşimi gözardı ederek, üretime etki eden ana faktörleri belirlemektedir (Jacques vd., 1999).

Amilaz üretimi üzerine etkisi bulunan değişkenler (Karbon kaynağı, azot kaynağı, mineral maddeler, pH ve inokülasyon miktarı) ve seviyeleri (Yüksek;''+''' ve düşük;''-'') Çizelge 3.5'de sunulmuştur. PB deney tasarımı kapsamında verilen 12 adet deney setinin bulunduğu matristeki (Çizelge 3.6.) faktörlerin yüksek ve düşük değerlerine göre gerçekleştirilen deneyler, biyokütle, indirgen şeker ve enzim aktivitesi olarak üç farklı sonuca dayanarak yorumlanmıştır.

Çizelge 3.5. Plackett-Burman Deneş Tasarımı ile etkisi araştırılan besiyeri bileşenleri ve seviyeleri

Faktörler	Düşük Değer (-1)	Yüksek Değer (+1)
	(g/100ml)	(g/100ml)
Nişasta	1,00	2,00
KH₂PO₄	0,05	0,10
NaCl	5,00	10,00
NaNO₃	0,15	0,30
Pepton	0,50	1,00
Maya Ekstraktı	0,10	0,3
KCl	0	0,05
MgSO₄.7H₂O	0	0,05
FeSO₄.7H₂O	0	0,05
İnokulum Miktarı (2x10⁷ spor/ml)	1,00 ml	2,00 ml
pH	5,5	6,5

Çizelge 3.6. Plackett-Burman deney tasarım matrisi

Deney Sayısı	Nişasta	KH ₂ PO ₄	NaCl	NaNO ₃	Pepton	Yeast Ext	KCl	MgSO ₄ 7H ₂ O	FeSO ₄ 7H ₂ O	pH	İnok Mik.
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(Faktör sayısı; 11, Deney Sayısı; 12, Tekrar; 2, Toplam Deney Sayısı; 24, Blok Sayısı; 1)

3.2.10. Derin kültür fermentör uygulaması

PB deney tasarımı ile erlenlerde gerçekleştirilen deneyler sonucu elde edilen veriler ışığında optimum koşullarda reaktör ölçeğinde enzim üretilmiştir. Tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla fermentör tuz içeren (Optimum Koşullar) ve tuz içermeyen, iki farklı fermentasyon ortamı kullanarak α -amilaz enzimi üretilmiştir.

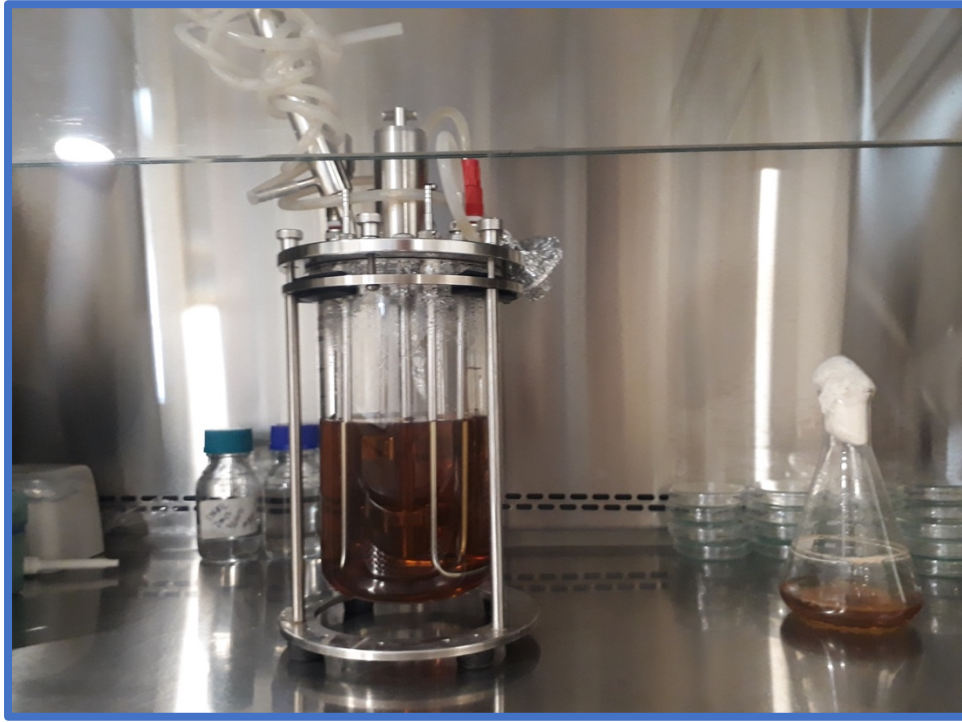
İnokulum hazırlığı: 500 ml hacmindeki 100 ml amilaz fermentasyon ortamı içeren erlenler mililitresinde $\sim 10^7$ spor içeren spor süspansiyonundan 2 ml ilave edilerek inoküle edilmiştir. 28 °C' de 150 rpm karıştırma hızında 4 gün süresince çalkalamalı inkübatörde (Thermoshake Incubating Orital Shaker, 115 VAC) inkübe edilmiştir. Oluşan miselyal pelletler derin kültür fermentasyonunda inokulum olarak kullanılmıştır.

Fungal α -amilaz enzimi üretimi, 3 litre hacmindeki laboratuvar ölçekli fermentörde (Bioflo 110, New Brunswick Scientific, USA) reaktör ölçeğinde gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.1)



Şekil 3.2. Laboratuvar ölçekli fermentör (Bioflo 110, New Brunswick Scientific, USA)

1,5 litre çalışma hacmindeki amilaz fermentasyon ortamını içeren fermentör, 110 °C' de 30 dakika 6 psi basınç altında otoklavda (Hirayama HG-50) sterilize edilmiştir. Soğutulduktan sonra 100 ml inokulum (%6.6) fermentöre aktarılmıştır. İnokülasyon laminar flow kabin (Labculture® Horizontal Flow Cabinets) içerisinde fermentörün üst kısmında bulunan port girişinden bir tanesi açılarak, steril huni yardımıyla aseptik şartlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sırasında oluşabilecek köpürme problemine karşı köpük kırıcı olarak 1 ml steril bitki yağı (%0,5 Ayçiçek) inokülasyondan sonra ilave edilmiştir. (Şekil 3.3.)



Şekil 3.3. Laminar flow kabin içerisinde inokülasyon

Fungal α -amilaz enzimi derin kültür fermentasyonu ile kesikli kültür operasyon tipi (Batch fermentasyon) seçilerek 7 gün fermentasyon süreci takip edilmiştir. Fermentörün karıştırılması, 2 adet rashton tipi karıştırıcı bıçağı 1,5 litre çalışma hacmine göre uygun uzaklıklarda konumlandırılarak, 300 rpm karıştırma hızında fermentasyon süresince sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Fermentör fermentasyon süresince dakikada litre başına 0,5 VVM steril hava verilerek oksijenlendirilmiştir. Çalışma sıcaklığı 28 °C sabit kalması sağlanmış ve fermentörün iç nem dengesi kondenser yardımıyla korunmuştur. pH fermentasyon başlangıcında pH 6,5 değerine ayarlanmış fermentasyon süresince kontrol edilmemiştir.

Fermentasyon süresince 1. Günden itibaren pH, çözülmüş oksijen (DO), enzim aktivitesi ve indirgen şeker analizleri 24 saatlik aralıklarla yapılmıştır. İndirgen şeker miktarı ve α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi için fermentörün örnek alma kısmından aseptik şartlar altında 10 ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler kontaminasyon kontrolü amacıyla 3. ve 5.

gün sonunda PDA besiyerine 20 µl pipetlenerek inkübasyona bırakılmıştır. Fermentasyon süresince mikrofungusa ait derin kültürdeki pellet morfolojileri gözlemlenmiştir.

Fermentörün üzerindeki uygun porta bağlanan probalar uygun prob deliğine denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Bu amaçla çözünmüş oksijen probu havalandırmanın verildiği püskürtücü aparatından uzak konumlandırılmıştır. Fermentasyon sırasında oluşan pelletler dalga kırıcı aparatının alt kısımlarına sıkışması nedeniyle dalga kırıcı aparatı kullanılmamıştır. Bu nedenle Fermentör içerisinde havalandırılmayan kısımlar gözardı edilmiştir.

Laboratuvar ölçekli fermentör ile 7 gün süresince gerçekleştirilen fermentasyon sonunda, fermentörün örnek alma aparatından vakum ile tüm hacim uygun bir şişeye çekilerek hasat tamamlanmıştır. Elde edilen süspansiyon Whatman filtre kağıdından huni yardımıyla süzülerek miselyal kütle sıvıdan ayrılmıştır. Miselyal kütle sonrasında kullanılmamıştır. Elde edilen filtrat ise + 4 °C de enzim karakterizasyonu ve tanımlanması için saklanmıştır.

3.2.11. Enzim kısmi karakterizasyonu

Derin kültür fermentasyonu ile fermentörde üretilen amilaz enziminin tipi, özellikleri ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştır. Amilazın tipi İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemi ile belirlenmiştir. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler sıcaklık, inkübasyon süresi, substrat konsantrasyonu, pH ve tuz konsantrasyonunun enzim üzerine etkisi gibi faktörler uygun deney koşullarında araştırılmıştır.

3.2.11.1. İnce tabaka kromatografisi

Nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi ve amilaz tipini belirlemek amacıyla ince tabaka kromatografisi (İTK) uygulanmıştır. 2 ml fermentasyon sıvısı (Filtrat) ile 2 ml %1 çözünebilir nişasta 55 °C' de 15, 30, 45, 60 dakika ve 24 saat

aralıklarında inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak, aynı deney şartları altında 2 ml ticari α - amilaz (Merck) 2 ml %1 çözünebilir nişasta ile inkübasyona bırakılmıştır. Standartlar glukoz (St 1), maltoz (St 2) %0,1 Nişasta (N) %1 olacak şekilde hazırlanmıştır. Standartlar ve farklı zaman aralıklarında alınan örnekler (A1, A2, A3, A4, A5 ve B1, B2, B3, B4 ve B5) mikropipet ile 10 μ l alınarak İTK plakalarına (Slika jel 60 F₂₅₄, Merck) uygulanmıştır (Çizelge 3.7.).

Mobil faz olarak n-butanol: etanol: su (5: 3: 2) kullanılmıştır. Yüklenen İTK plakaları mobil faz içeren tanka yerleştirilerek örnekler yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra plakalar kurutulmuştur. Çözücünün aldığı yol ölçülmüştür. İTK plakalarını boyama işlemi sülfirik asit: metanol (1:9) çözeltisi ile yapılmıştır. Boyanan plakalar 100 °C' de manyetik karıştırıcı üzerinde kısa bir süre tutulmuş böylelikle İTK plakalarında renk değişimi ile oluşan bantlar gözlemlenmiştir. Belirli zaman aralığında alınan örneklerin ve standartların Rf değerleri hesaplanmıştır ($R_f = \frac{\text{Örneğin aldığı yol}}{\text{Çözücünün aldığı yol}}$). Deney sonucunda nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu ortaya çıkan ürünler ve enzimin tipi, pozitif kontrol olarak kullanılan ticari amilaz ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. Ticari amilaz ve filtrat ile İTK yöntemi; Standartlar ve inkübasyon süreleri

Standartları			Enzim içeren filtratlar				
(St 1)	(St 2)	(N)	(A1)	(A2)	(A3)	(A4)	(A5)
Glukoz (%0.1)	Maltoz (%0.1)	Nişasta (%1)	15'	30'	45'	60'	24 saat
			Ticari α - amilaz				
(St 1)	(St 2)	(N)	(B1)	(B2)	(B3)	(B4)	(B5)
Glukoz (%0.1)	Maltoz (%0.1)	Nişasta (%1)	15'	30'	45'	60'	24 saat
St: standart							

3.2.11.2. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 10 mM pH 6.0 sitrat-fosfat tamponunda hazırlanan %1'lik çözünebilir patates nişastası ile enzim içeren filtrat farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 °C) 30 dakika süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi, Çizelge 3.8.'de verilen deney ortamındaki basamaklar sırasıyla takip edilerek belirlenmiştir.

Çizelge 3.8. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesinde kullanılan deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
%1'lik Çözünür patates nişastası	400 µl	400 µl
Enzim içeren filtrat	400 µl	-
25,30,35,40,45,50,55,60,70,80,90 °C' de İnkübasyon	30 dk	-
DNS	200 µl	200 µl
Enzim	-	400 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.11.3. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Elde edilen amilazın aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek amacıyla enzim, substrat olarak 10 mM pH 6.0 sitrat-fosfat tamponunda hazırlanan %1'lik çözünebilir patates nişastası ile farklı zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 dakika) enzim içeren filtrat ile 55 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi, Çizelge 3.9.'da verilen deney ortamındaki basamaklar sırasıyla takip edilerek belirlenmiştir.

Çizelge 3.9. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesinde kullanılan deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
%1'lik Çözünür patates nişastası	400 µl	400 µl
Enzim içeren filtrat	400 µl	-
55 °C' İnkübasyon (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 dakika)		
DNS	200 µl	200 µl
Enzim içeren filtrat	-	400 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.11.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Elde edilen amilazın aktivitesi üzerine nişasta konsantrasyonunun etkisinin belirlenebilmesi amacıyla 10 mM pH 6.0 sitrat-fosfat tamponunda hazırlanan çözünebilir nişasta substrat olarak kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan patates nişastası (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 ve 2,0 mg/ml), enzim içeren filtrat ile 55 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi, Çizelge 3.10.'da verilen deney ortamındaki basamaklar sırasıyla takip edilerek belirlenmiştir.

Çizelge 3.10. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesinde kullanılan deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 ve 2,0 mg/ml Çözünür Patates Nişastası	400 µl	400 µl
Enzim	400 µl	-
55 °C' İnkübasyon		
DNS	200 µl	200 µl
Enzim	-	400 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2 dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.11.5. Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

Elde edilen amilazın üzerine pH'ın etkisini belirlemek amacıyla enzim içeren filtratın pH değeri, pH 3,0 – pH 8,0 aralığında tampon çözeltileri ile ayarlanmıştır. pH 3,0 – 6,5 değeri için sitrat-fosfat tamponu (Çözelti 2), pH 7,0-7,5 aralığı için Potasyum Fosfat tamponu (Çözelti 3) ve pH 8,0 – 8,5 aralığı için Tris-HCl tamponu (Çözelti 4) kullanılmıştır. Uygun pH aralığında hazırlanan filtratlar substrat olarak %5 çözünür patatesi nişastası ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi, Çizelge 3.11.'de verilen deney ortamındaki basamaklar sırasıyla takip edilerek belirlenmiştir.

Çizelge 3.11. Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesinde kullanılan deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
Çözünür Patates Nişastası (%5)	400 µl	400 µl
Tampon	400 µl	400 µl
Enzim içeren filtrat	400 µl	-
İnkübasyon (55 °C)	30 dk	30 dk
DNS	200 µl	200 µl
Enzim	-	400 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.11.6. Enzimin tuza toleransının belirlenmesi

Elde edilen amilazın tuza toleransını belirlenebilmesi amacıyla, enzim içeren filtrat final konsantrasyonu 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ve 2,5 Molar tuz olacak şekilde +4 °C sıcaklıkta, 24 saat tuz ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi, Çizelge 3.12.'de verilen deney ortamındaki basamaklar sırasıyla takip edilerek belirlenmiştir. Başlangıç konsantrasyon aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3.12. Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisinin belirlenmesinde kullanılan deney ortamı

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
%1 Çözünür Patates Nişastası	400 µl	400 µl
Enzim içeren filtrat (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ve 2,5 M NaCl ile 24 saat inkübasyon)	400 µl	-
55 °C' İnkübasyon	30 dk	30 dk
DNS	200 µl	200 µl
Enzim İçeren Filtrat (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ve 2,5 M NaCl ile 24 saat inkübasyon)	-	400 µl
Soğuk su banyosu	2 dk	2dk
Kaynar su banyosu	5 dk	5 dk
Soğuk su banyosu	3 dk	3 dk
Distile su	1000 µl	1000µl
Absorbans	530 nm	530 nm

3.2.12. Verilerin değerlendirilmesi

Plackett-Burman Deney Tasarımı verilerinin istatistiksel analizinde Minitab 19 paket programı kullanılmıştır. Optimizasyon deneyleri iki tekrarlı, enzim karakterizasyonu üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde t-tesisi (Microsoft Excel) uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Amilolitik Aktivitenin Belirlenmesi ve Tuz Testi

Aspergillus, *Penicillium* cinslerine ait türlerden oluşan toplam 40 fungal izolattan (Bkz. Çizelge 3.1) sadece beş *Aspergillus* izolatında amilaz enzim aktivitesi gözlenmiştir. Bu beş izolatın farklı tuz konsantrasyonlarındaki büyüme oranları Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Nişasta agar besiyeri plakalarının bistüri yardımı ile birbirine paralel iki çizgi çekilerek uygulanan birinci yöntem, amilolitik aktivite varlığını ifade eden şeffaf zonun net bir şekilde ölçülememesi nedeni ile kullanışlı bir yöntem olarak tercih edilmemiştir. Fungus sporlarının tek nokta olarak nişasta agar besiyeri içeren plakalara inokülasyonu ile gerçekleştirilen ikinci yöntemde amilolitik aktiviteyi gösteren şeffaf zon net bir şekilde ölçülebilmektedir. Ve amilolitik aktivite gösteren türlerin seçiminde bu yöntem dikkate alınarak 3 fungus türü seçilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, ve Şekil 4.3). *A. clavatus*, *A. sydowii* ve *A. tamarii* mikrofunguslarının farklı tuz konsantrasyonlarındaki büyümeleri ve amilaz aktiviteleri onların tuzlu ortamlarda iyi bir amilaz üreticisi olduklarını göstermiştir

Üretici filamentli fungusun pellet morfolojisi ve reolojisi (akış özellikleri) fermentasyon süreci performansını etkileyen en önemli faktörler arasındadır (Posch vd., 2013). Bu nedenle seçilen üç fungus türünün fermentasyon sürecinde davranış özelliklerini ve enzim üretimine uygunluğu belirlemek amacıyla erlenlerde derin kültür fermentasyonuna bir ön çalışma yapılmıştır.

Literatürde pellet morfolojisi ile proses kontrolü ve verimliliği arasında yüksek derecede ilişki olduğu vurgulanmaktadır. Sıkı ve küçük fungal pellet morfolojisi fungal proses için olumlu parametrelerdir (Veiter vd., 2018). Erlenlerde yapılan derin kültür fermentasyonunda *A. clavatus* çok büyük, seyrek ve küresel *A. sydowii* ve *A. tamarii* ise küçük, sıkı ve küresel pellet morfolojisi göstermiştir. *A. clavatus* pellet morfolojisi açısından derin kültür fermentör uygulamalarında elverişli olamayacağı düşünülerek elenmiştir.

Ancak, morfolojiyi etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Karbon substratının türü ve konsantrasyonu, azot ve fosfat seviyeleri, eser mineraller, çözülmüş oksijen ve karbon dioksit, pH ve sıcaklık gibi etkenler pellet morfolojisini etkilemektedir (Papagianni, 2004).

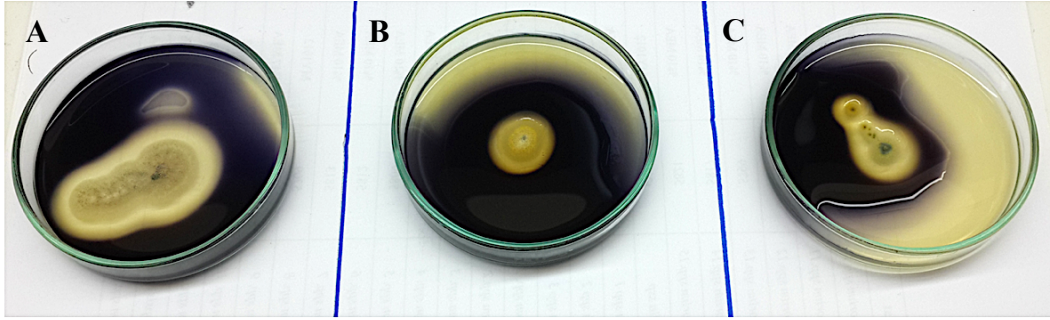
Endüstriyel öneme sahip bir üretici mikroorganizma, genetik stabiliteye sahip olması, hedef ürünün etkin üretmesi, vitamin ve ilave gelişim faktörlerine ihtiyaç duymaması, düşük maliyetteki karbon kaynaklarını etkin bir şekilde kullanabilmesi, güvenlik, patojen olmama ve toksik ajanları üretmemesi gerekmektedir (Waites vd., 2001). Diğer bir amilaz üreticisi olan *A. sydowii* mikrofungusunun ise literatür bilgisine dayanarak mikotoksinejik metabolitler üretmesi (Varga vd., 2015), (Nadumane vd., 2016) nedeniyle uygun bir üretici organizma olmadığı düşünülmüştür.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda *A. tamarii* mikrofungusu laboratuvar ölçekli fermentör uygulaması için uygun özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu fungus yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere ederek büyümesi ve aynı anda amilolitik aktivite göstermesi (Çizelge 4.1), derin kültürde pellet morfolojisinin küçük ve sıkı olması gibi özellikleriyle öne çıkmıştır. Ayrıca araştırma ekibimiz tarafından daha önce yapılan çalışmada *A.tamarii* izolatının, %8 tuz içeren modifiye malt ekstrakt agar besiyerinde, 27 °C sıcaklıkta çapı 24 mm kadar büyük bir koloni oluşturduğu bildirilmektedir (Kayış vd., 2018). Bu bilgi *A. tamarii* izolatının amilaz üreticisi mikrofungus olarak seçilmesinde etkili olmuştur.

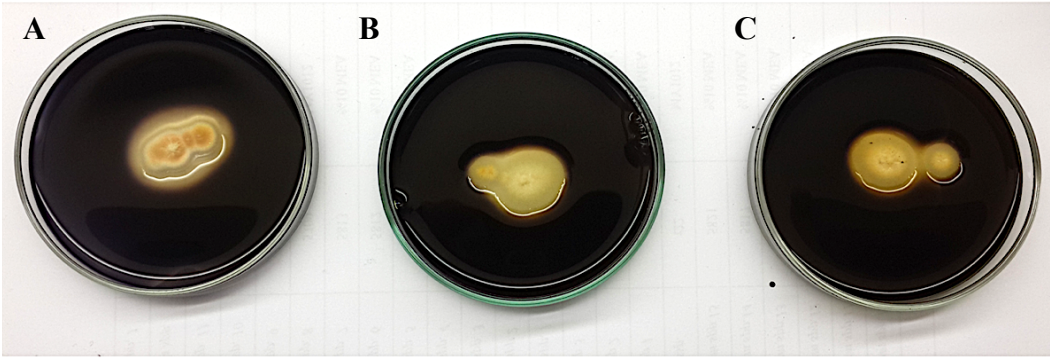
Çizelge 4.1. Mikrofungusların 4 günlük, 28 °C’de, farklı tuz konsantrasyonlarındaki nişasta agar besiyerindeki koloni çapları ve amilaz aktiviteleri (+; az aktivite ++; orta aktivite, +++; iyi aktivite, ++++; çok iyi aktivite)

Tuz Konsantrasyonu	% 0 NaCl		% 5 NaCl		% 7 NaCl		%12 NaCl		%15 NaCl	
Test Tipi İzolot Adı	Koloni Çapı (mm)	Amilaz aktivitesi	Koloni Çapı (mm)	Amilaz Aktivitesi	Koloni Çapı (mm)	Amilaz Aktivitesi	Koloni Çapı (mm)	Amilaz Aktivitesi	Koloni Çapı (mm)	Amilaz Aktivitesi
<i>Aspergillus sydowii</i>	7	++	12	+	10	+	4 / 8*	+	Mk / 5 *	+
<i>Aspergillus terreus</i>	13	++	11	+	8	-	Mk	-	Koloni Yok	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	7	+++	15	+	12	+	5	+	Mk / 15*	+
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	++++	7	++++	5	++++	Mk	+	Koloni Yok	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	5	+	8	+	7	+	Mk	+	Mk	-

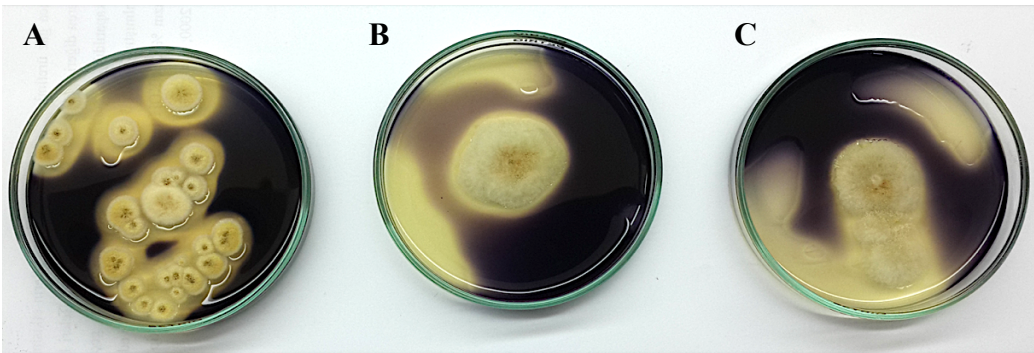
(*7.gündeki koloni büyüklükleri, Mk; Mikrokoloni)



Şekil 4.1. *Aspergillus clavatus* 4 günlük, 28 °C' de, farklı tuz konsantrasyonu ile hazırlanan nişasta agar besiyerindeki koloni görüntüsü ve amilaz aktivitesi (A), %0 NaCl, (B), %5 NaCl, (C), %7 NaCl



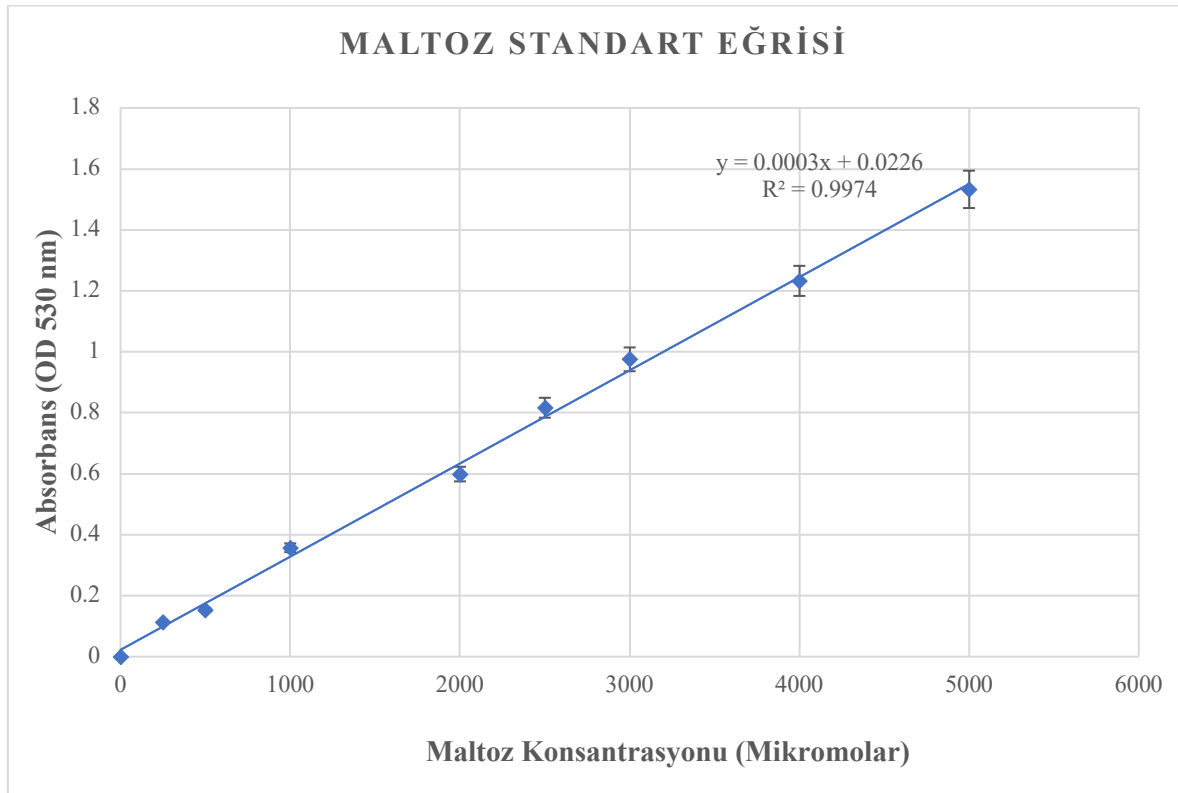
Şekil 4.2. *Aspergillus sydowii* 4 günlük, 28 °C' de, farklı tuz konsantrasyonu ile hazırlanan nişasta agar besiyerindeki koloni görüntüsü ve amilaz aktivitesi (A), %0 NaCl, (B), %5 NaCl, (C), %7 NaCl



Şekil 4.3. *Aspergillus tamarii* 4 günlük, 28 °C' de, farklı tuz konsantrasyonu ile hazırlanan nişasta agar besiyerindeki koloni görüntüsü ve amilaz aktivitesi (A), %0 NaCl, (B), %5 NaCl, (C), %7 NaCl

4.2. Maltoz Standart Eğrisi

Farklı konsantrasyonlardaki maltoz standart çözeltilerinin spektrofotometredeki absorbans değerlerine karşı konsantrasyon değerleri ölçülmüştür. Örnekteki bilinmeyen maltoz konsantrasyonu denklemden hesaplanmıştır. Buna göre oluşturulan standart grafik denklemi $y = 0.0003x + 0.0226$, regresyon katsayısı ise $R^2 = 0.9974$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Maltoz Standart Eğrisi

4.3. Büyüme Eğrisi ve Enzim Aktivitesi

Erlenlerde 12 gün süresince çalkalamalı olarak inkübe edilen fungal kültür sıvısındaki biyokütle miktarı, indirgen şeker ve enzim aktivitesinin değişimi Çizelge 4.2' de verilmiştir. Bu değişime bağlı grafikler Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *A. tamarii* 12 gün süresince indirgen şeker, enzim aktivitesi, pH ve biyokütle değerleri

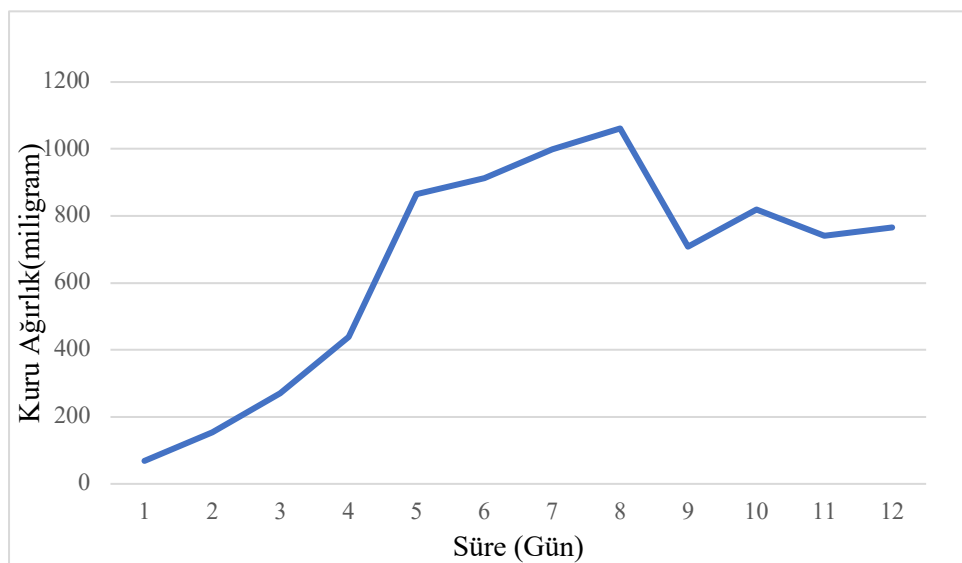
İnkübasyon Süresi (gün)	İndirgen Şeker ($\mu\text{mol/ml}$)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	pH	Biyokütle (mg/100 ml)
1	395,6	Ölçülemedi	7,70	68,63
2	1142,3	Ölçülemedi	7,17	153,35
3	1282,3	2.4	7,08	270,39
4	1135,6	12.1	7,56	438,80
5	1609,0	98.75	7,99	865,29
6	635,6	117.6	7,54	912,44
7	535,6	317.5	7,50	998,87
8	569,0	258.3	7,46	1061,38
9	595,6	209.9	7,44	709,06
10	549,0	169.8	7,48	819,42
11	402,3	180.6	7,30	741,04
12	469,0	143.3	7,20	765,491

12 gün süresince indirgen şeker (maltoz), enzim aktivitesi (U/ml) ve pH değerlerine göre takibi yapılan kesikli üretim sürecinde, biyokütle miktarı mikrofungusun fermentasyonun birinci gününde lag fazında olduğunu göstermektedir (Şekil 4.5). Birinci günde biyokütle miktarı (kuru ağırlık) en düşük seviyededir (0,06863 g). Birinci günden itibaren fungusa ait biyokütle miktarı sekizinci güne kadar logaritmik fazdadır. Sekizinci günden sonra ise durgunluk fazına girerek biyokütle artışı durmuştur.

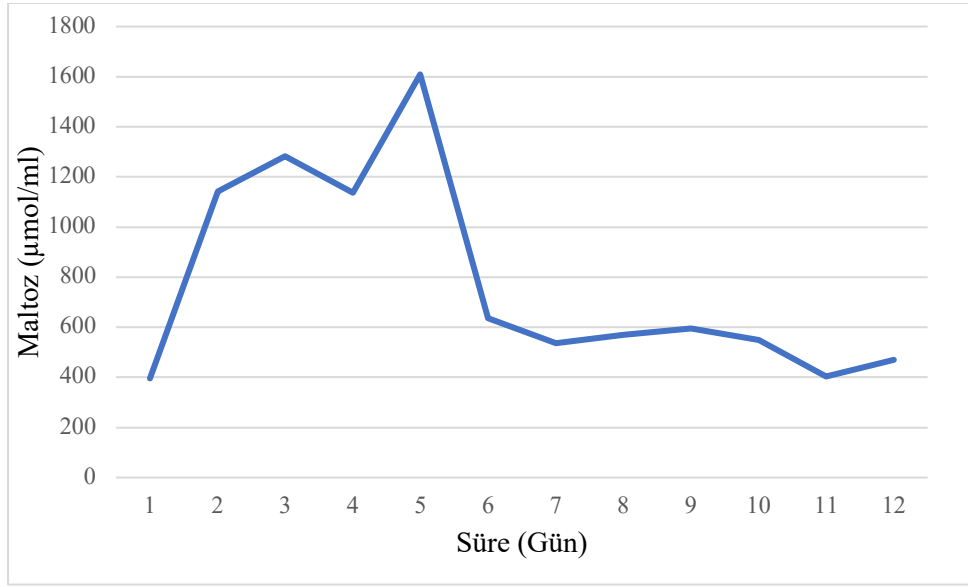
Biyokütle artışına paralel olarak birinci gündeki fermentasyon ortamındaki maltoz miktarı en düşük seviyededir (395.6 $\mu\text{mol/ml}$). Maltoz miktarı birinci günden itibaren artarak beşinci günün sonunda altıncı günde maksimum seviye gelmiştir (1609 $\mu\text{mol/ml}$). Maltoz miktarının en az olduğu altıncı günde biyokütle miktarının logaritmik artışı durmuş, durağan faza girmiştir. Maltoz miktarı beşinci günden sonra logaritmik fazın ve durgun fazın sonuna kadar azalarak onikinci güne kadar bu durum devam etmiştir.

Fermentasyon ortamının pH değişimi ise fermentasyon süresinde nötral pH değerlerindedir. Kültür ortamının pH değeri logaritmik fazın sonuna kadar (8.gün) az bir miktarda artmış, durgunluk fazında ise azalma gözlemlenmiştir.

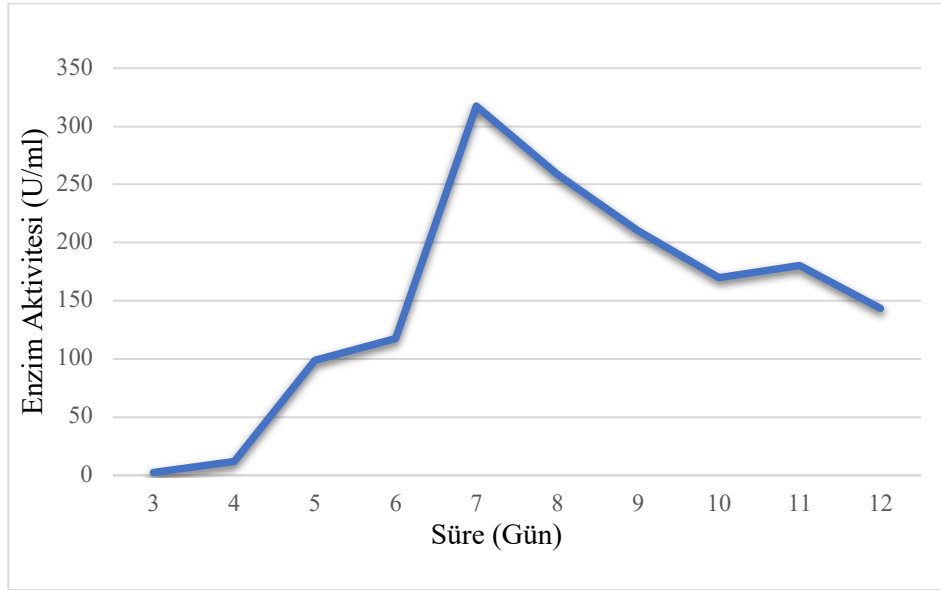
Literatürde daha önce yapılan araştırmalara göre amilaz üretiminin durağan fazda maksimum seviyede olduğu bildirilmektedir (Abou-Zeid, 1997), (Goto vd., 1998), (Mohapatra vd., 1998), (Bignell vd., 2000), (Marlida vd., 2000), (Okolo vd., 2001). Halofilik mikroorganizmalarda da amilaz üretimi genellikle büyümeye bağlı olup logaritmik (eksponansiyel) fazda başlar ve durağan fazda maksimuma ulaşmaktadır (Kumar & Khare, 2015). Çalışmamızda ise enzim aktivitesi durağan fazda (yedinci günde) en yüksek değer olan 317,5 U/ml'ye ulaşmıştır. Ayrıca yedinci günde fermentasyon ortamındaki maltoz miktarı düşük seviyededir (535,6 $\mu\text{mol/ml}$).



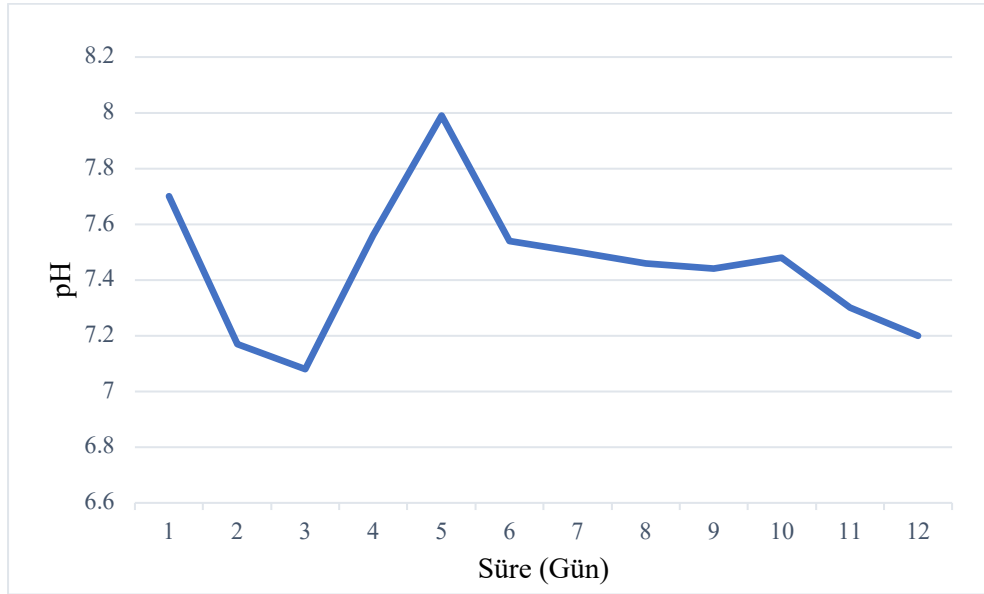
Şekil 4.5. *A. tamarii*, 28 °C'de, 12 günlük inkübasyon süresince biyokütle miktarının zamana bağlı değişim grafiği



Şekil 4.6. *A. tamarii*, 28 °C'de 12 günlük inkübasyon süresince maltoz miktarının zamana bağlı değişim grafiği



Şekil 4.7. *A. tamarii*, 28 °C'de 12 günlük inkübasyon süresince amilaz aktivitesinin zamana bağlı değişim grafiği



Şekil 4.8. *A. tamarii*, 28 °C’de 12 günlük inkübasyon süresince pH değerinin zamana bağlı değişim grafiği (Besiyeri pH değeri 6,5)

4.4. İstatistiksel Deney Tasarımı ile Amilaz Üretimi Optimizasyonu

Amilaz üreticisi mikrofungus tarafından üretilen amilazın PB deney tasarımı ile elde edilen optimizasyon çalışmasına ait sonuçlar, indirgen şeker miktarı, enzim aktivitesi ve biyokütle miktarı olarak Çizelge 4.3.’ de verilmiştir.

Plackett-Burman deney tasarımı ile iki farklı yanıtı göre optimizasyon değerlendirilmiştir

İlk olarak enzim aktivitesi yanıtına göre elde edilen sonuçlar, katsayı değerleri; (p ve t değerleri) çizelge 4.5, model özeti (R^2 değeri); Çizelge 4.6., varyans analizi; Çizelge 4.7, regresyon denklemi; Çizelge 4.8’ de verilmiştir. Bu sonuçlar plot grafiği; Şekil 4.9, pareto grafiği; Şekil 4.10, normal olasılık testi plot grafiği; şekil 4.11 ile desteklenmiştir.

İndirgen şeker yanıtına göre elde edilen analiz sonuçlarına göre etkisi incelenen tüm faktörler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. İndirgen şeker miktarına göre optimizasyon analizinin anlamlı olmadığı ve fermentör uygulamalarına geçebilecek sağlıklı bir veri içermediği için indirgen şeker verileri dikkate alınmamıştır.

Çizelge 4.3. Plackett-Burman Deney tasarımı ile biyokütle, amilaz aktivitesi ve indirgen şeker optimizasyon sonuçları

Deney Seti	Amilaz Aktivitesi (U/ml) Ort ± S	Biyokütle (g/100 ml) Ort ± S	İndirgen Şeker (µmol/ml) Ort ± S
Deney 1	95,8 ± 10,60	0,3370 ± 0,040	902,33 ± 9,42
Deney 2	73,3 ± 70,71	0,2436 ± 0,061	2179 ± 23,57
Deney 3	90,8 ± 0,60	0,1866 ± 0,015	679 ± 61,28
Deney 4	36,65 ± 4,73	0,1184 ± 0,018	329 ± 56,56
Deney 5	21,65 ± 11,80	0,2265 ± 0,010	522,33 ± 28,28
Deney 6	30,8 ± 3,53	0,4319 ± 0,072	779 ± 306,41
Deney 7	5,355 ± 4,16	0,1921 ± 0,003	4229 ± 235,70
Deney 8	21,65 ± 2,33	0,1719 ± 0,012	17,33 ± 2,35
Deney 9	4,16 ± 1,96	0,3891 ± 0,003	779 ± 42,42
Deney 10	12,45 ± 5,86	0,3584 ± 0,045	1052,33 ± 32,99
Deney 11	20,8 ± 5,93	0,1489 ± 0,012	179 ± 42,42
Deney 12	2,73 ± 1,51	0,1551 ± 0,047	159 ± 51,85

PB deney tasarımı ile elde edilen veri analizlerine göre enzim aktivitesini etkileyen faktörler, nişasta, KCl, FeSO₄.7H₂O, pepton ve NaNO₃ olarak bulunmuştur. Anlamlı bir etki gösteren faktörler pareto grafiği (Şekil 4.10) ile gösterilmiştir. Bu faktörlerden nişasta, KCl ve FeSO₄.7H₂O pozitif etki gösterirken, NaNO₃ ve pepton negatif etki göstermiştir. Faktörlerin pozitif ve negatif etki değerleri faktöriyel regresyon analizi grafiğinde verilmiştir (Çizelge 4.5). Ayrıca enzim aktivitesini etkileyen faktörlerden negatif etki gösteren faktörler plot grafiğinde eğrinin sol tarafında, pozitif etki gösteren faktörler plot grafiğinin sağ tarafında gösterilmiştir (Şekil 4.9) Bu faktörlerin *p* değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır (*p* < .05) (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.7). Oluşturulan modelin R² değerinin (%84,44) 1'e yakın

olması deneysel ve beklenen sonuçların arasında iyi bir kolerasyonun varlığını işaret etmektedir. Tasarım verileri normal olasılık testi plot grafiğinde eksenin merkezinde normal bir dağılım ile ‘‘s’’ şeklinde uzun kuyruklu bir desen göstermiştir (Şekil 4.11). Bu dağılımın veriler için iyi bir model oluşturduğu söylenebilir.

Çizelge 4.5. *A. tamarii* enzim aktivitesi optimizasyonu, katsayı değerleri

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		416,5	50,4	8,26	0,001	
Blocks						
1		-70,7	50,4	-1,40	0,188	1,00
Nişasta	221,5	110,7	50,4	2,20	0,050	1,00
KH ₂ PO ₄	-158,5	-79,3	50,4	-1,57	0,144	1,00
NaCl	120,4	60,2	50,4	1,19	0,258	1,00
NaNO₃	-280,4	-140,2	50,4	-2,78	0,018	1,00
Pepton	-283,7	-141,8	50,4	-2,81	0,017	1,00
Yeast Ext	201,9	100,9	50,4	2,00	0,071	1,00
KCl	381,5	190,7	50,4	3,78	0,003	1,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	-91,5	-45,7	50,4	-0,91	0,384	1,00
FeSO₄7H₂O	365,2	182,6	50,4	3,62	0,004	1,00
ph	-46,3	-23,2	50,4	-0,46	0,655	1,00
İnok Miktarı	-97,0	-48,5	50,4	-0,96	0,357	1,00

Faktöriyel Regresyon: Enzim aktivitesi, Bloklar; Nişasta; KH₂PO₄; NaCl; NaNO₃; Pepton; Yeast Ext; KCl; MgSO₄7H₂O; FeSO₄7H₂O; ph; İnok Miktarı

Çizelge 4.6. Enzim aktivitesi optimizasyonu model özeti, R² değeri

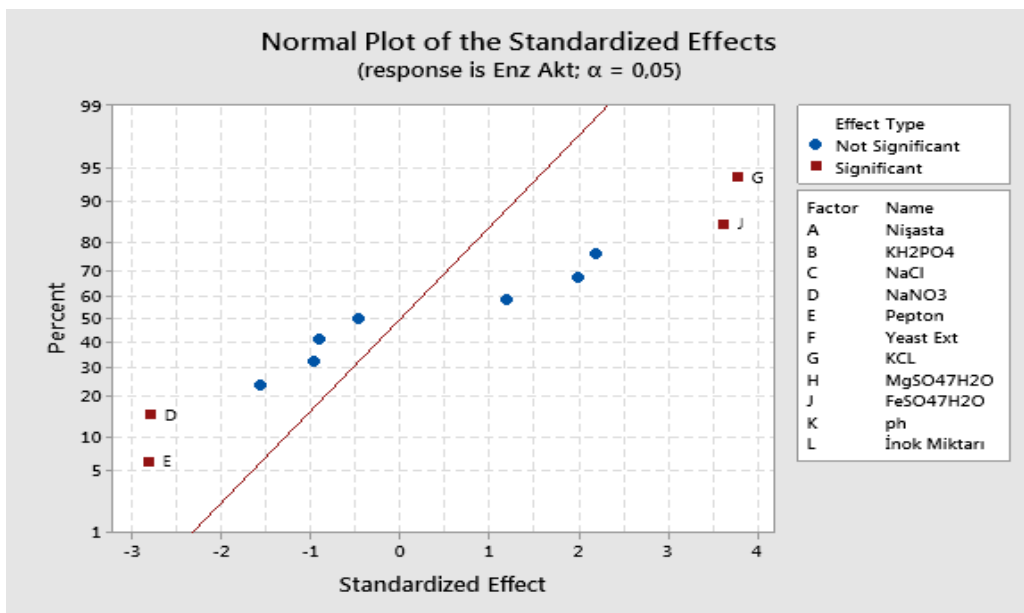
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
247,082	84,44%	67,46%	25,92%

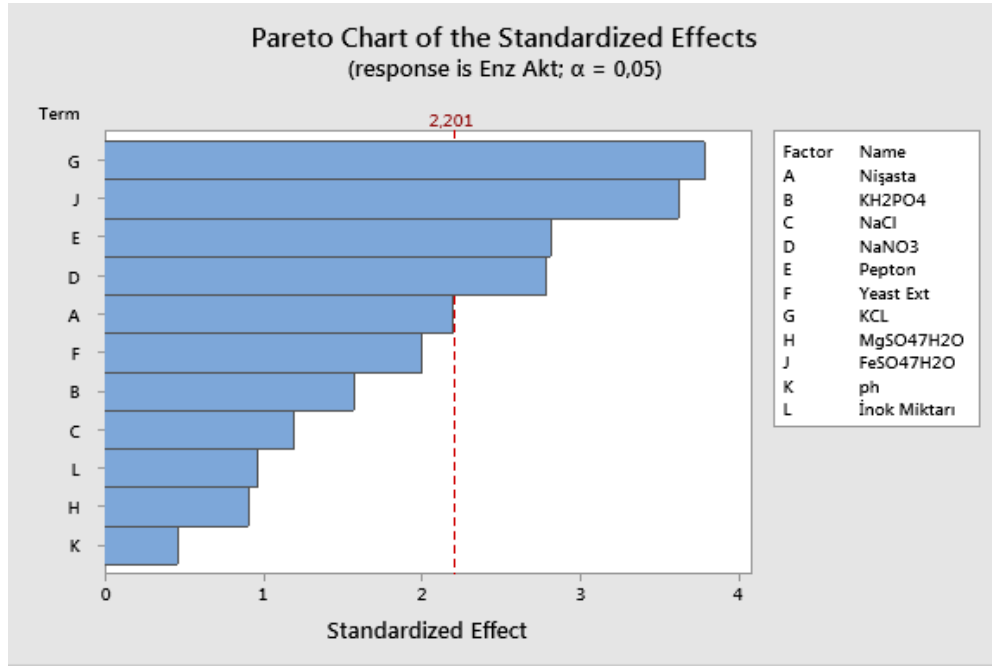
Çizelge 4.7. Enzim Aktivitesi optimizasyonuna ait varyans analizi

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	12	3643973	303664	4,97	0,006
Blocks	1	120086	120086	1,97	0,188
Linear	11	3523886	320353	5,25	0,005
Nişasta	1	294300	294300	4,82	0,050
KH ₂ PO ₄	1	150786	150786	2,47	0,144
NaCl	1	86921	86921	1,42	0,258
NaNO ₃	1	471614	471614	7,73	0,018
Pepton	1	482895	482895	7,91	0,017
Yeast Ext	1	244487	244487	4,00	0,071
KCl	1	873126	873126	14,30	0,003
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	50203	50203	0,82	0,384
FeSO ₄ 7H ₂ O	1	800202	800202	13,11	0,004
ph	1	12865	12865	0,21	0,655
İnok Miktarı	1	56486	56486	0,93	0,357
Error	11	671545	61050		
Total	23	4315518			

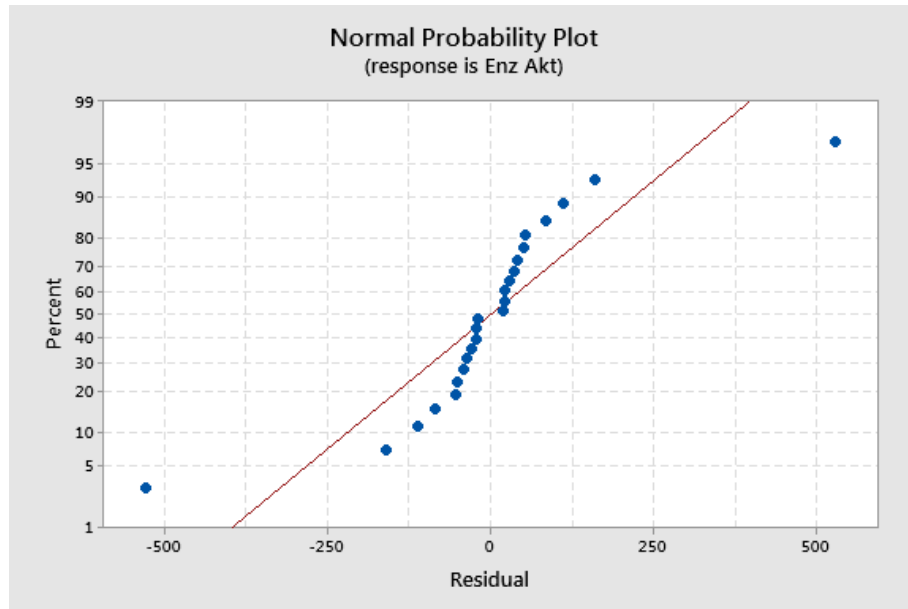
Çizelge 4.8. Enzim aktivitesi optimizasyonu regresyon denklemi

$$\begin{aligned} \text{Enzim Aktivitesi} &= 882 + 221 \text{ Nişasta} - 3171 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 24,1 \text{ NaCl} - 1869 \text{ NaNO}_3 - 567 \text{ Pepton} \\ &+ 1009 \text{ Yeast Ext} + 7629 \text{ KCl} - 1829 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 7304 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 46 \text{ pH} \\ &- 97 \text{ İnok Miktarı} \end{aligned}$$

Şekil 4.9. Enzim aktivitesi optimizasyonu plot grafiği (Faktörler; A: Nişasta, B: KH₂PO₄, C: NaCl, D: NaNO₃, E: Pepton, F: Yeast Extract, G: KCl, H: MgSO₄·7H₂O, J: FeSO₄·7H₂O, K: pH, L: İnokulum Miktarı)



Şekil 4.10. Enzim aktivitesi optimizasyonu pareto grafiği (Faktörler; A: Nişasta, B: KH₂PO₄, C: NaCl, D: NaNO₃, E: Pepton, F: Yeast Extract, G: KCl, H: MgSO₄·7H₂O, J: FeSO₄·7H₂O, K: pH, L: İnokulum Miktarı)



Şekil 4.11. Enzim aktivitesi optimizasyonu normal olasılık testi plot grafiği

Biyokütle miktarı yanıtına göre elde edilen sonuçlar, katsayı değerleri; (p ve t değerleri) çizelge 4.9, model özeti (R^2 değeri); Çizelge 4.10, varyans analizi; Çizelge 4.11, regresyon denklemi; Çizelge 4.12 'de verilmiştir. Bu sonuçlar plot grafiği; Şekil 4.12, pareto grafiği; Şekil 4.13, normal olasılık testi plot grafiği; şekil 4.14 ile desteklenmiştir.

PB deney tasarımı ile elde edilen veri analizlerine göre biyokütle miktarını etkileyen faktörler, NaCl, pH, KH_2PO_4 inokulum miktarı olarak bulunmuştur. Anlamlı bir etki gösteren faktörler pareto grafiği (Şekil 4.13) ile gösterilmiştir. Bu faktörlerden NaCl, pH ve inokulum miktarı pozitif etki gösterirken, KH_2PO_4 negatif etki göstermiştir. Faktörlerin pozitif ve negatif etki değerleri faktöriyel regresyon analizi grafiğinde verilmiştir (Çizelge 4.9). Ayrıca biyokütle miktarını etkileyen faktörlerden negatif etki gösteren faktörler plot grafiğinde eğrinin sol tarafında, pozitif etki gösteren faktörler plot grafiğinin sağ tarafında gösterilmiştir (Şekil 4.12). Bu faktörlerin p değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < .001$) (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.11) Oluşturulan modelin R^2 değerinin (%97,11) 1'e yakın olması deneysel ve beklenen sonuçların arasında iyi bir kolerasyonun varlığını işaret etmektedir. Tasarım verileri, normal olasılık testi plot grafiğindeki sabit çizgiden küçük sapmalar olsa da genel olarak güçlü bir doğrusal desen göstermiştir (Şekil 4.14). Bu dağılımın veriler için iyi bir model oluşturduğu söylenebilir.

Normal olasılık grafiği, bir veri setinin yaklaşık olarak normal dağılıp dağılmadığını değerlendirmek için kullanılan grafiksel bir tekniktir (Chambers, 2018). Bu teknik doğa bilimlerinin birçok dalında kullanılmaktadır. Biyokütle optimizasyonu plot grafiğindeki normal dağılımın veriler için iyi bir model oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu modelin enzim aktivitesi ile elde edilen sonuçlardan daha etkili bir model olması nedeniyle fermentör çalışmalarında biyokütleyi etkileyen anlamlı faktörler dikkate alınarak çalışılmıştır.

Çizelge 4.9. Biyokütle optimizasyonu katsayı değerleri

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		0,25611	0,00497	51,49	0,001	
Blocks						
1		-0,01995	0,00497	-4,01	0,002	1,00
Nişasta	-0,00907	-0,00453	0,00497	-0,91	0,382	1,00
KH ₂ PO ₄	-0,04967	-0,02483	0,00497	-4,99	0,000	1,00
NaCl	0,15012	0,07506	0,00497	15,09	0,001	1,00
NaNO ₃	0,01567	0,00784	0,00497	1,58	0,143	1,00
Pepton	-0,00937	-0,00468	0,00497	-0,94	0,367	1,00
Yeast Ext	-0,00800	-0,00400	0,00497	-0,80	0,438	1,00
KCl	0,00216	0,00108	0,00497	0,22	0,832	1,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,00405	0,00202	0,00497	0,41	0,692	1,00
FeSO ₄ 7H ₂ O	-0,01556	-0,00778	0,00497	-1,56	0,146	1,00
pH	0,07758	0,03879	0,00497	7,80	0,001	1,00
İnok Miktarı	0,05647	0,02823	0,00497	5,68	0,001	1,00

Faktöriyel regresyon: Biyokütle, Bloklar; Nişasta; KH₂PO₄; NaCl; NaNO₃; Pepton; Yeast Ext; KCl; MgSO₄7H₂O; FeSO₄7H₂O; ph; İnok Miktarı

Çizelge 4.10. Biyokütle model özeti, R² değeri

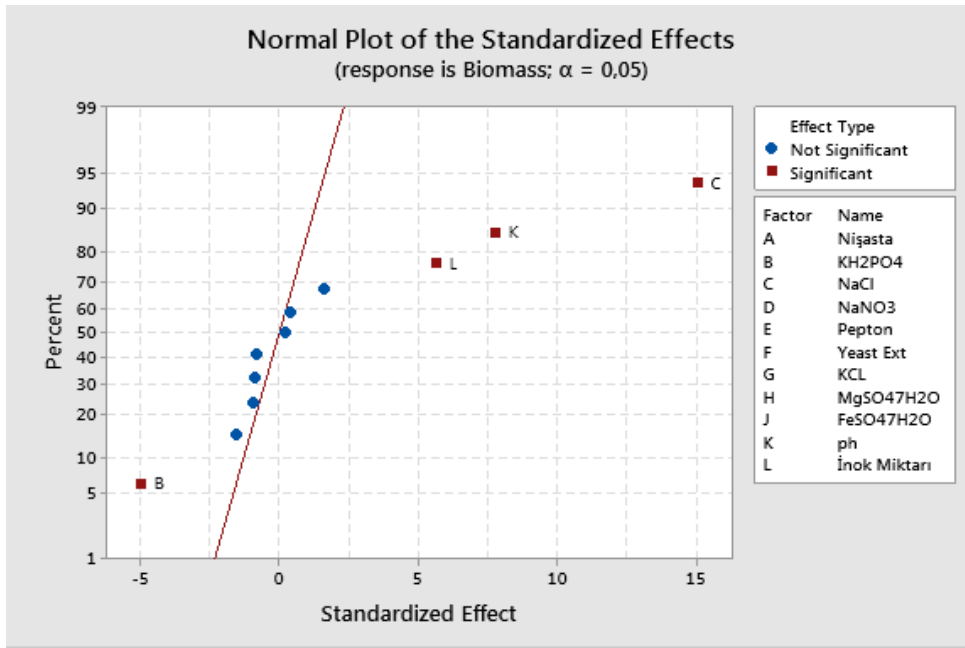
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0243696	97,11%	93,95%	86,23%

Çizelge 4.11. Biyokütle optimizasyonu varyans analizi

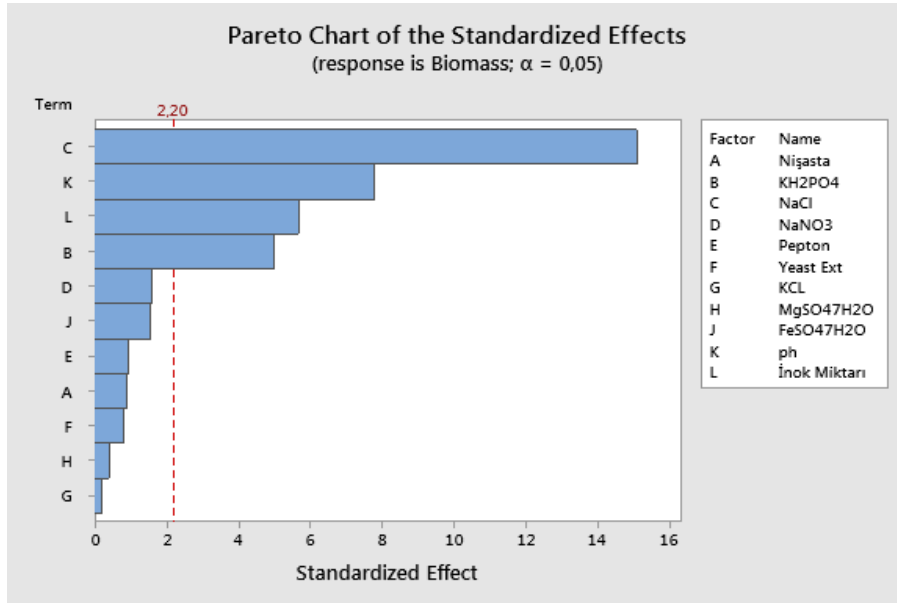
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	12	0,219257	0,018271	30,77	0,001
Blocks	1	0,009549	0,009549	16,08	0,002
Linear	11	0,209709	0,019064	32,10	0,001
Nişasta	1	0,000493	0,000493	0,83	0,382
KH ₂ PO ₄	1	0,014801	0,014801	24,92	0,001
NaCl	1	0,135207	0,135207	227,67	0,001
NaNO ₃	1	0,001474	0,001474	2,48	0,143
Pepton	1	0,000526	0,000526	0,89	0,367
Yeast Ext	1	0,000384	0,000384	0,65	0,438
KCL	1	0,000028	0,000028	0,05	0,832
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	0,000098	0,000098	0,17	0,692
FeSO ₄ .7H ₂ O	1	0,001453	0,001453	2,45	0,146
pH	1	0,036112	0,036112	60,81	0,001
İnok Miktarı	1	0,019132	0,019132	32,22	0,001
Error	11	0,006533	0,000594		
Total	23	0,225790			

Çizelge 4.12. Biyokütle optimizasyonu regresyon eşitliği denklemi

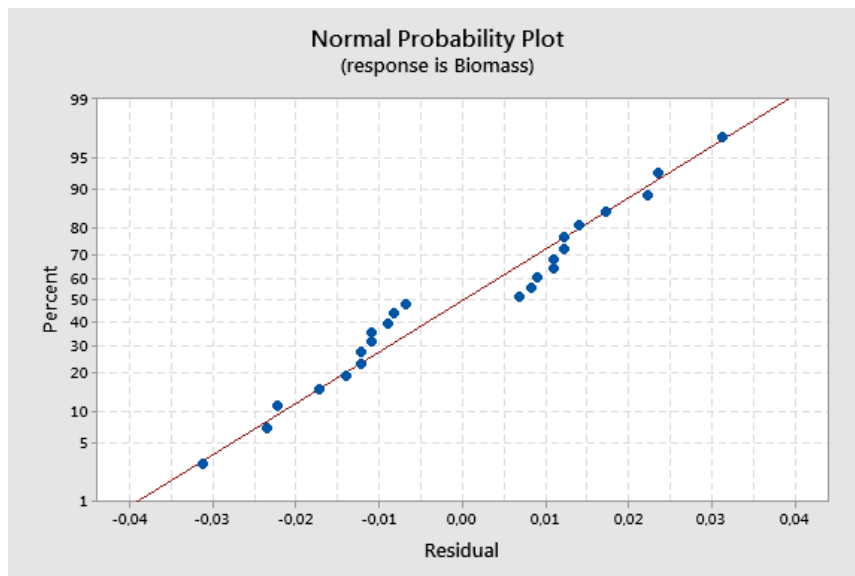
$$\begin{aligned} \text{Biyokütle} = & -0,4279 - 0,00906 \text{ Nişasta} - 0,993 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 0,03002 \text{ NaCl} + 0,1045 \text{ NaNO}_3 \\ & - 0,0187 \text{ Pepton} - 0,0400 \text{ Yeast Ext} + 0,043 \text{ KCl} + 0,081 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \\ & - 0,311 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 0,07758 \text{ pH} + 0,05647 \text{ İnok Miktarı} \end{aligned}$$



Şekil 4.12. Biyokütle Optimizasyonu Plot Grafiği (Faktörler; A: Nişasta, B: KH₂PO₄, C: NaCl, D: NaNO₃, E: Pepton, F: Yeast Extract, G: KCl, H: MgSO₄·7H₂O, J: FeSO₄·7H₂O, K: pH, L: İnokulum



Şekil 4.13. Biyokütle optimizasyonu pareto grafiği (Faktörler; A: Nişasta, B: KH₂PO₄, C: NaCl, D: NaNO₃, E: Pepton, F: Yeast Extract, G: KCl, H: MgSO₄.7H₂O, J: FeSO₄.7H₂O, K: pH, L: İnokulum Miktarı)



Şekil 4.14. Biyokütle optimizasyonu normallik testi plot grafiği

Maksimum enzim üretimi, herhangi bir biyoteknolojik süreçteki hedeflerden biridir. Bu bağlamda, suş geliştirme, fermentasyon ortamının optimizasyonu, biyoproses optimizasyonu ve matematiksel modelleme gibi çeşitli stratejiler yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel bir fermantasyon geliştirirken, ortam geliştirme en önemli noktadır. Ürün verimi ve biyokütle, karbon kaynağı, azot kaynağı ve inorganik tuzlar gibi

ortam bileşiminden güçlü bir şekilde etkilenmektedir (Djekrif-Dakhmouche vd., 2006) . PB deney tasarımı, çok sayıda değişkenin taranması ve en önemlilerinin belirlenmesinin kullanışlı bir yolunu sağlamaktadır. PB deney tasarımı ile biyokütle optimizasyonunda tuzun biyokütle miktarını etkileyen anlamlı bir faktör olması düşüncemizi destekleyen bir bulgudur. Buradan yola çıkarak halotolerant özellikte bir amilaz enzimi üretiminin bu koşullar dikkate alınarak halotolerant/halofilik bir fungus olan *A. tamarii* ile derin kültür fermentörde üretime geçilmiştir. Bununla birlikte optimizasyon bulguları ışığında yüksek inokulum miktarı ve pH'nın olumlu etkileri de dikkate alınmıştır.

PB deney tasarımı ile *A. niger* ATCC 16404 izolatının α -amilaz aktivitesinin optimizasyonu çalışmasında, fermentasyon ortamında bulunan inorganik tuzların (manganez ve demir sülfatların yanı sıra magnezyum klorür) kullanımı, α -amilaz üretimini arttırdığı ancak protein miktarı ve biyokütleyi etkilemediği belirtilmiştir. Ancak bu durumun nedeninin protein sentezini ve fungal büyüme için gerekli moleküllerin, substrat kaynağı olarak kullandıkları portakal atığınınındaki oligoelementlerden kaynaklandığını belirtilmiştir. (Djekrif-Dakhmouche vd., 2006). Biyokütleyi ve protein sentezini arttırıcı moleküllerin karbon ve azot kaynağından sağlanmasının yanısıra mikroorganizmanın sahip olduğu ekstreofilik özellikler de göz önünde bulundurulabilir. Bu açıdan bakıldığında sahip olduğu özellikler bakımından bizim çalışmamızda amilaz üreticisi olarak seçtiğimiz *A. tamarii* halotolerant/halofil gibi ekstreofilik özelliktedir. Tuzun biyokütleyi miktarını etkileyen bir faktör olduğu optimizasyon çalışmalarında saptanmıştır. Tuz bu mikrofungusun büyümesi için önemli bir faktördür. Bu nedenle biyokütle miktarının arttırılması amilaz aktivitesini de arttıracığı düşünülerek fermentör çalışmalarında biyokütleyi etkileyen faktörler (NaCl, pH ve inokulum miktarı) dikkate alınmıştır.

4.5. Derin Kültür Fermentör Uygulaması

Standart fermentasyon ortamı ve PB deney tasarımı ile erlenlerde elde edilen veriler, iki farklı üretim koşulları (normal ve optimum şartlar) altında, reaktör ölçeğinde amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Normal ve optimum koşullar karşılaştırılmıştır.

Buna göre standart fermentasyon ortamı (Besiyeri 3) ile gerçekleştirilen yedi günlük üretimde, enzim aktivitesi yedinci günde 308.15 U/ml değerine ulaşmıştır. Buna paralel

maltoz miktarı birinci günden itibaren artarak altıncı günde maksimum değerine ulaşmıştır. Ancak maltoz miktarı yedinci günde ani bir düşüş (1179 $\mu\text{mol/ml}$) göstermiştir. Büyüme grafiğinde de görüldüğü üzere bu ani düşüş biyokütle miktarındaki artışla açıklanabilir (Çizelge 4.2).

Fermentasyon ortamının pH değeri birinci günden dördüncü güne kadar azalmıştır. Dördüncü günden itibaren artış gözlemlenerek pH değeri maksimum değerine altıncı günde ulaşmıştır. Üretim süresince pH değeri nötr ve nötre yakın pH değerlerindedir.

Fermentasyon sırasında fermentör içerisindeki çözülmüş oksijen konsantrasyonu ise birinci günden itibaren azalarak yedinci günde minimum düşmüştür. Bu azalış büyük oranda biyokütle artışı nedeniyle oksijen gereksiniminin artmasına bağlanabilir. Ancak 7. gündeki çözülmüş oksijendeki ani düşüşün, fungal biyokütlenin artışıyla birlikte oksijen probunun ölçüm yapan kısmının fungal hifle sarılması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Funguslarla gerçekleştirilen fermentör uygulamalarında sıklıkla karşılaşılan bir durum olarak yorumlanabilir.

Çizelge 4.13. *A. tamarii*, 28 °C’de standart koşullarda, fermentördeki 7 günlük indirgen şeker, enzim aktivitesi, pH ve çözülmüş oksijen değerleri

İnkübasyon Süresi (gün)	İndirgen şeker ($\mu\text{mol/ml}$)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	pH	Çözülmüş Oksijen (DO)
1	3962.3	0	7.16	92.7
2	7129	16.4	6.60	87.3
3	7395.6	12.3	6.53	79.2
4	7729	47.04	6.99	83.1
5	7545.6	210.9	7.73	89.2
6	7979	238.7	7.92	66.8
7	1779	308.15	7.64	7.1

4.6. Derin Kültür Fermentör Uygulaması (Optimum Koşullar)

PB deney tasarımı sonucu biyokütle miktarını etkileyen faktörlerden NaCl, pH ve inkulum miktarlarının (NaCl; %10, pH; 5.5, inkulum miktarı; 1 ml) istatistiksel olarak anlamlı bulunması nedeniyle, bu faktörler göz önünde bulundurularak derin kültür fermentör uygulaması ile amilaz enzimi üretilmiştir.

Erlenlerde gerçekleştirilen biyokütle optimizasyonu ile elde veriler doğrultusunda %10 NaCl ile gerçekleştirilen fermentör uygulamasında enzim aktivitesi 7. günde maksimum değerdedir. Fermentasyon ortamında bulunan maltoz miktarı ise 1. günden itibaren 5. Güne kadar artış gözlemlenmiştir. Bu artış 5. Günden itibaren azalarak 7. günde minimum değerdedir (Çizelge 4.14).

Optimum olmayan koşullar altındaki amilaz aktivitesi 308 U/ml, optimum koşulların sağlandığı fermentör uygulamasında amilaz aktivitesi 403 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.15). PB deney tasarımı ile belirlenen etkili faktörlerin fermentörde uygulanması ile amilaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Fermentörde optimum koşullarda yapılan üretimde başlangıç inkulum miktarı standart koşullardakinden daha düşük orandadır. Enzim aktivitesinin zamana göre değişim grafiğinde standart koşullarda enzim üretiminin hızlı başlaması inoculum oranıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. %10 oranında tuz içeren fermentasyon ortamında biyokütlenin yavaş artışı ile birlikte amilaz üretiminin de yavaş olduğu görülmektedir. Amilaz aktivitesi her iki uygulamada da 7. günde en üst düzeye ulaşmakla birlikte optimum koşullarda daha yüksek bir amilaz aktivitesi görülmektedir. Şimdiye kadar literatürde halofilik/halotolerant fungusların amilaz üreticisi olarak kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamış olup daha çok halofilik prokaryotik organizmalarla bu tip çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Bu nedenle bulgular bu çalışmalar ışığında tartışılacaktır.

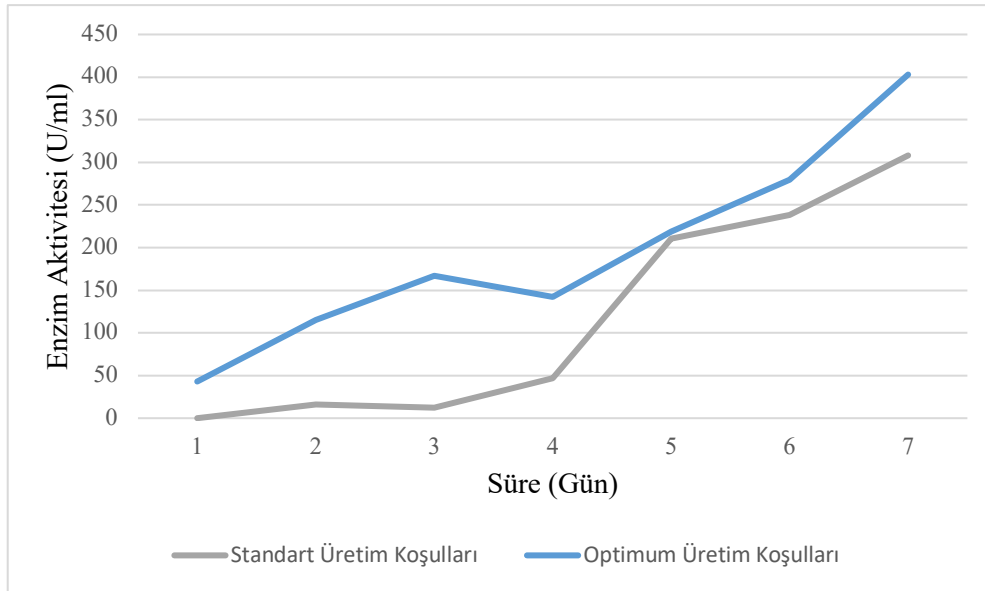
Tuz, halofillerin büyümesi için hayati önem taşımaktadır, bu nedenle çoğu durumda büyüme ve amilaz üretimi, tuz yokluğunda azalır. Sodyum klorür, büyüme ve amilaz üretimi için tercih edilen tuzdur. Maksimum üretim için optimum tuz konsantrasyonu % 5-25 (w/v)

arasında değişmektedir (Kumar vd., 2016). Literatürde bazı amilaz üretim çalışmalarında optimize edilmiş tuz konsantrasyonları, *Halomonas meridiana* (Coronado vd., 2000); % 5 NaCl (w/v), *Bacillus* sp. (Kiran & Chandra, 2008); % 10 NaCl (w/v), *Chromohalobacter* sp. (Prakash vd., 2009); %20 NaCl (w/v), *Halobacterium halobium* (Patel vd., 1993) ; %25 NaCl (w/v) çalışmalarında belirtilmiştir.

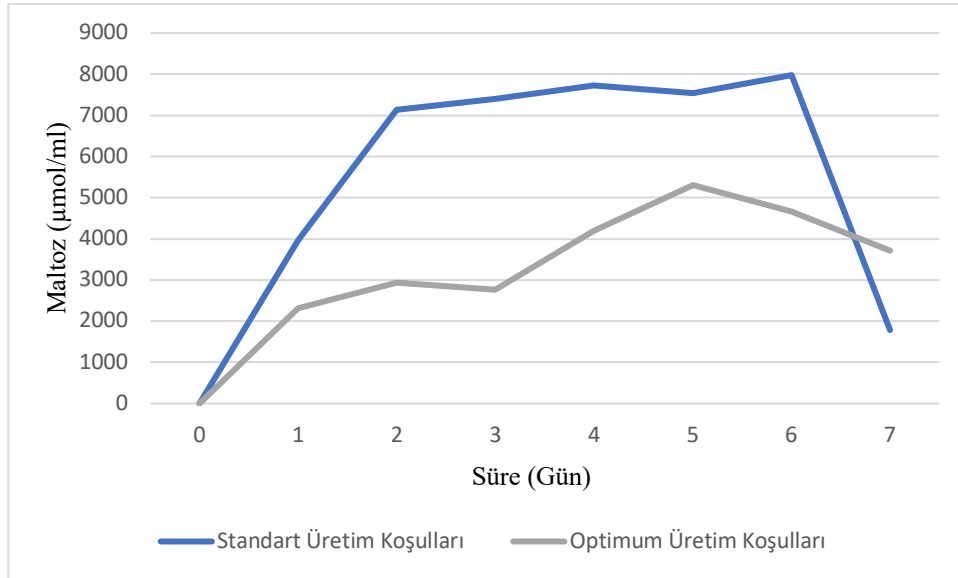
Fermentasyon ortamının pH değeri ise üretim süresince nötral pH değerindedir ancak amilaz aktivitesinin en yüksek olduğu 7. günde maksimum pH değerine ulaşmıştır (Şekil 4.17).

Çizelge 4.14. *A. tamarii*, 28 °C'de, optimize koşullarda, fermentördeki 7 günlük indirgen şeker, enzim aktivitesi, pH ve çözülmüş oksijen değerleri

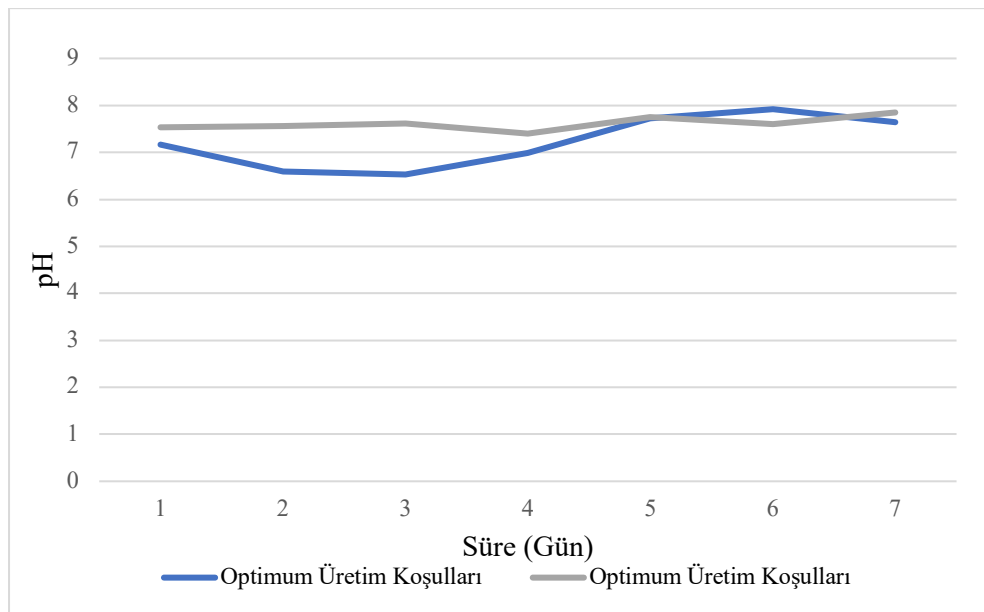
İnkübasyon Süresi (gün)	Redüktör şeker (μmol/ml)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	pH	Çözülmüş Oksijen (DO)
1	2312.3	43	7.53	98.1
2	2934.5	115	7.56	97.3
3	2767.8	167	7.62	89.7
4	4190.1	142	7.40	90.2
5	5306.7	219	7.75	90.5
6	4662.3	280	7.60	90.3
7	3712.33	403	7.85	91.3



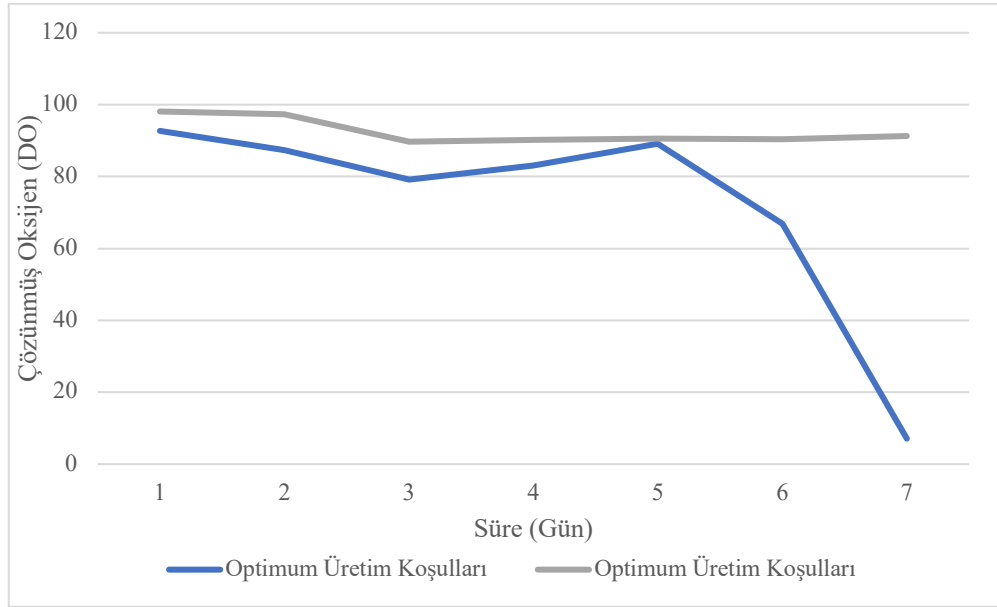
Şekil 4.15. *A. tamarii*, 28 °C'de, fermentörde, standart ve optimize koşullardaki enzim aktiviteleri



Şekil 4.16. *A. tamarii*, 28 °C’de, fermentörde, standart ve optimize koşullardaki maltoz miktarları



Şekil 4.17. *A. tamarii*, 28 °C’de, fermentörde, standart ve optimize koşullardaki pH değerleri

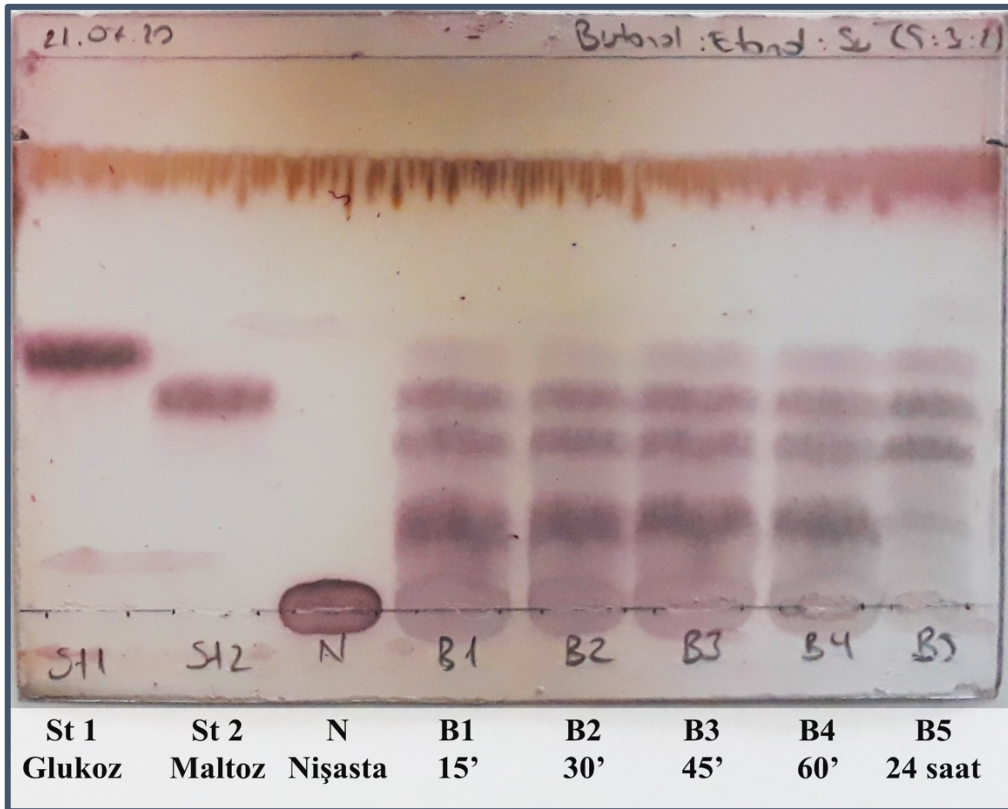
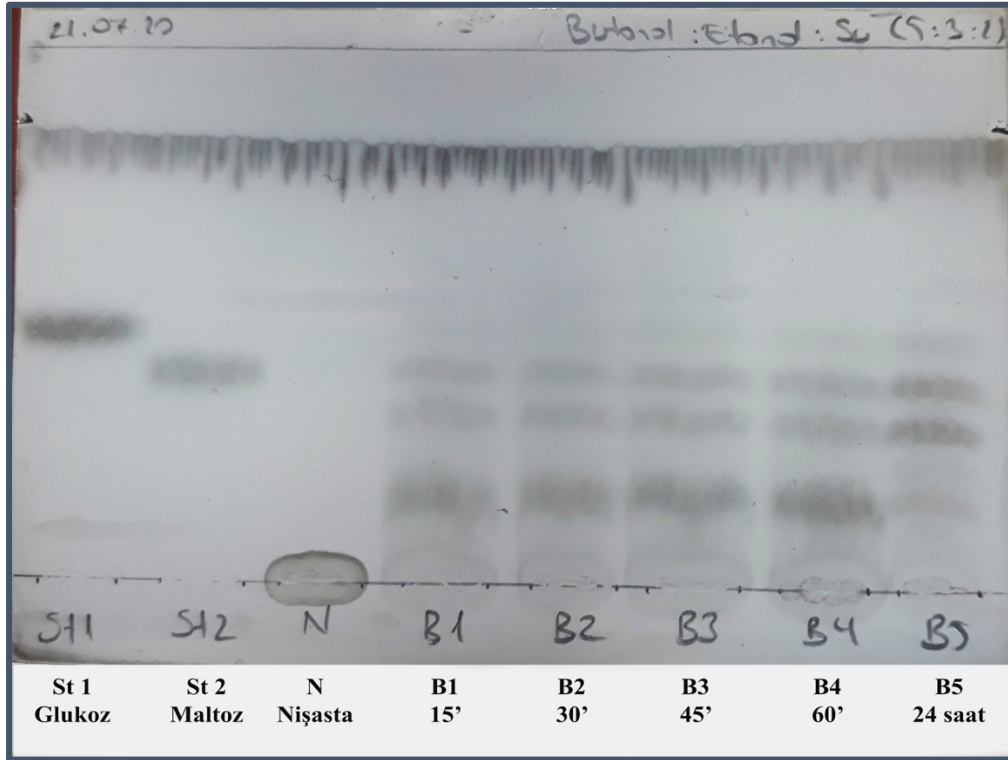


Şekil 4.18. *A. tamarii*, 28 °C’de, fermentörde, standart ve optimize koşullardaki çözülmüş oksijen değerleri

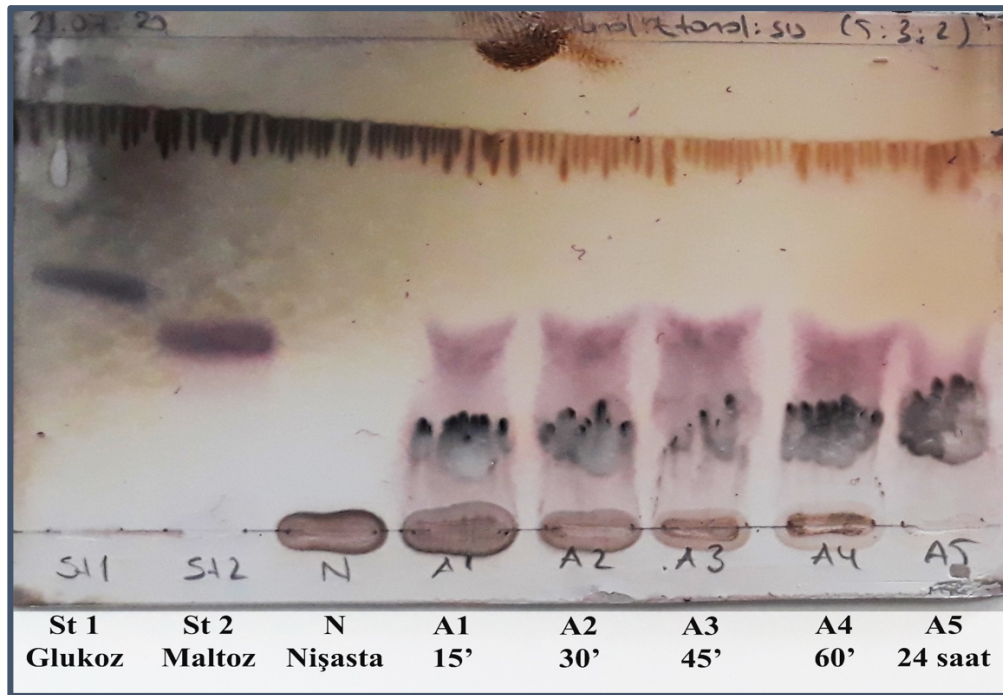
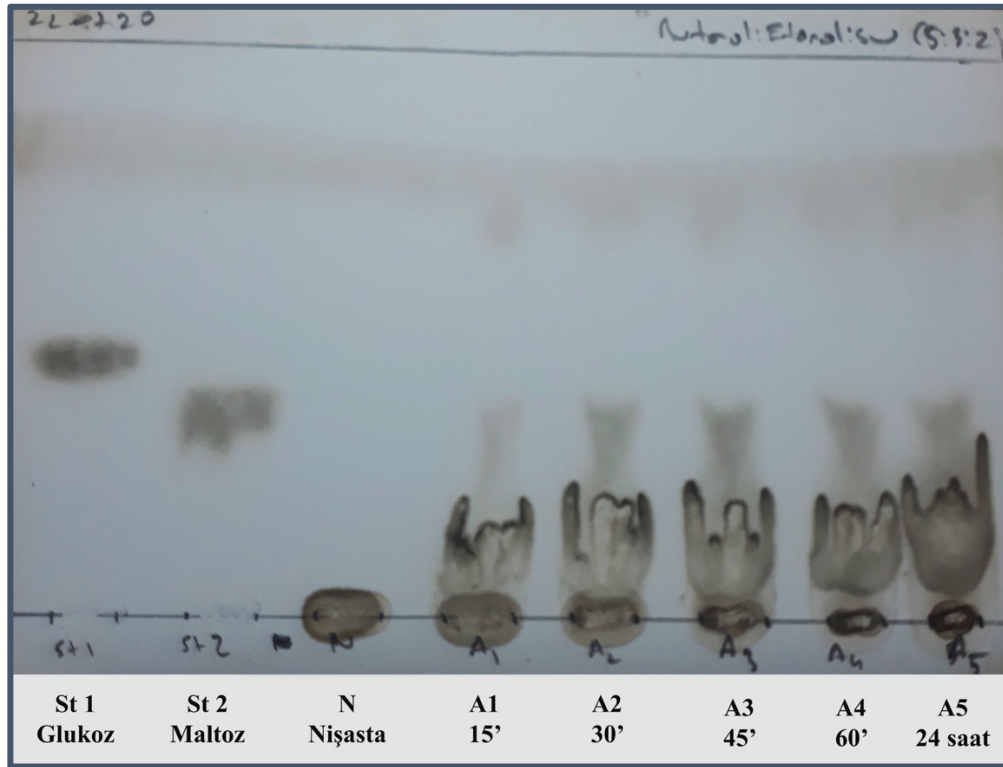
4.7. İnce Tabaka Kromatografisi

Nişastanın 15, 30, 45, 60 dakika ve 24 saat aralıklarla *A. tamarii* tarafından üretilen amilaz enzimi ile inkübasyonu sonucunda ortaya çıkan ürünün maltoz olduğu, ticari olarak üretilen α -amilaz ile (Şekil 4.19) karşılaştırılarak ince tabaka plakalarında gözlemlenmiştir.

Derin kültür fermentasyonu ile reaktör ölçeğinde üretilen filtrat ile nişastanın enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen son ürünlerin ince tabaka kromatografisi yönteminden elde edilen sonuçlara göre maltoz ve glikoz olduğu saptanmıştır. Nişastanın ticari olarak satılan α -amilaz ile enzimatik reaksiyonu ile karşılaştırılarak yapılan deneyde son ürünleri maltoz ve glikoz oluşu saptanmıştır. Maltozun Rf değeri 0.53 bulunmuştur (Şekil 4.20).



şekil 4.19. Nişastanın belirli zaman aralıklarında ticari amilaz ile hidrolizi sonucu ortaya çıkan ürünlerin İTK plakasında gözlemlenmesi. (St 1: %0,1 glukoz, St 2: %0,1 maltoz, N: %1 Nişasta, B1, B2, B3, B4, ve B5; sırasıyla 15 30 45 60 dakika ve 24 saat inkübasyon)



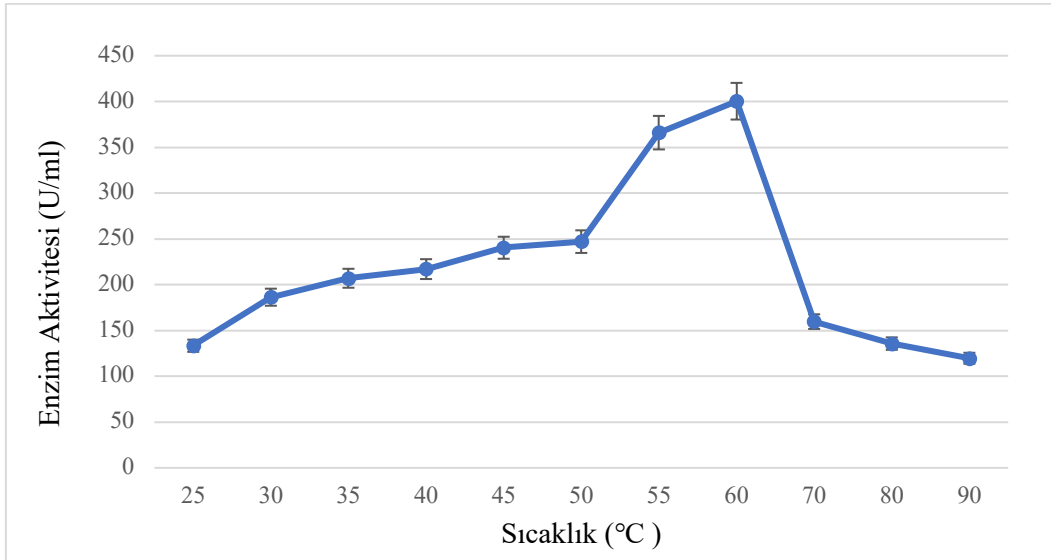
Şekil 4.20. Nişastanın belirli zaman aralıklarında *A. tamaris* tarafından üretilen amilaz enzimi ile hidrolizi sonucu ortaya çıkan ürünlerin İTK plakasında gözlemlenmesi. (St 1: % 0,1 glukoz, St 2: % 0,1 maltoz, N: %1 Nişasta, A1, A2, A3, A4, ve A5; sırasıyla 15 30 45 60 dakika ve 24 saat inkübasyon)

4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın α -amilaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla %1'lik çözünebilir patates nişastası ile filtrat 25 °C – 90 °C sıcaklık aralığında aralıklarında 30 dakika inkübe edilmiştir (Bkz; Çizelge 3.8). Farklı sıcaklık aralıklarındaki enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.15 ve şekil 4.21' de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi 25 °C' de en düşük aktiviteyi, en yüksek aktivite değerini ise 55 °C ve 60 °C aralığında ortalama 380 U/ml volümetrik aktivitedir. Sıcaklığın 70 °C, 80 °C ve 90 °C olduğu koşullarda enzim aktivitesi hızlı bir şekilde azalmaktadır. Maksimum enzim aktivitesi 60 °C sıcaklıktaki 100 olarak kabul edilmiştir. Sıcaklık değişimine göre yüzde aktivite değerleri Çizelge 4.15 de verilmiştir. Tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.15. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi(U/ml) (Ortalama \pm Standart Sapma)	% Aktivite
25	133.3 \pm 4.72	33
30	186.3 \pm 2.88	46
35	207.0 \pm 3.60	51
40	143.6 \pm 3.78	54
45	240.3 \pm 4.041	60
50	247.0 \pm 2.64	61
55	366.0 \pm 3.60	91
60	400.3 \pm 8.14	100
70	159.6 \pm 4.72	39
80	135.6 \pm 2.081	33
90	119.6 \pm 2.516	29



Şekil 4.21. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Nişasta işleme endüstrisinde nişastanın sakkarifikasyonu, yüksek sıcaklıklarda sıvılaştırılması aşamalarında yüksek sıcaklıklarda stabilite ve aktivite gösteren amilazların kullanımı çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Ballschmiter vd., 2006), (Yoon vd., 2008).

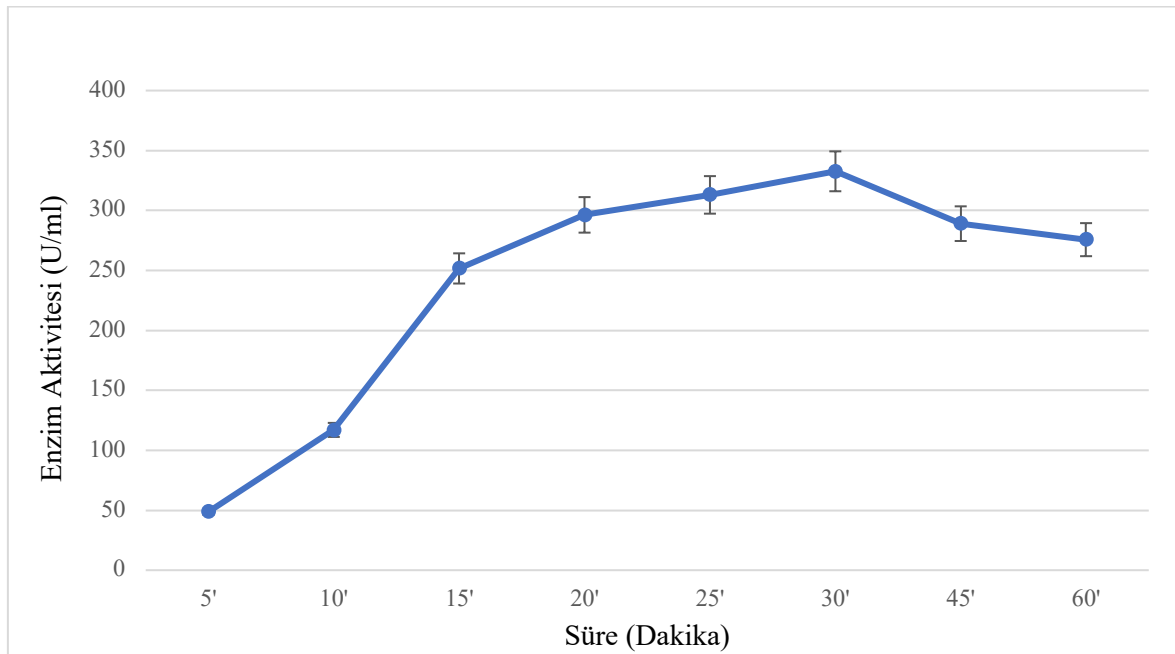
Enzim aktivitesinin 55 °C – 60 °C aralığında yüksek olması bu sıcaklık aralığında gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalar için uygun olabilecek enzim olduğunu göstermiştir

4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

İnkübasyon süresinin α -amilaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla %1'lik çözünebilir patates nişastası ile filtrat, 55 °C' de 5-60 dakika aralığında aralıklarında inkübe edilmiştir (Bkz; Çizelge 3.9). Farklı inkübasyon sürelerindeki enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.16 ve Şekil 4.22' de verilmiştir. Amilaz aktivitesinin en uygun olduğu süre 20 dakika ile 30 dakika zaman aralığındadır. *Aspergillus tamarri* fungusundan derin kültür fermentasyonu ile elde edilen α -amilaz enziminin, çözünebilir nişasta (%1) ile inkübasyonu sonucunda inkübasyon süresinin en uygun olduğu süre 332.6 U/ml enzim aktivitesi ile 30 dk inkübasyon süresi olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi ilk 15 dakikadan itibaren 30. dakika inkübasyon süresine kadar doğrusal olarak artmıştır. 30 dakika inkübasyon süresinden sonraki 45 ve 60 dakika sürelerinde enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Tüm süreler aralığındaki enzim aktiviteler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$)

Çizelge 4.16. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon Süresi (Dakika)	Enzim Aktivitesi(U/ml) (Ortalama \pm Standart Sapma)
5'	48.66 \pm 5.77
10'	117 \pm 10.69
15'	251.66 \pm 24.26
20'	296.33 \pm 15.82
25'	313.00 \pm 15.88
30'	332.66 \pm 8.71
45'	289.00 \pm 14.12
60'	275.66 \pm 14.64



Şekil 4.22. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

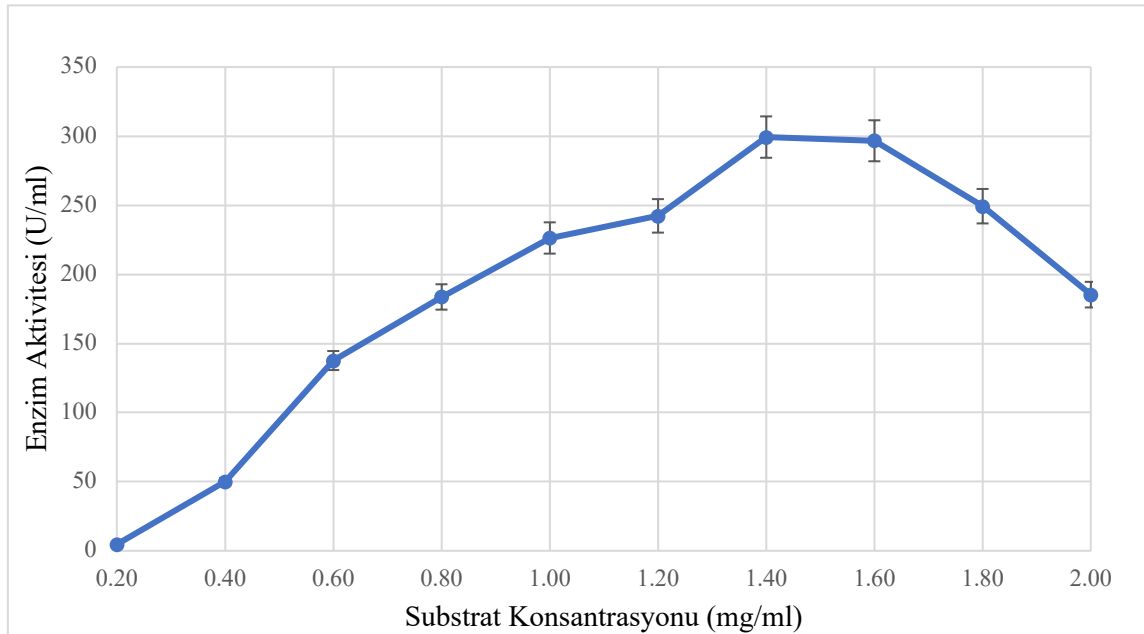
4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Substrat konsantrasyonunun α -amilaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla 0,2-2,0 mg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan çözünebilir patates nişastası ile filtrat, 55 °C' de, 30 dakika inkübe edilmiştir (Bkz; Çizelge 3.10). Farklı nişasta konsantrasyonlarındaki enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.17 ve Şekil 4.23' de verilmiştir *A. tamarii*' den üretilen α -amilaz enziminin çözünebilir nişastanın farklı konsantrasyonları üzerinde gösterdiği enzim aktivitesi, substrat konsantrasyonu artmasıyla artmıştır. En uygun substrat konsantrasyon değeri 1.4 mg/ml çözünebilir nişasta olarak bulunmuştur. Bu

konsantrasyon değerinde α -amilaz aktivitesi 299.3 U/ml hacimsel aktivite olarak bulunmuştur. Tüm konsantrasyonlardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

Çizelge 4.17. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat Konsantrasyonu (mg/ml)	Enzim Aktivitesi(U/ml) (Ortalama \pm Standart Sapma)
0.2	4.6 \pm 2.51
0.4	50.0 \pm 3.60
0.6	137.6 \pm 4.04
0.8	183.6 \pm 2.30
1.0	226.3 \pm 6.02
1.2	242.3 \pm 1.52
1.4	299.3 \pm 1.52
1.6	296.6 \pm 6.02
1.8	249.3 \pm 5.13
2.0	185.3 \pm 3.51



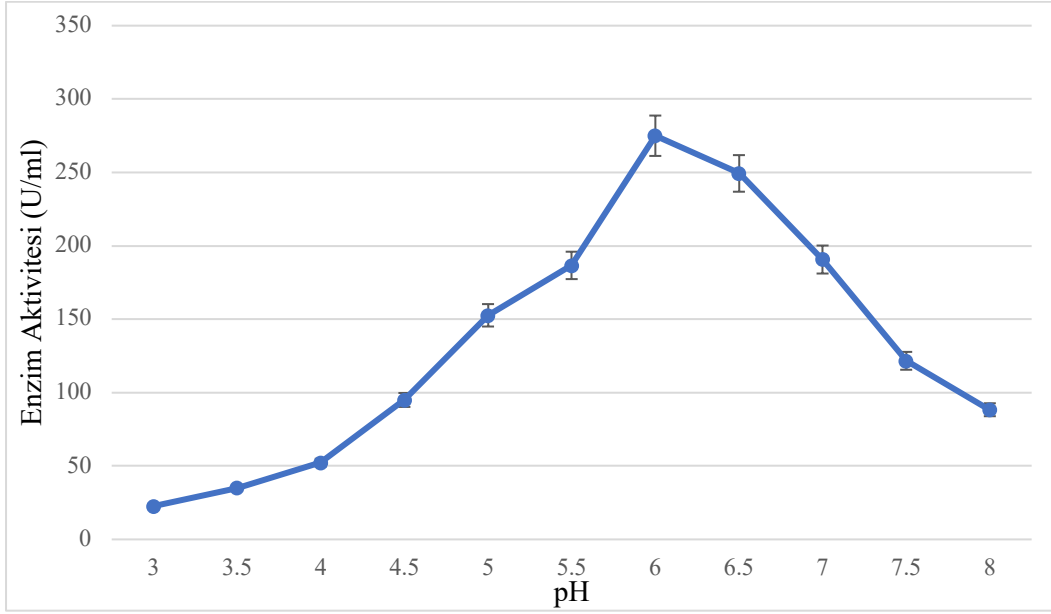
Şekil 4.23. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

4.11. Enzim Aktivitesi Üzerin pH' ın etkisi

pH'nın α -amilaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla %5'lik çözünebilir patates nişastası ile filtrat, 55 °C' de 3.0-8.0 pH aralığında 30 dakika inkübe edilmiştir (Bkz; Çizelge 3.11). Farklı pH değerlerindeki enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.18 ve Şekil 4.24' de verilmiştir. *A. tamarii*' den üretilen α -amilaz enziminin farklı pH değerlerinin enzim aktivitesi üzerinde gösterdiği etki incelendiğinde en yüksek aktivite değeri pH 6.0 'da saptanmıştır. En yüksek pH değeri pH 6.0 değerinde 100 olarak kabul edilmiştir. Diğer pH değerlerinde aktivite değişimi yüzde olarak verilmiştir.

Çizelge 4.18. Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

pH	Enzim Aktivitesi(u/ml) (Ortalama \pm Standart Sapma)	% Aktivite
3.0	22.66 \pm 3.51	8
3.5	35.00 \pm 7.09	12
4.0	52.33 \pm 7.00	19
4.5	95.00 \pm 20.84	34
5.0	152.66 \pm 1.52	55
5.5	186.66 \pm 23.57	67
6.0	275.00 \pm 5.13	100
6.5	249.33 \pm 7.37	90
7.0	190.66 \pm 5.50	69
7.5	121.66 \pm 5.77	44
8.0	88.33 \pm 5.77	32



Şekil 4.24. Enzim aktivitesi üzerine pH' ın etkisi

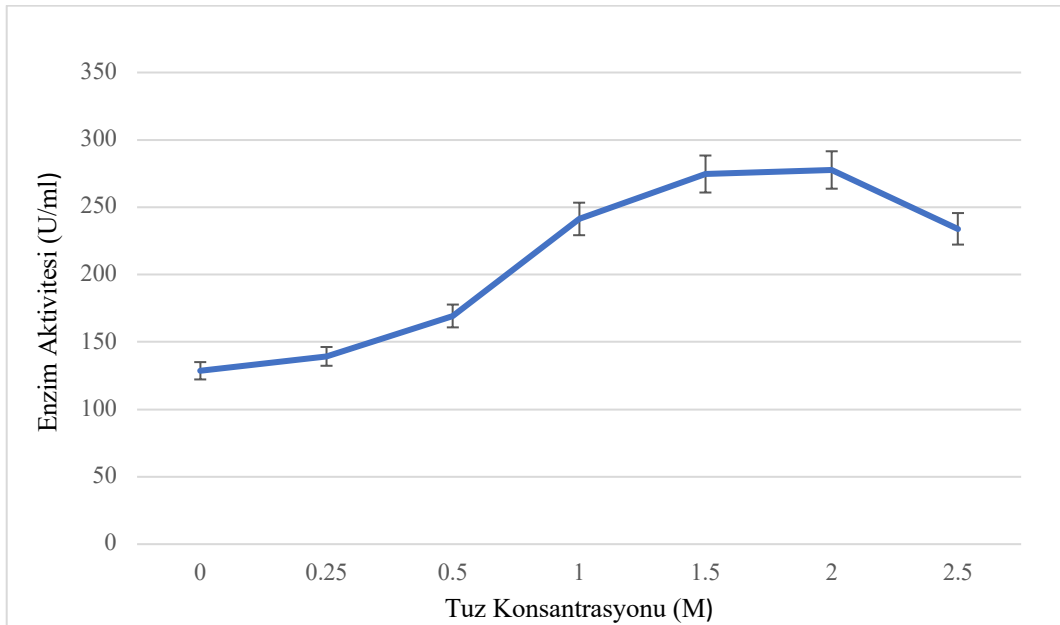
Sonuçlar enzimin pH 5.0 ile pH 7.0 aralığında geniş bir pH aralığında aktif olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte enzimin asidik ve nötral pH değerlerine yakın aralıkta aktivite gösterdiği söylenebilir. Geniş pH aralığında aktivite göstermesi enzimin bu pH aralığında gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalar için elverişli bir enzim olduğunu göstermektedir

4.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Tuz Etkisi

Tuzun α -amilaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla %1 çözünebilir patates nişastası ile filtrat, 55 °C' de 0,25 M ile 2,5 M tuz konsantrasyonu aralığında 30 dakika inkübe edilmiştir (Bkz; Çizelge 3.12). Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisinin belirlenmesi amacıyla filtrat ve enzim, 0,25 M ile 2,5 M aralığındaki tuz ile inkübasyona bırakılmıştır. Farklı tuz konsantrasyonlarındaki enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.19 ve Şekil 4.25' de verilmiştir. *A. tamarii* fungusu tarafından üretilen α -amilaz enzimi en yüksek aktivite değerini 2 M NaCl konsantrasyonunda göstermiştir. Bu değer 100 olarak kabul edilmiş diğer konsantrasyonlardaki aktivite değişimleri yüzde olarak verilmiştir. Tüm konsantrasyonlardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.19. Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisi

Tuz Konsantrasyonu Molar (%)	Enzim Aktivitesi(u/ml) (Ortalama ± Standart Sapma)	% Aktivite
0.0 (0)	128.6 ± 2.51	46
0.25 (%1,4)	139.3 ± 3.21	50
0.5 (%2,9)	169.3 ± 0.57	61
1.0 (%5,8)	241.3 ± 3.78	87
1.5 (%8,7)	274.6 ± 26.76	98
2.0 (%11,6)	277.6 ± 18.71	100
2.5 (%14,5)	234.0 ± 7.00	85



Şekil 4.25. Enzim aktivitesi üzerine tuzun etkisi

Genel olarak, tuz varlığında aktiviteye sahip enzimler 0.2 M ile 5.2 M arasında değişen tuz konsantrasyonlarında aktiftir. Peptit sentezi, gelişmiş yağ geri kazanımı ve tuz içeren atıkların arıtımı için daha iyi katalizörler oldukları bildirilmiştir. Normal enzimlerin aktivite göstermediği hatta denatüre olduğu bu uygulamalarda aktivite gösterdiği bilinmektedir (Oren, 2010), (Ryu vd., 1994). *A. tamarii* tarafından üretilen α -amilaz'ın yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite göstermesi, yüksek tuz konsantrasyonları ile gerçekleştirilen endüstriyel süreçlerde kullanımına uygun bir enzim olabileceği düşünülmektedir.

Büyük bir hızla değişen dünyada su kaynaklarının azalması insanları arıtılmamış yer altı sert suları da dahil olmak üzere, günlük ev içi kullanımlar için tuzlu su veya sert arıtılmamış su kullanımını zorunlu kılmaktadır. Bu durum da temizlikte kullanılan deterjanların etkinliğini azaltmaktadır (Ali vd., 2015). Deterjanlarda tuza tolerans gösteren amilaz enzimini kullanılması bu soruna çözüm sunabilir.

Yüksek tuz konsantrasyonunda aktivite gösteren amilazların, yüzey aktif madde, ticari deterjanlar, oksidanlara karşı mükemmel stabilite gösterdiği ve özellikle alkali pH'ta geniş pH aralığında stabil olduğu bildirilmiştir (Chakraborty vd., 2011)

Streptomyces sp., *Saccharopolyspora sp.* (Chakraborty vd., 2009) ve *Bacillus sp.* (Kiran & Chandra, 2008) gibi halofilik organizmalarda elde edilen tuza tolarens gösteren amilaz enziminin deterjan uygulamalarında ticari deterjanlarla, surfaktanlar ve okside edici ajanlarla uyumluluk gösterdiği bildirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında hipersalin çevrelerden izole edilen mikrofungus türlerinin amilaz aktiviteleri açısından kalitatif olarak taranarak belirlenmiştir. Amilolitik aktivite açısından taranan mikrofungus türlerinden *A. clavatus*, *A. sydowi* ve *A. tamarii* mikrofungus türleri tuz varlığında gelişim göstermeleri ve amilolitik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle amilaz üreticisi olarak seçilmiştir. Bu üç mikrofungus türünden ise *A. tamarii* pellet morfolojisinin derin kültür fermentör uygulamasına uygunluğu nedeniyle üretici olarak seçilmiştir.

Üretim koşullarının optimizasyonu *A. tamarii*'nin biyokütle miktarını etkileyen faktörün tuz, pH ve inokulum miktarı olduğunu göstermiştir. Bu veriler ışığında optimum olmayan koşullar altında ve optimum koşullar altında derin kültür fermentör uygulaması ile amilaz enzimi üretilmiş, optimum koşullarda enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir.

A. tamarii tarafından üretilen α -amilaz enzimi yüksek sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında aktivite göstermesi nedeniyle poliektromofilik özelliği ile ön plana çıkmıştır.

Bu tez çalışmasında çalışılan konuların yanısıra yapılması gerekli görülen çalışmalar aşağıda özetlenmiştir,

- Ekstrem çevrelerden izolasyon ve tanımlama çalışmalarının artması, yeni üretici mikroorganizmaların araştırılması
- Enzim saflaştırma çalışmalarının yapılması
- Fermentör uygulamalarında çevresel şartların kontrol edilmesi ve anında ölçüm sağlayan teknolojilerle üretimin daha kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesi
- Enzim karakterizyonun daha detaylı bir şekilde çalışılması
- Farklı substrat tipleri ve ekonomik karbon kaynakları ile enzimatik aktivitenin çalışılması

- Optimizasyon çalışmasında üretim koşullarının belirlenmesinde enzim aktivitesi üzerine etkisi bulunan faktörlerin birbirleriyle olan ilişkisinin ve düzeylerinin daha detaylı araştırılması

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abou-Zeid, A. M. (1997). Production, purification and characterization of an extracellular alpha-amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. *Microbios*, 89(358), 55-66.
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139.
- Ahlawat, S., Dhiman, S. S., Battan, B., Mandhan, R. P., & Sharma, J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, 44(5), 521–526.
- Ali, I., Akbar, A., Anwar, M., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2015, Haziran 9). *Purification and Characterization of a Polyextremophilic α -Amylase from an Obligate Halophilic *Aspergillus penicillioides* Isolate and Its Potential for Souse with Detergents* [Research Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2015/245649>
- Alpha-Amylase Baking Enzyme Market Size & Share Report, 2024*. (t.y.). Geliş tarihi 18 Mayıs 2020, gönderen <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/alpha-amylase-baking-enzyme-market>
- Arikan, B. (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071-3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.019>
- Ballschmiter, M., Fütterer, O., & Liebl, W. (2006). Identification and characterization of a novel intracellular alkaline α -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 2206–2211.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases, alpha and beta. *Methods in enzymology I*, 149–158.
- Białkowska, A., & Turkiewicz, M. (2014). Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance. İçinde P. Buzzini & R. Margesin (Ed.), *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance* (ss. 377-395). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_17
- Bignell, G. R., Bruce, I. J., & Evans, I. H. (2000). Amylolytic enzymes of *Lipomyces*

KAYNAKLAR DİZİN (devam)

- starkeyi: Purification and size-determination. *Biotechnology letters*, 22(21), 1713–1718.
- Birgisson, H., Delgado, O., Arroyo, L. G., Hatti-Kaul, R., & Mattiasson, B. (2003). Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. *Extremophiles*, 7(3), 185–193.
- Bruinenberg, P. M., Hulst, A. C., Faber, A., & Voogd, R. H. (1996). A process for surface sizing or coating of paper. *European Patent Application*.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Biao, R., Jian, W., Liu, X.-Y., Mahadik, K., Chopade, B., Zhang, L., & Kokare, C. (2011). Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.09.009>
- Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K., & Chopade, B. (2009). Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 17–23.
- Chambers, J. M. (2018). *Graphical Methods for Data Analysis*. CRC Press.
- Chang, P., Tsai, W.-S., Tsai, C.-L., & Tseng, M.-J. (2004). Cloning and characterization of two thermostable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(3), 1017–1025.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., & Zhang, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology advances*, 27(4), 423–431.
- Coronado, M.-J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (2000). Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS microbiology letters*, 183(1), 67–71.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291–302.
- de Moraes, L. M., Astolfi Filho, S., & Ulhoa, C. J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces*

KAYNAKLAR DİZİ (devam)

- cerevisiae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(5), 561–564.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z., & Bennamoun, L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73(2), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>
- Dumorne, K., Córdova, D. C., Astorga-Elo, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol*, 27(4), 649–659.
- Enzymes Market Size, Share | Global Industry Report, 2020-2027*. (t.y.). Geliş tarihi 18 Mayıs 2020, gönderen <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>
- Feitkenhauer, H. (2003). Anaerobic digestion of desizing wastewater: Influence of p retreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation. *Enzyme and microbial technology*, 33(2-3), 250–258.
- Freedonia (2008). (t.y.). *Freedonia (2008)*,. Geliş tarihi 18 Mayıs 2020, gönderen [https://www.google.com/search?q=Freedonia+\(2008\)](https://www.google.com/search?q=Freedonia+(2008))
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., & Usami, R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. Strain S-1. *Extremophiles*, 9(1), 85–89.
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). *Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production* [Review Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Goto, C. E., Barbosa, E. P., Kistner, L. C. L., Moreira, F. G., Lenartovicz, V., & Peralta, R. M. (1998). Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing α -methyl-d-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), 139-143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13219.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Gouda, M. K., & Elbahloul, Y. (2008). *Statistical Optimization and Partial Characterization of Amylases Produced by Halotolerant Penicillium Sp.*
<https://www.semanticscholar.org/paper/Statistical-Optimization-and-Partial-of-Amylases-by-Gouda-Elbahloul/d59df68910c0cda56874cc5a297373013419675f>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599–1616.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013.
- Hall, F. F., Culp, T. W., Hayakawa, T., Ratliff, C. R., & Hightower, N. C. (1970). An Improved Amylase Assay Using a New Starch Derivative. *American Journal of Clinical Pathology*, 53(5), 627-634. <https://doi.org/10.1093/ajcp/53.5.627>
- Hmidet, N., Ali, N. E.-H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.-K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 71–79.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., & Thonart, P. (1999). Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. İçinde B. H. Davison & M. Finkelstein (Ed.), *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Presented as Volumes 77–79 of Applied Biochemistry and Biotechnology Proceedings of the Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 3–7, 1998, Gatlinburg, Tennessee* (ss. 223-233). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1604-9_22
- Karbalaei-Heidari, H. R., Ziaee, A.-A., & Amoozegar, M. A. (2007). Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. Strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. *Extremophiles*, 11(2), 237–243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kayış, O., İlhan, S., & Demirel, R. (2018). *Effect of combinations of salt and temperature on morphological characteristics of microfungi*. <http://acikerisim.selcuk.edu.tr:8080/xmlui/handle/123456789/14147>
- Kim, J., & Dordick, J. S. (1997). Unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile. *Biotechnology and bioengineering*, 55(3), 471–479.
- Kiran, K. K., & Chandra, T. S. (2008). Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(5), 1023–1031.
- Kumar, S., Grewal, J., Sadaf, A., Hemamalini, R., & Khare, S. K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiol*, 2(1), 1–26.
- Kumar, S., & Khare, S. K. (2015). Chloride activated halophilic α -amylase from *Marinobacter* sp. EMB8: Production optimization and nanoimmobilization for efficient starch hydrolysis. *Enzyme Research*, 2015.
- Litchfield, C. D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(10), 1635. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1021-9>
- Ma, Y., Xue, Y., Grant, W. D., Collins, N. C., Duckworth, A. W., van Steenberg, R. P., & Jones, B. E. (2004). *Alkalimonas amylolytica* gen. Nov., sp. Nov., and *Alkalimonas delamerensis* gen. Nov., sp. Nov., novel alkaliphilic bacteria from soda lakes in China and East Africa. *Extremophiles*, 8(3), 193–200.
- Marlida, Y., Saari, N., Radu, S., & Abu Bakar, F. (2000). Production of an amylase-degrading raw starch by *Gibberella pulicaris*. *Biotechnology Letters*, 22(1), 95-97. <https://doi.org/10.1023/A:1005685118614>
- Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource technology*, 97(10), 1217–1224.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mohapatra, B. R., Banerjee, U. C., & Bapuji, M. (1998). Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. Associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *Journal of Biotechnology*, 60(1), 113-117. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00197-1)
- Mojsov, K. (2012). Microbial α -amylases and their industrial applications: A review. *International Journal of Management, IT and Engineering*, 2(10), 583–609.
- Mukherjee, A. K., Borah, M., & Rai, S. K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 149–156.
- Munawar, N., & Engel, P. C. (2012). Overexpression in a non-native halophilic host and biotechnological potential of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* strain NRC-36014. *Extremophiles*, 16(3), 463–476.
- Nadumane, V. K., Venkatachalam, P., & Gajaraj, B. (2016). Aspergillus applications in cancer research. İçinde *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (ss. 243–255). Elsevier.
- Nielsen, J. E., & Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 253–274.
- Okolo, B. N., Ire, F. S., Ezeogu, L. I., Anyanwu, C. U., & Odibo, F. J. C. (2001). Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(3), 329-336. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200102\)81:3<329::AID-JSFA815>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200102)81:3<329::AID-JSFA815>3.0.CO;2-3)
- Olsen, H. S., & Falholt, P. (1998). The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1(4), 555–567.
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental technology*, 31(8-9), 825–834.
- Ortega, G., Laín, A., Tadeo, X., López-Méndez, B., Castaño, D., & Millet, O. (2011).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halophilic enzyme activation induced by salts. *Scientific Reports*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.1038/srep00006>
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189-259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Patel, S., Jain, N., & Madamwar, D. (1993). Production of α -amylase from *Halobacterium halobium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(1), 25–28.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., & Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical reviews in microbiology*, 33(3), 183–209.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325. <https://doi.org/10.2307/2332195>
- Posch, A. E., Herwig, C., & Spadiut, O. (2013). Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 31(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.008>
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M. S., Muralikrishna, G., & Sreeramulu, K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*, 44(2), 210–215.
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., & Fava, F. (2013). Halo-alkalitolerant and thermostable cellulases with improved tolerance to ionic liquids and organic solvents from *Paenibacillus tarimensis* isolated from the Chott El Fejej, Sahara desert, Tunisia. *Bioresource technology*, 150, 121–128.
- Reiss, T., et al. (2007),. (t.y.). Geliş tarihi 18 Mayıs 2020, gönderen <https://www.google.com/search?safe=>
- Robyt, J. F. (2012). *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Ryu, K., Kim, J., & Dordick, J. S. (1994). Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme and microbial technology*,

KAYNKALAR DİZİNİ (devam)

- 16(4), 266–275.
- Sanchez, O. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270–5295.
- Schreck, S. D., & Grunden, A. M. (2014). Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1011–1021. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5417-5>
- Serour, E., & Antranikian, G. (2002). Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 73–83. <https://doi.org/10.1023/A:1020525525490>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Thomas, L., Goswami, M., Giri, B. S., & Pandey, A. (2015). Industrial enzymes. İçinde *Industrial biorefineries & white biotechnology* (ss. 473–497). Elsevier.
- Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014). α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166–175. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-10>
- The Bioeconomy to 2030 OECD*. (t.y.). Geliş tarihi 18 Mayıs 2020, gönderen <https://www.oecd.org/futures/long-termtechnologicalsocietalchallenges/thebioeconomyto2030designingapolicyagenda.htm>
- Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar | Analytical Chemistry*. (t.y.). Geliş tarihi 02 Kasım 2020, gönderen <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60147a030>
- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137–155.
- Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M., Vágvölgyi, C., & Kocsubé, S. (2015). Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(2), 151–167.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet—Relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 2997-3006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., & Higon, G. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. Wiley.
- Yoon, S., Ryu, S.-I., Lee, S.-B., & Moon, T.-W. (2008). Purification and characterization of branching specificity of a novel extracellular amylolytic enzyme from marine hyperthermophilic *Rhodothermus marinus*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(3), 457–464.