

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASPERGILLUS NIGER'DE PULLULANAZ
İNDÜKSİYONU ve ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARA
İMMOBİLİZASYONU**

Kimya Mühendisi Ayşe AKAN

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL (YTÜ)

İSTANBUL, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ OLAN MİKROORGANİZMALAR	3
2.1 Mikrobiyal Enzim Üretimi.....	3
2.1.1 Mikroorganizmaların Gelişme Koşulları.....	5
3. ENZİM.....	10
3.1 Enzimlerin Yapısı	10
3.2 Enzimlerin Spesifikliğı	11
3.3 Enzimlerin Aktif Merkezi	12
3.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	14
3.5 Enzimlerin İsimlendirilmesi.....	19
3.6 Endüstriyel Enzimler	21
3.6.1 Nişasta ve Amilazlar	21
3.6.1.1 Nişastanın Parçalanması	23
3.6.1.1.1 α -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1)	24
3.6.1.1.2 β -Amilazlar (E.C. 3.2.1.2)	25
3.6.1.1.3 Amiloglikozidazlar (Glikoamilazlar) (E.C. 3.2.1.3).....	26
3.6.1.1.4 α -Glukozidazlar (E.C. 3.2.1.20)	26
3.6.1.1.5 Siklodekstrin Glukanotransferaz (CGTazlar) (E.C. 2.4.1.19)	26
3.6.2 Pullulan ve Pullulanazlar	26
3.6.2.1 Pullulanın Hidrolizi	27
3.6.2.2 Pullulanın Kullanım Alanları	27
3.6.2.3 Pullulanazlar (E.C. 3.2.1.41).....	28
3.7 Enzim İmmobilizasyonu.....	32
3.7.1 Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....	33
3.7.1.1 Bağlama Yöntemleri.....	33
3.7.1.2 Tutuklama Yöntemleri.....	35
3.7.2 Çözünür Formda İmmobilizasyon.....	37
3.7.3 İmmobilizasyon Yöntemi Seçimi	37

3.7.4	İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	38
4.	ASPERGILLUS NIGER.....	39
5.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	41
6.	MATERYAL ve METODLAR	45
6.1	Deneysel Çalışmadan Kullanılan Materyaller	45
6.1.1	<i>Aspergillus niger</i>	45
6.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
6.1.3	Kullanılan Cihazlar	47
6.2	Kullanılan Metotlar	47
6.2.1	Kültür Ortamı.....	47
6.2.1.1	Saf Kültür Ortamı	48
6.2.1.1.1	Spor Çözeltinin Hazırlanması.....	48
6.2.1.2	Enzim Üretim Ortamı	48
6.2.2	Pullulanaz Aktivitesinin Tayini	49
6.2.3	Enzim Aktivitesinin Hesaplanması	50
6.2.3.1	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması	50
6.2.4	Glukoz Standart Eğrisinin Çizilmesi	51
6.2.5	Protein Miktarının Belirlenmesi.....	52
6.2.5.1	Protein Miktarının Hesaplanması	52
6.2.6	Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi	52
6.2.7	Kültür Ortamında Pullulanaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi.....	53
6.2.7.1	Farklı Konsantrasyonlardaki Farklı Substratların Pullulanaz Üretimine Etkisinin Saptanması	53
6.2.7.2	Pullulanaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması	54
6.2.7.3	pH'ın Pullulanaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	54
6.2.7.4	Sıcaklığın Pullulanaz Üretimine Etkisinin Saptanması	54
6.2.8	Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması	54
6.2.8.1	<i>A. niger</i> 'den Pullulanaz Eldesi	54
6.2.8.1.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	55
6.2.8.1.1.1	<i>A. niger</i> Pullulanazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Bulunması	55
6.2.8.1.1.2	<i>A. niger</i> Pullulanazının % 60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi	55
6.2.9	Kısmi Olarak Saflaştırılmış <i>A. niger</i> Pullulanazının Karakterizasyonu	56
6.2.9.1	Pullulanazın Substrat Spesifikliğı	56
6.2.9.2	Pullulanazın Aktivitesine pH Etkisi	56
6.2.9.3	Pullulanazın Aktivitesine Sıcaklık Etkisi	56
6.2.9.4	Pullulanazın K_m ve V_{max} Değerleri.....	57
6.2.10	<i>A. niger</i> Pullulanazının İmmobilizasyonu.....	57
6.2.10.1	Pullulanaz Enziminin Cam Boncuklara İmmobilizasyonu	57
6.2.10.2	Pullulanaz Enziminin PEG İçeren Kitosan Boncuklara İmmobilizasyonu.....	58
6.2.10.3	İmmobilize <i>A. niger</i> Pullulanazının Karakterizasyonu.....	58
6.2.10.3.1	İmmobilize Pullulanazın Aktivitesine pH Etkisi.....	58
6.2.10.3.2	İmmobilize Pullulanazın Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	58
6.2.10.3.3	İmmobilize Pullulanazın K_m ve V_{max} Değerleri	58

7.	SONUÇLAR	59
7.1	Kültür Ortamında Pullulanaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi	59
7.1.1	Nişastanın Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi.....	59
7.1.2	Amilopektinin Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi.....	60
7.1.3	Dekstrinin Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi.....	61
7.1.4	Pullulanın Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi	62
7.1.5	pH'ın Pullulanaz Üretimine Etkisi	63
7.1.6	Sıcaklığın Pullulanaz Üretimine Etkisi.....	65
7.2	Kısmi Olarak Saflaştırılmış Pullulanaz Enziminin Karakterizasyonu	66
7.2.1	Pullulanazın Substrat Spesifikliğı.....	66
7.2.2	Pullulanaz Aktivitesine pH Etkisi	67
7.2.3	Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	68
7.2.4	Pullulanazın K_m ve V_{max} değerleri.....	69
7.3	Pullulanaz Enziminin İmmobilizasyonu	70
7.3.1	Pullulanaz Enziminin Cam Boncuklara İmmobilizasyonu	70
7.3.2	Pullulanaz Enziminin PEG İçeren Kitosan Boncuklara İmmobilizasyonu	71
7.3.3	İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine pH Etkisi.....	71
7.3.4	İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	72
7.3.5	İmmobilize Pullulanazın K_m ve V_{max} Değerleri	73
8.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	75
	KAYNAKLAR.....	78
	ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGE LİSTESİ

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
g	gram
L	litre
mL	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
M	Molar
N	Normalite
A	Absorbans
U	Ünite
M_G	Moleküler Ağırlık
mg	miligram
R^2	Regresyon katsayısı
C	Konsantrasyon
α	Alfa
β	Beta
K_m	Enzimin substrata olan ilgisi
V_{max}	Enzimin maksimum hızı
amy	Amilaz enzimi geni transkripsiyon faktörü
gla	Glukoamilaz enzimi transkripsiyon faktörü

KISALTMA LİSTESİ

GH	Glikohidrolaz
BSA	Bovine Serum Albumin
ATP	Adenozintrifosfat
ADPG	Adenozin 5'-difosfatglukoz
UDPG	Uridin 5'-difosfatglukoz
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
DEAE	Dietilaminoetil
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
DE	Dekstroz Eşdeğerliği
DNS	Dinitrosalisilikasit
PEG	Polietilenglikol

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1	Enzimin yapısı..... 11
Şekil 3.2	Anahtar- kilit modeli 12
Şekil 3.3	İndüklenmiş uyum modeli 13
Şekil 3.4	Enzimin substrat karşısındaki durumu 13
Şekil 3.5	Substrat konsantrasyonunun enzim reaksiyon hızına etkisi 15
Şekil 3.6	Lineaweaver-Burke grafiği 18
Şekil 3.7	Enzimatik reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi..... 19
Şekil 3.8	Disakkaritlerin oluşumu..... 21
Şekil 3.9	α -glikozidik bağ..... 21
Şekil 3.10	β -glikozidik bağ..... 22
Şekil 3.11	α ve β bağlarının gösterimi 22
Şekil 3.12	Glikozidik bağın asit ile hidrolizi 22
Şekil 3.13	Amiloz ve amilopektin 22
Şekil 3.12	Nişastanın amilolitik enzimlerle hidrolizi..... 23
Şekil 3.15	Pullulan 26
Şekil 3.16	Ticari olarak kullanılan pullulan 28
Şekil 3.17	Enzim immobilizasyon yöntemleri..... 33
Şekil 3.18	Çapraz bağlama yöntemi 35
Şekil 3.19	Mikrokapsülleme tekniği..... 38
Şekil 4.1	Siyah <i>Aspergillus</i> 'un aseksüel ve paraseksüel yaşam döngüsü 40
Şekil 6.1	Glukozun yükseltgenmesi..... 49
Şekil 6.2	Glukoz standart eğrisi..... 51
Şekil 6.3	Protein standart eğrisi 53
Şekil 6.4	Diyaliz 56
Şekil 7.1	Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı nişastanın konsantrasyonuna göre değişimi..... 59
Şekil 7.2	Karbon kaynağı nişastanın farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi..... 60
Şekil 7.3	Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı amilopektinin konsantrasyonuna göre değişimi..... 60
Şekil 7.4	Karbon kaynağı amilopektinin farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi..... 61
Şekil 7.5	Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı dekstrinin konsantrasyonuna göre değişimi 61
Şekil 7.6	Karbon kaynağı dekstrinin farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi..... 62
Şekil 7.7	Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı pullulanın konsantrasyonuna göre değişimi 62
Şekil 7.8	Karbon kaynağı pullulanın farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi..... 63
Şekil 7.9	Pullulanaz üretiminin farklı pH değerlerine göre değişimi 64
Şekil 7.10	Farklı pH değerlerinde pullulanaz üretiminin spesifik aktiviteye etkisi..... 64
Şekil 7.11	Pullulanaz üretiminin farklı sıcaklık değerlerine göre değişimi 65
Şekil 7.12	Farklı sıcaklık değerlerinde pullulanaz üretiminin spesifik aktiviteye etkisi 66
Şekil 7.13	Pullulanaz aktivitesinin farklı substratlara göre değişimi..... 67
Şekil 7.14	Farklı substratların pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi..... 67
Şekil 7.15	Pullulanaz aktivitesinin farklı pH değerlerine göre değişimi 68

Şekil 7.16	Farklı pH değerlerinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi.....	68
Şekil 7.17	Pullulanaz aktivitesinin farklı sıcaklıklara göre değişimi.....	69
Şekil 7.18	Farklı sıcaklıkların pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi.....	69
Şekil 7.19	<i>A. niger</i> pullulanaz aktivitesine substrat konsantrasyonu etkisi.....	70
Şekil 7.20	İmmobilize pullulanaz aktivitesinin farklı pH değerlerine göre değişimi.....	72
Şekil 7.21	Farklı pH değerlerinin immobilize pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi	72
Şekil 7.22	İmmobilize pullulanaz aktivitesinin farklı sıcaklık değerlerine göre değişimi....	73
Şekil 7.23	Farklı sıcaklık değerlerinin immobilize pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi..	73
Şekil 7.24	İmmobilize <i>A. niger</i> pullulanaz aktivitesine substrat konsantrasyonu etkisi.....	74

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Enzimlerin elde edildiği mikroorganizma kaynakları	9
Çizelge 3.1 Enzimlerin isimlendirilmesi	20
Çizelge 3.2 Pullulanazların sınıflandırılması.....	29
Çizelge 3.3 Farklı cins mikroorganizmalara ait pullulanazların optimum şartları	30
Çizelge 3.4 Pullulanaz enziminden farklı substratların varlığında elde edilen ürünler	31
Çizelge 3.5 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar	34
Çizelge 3.6 İmmobilize mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler	37
Çizelge 6.1 Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	46
Çizelge 6.2 Glukoz standart eğrisi için absorbans değerleri	51
Çizelge 6.3 Protein absorbans değerleri.....	53
Çizelge 7.1 Pullulanaz enziminin cam boncuklara immobilizasyonu	71
Çizelge 7.2 Pullulanaz enziminin PEG içeren kitosan boncuklara immobilizasyonu	71

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı değerli fikirleriyle yönlendiren, çalışmalarım sırasında beni destekleyen tez danışmanım Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e, çalışmam süresince bilgilerini benimle paylaşan, hiçbir yardımdan kaçınmayan, manevi olarak da destek olan Araş. Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ'a, yüksek lisans eğitimimi yaptığım Biyokimya Bölümü tüm saygıdeğer Öğretim Üyelerine, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Aspergillus niger filamentli bir küf mantarıdır. Endüstride sitrik asit, oksalik asit gibi organik asit eldesinde yaygın olarak kullanılır. Glukozidaz, galaktozidaz ve daha birçok hidrolitik enzim *Aspergillus niger*'den indüksiyon yoluyla elde edilir.

Pullulanaz (pullulan 6-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.41) pullulan, amilopektin ve β -limit dekstrinde, α -1,6 glikozidik bağlarını hidrolizleyen bir enzimdir. Şeker şuruplarının üretimi için nişasta işleme endüstrisinde diğer amilolitik enzimlerle (α -amilaz, β -amilaz, glukoamilaz) birlikte kullanılır. Pullulanazın kullanıldığı hidroliz oldukça hızlı olmasından dolayı tercih edilmektedir.

İmmobilizasyon enzim teknolojisinin en eski ve en pratik tekniklerinden birisidir. İmmobilizasyon biyolojik olarak aktiviteye sahip maddelerin katalitik aktivitelerini kaybetmeksizin defalarca ve sürekli kullanılması amacıyla çeşitli desteklere yerleştirilmesidir. İmmobilize enzimler, gıda sanayinde, klinikte ve endüstriyel alanda pek çok uygulama alanı bulurlar.

Bu çalışmada *Aspergillus niger* küf mantarı optimum koşullarda inkübe edilerek kısmi olarak saflaştırıldı ve enzime ait optimum pH, sıcaklık değerleri, substrat spesifikliğı, % 0,5-2,5 konsantrasyonlarında substrat ile kinetik parametreler K_m , V_{max} değerleri incelendi. Optimum koşullar belirlendikten sonra enzim uygun taşıyıcılara immobilize edildi ve immobilize enzime ait optimum pH, sıcaklık değerleri, % 0,5-2,5 konsantrasyonlarında substrat ile immobilize enzime ait kinetik parametreler K_m , V_{max} değerleri incelendi.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus niger*, pullulanaz, optimizasyon, immobilizasyon.

ABSTRACT

Aspergillus niger is a filamentous fungus. This fungus could be used generally to produce organic acids like citric acid, oxalic acid. Glycosidase, galactosidase and many numbers of hydrolytic enzymes are obtained from *Aspergillus niger* with induction method.

Pullulanase (pullulan-6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.41) is an enzyme that hydrolyzes α -1,6 glycosidic linkages in pullulan, amylopectin and β limit dextrin. Pullulanase is used with other amylolytic enzymes (α -amylase, β -amylase, glucoamylase) in starch hydrolyzing industry. It's preferable to use pullulanase in starch hydrolysis as a result of quickness.

Immobilization is one of the oldest and practical techniques in enzyme technology. Immobilization means to place various supports to materials which have biological functions. Immobilized enzymes have numbers of application in food industry, clinics and industrial places.

In this study, the pullulanase induction was studied using *Aspergillus niger*. For this purpose, the fungus was incubated at appropriate culture media to determine optimum culture conditions. Enzyme was partially purified from culture broth and then characterized for appropriate pH, temperature, substrate concentration and substrate specificity. Kinetic parameters was also determined. Afterwards, the purified enzyme was immobilized to suitable supporters. Characterization and kinetic properties were investigated for the immobilized enzyme.

Key words: *Aspergillus niger*, pullulanase, optimization, immobilization.

1. GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks moleküllerdir.

Günümüzde enzimler, süt ürünlerinin üretiminde, biracılıkta, etlerin işlenmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında, fruktoz şurubu üretiminde kullanımlarıyla gıda sektöründe, protein ve yağ artıklarını parçalamak üzere deterjan endüstrisinde, deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırarak tekstilde, teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen enzimlere göre katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması, daha stabil ve daha ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir.

Mikrobiyal enzimler arasında en yaygın olarak kullanılanlar α -amilaz, glukoamilaz, glukoizomeraz ve proteazlardır.

Bu çalışmada hidrolitik bir enzim olan pullulanaz enziminin *Aspergillus niger* tarafından indüklenmesi incelenmiştir. Pullulanazlar, pullulanı hidroliz eden bir çeşit glukanazdır. Substrat molekülünün sadece α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterdikleri için "sınır dekstrinazlar" olarak da adlandırılırlar. Pullulan haricinde nişastanın dallanma noktalarını da parçalarlar. Böylece pullulanazlar nişasta parçalayıcı enzim adını alırlar. Pullulanazların gıda endüstrisinde nişasta hidrolizinde kullanılması, prosesi daha verimli hale getirir. Bu tür enzim ilk defa *Klebsiella* türü mikroorganizmalarda keşfedilmiştir.

Mikroorganizmalar yardımı ile enzim üretimi birçok faktör tarafından etkilenir. Besi ortamının kompleks kimyasal bileşimi, indüksiyon ve represyon gibi iç faktörler yanında pH ve oksijen temini gibi dış faktörler de enzim verimi için önemlidir. Bu tezle gerçekleştirilen çalışmada pullulanaz enziminin *Aspergillus niger*'den indüklenmesi için gereken optimum karbon kaynağı çeşidi, optimum karbon kaynağı konsantrasyonu, optimum sıcaklık, optimum pH ve optimum inkübasyon süresi bulunmuştur.

A. niger pullulanaz enzimine sırasıyla santrifüj, amonyum sülfat çöktürmesi ve tampona karşı diyaliz işlemleri uygulanarak enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır.

Enzimlerin etkinliğini, dolayısıyla kimyasal tepkimelerin hızını artıran veya azaltan pek çok faktör vardır. Bu faktörler; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, su aktivitesi, reaksiyon süresi, reaksiyon ürünleri, enzim inhibitörleri ve aktiviteleri, radyasyon,

basınç, kaynama güçleri ve ışık gibi çeşitli fiziksel faktörler ve hormonlar şeklinde sıralanabilir. Sıcaklık, enzimlerin hem hızını hem de stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Her enzimin optimum çalıştığı bir sıcaklık değeri aynı zamanda optimum bir pH değeri vardır.

Bu çalışmada kısmi olarak saflaştırılan *A. niger* pullulanaz enziminin aktivitesini etkileyen optimum sıcaklık, optimum pH değerleri belirlenmiştir. Ayrıca en yüksek enzim aktivitesini sağlayacak substrat kaynağı incelenmiş; pullulanaz enziminin substrata olan ilgisi araştırılmış ve K_m , V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler. İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlüklerini özetlemek gerekirse immobilize enzimler reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz, çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır, birçok kez ve uzun süre kullanılabilir, sürekli işlemlere uygulanabilir, doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.

Bu çalışmada kısmi olarak saflaştırılan *Aspergillus niger* pullulanazı farklı adsorbanlara immobilize edilmiş ve immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. İmmobilizasyon sonucunda enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Bu çalışmada immobilize pullulanazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık, pH değerleri araştırılmış; immobilize pullulanazın substrata olan ilgisi K_m , V_{max} değerleri hesaplanmıştır. İmmobilize pullulanaz ile kısmi olarak saflaştırılmış serbest pullulanaza ait optimizasyon sonuçları karşılaştırılmıştır.

2. ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ OLAN MİKROORGANİZMALAR

Mikroorganizmalarla elde edilen ürünlere baktığımızda endüstride mikroorganizmaların ne kadar önemli bir yer tuttuğunu görürüz. Ucuz ve kolay elde edilmeleri, çok farklı endüstri dallarında kullanılabilir olmaları ayrıca hızlı üremeleri nedeniyle endüstride mikroorganizmalarla çalışmak tercih edilir (Ataç ve Peksel, 2006).

Bakteriler, mantarlar ve mayalar endüstride kullanılan önemli mikroorganizmalardandır.

Bakteriler küresel, spiral ve çubuk olmak üzere üç morfolojik şekilde bulunurlar. Bakterilerde membran ile çevrili bir hücre çekirdeği görülmez. Monera alemi oluşturana prokaryot canlıların en yaygın ve en çok bilinen grubu bakterilerdir. O kadar yaygındırlar ki bugün dünyamızda bakterinin bulunmadığı yer yoktur diyebiliriz. En çok organik atıkların bol bulunduğu yerlerde ve sularda yaşarlar.

Mantarlar fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Görünüm bakımından mantarlar iki tür yapı gösterirler. Bir kısmı çok hücreli ipçikler oluşturarak gelişirler. Küfler bu çeşit mantarlardır. Bir kısmı ise tek hücreler şeklinde üremek suretiyle bir bakıma bakterilerin görünümüne benzerlik gösterirler. Maya diye adlandırılan mantarlar bu biçimdedirler.

Mayalar doğada çok yaygın olarak bulunurlar, ökaryotik canlılardır. Oval ya da silindirik şekilde bulunurlar; eşeyli ve eşeysiz şekilde çoğalabilirler. Şarap, bira ve ekmek endüstrisi mayaların en yaygın biçimde kullanıldığı klasik fermentasyon işlemleridir.

Maya çeşitleri ile beraber birçok mantar türü de endüstride kullanılmaktadır. Mantarlar besin maddeleri üzerinde beyaz ya da renkli görünüşleri ile dikkat çekerler. Küf mantarları, kendileri sentez yapamadıkları için daha önce oluşmuş organik maddelere gereksinim duyarlar. Karbon kaynağı olarak organik bileşikler (asetil, asit, glikoz), amonyum azotu, nitrat ve nitrit azotlarını kullanabilirler. Küf mantarları aerob olduklarından yüzeyde gelişirler. Fermentasyon teknolojisinde çok önemli yerleri vardır (Bilgehan, 2008).

2.1 Mikrobiyal Enzim Üretimi

Enzimler bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir. Bazı özel uygulamalar için bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler özel önemlerini korumakla birlikte son 30 yıldan beri teknik uygulamalar için mikrobiyal kaynaklar ağırlık kazanmaya başlamıştır. Enzimlerin mikrobiyolojik yolla üretilmesinde genellikle derin kültür tekniği ve aerobik karıştırmalı tank tipi biyoreaktörler kullanılır.

Mikroorganizmalar yardımı ile enzim üretimi birçok faktör tarafından etkilenir. Besi ortamının kompleks kimyasal bileşimi, indüksiyon ve represyon gibi iç faktörler yanında pH ve oksijen temini gibi dış faktörler de enzim verimi için önemlidir. Mikroorganizma seçimi bir başka önemli konudur. Seçilen mikroorganizma kısa sürede yüksek verimle enzim üretebilmeli, toksik madde ve antibiyotik üretmemeli, ucuz besi ortamında rahatlıkla çoğalabilmeli, gerek enzim üretimi sırasında gerekse izolasyon ve saflaştırma işlemleri sırasında problem oluşturacak yan ürünler üretmemelidir.

Enzimlerin üretiminde yararlanılan besi ortamları genellikle kompleks karbon ve azot maddelerinin karışımıdır. Besi ortamı karbon ve enerji kaynağı içermek zorundadır. Çoğu kez ortama mineraller ve bazı büyüme faktörleri de eklenir. Eğer indüklenen bir enzim üretilecekse ortamda indüktör bulunmalı fakat repressör bulunmamalıdır. Substratlar genellikle indüktör etkiye sahiptir. Örneğin amilaz için nişasta, üreaz için üre indüktör etkiye sahiptir. Bazı substratlar düşük konsantrasyonda indüktör, yüksek konsantrasyonda repressör olarak etki gösterebilir. Substratların çok yavaş parçalanabilen türevleri güçlü bir indüktif etkiye sahiptir (invertaz için sakkarozpalmitat). Koenzimlerde indüktör olarak etki gösterebilirler. Örneğin tiamin, pirüvat karboksilaz verimini artırmaktadır. Bazı durumlarda üretilecek enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünü enzim için indüktör etkiye sahip olabilmektedir (β -amilaz üretiminde maltodekstrin ve pullulanaz üretiminde maltoz). Bazı enzimler için ise tamamen ters bir etki söz konusu olup ürünler repressör etki gösterirler. Katabolik represyon olarak adlandırılan bu etkiyi ortadan kaldırmak için şu önlemler alınabilir.

1. Glukoz gibi kolay değerlendirilen substratlarca zengin besi ortamlarından kaçınılması,
2. Represif etkili maddenin besi ortamındaki konsantrasyonunun düşürülmesi,
3. Büyüme faktörlerinin konsantrasyonu ve sıcaklık düşürülerek veya zayıf toksik etkili maddelerin ilavesi ile büyüme hızının düşürülmesi.

Katabolik represyon durumunda karbon kaynağı seçimi çok kritiktir. Glukoz gibi kolay değerlendirilebilen madde durumunda, fermentör ortamındaki glukoz konsantrasyonu düşük tutulmalıdır. Bu ise azar azar ama sürekli glukoz ilavesiyle sağlanır. Enzim veriminde azot kaynağının (amonyak, nitrat veya organik azot bileşikleri) doğru seçilmesi ve mineral ile iz elementler arasındaki oran da önemlidir. Besi ortamının optimizasyonunda ortam bileşenleri, üretimden sonra enzimin saflaştırılmasını en az etkilemeli ve fermentasyon sonunda büyük ölçüde tüketilmelidir [1].

2.1.1 Mikroorganizmaların Gelişme Koşulları

Mikroorganizmalar için hazırlanacak besi ortamının bileşimi belirli bir mikroorganizmanın gelişmesi, üremesi ve fizyolojik yaşamlarını sürdürebilmeye yetecek nitelikte gerekli maddeleri içermelidir. Mikroorganizma besinleri genel olarak şu temel gruplara ayrılır:

- 1) Karbon, hidrojen, oksijen ve azot gibi mikroorganizma yapısının temelini oluşturan elementleri sağlayan besinler,
- 2) Temel elementlere kıyasla ikinci derecede önemi olan fosfor, potasyum, kükürt, magnezyum gibi elementleri sağlayan besinler,
- 3) Vitamin gibi metabolizmada çeşitli görevleri olan özel maddeleri sağlayan besinler,
- 4) İz elementler (Ataç ve Peksel, 2006).

Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun damıtma veya deiyonizasyon ile taze hazırlanmış olması, başta bakır olmak üzere toksik metalleri içermemesi gerekir. İyon değiştirici reçineden geçirilerek elde edilen deiyonize (demineralize) su kullanıldığında bunun içinde yüksek sayıda mikroorganizma bulunabileceği dikkate alınmalıdır. Damıtık (destile) su için en ideali, cam sistemlerden elde edilen suyun kullanılmasıdır.

Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. Bu terim ilk kez R. Koch'un çalışma arkadaşlarından Nægeli tarafından 1880 yılında kullanılmıştır. Nægeli, kemoorganotrof mikroorganizmaların kısmen parçalanmış (hazmedilmiş, sindirilmiş) protein içeren besiyerinde iyi geliştiklerini açıklayan ilk bilim adamıdır.

Yaşayan tüm hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da azot, karbon, tuzlar ve diğer besin maddelerine gereksinim duyarlar. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz. Bu nedenle azotlu bileşikleri, çok daha kolay kullanabildikleri protein hidrolizatlarından sağlar.

Peptonlar sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür. Peptonlar, birçok ticari firma tarafından çeşitli hayvansal dokulardan, süttten ve soyadan farklı yöntemlerle elde edilir ve farklı ticari isimlerle pazarlanır veya dehidre besiyerleri içine katılır.

Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle yüksek B kompleks vitamini konsantrasyonu sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar. Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbonhidratlar ve mineraller nedeniyle pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır. Karbonhidrat içermesi nedeniyle karbonhidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılmaz.

Et ekstraktı (et özütü, meat extract), genellikle yağı ve tendonları ayrılmış, ekstraksiyon öncesi hafifçe hidrolize edilmiş etten elde edilir. Karbonhidrat içermez. Bu nedenle karbonhidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir. Çeşitli besiyerlerinde et peptonlarının yerini alabilir.

Malt ekstraktı (malt özütü, malt extract), biralık arpanın çimlendirilmesi ve kavrulması ile elde edilen malttan üretilir. Başta maltoz olmak üzere, çeşitli karbonhidratların yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak maya ve küflerin geliştirilmesi için kullanılır. % 1,7 konsantrasyondaki çözeltisi maya ve küflerin geliştirilmesi için uygun bir besiyeridir. Gerekirse bu çözelti çeşitli peptonlar ile desteklenebilir veya asitlendirilebilir ya da agar ve pepton eklenerek malt ekstrakt agar şeklinde katı besiyeri olarak kullanılabilir.

Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract) streptokoklar, pneumokoklar, meningokoklar, gonokoklar vb. gibi zor gelişen (fastidious) patojen bakterilerin geliştirilmesi için Brain Heart Broth ve Brain Heart Infusion gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır. Ayrıca çeşitli toksin testleri için patojenlerin bu besiyerinde geliştirilmesi önerilmektedir.

Agar, besiyerlerinin katı hale getirilmesi için en çok kullanılan jelleştiricidir. Çoğu kez diğer agarlı besiyerleri ile karıştırılmaması için "agar agar" olarak anılır. Agar bir poligalaktosid olup bazı kırmızı deniz yosunlarından (*Gelidium*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia*, *Pterocladia* türleri) elde edilir. Agar, besiyeri bileşimine sadece jelleştirici olarak katılır. Uzun ve dallanmış zincir yapısı nedeniyle (birkaç istisna dışında) mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılamaz.

Karbonhidratlar, bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılırlar. Besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbonhidratlar glukoz, laktoz ve sakkarozdur. Bunlardan glukoz pek çok bakteri tarafından kullanılabilirdiği için, daha çok genel besiyeri bileşimlerinde yer alır.

Koliform grubu bakterilerin geliştirileceği besiyerlerinin hemen hepsinde karbon kaynağı olarak laktoz kullanılır. Koliformların analizi için hazırlanmış sıvı besiyerlerinde laktozdan gaz oluşumu bu grup için belirleyicidir.

Nişasta kullanımı (hidrolizi) bazı bakteriler için tipik olduğundan çeşitli özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

Genel olarak karbohidratların çözelti halinde filtrasyon ile sterilize edilmesi önerilir. Çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan glukoz, laktoz, sakkaroz gibi şekerler besiyeri ile birlikte otoklavda da sterilize edilebilir.

Aksine bir belirtme yoksa "tuz" denilince sodyum klorür anlaşılır. Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. % 0,85 NaCl, serum fizyolojik adı ile seyreltme çözeltisi olarak yaygın olarak kullanılır.

Mikroorganizmalar genel olarak nötr ve nötre yakın pH'larda iyi gelişir. Bazı mikroorganizmalar alkali pH'ları yeğlerken (örneğin *Rhizobium* bakterileri), bazıları (örneğin mayalar, küfler, asidofilik bakteriler) asidik ortamları severler. Tampon (buffer) olarak en çok kullanılan maddeler, fosfatlar (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , β gliserofosfat), karbonatlar, asetatlar ve sitratlardır.

Selektif besiyeri bileşimlerinde, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini baskılayan çeşitli inhibitör maddeler kullanılır. İnhibitör maddelerin etki şekilleri çok farklıdır ve güçleri konsantrasyonlarına bağlıdır. İnhibitör olarak kullanılan maddenin görevi, istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini önlemek iken, gelişmesi istenen mikroorganizma için inhibitör etki yapmaması gerekir.

Besiyerlerine çeşitli amaçlarla katılan ve yukarıdaki gruplara girmeyen daha pek çok madde vardır. Bunlardan bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

İnaktivatör olarak lesitin, sistein, Tween 20, Tween 80 gibi maddeler başta ilaç ve kozmetik endüstrisinde ham madde, ara ürün ve son ürünlerindeki çeşitli antimikrobiyal maddeleri inaktive ederek bu gibi ürünlerde bulunması olası mikroorganizmaların belirlenmesini sağlarlar.

Stimülatörler (gelişmeyi teşvik ediciler), analiz edilen örnekte gelişmesi istenen mikroorganizmayı teşvik etmek amacıyla besiyeri bileşimine katılan maddelerdendir. Bunlar arasında vitaminler, glisin, piruvat, Tween 80 ve çeşitli elementler ilk akla gelenlerdir.

Besiyerleri içinde gelişmesi istenen mikroorganizmanın kullanabileceği, diğerleri için besin maddesi olarak yararlanılmayacak çeşitli maddeler yer alabilir. Bunlara en tipik örnek azot kaynağı olarak nitrat (NO_3) kullanılmasıdır. Özel besin maddeleri olarak nişasta ve glutamat da kullanılabilir.

Anaerobik ortam oluşturmak için indirgeyici adı verilen çeşitli maddeler kullanılır. Bunlar arasında ilk akla gelen thioglycollate'tır (Halkman, 2005).

Çizelge 2.1 Enzimlerin elde edildiği mikroorganizma kaynakları [1]

ENZİM	KULLANIM ALANI	MİKROORGANİZMA
α -amilaz	Maltoz ve dekstrinin yıkılması Leke çıkarıcı Glukoz şurubu	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>B. licheniformis</i>
β -glukanaz	β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması	<i>A. oryzae</i> <i>B. subtilis</i>
Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önlemek için	<i>A. niger</i>
Selülaz	Deterjan katkı maddesi Atıkların değerlendirilmesi	<i>Penicillium spp.</i>
Glikoz izomeraz	Glukoz, Fruktöz dönüşümü	<i>Streptomyces spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>
Glikoz oksidaz	Biyosensör	<i>A. niger</i>
Laktaz	Peynir altı suyu Laktozsus gıda üretimi	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Lipaz	Deterjan katkı maddesi Yağların parçalanması	<i>A. oryzae</i>
Pektinaz	Meyve suyu ekstraksiyonu Şarap ve meyve suyu berraklaştırılması	<i>Erwinia spp.</i>
Proteaz	Deterjan katkı maddesi Deri Endüstrisi, et ekstraksiyonu	<i>B. Subtilis</i>

3. ENZİM

Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks moleküllerdir. Enzimler son derece özgün olup birbirinin aynısı olan enantiomerleri bile ayırt edebilirler.

Enzimler in vitro koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmaların bu proteinleri bol miktarda üretmeleri sonucu izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Günümüzde enzimler, süt ürünlerinin üretiminde, biracılıkta, etlerin işlenmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında, fruktoz şurubu üretiminde kullanımlarıyla gıda sektöründe, protein ve yağ artıklarını parçalamak üzere deterjan endüstrisinde, deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırarak tekstilde, teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar.

Enzimler bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir (Telefoncu, 1997).

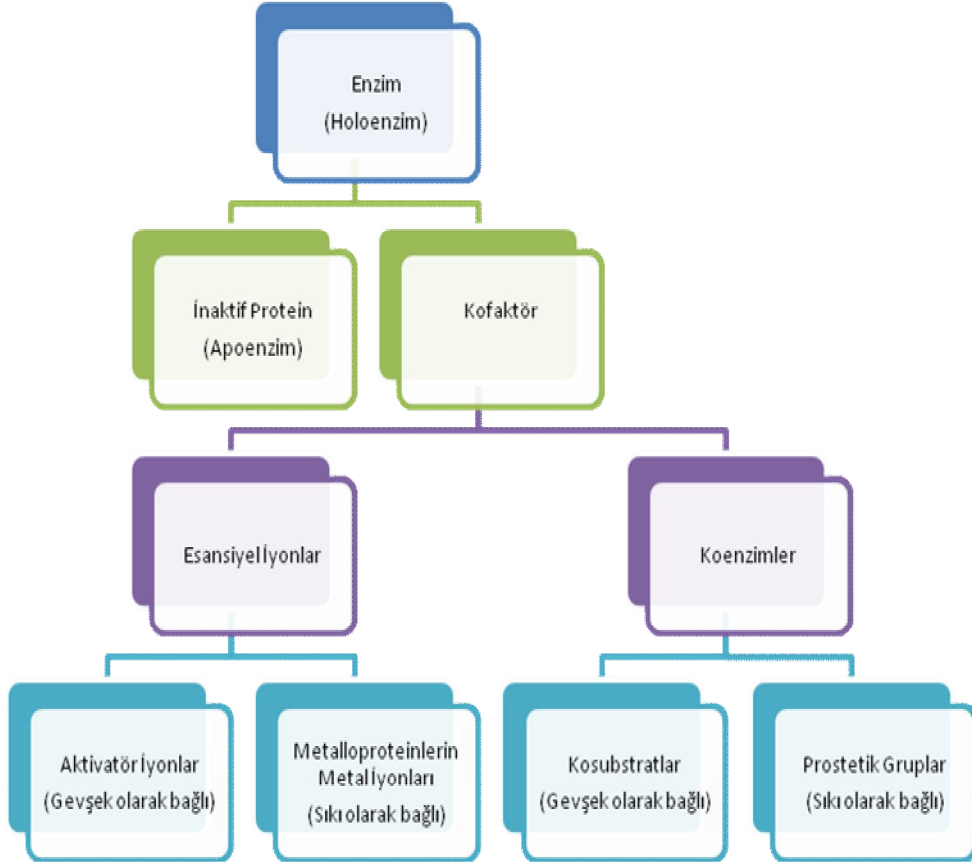
3.1 Enzimlerin Yapısı

Bütün enzimler protein yapısında bulunmaktadır, bu şarta uymayan tek biyolojik katalizör RNA molekülüdür. Protein yapısında bulunan enzimler doğal olarak bu yapının özelliklerini taşırlar. Bazı proteinler tersiyer yapı (α -heliks, β plakalı ve tabakalı ile tesadüfi kırılma ve bükülmelerin kombinasyonu olan üç boyutlu yapı) kazandıktan sonra iki veya daha fazla polipeptid zinciri ile bir araya gelerek daha ileri bir yapısal organizasyona gitmektedir. Bu ortak yapıda bulunan her bir protein birimine subunit veya monomer denir. Pek çok protein ancak bu yapıyı kazandıktan sonra fonksiyonel hale gelmektedir. Enzim proteinlerinde de polipeptid, sekonder, tersiyer ve bazı hallerde de kuaterner yapı gösterir. İki veya daha fazla monomerdan meydana gelmiş enzim moleküllerinin alt birimleri daha üst yapılar meydana getirmek üzere belli bir düzen dahilinde bir araya gelirler ve kuaterner yapıyı meydana getirirler. Enzim molekülleri genellikle bu formda bulunurlar. Tek bir polipeptid zincirinden meydana gelmiş enzim sayısı azdır. Örneğin heksokinaz 2, adenilat siklaz 3 monomere sahiptir. Enzimlerde bu protein kısmından başka protein olmayan ve kofaktör denilen bir kısım bulunur. Kofaktörler birçok enzimin katalitik aktivite gösterebilmesi için gerekli olan maddelerdir.

Kofaktörler inaktif olan protein yapısındaki apoenzimlerin, aktif holoenzime çevrilmesi için gerekli kimyasal maddelerdir. Bunlar esansiyel iyonlar ve koenzimler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Esansiyel iyonlar da ikiye ayrılırlar:

a. Aktivatör iyonlar: Enzime gevşek olarak bağlı olup, genellikle substratla bağlanmaya katılırlar.

b. Metal iyonları: Enzime sıkı olarak bağlıdır ve katalitik reaksiyona direkt olarak katılırlar. Enzimin koenzimleri ise kosubstratlar ve prostetik gruplar olmak üzere ikiye ayrılırlar.



Şekil 3.1 Enzimin yapısı

Bazı enzimlerde bulunan metal iyonları şunlardır: Cu tirozinaz, sitokrom oksidaz, Fe katalaz.

Koenzimler yapılarının bir parçası olarak vitamin ihtiva ederler. Koenzimler genellikle enzimatik reaksiyonun tamamında elektronların, özel atomların ve fonksiyonel grupların transferinde ara taşıyıcı olarak rol oynarlar (Kalaycıoğlu vd., 2006).

3.2 Enzimlerin Spesifikliği

Enzimlerin spesifikliği veya özgülüğü, katalize ettikleri belirli reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Enzimler için çeşitli spesifiklikler (özgüllükler) tanımlanmıştır:

1) Mutlak spesifiklik: Bir enzimin, yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etmesi özelliğidir. Enzimlerin çoğu mutlak spesifiklik gösterirler.

2) Grup spesifikliği: Bir enzimin, benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyonlaşması özelliğidir. Örneğin glukozidazlar glukozidler üzerine, alkol dehidrojenaz ise alkol üzerine etkilidir.

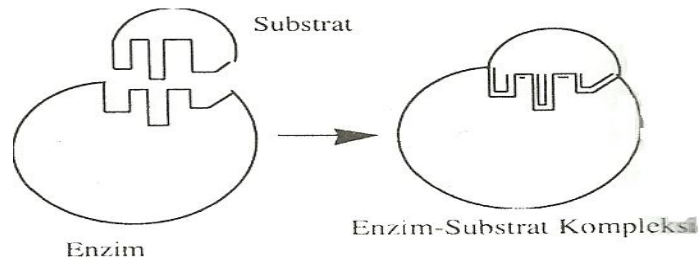
3) Bağ spesifikliği: Bir enzimin proteinlerin peptid bağı, karbohidratların glikozidik bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir. Kimotripsin, peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli bir enzimdir; etkili olduğu bağlar ise aromatik halkalı amino asitlerin oluşturduğu peptid bağlarıdır.

4) Stereospesifiklik: Bir enzimin yalnızca glukozun D veya L izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olması özelliğidir. Örneğin maltaz, α -glukozidlere etkili fakat β -glukozidlere etkili değildir.

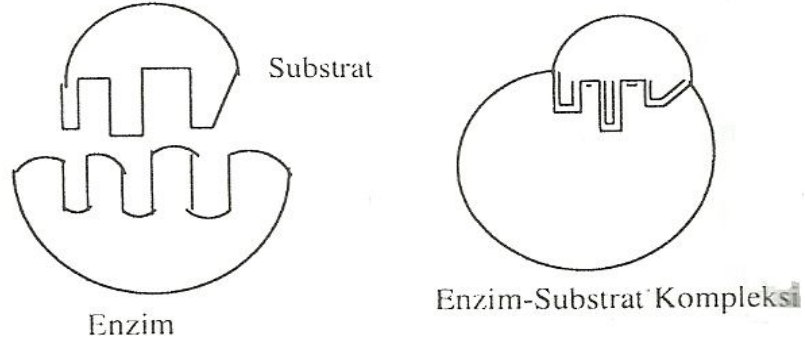
Hücre içindeki çeşitli metabolik aktiviteler hücrenin farklı organellerinde gerçekleşmektedir. Buna göre enzimlerin hücre içi dağılımları da çeşitlilik gösterir. Örneğin glikoliz olayı hücrenin sitoplazmasında, solunum zinciri ise mitokondrilerde gerçekleşir; dolayısıyla glikolizde görevli enzimler sitoplazmada, solunum zincirinde görevli enzimler ise mitokondride lokalizedirler. Hücrenin çeşitli fraksiyonlarındaki enzimler, ilgili organel subsellüler fraksiyonlama işlemiyle izole edildikten sonra incelenebilir [2].

3.3 Enzimlerin Aktif Merkezi

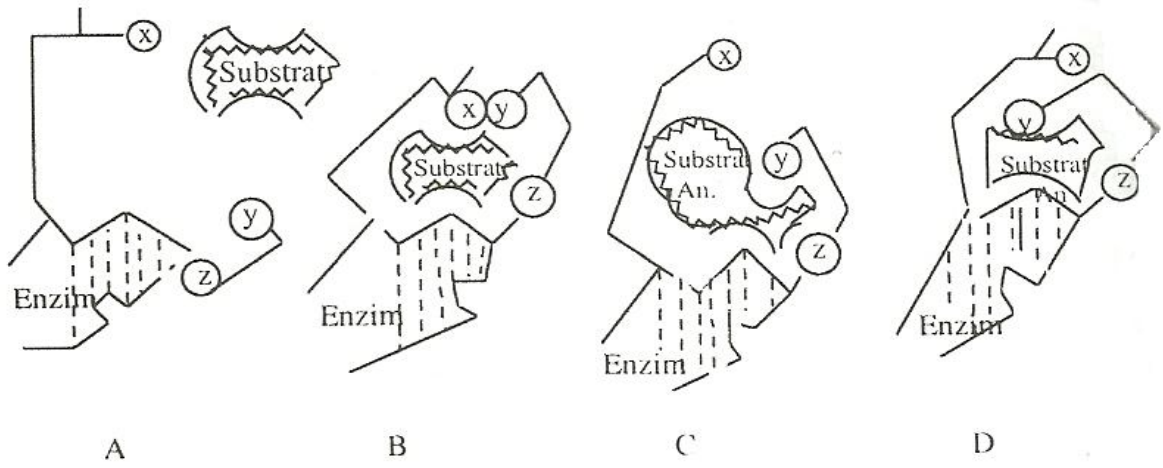
Enzimler genellikle substratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerinde kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi içerir. Aktif merkezde substrat bağlama bölgesi ve bir veya daha fazla katalitik aktivite bölgeleri mevcuttur. Enzimin aktif merkezde substrata bağlanması konusunda iki hipotez mevcuttur. Bunlardan birisi substrat ile enzim arasında anahtar-kilit modelidir. Diğeri ise indüklenmiş uyma modelidir. İkinci hipoteze göre aktif merkez fleksibl bir durum göstermekte ve ancak substrat enzim yüzeyine bağlanınca belirli bir şekil almaktadır.



şekil 3.2 Anahtar- kilit modeli (Kalaycıoğlu vd., 2006)



Şekil 3.3 İndüklenmiş uyum modeli (Kalaycıoğlu vd., 2006)



Şekil 3.4 Enzimin substrat karşısındaki durumu (Kalaycıoğlu vd., 2006)

İndüklenmiş uyum modeline göre iki katalitik bölgesi olan bir enzimin farklı büyüklüklerdeki substrat karşısındaki durumu Şekil 3.4'de görülmektedir. Burada x ve y katalitik bölgeleri, z ise bağlanma grubu ile protein zincirini göstermektedir.

A. Enzim ve substrat ayrı ayrı bulunmaktadır.

B. Substrat z noktasından aktif merkeze bağlanmıştır. Karşı karşıya gelen x ve y noktaları kataliz olayını yapmaktadır.

C. Aktif merkeze daha büyük yapıya sahip substrat analogu girmiştir. Z noktası substrat analoguna normal olarak bağlanmıştır. Fakat x ve y katalitik bölgeleri karşı karşıya gelmedikleri için reaksiyon gerçekleşmemiştir.

D. Normal substrattan daha küçük bir substrat analogu aktif merkeze yerleşmiştir. Z bağlanma noktası normal olarak substrat analoguna bağlanmıştır. Fakat x ve y katalitik bölgeleri B' deki gibi yan yana gelemediklerinden reaksiyon oluşamaz (Kalaycıoğlu vd., 2006).

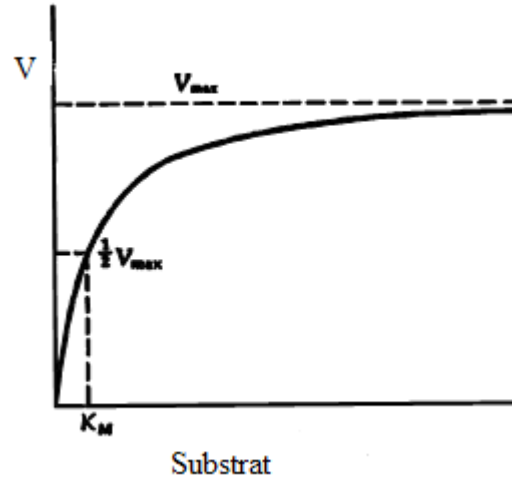
3.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzimlerin etkinliğini, dolayısıyla kimyasal tepkimelerin hızını artıran veya azaltan pek çok faktör vardır. Bu faktörler; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, su aktivitesi, reaksiyon süresi, reaksiyon ürünleri, enzim inhibitörleri ve aktiviteyi, radyasyon, basınç, kaynama güçleri ve ışık gibi çeşitli fiziksel faktörler ve hormonlar şeklinde sıralanabilir.

Bir enzimatik reaksiyonda reaksiyon hızı bu faktörlerden değişik derecelerde etkilenmektedir. Ancak enzimatik reaksiyonlarda faktörler arası etkileşim de önemli olmaktadır. Örneğin bir enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri farklı ortam sıcaklıklarından etkilenerek değişiklik gösterebilir. Bu nedenle enzimatik reaksiyonlarda, ortam koşulları bir bütün halinde dikkate alınmalıdır. Enzim aktivitesini etkileyen bazı faktörler aşağıda açıklanmıştır [2].

Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi, diğer koşullar sabit tutulduğunda doğrusal bir ilişki gösterir. Yani enzim konsantrasyonu arttıkça enzim hızı da doğru orantılı olarak artar. Ortamdaki her enzim molekülü bağımsız çalıştığı için ne kadar enzim molekülü varsa o kadar çabuk gelişen bir reaksiyon söz konusudur.

Enzim miktarının sabit tutulduğu bir ortamda substrat yoğunluğu arttıkça, tepkimenin hızı da artar. Tepkime hızı en yüksek noktaya eriştikten sonra sabit kalır. Enzim ile substrat, $E+S \rightarrow ES$ halinde iken enzim çalışmaktadır. Enzim görevini yapıp tekrar serbest iken ve birleşmek için substrat ararken çalışmamaktadır. Eğer ortamda bol substrat varsa enzim sürekli çalışır bir duruma gelir. Bu optimum substrat düzeyinin üzerindeki substrat değerleri, enzim reaksiyon hızına artık katkıda bulunmaz.



Şekil 3.5 Substrat konsantrasyonunun enzim reaksiyon hızına etkisi [2]

V_{max} noktasındaki substrat konsantrasyonu enzimi doyuran ve bunun üzerinde herhangi bir değer olabileceğinden bunun ölçülmesi pratik olarak zordur. Buna karşılık enzimatik bir reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doydugu ve böylece yarı maksimal hızın ($\frac{1}{2} V_{max}$) gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonu ölçülebilir. Bir enzimatik reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doydugu ve böylece yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonuna “**Michaelis-Menten sabiti**” denir ve K_m ile gösterilir.

Bir enzim için K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimlerini karakterize eden bir sabit sayıdır. Enzim konsantrasyonundan bağımsız bir değerdir, maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu gösterir.

Enzimatik bir reaksiyon için K_m başlangıç hızını (V_o) substrat konsantrasyonunun ($[S]$) bir fonksiyonu kabul ederek grafik çizmek suretiyle deneysel olarak saptanabilir [2]:

Enzimatik bir reaksiyon için V_o , V_{max} , K_m ve $[S]$ arasındaki ilişki, “**Michaelis-Menten denklemi**” denem eşitlikle ifade edilir:

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3.1)$$

Michaelis-Menten denklemi, enzimatik bir reaksiyon için başlangıç hızını (V_o) substrat konsantrasyonunun ($[S]$) bir fonksiyonu kabul ederek çizilen hiperbolik eğrinin matematiksel ifadesidir.

Enzimatik reaksiyonlar için kinetik modeller 1903'de Henry ve 1913'de Michaelis-Menten tarafından geliştirilmiştir.

Michaelis-Menten denklemi bir enzimin etkili olduğu reaksiyonda, substrat konsantrasyonuna göre ne şekilde davranacağını tanımlar:

1) K_m çok büyük ($[S]$, K_m 'den çok çok küçük) ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlıdır:

$$V_0 \approx \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m} \quad (3.2)$$

$$V_0 \approx K \cdot [S] \quad (3.3)$$

Böyle reaksiyonlar, birinci dereceden reaksiyon olarak tanımlanırlar.

2) K_m çok küçük ($[S]$, K_m 'den çok çok büyük) ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlı değildir, V_{\max} değerine eşittir:

$$V_0 \approx \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S]} \quad (3.4)$$

$$V_0 \approx V_{\max} \quad (3.5)$$

Böyle reaksiyonlar sıfıncı dereceden reaksiyon olarak tanımlanırlar.

3) K_m , $[S]$ 'ye eşit ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlı değildir, $1/2V_{\max}$ değerine eşittir [1]:

$$V_0 \approx \frac{V_{\max} \cdot [S]}{2[S]} \quad (3.6)$$

$$V_0 \approx \frac{V_{\max} \cdot [S]}{2} \quad (3.7)$$

Michaelis-Menten denkleminde göre K_m (Michaelis-Menten sabiti) enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_m değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doyararak maksimum hız sağlar. K_m

değeri 10^{-6} M (10^{-3} mM) ve daha düşük olan enzimler yüksek affiniteli enzimlerdir ki bunların metabolizmada büyük önemi vardır. K_m değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat konsantrasyonu gerekmektedir. Bir enzim için K_m değeri, enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden bir sabit sayıdır.

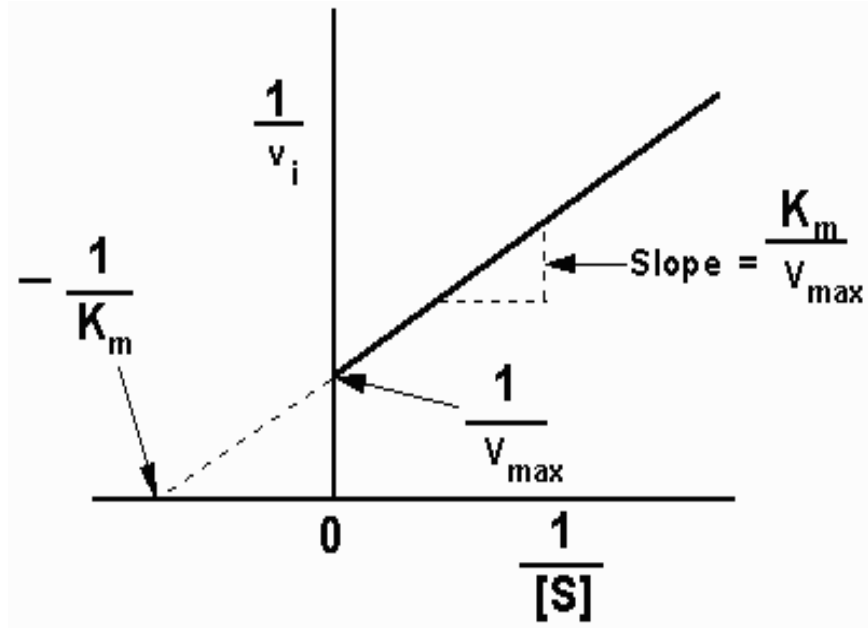
Michaelis-Menten denklemi bir hiperbolik eğrinin denklemi olduğundan ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan bir enzime ait V_{max} ve K_m 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir. Bunlardan Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen Lineweaver-Burk denklemi en sık kullanılanıdır [2]:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.8)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} \quad (3.9)$$

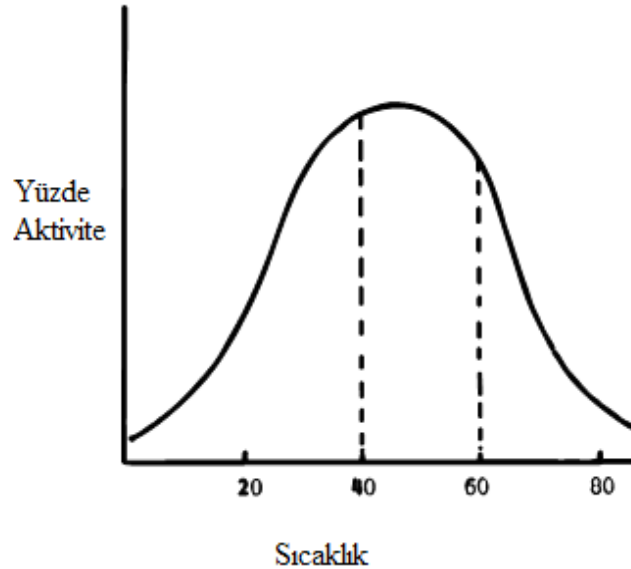
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad (3.10)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.11)$$



Şekil 3.6 Lineaweaver-Burke grafiği [4]

Sıcaklık, enzimlerin hem hızını hem de stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Bütün diğer koşullar standardize edildiğinde, ortamının sıcaklığı arttıkça reaksiyon hızı da belli bir noktaya kadar artmaktadır. Bu noktadan sonraki sıcaklık artışlarında enzim hızında ani düşüşler meydana gelmektedir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği bu düşüş noktasına optimum sıcaklık adı verilir.



Şekil 3.7 Enzimatik reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi [2]

pH derecesi ortamın asitlik ve bazlık derecesini ifade eder ve 0 - 14 arasında değişir. Ortam pH'ı enzimatik reaksiyonların çoğunda hızı etkileyen önemli bir faktördür. Her enzimin optimum çalıştığı bir pH aralığı vardır ve bu pH'a "Optimum pH" denilmektedir.

Enzimlerin optimum pH'ları 2 -10 arasında değişmektedir. Örneğin pepsinin optimum pH'ı 2 iken, alkalın fosfatazın 10'dur. Bir enzimin çalıştığı optimum pH değeri mevcut değilse enzimin etkinliği azalır. Ayrıca kuvvetli asitler ve bazlar enzimlerin yapısını bozarak çalışmalarını engeller.

Enzim-substrat kompleksinin oluşmasını değişik şekillerde etkileyen, enzim faaliyetinin azalmasına yol açan doğal veya yapay kimyasal maddelere "enzim inhibitörleri", bu olaya ise "enzim inhibisyonu" denir. Bu maddeler istenmeyen enzim aktivitesinin önlenmesi veya kontrol altında tutulmasında aracı olarak kullanılır. Enzim inhibitörleri, tersinir-geri dönüşümlü (reversible), tersinmez-geri dönüşümsüz (irreversible) ve allosterik inhibitörler olmak üzere 3 başlıkta incelenebilmektedir [4].

3.5 Enzimlerin İsimlendirilmesi

Birçok enzim, substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna "az" soneki ekleyerek adlandırılır. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Üreaz, ürenin hidrolizini katalize eden; DNA polimeraz ise DNA'nın sentezini katalize eden enzimdir.

Pepsin, tripsin, amigdalin, pityalin, zimaz gibi, substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan, genel bir tanıma uymayan enzim isimleri de kullanılmıştır.

Karışık isimlendirmelerin sonucu olarak bazen aynı enzim için iki veya daha fazla ad kullanılmış, bazen de iki farklı enzim için aynı ad kullanılmıştır. Böyle belirsiz anlamlılıklar ve yeni olarak keşfedilen enzimlerin sürekli artan sayısı nedeniyle, uluslararası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem benimsenmiştir.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır [2].

Çizelge 3.1 Enzimlerin isimlendirilmesi [2]

Sınıf	İsim	Katalize Ettiği Reaksiyon Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları
2	Transferazlar	İki molekül arasında bir atom veya grubun transferi
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
4	Liyazlar	Substrattan hidroliz ve yükseltgenme harici bir yolla bir grubun ayrılması
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
6	Ligazlar	ATP veya diğer nükleozid trifosfatın yıkımı ile birlikte yeni bir bağın sentezi

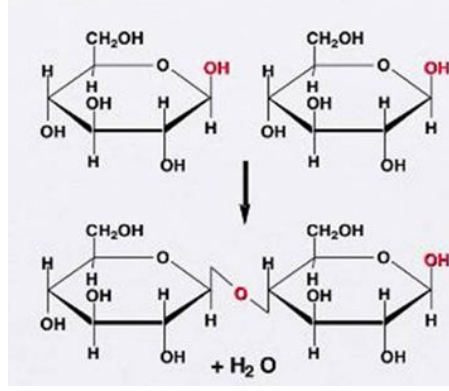
Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan ibaret olup ilk rakam enzimin 6 ana enzim grubundan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını gösterir (Kalaycıoğlu vd., 2006).

3.6 Endüstriyel Enzimler

3.6.1 Nişasta ve Amilazlar

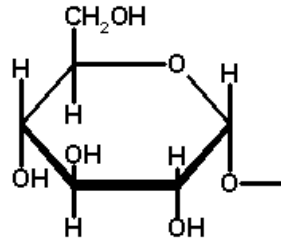
Nişasta bitkilerde karbonhidrat şeklinde depolanan, çok sayıda glukoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Ticari olarak üretilen nişastanın asıl kaynağını mısır oluşturur, bunun yanında patates, buğday gibi hububatların nişastaları da ticari olarak üretilmektedir. Nişasta iki tip glukoz polimerinden oluşur: amiloz ve amilopektin (Tatar, 2007).

Glikozidik bağ bir monosakkarit molekülü üzerindeki anomerik karbon hidroksil grubunun bir diğer monosakkarit molekülü üzerindeki bir hidroksil grubu ile reaksiyonlaşması sonucu oluşur. Bu o-glikozidik bağ vasıtasıyla birbirine bağlanmış iki monosakkarit biriminden disakkaritler meydana gelir.

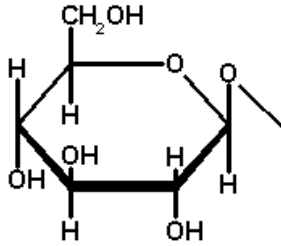


Şekil 3.8 Disakkaritlerin oluşumu [2]

Disakkaritlerin oluşumunu sağlayan glikozidik bağlar, α ve β olmak üzere iki tipte olur. Glikozidik bağın tipini, 1. karbon atomundaki $-OH$ grubunun pozisyonu belirler.

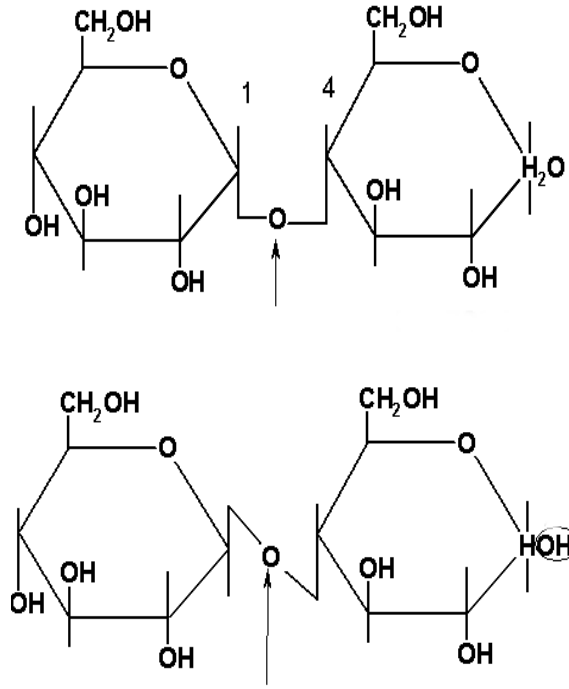


Şekil 3.9 α -glikozidik bağ [2]



Şekil 3.10 β -glikozidik bağ [2]

İlk karbon atomundaki $-OH$ grubunun pozisyonu α pozisyonu ise α -glikozidik bağ, β pozisyonu ise β -glikozidik bağ oluşur.



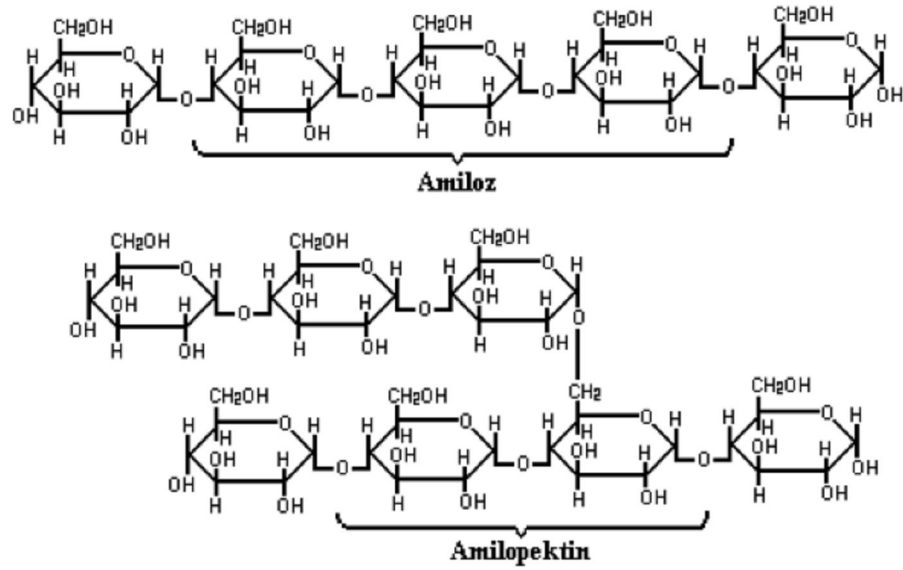
Şekil 3.11 α ve β bağlarının gösterimi [2]

Glikozidik bağlar, asit vasıtasıyla kolayca hidroliz edilebilirler, fakat baz vasıtasıyla yıkılmaya karşı dirençlidirler.



Şekil 3.12 Glikozidik bağın asit ile hidrolizi [2]

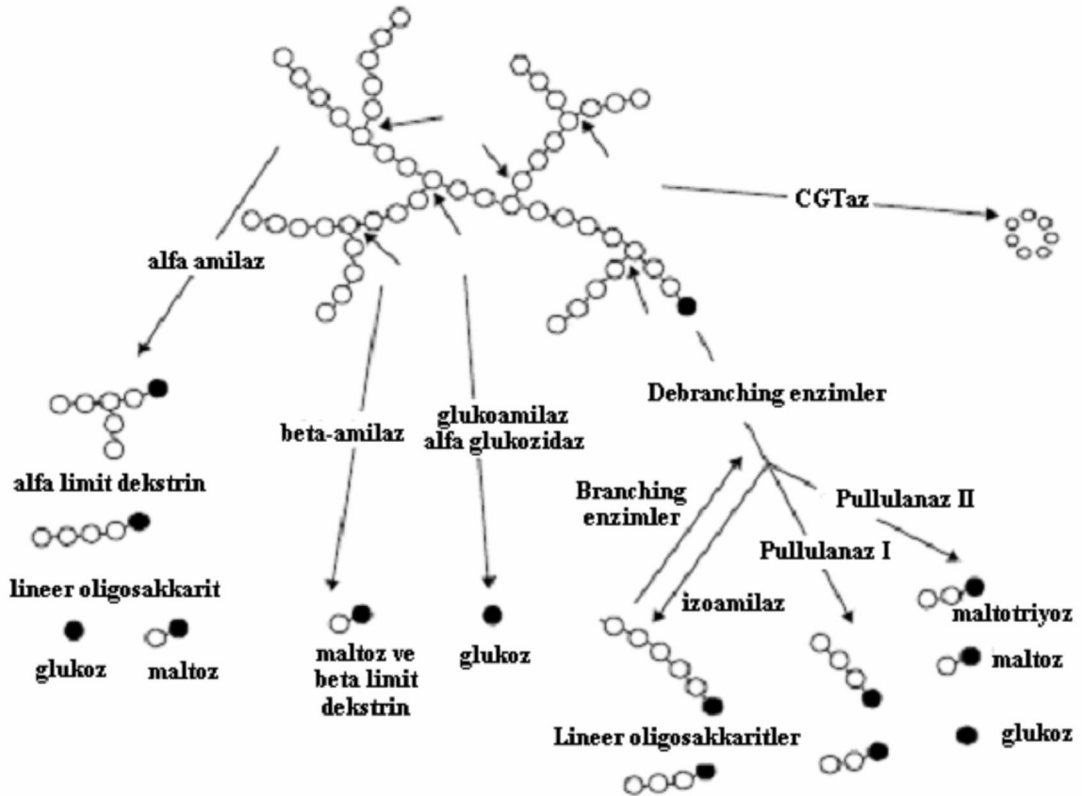
Niştasanın moleküler ağırlığı 50 000 ile 1 000 000 dalton arasında değişmekte olup, bir nişasta molekülü amiloz ve amilopektin olmak üzere iki adet glukoz polimeri içerir. Amiloz, glukoz birimlerinin α -1,4 glikozidik bağ ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıda iken amilopektin, glukoz birimleri arasında α -1,4 bağlantısına ek olarak α -1,6 glikozidik dallanma bağ noktalarını da içermektedir. Amiloz ve amilopektin içeriği bitki türlerine göre değişir. Örneğin, buğday niştası yaklaşık % 25 amiloz içerirken, mısır niştası % 97-99 oranında amilopektine sahiptir. Granüllerinin yapısı, şekli ve büyüklüğünde de farklılıklar vardır (Coşkun, 2010).



Şekil 3.13 Amyloz ve amylopektin (Coşkun, 2010)

3.6.1.1 Nişastanın Parçalanması

Nişasta; α -amilaz, glukoamilaz, β -amilaz, izoamilaz ve pullulanaz gibi enzimlerle glukoz, maltoz ve oligosakkaritlere hidroliz edilmektedir.



Şekil 3.14 Nişastanın amilolitik enzimlerle hidrolizi (Bertoldo ve Antranikian, 2002)

3.6.1.1.1 α -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1)

α -amilaz enzimi (1,4- α -D-glukan-glukonohidrolaz) nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glukoz, maltoz ve dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Fungal α -amilazlar sıcaklığa karşı bakteriyel α -amilazlardan daha az kararlı olduklarından üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel amilazlar oluşturmaktadır [1].

α -amilaz enzimi nişasta molekülündeki amiloz zincirinin α -1,4 bağlarına rastgele etki ederek son ürün olarak 1/10'u glukoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışım meydana getirir. α -amilazlar α -1,6 glikozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki etmeden geçer. Amilopektin hidrolizi sonucunda glukoz ve maltoza ek olarak bir dizi dallı sınırlı dekstrinler oluşmaktadır. Dört veya daha fazla glukoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının α -1,6 glukoz bağlarını içermektedir. Belirli sayıda glukoz ünitesi kalınca dallanma noktasına amilazlar etki edemediğinden bu dekstrinlere sınırlı dekstrin (limit dekstrin) denilmektedir. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda oluşan ürünler α optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere α -amilazlar denilmektedir. Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarındaki α -1,4 bağlarına etki yaptıkları için endoenzim olarak da adlandırılırlar (Coşkun, 2010).

α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde kullanılan α -amilaz enzimi *Aspergillus oryzae* kültüründen üretilmiştir. α -amilaz enziminin endüstriyel boyutlardaki üretimine 1939 yılında ilk kez Japonya'da başlanmış ve *B. subtilis* kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda α -amilaz enzimi nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılmıştır.

Nişastanın maltoza kadar hidrolizi, nişasta molekülünün öncelikle α -amilaz enzimi tarafından sıvılaştırılıp, daha sonra da ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin ilavesi ile sağlanmaktadır. Açığa çıkan yüksek saflıktaki maltoz, reçel, şekerleme, ekmek ve bira üretiminde kullanıldığı gibi, gıdalarda tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır. Nişastanın hidrolizi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan maltotetroz ise nem tutucu olarak kullanılmaktadır

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşılama denilmektedir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın giderilmesi gerekmektedir. Bu işleme haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da α -amilaz enzimi kullanılmaktadır.

α -amilaz enzimi alkol üretiminde de kullanılmaktadır. Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller, α -amilaz ve amiloglikozidaz enzimleri ile muamele edilmektedir. Nişasta yeterince parçalandıktan sonra ortama maya aşıl原因arak fermentasyon işlemine geçilmektedir.

α -amilaz enzimi meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulmuştur. Özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır (Tatar, 2007).

3.6.1.1.2 β -Amilazlar (E.C. 3.2.1.2)

Nişasta molekülünün indirgen olmayan ucunda ardı ardına gelen maltoz birimlerini uzaklaştıran enzimlerdir. Etkileri β -1,6 bağlarına gelince durur. Böylece sınır dekstrinler meydana gelmektedir. Hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler β optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere de β -amilazlar adı verilmiştir. Genel olarak β -amilazlar nişastanın dış kısmındaki 1,4 bağlarına etki ettikleri için ekzoenzimlerdir. α ve β -amilaz ile nişasta maltoza parçalanır (Coşkun, 2010).

Bu enzimin özelliği 65°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda herhangi bir aktivite göstermemesidir. β -amilaz enzimi maltoz üretimi ile yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılmaktadır (Tatar, 2007).

3.6.1.1.3 Amiloglikozidazlar (Glikoamilazlar) (E.C. 3.2.1.3)

Nişasta zincirinin ucundaki indirgen olmayan kısımdan ardışık olarak glukoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Amiloglikozidazların ürün olarak sadece glukoz oluşturması bu enzimleri α ve β -amilazdan ayırmaktadır. Bu enzim hem α -1,4 bağlarını etkiler hem de yavaş bir hızla da olsa α -1,6 bağlarını hidroliz eder. Nişasta α -amilaz ve glikoamilazlarla glukozu kadar parçalanır, bu enzim pullulanaz enzimiyle beraber kullanıldığında ise nişastadan hidroliz ürünü glukoz ve maltoz eldesi verimi artar.

3.6.1.1.4 α -Glukozidazlar (E.C. 3.2.1.20)

α -glukozidazlar, amiloz ve amilopektinin parçalanma ürünleri olan kısa zincirli oligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarını hidroliz ederek serbest glukoz birimleri oluşturan enzimlerdir (Aiyer, 2005).

3.6.1.1.5 Siklodekstrin Glukanotransferaz (CGTazlar) (E.C. 2.4.1.19)

Nişastadan siklodekstrin adı verilen ve 6, 7 veya 8 glukoz ünitesinden oluşan siklik D-glikozil birimleri oluşturan enzimlerdir. *Bacillus macerans* amilazları bunlara örnektir (Aiyer, 2005).

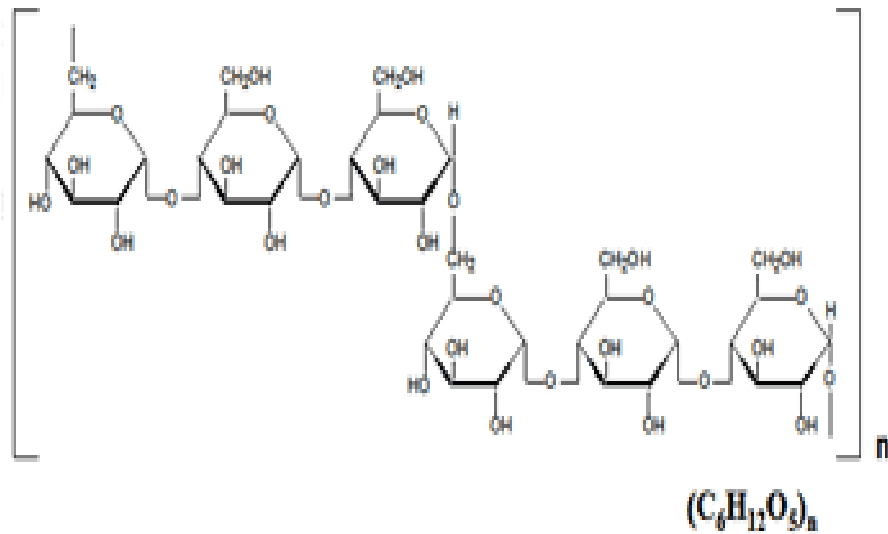
3.6.2 Pullulan ve Pullulanazlar

Pullulan amiloz, dekstroz, selüloz gibi nötral bir glukandır. Mikroorganizmalar tarafından (özellikle *Aureobasidium pullulans*) fermentasyon yoluyla elde edilir [5].

Pullulan maltotrioz birimlerinin birbirine α -1,6 glikozidik bağlarla bağlandığı lineer bir polisakkarittir.

Aureobasidium pullulans ilk defa 1866 yılında De Bary tarafından tanımlanmış; ancak bu mikroorganizmanın ürettiği pullulan polimerinin saflaştırılıp karakterizasyonunun yapılması 1958 yılında Bernier adındaki bilim adamı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bugün kullanılan pullulan adı ise 1959 yılında Bender tarafından verilmiştir (Leathers, 2003).

Pullulan düzenli olarak birbirini tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşmuştur. Pullulanın bir diğer yapısal birimi tetramer veya maltotetrozdur. Catley ve arkadaşları tarafından 1986 yılında yapılan çalışmada pullulanın maltotrioz birimleri yanında miktarı % 7'yi aşmayacak şekilde maltotetroz birimlerinden de meydana geldiği ortaya çıkmıştır. Pullulanın kimyasal formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olarak önerilmiştir. α -D-(1-4)- α -D-(1-4)- α -D-(1-6)_n (Singh vd., 2008).



Şekil 3.15 Pullulan [6]

3.6.2.1 Pullulanın Hidrolizi

Pullulanın asitle hidrolizi sonucu isomaltoz, maltoz, panoz ve isopanoz oluşumu görülür. Böylece pullulan, üretildiği biyosentetik kökene bağlı olarak panoz, isopanoz birimlerinden oluşan polimer olarak da adlandırılmaya başlanmıştır.

Pullulanın hidrolizini gerçekleştiren enzimler 4 grupta toplanabilir:

1. Glikoamilaz: Pullulanın indirgen olmayan ucundan glukoz oluşur.
2. Pullulanaz: Pullulanın α -1,6 glikozidik bağları parçalanır, maltorioz birimleri oluşur.
3. İsopullulanaz: Pullulanın α -1,4 bağları parçalanır, isopanoz oluşur.
4. Neopullulanaz: Pullulanın α -1,4 bağları parçalanır, panoz oluşur (Nair vd., 2006).

3.6.2.2 Pullulanın Kullanım Alanları

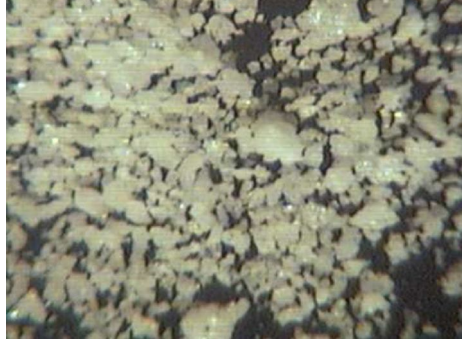
Pullulanın yapısındaki α -1,4 ve α -1,6 bağlarının düzenli değişimi ona iki belirgin özellik kazandırmıştır: çözünürlük artışı ve yapısal esneklik. Pullulan suda çözünür ancak organik çözücülerde çözünürlüğü yoktur. Nem geçirmez, diğer polisakkaritlere kıyasla daha düşük viskoziteye sahiptir (Singh vd., 2008).

Pullulanın endüstride kullanım alanı (tarım, tekstil, gıda sektörü, kağıt sanayi, kozmetik) oldukça geniştir.

Pullulan iyi yapıştırıcı özellik gösterir, tekstilde ipliklere şekil vermek için kullanılır.

Gıda endüstrisinde mükemmel oksijen geçirmez özelliğinden dolayı film ve folyo yapımında kullanılır. Gıda ürünlerinde mikroorganizma üremesini engeller. Düşük viskoziteye sahip olduğundan meşrubatlarda ve soslarda dolgu maddesi olarak kullanılmaya uygundur.

Cilt bakım ürünlerinde yumuşaklık vermek amacıyla, ilaç sektöründe tablet kaplama ve aktif madde yardımcı ürünü olarak kullanılır. Ayrıca ağız bakım ürünü olarak da kullanılmaktadır. Pullulanın ilk ticari üretimi 1976 yılında Hayashibara şirketi tarafından Japonyada başlamıştır (Leathers, 2003).



Şekil 3.16 Ticari olarak kullanılan pullulan [5]

3.6.2.3 Pullulanazlar (E.C. 3.2.1.41)

Substrat molekülünün sadece α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterdikleri için ‘sınırlı dekstrinazlar’ olarak da adlandırılırlar. Pullulanazlar, glukoz ve maltoz verimini arttırmaları (Aiyer, 2005).

Pullulanaz enzimi ilk defa Bender ve Wallenfel tarafından 1961 yılında, pullulan polimerinin α -1,6 bağlarını hidroliz eden enzim olarak tanımlanmıştır (Leathers, 2003). Pullulanaz, pullulan, amilopektin ve glikojendeki α -1,6 glikozidik bağlarına etki eder. Başlıca kullanım alanı nişasta endüstrisidir.

Pullulanazlar (pullulan-6-glucanhydrolase EC(3.2.1.41)) nişasta, amilopektin ve çeşitli oligosakkaritlerin α -D-1,4 glikozidik bağlarını hidrolizleyebilme yeteneğine göre Pullulanaz Tip I ve Pullulanaz Tip II (amilopullulanaz) olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır. Her iki tip pullulanaz, pullulanın α -D-1,6 glikozidik bağlarını parçalar ve ortaya maltotrioz çıkar. Ancak Pullulanaz Tip II enzimleri, Tip I’den farklı olarak α -D-1,4 glikozidik bağlarına karşıda etki gösterebilirler.

Pullulan Hidrolaz Tip I (neopullulanaz) ve Pullulan Hidrolaz Tip II (isopullulanaz) ise pullulandaki α -D-1,4 glikozidik bağlarını parçalaması sonucu hidroliz ürünü olarak panoz ve isopanoz oluşur. Son zamanlarda pullulandaki α -D-1,6 ve α -D-1,4 glikozidik bağlarının ikisini birden aynı anda parçalayarak maltotrioz, panoz ve maltoz birimleri oluşturan Pullulan Hidrolaz Tip III enzimi tanımlanmıştır (Zareian vd., 2009).

Çizelge 3.2 Pullulanazların sınıflandırılması (Bertoldo ve Antranikian, 2003)

Pullulanaz Çeşidi	Son Ürün
Pullulanaz Tip I (EC 3.2.1.41)	Maltotrioz, lineer oligosakkarit
Pullulanaz Tip II	Glukoz, maltoz, maltotrioz
Pullulan Hidrolaz Tip I (EC 3.2.1.135) (Neopullulanaz)	Panoz (α -6-D-glukozilmaltoz)
Pullulan Hidrolaz Tip 2 (EC 3.2.1.57) (İsopullulanaz)	İsopanoz (α -6-maltozilglukoz)
Pullulan Hidrolaz Tip 3	Maltotrioz, panoz, maltoz

Pullulanaz Tip I, α -dekstrin-6-glukanohidrolaz ya da limit dekstrinaz olarak isimlendirilir. Bu tür enzim ilk defa *Klebsiella* türü mikroorganizmalarda keşfedilmiştir. Pullulan haricinde nişastanın dallanma noktalarını da parçalar. Böylece nişasta parçalayıcı enzim adını alır. Glikoamilaz enzimi ile beraber kullanılarak, nişastadan yüksek verimde glukoz oluşumunu sağlar. Bu iki enzimin birlikteliğinden düşük kalorili bira yapımında yararlanır. Pullulanaz Tip I, β -amilaz ile beraber kullanıldığında nişastadan maltoz meydana gelir. Böylece pullulanaz yüksek saflıkta fruktoz eldesinde ve maltoz şurubu üretiminde de kullanır.

Pullulanazların gıda endüstrisinde nişasta hidrolizinde kullanılması prosesi daha verimli hale getirir. Ancak ticari pullulanazların termal stabilitesi yüksek değildir ve 60°C gibi düşük sıcaklıklarda bile birkaç saat içerisinde başlangıç aktivitesinin büyük oranda kaybedilmesi istenmeyen bir özelliktir. Bu sebeple pullulanazların endüstride kullanım alanı sınırlıdır (Kuroiwa, 2004).

Çizelge 3.3'de farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiş amilopullulanazların karşılaştırılması verilmiştir (Zareian vd., 2009).

Çizelge 3.3 Farklı cins mikroorganizma pullulanazlarının optimum şartları (Zareian vd., 2009)

Cins	Moleküler ağırlık (kDa)	Optimum aktivite pH'ı	Optimum aktivite sıcaklığı (°C)	Optimum büyüme ortamı sıcaklığı (°C)
<i>Geobacillus sp</i> L14	100	5,0-7,0	65	50
<i>Desulfurococcus mucosus</i>	74	5	85	-
<i>Bacillus sp</i> KSM-3781	210	8,5-9,5	50	30-35
<i>Pyrococcus furiosus</i>	89	5,5-6,0	105	-
<i>Pyrococcus woesei</i>	90	6	100	-
<i>Thermoanaerobacter</i> B6A	450	5	75	60

Çizelge 3.4 Pullulanaz enziminden farklı substratların varlığında elde edilen ürünler [7]

Substrat	Ürün	Mikroorganizma
Amilopektin + H ₂ O	Maltooligosakkaritler + maltoz	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus acidopullulyticus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Beta</i> <i>vulgaris</i> , <i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i>
Dekstrin+ H ₂ O	Maltooligosakkaritler + maltoz	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> , <i>Pyrococcus woesei</i>
Pullulan+ H ₂ O	Maltotrioz	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Beta</i> <i>vulgaris</i> , <i>Bacteroides</i> <i>thetaitotaomicron</i>
Pullulan+ H ₂ O	Maltotrioz+ maltoz	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i>
Çözünür Nişasta+ H ₂ O	Maltotrioz+ maltoz	<i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> <i>ethanolicus</i> ,
Nişasta+ H ₂ O	Maltotrioz	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>
Glikojen+ H ₂ O	Maltooligosakkaritler + maltoz	<i>Clostridium</i> <i>thermohydrosulfuricum</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Micrococcus</i> <i>sp.</i> <i>Fervidobacterium</i> <i>pennavorans</i>

3.7 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler (Telefoncu, 1997).

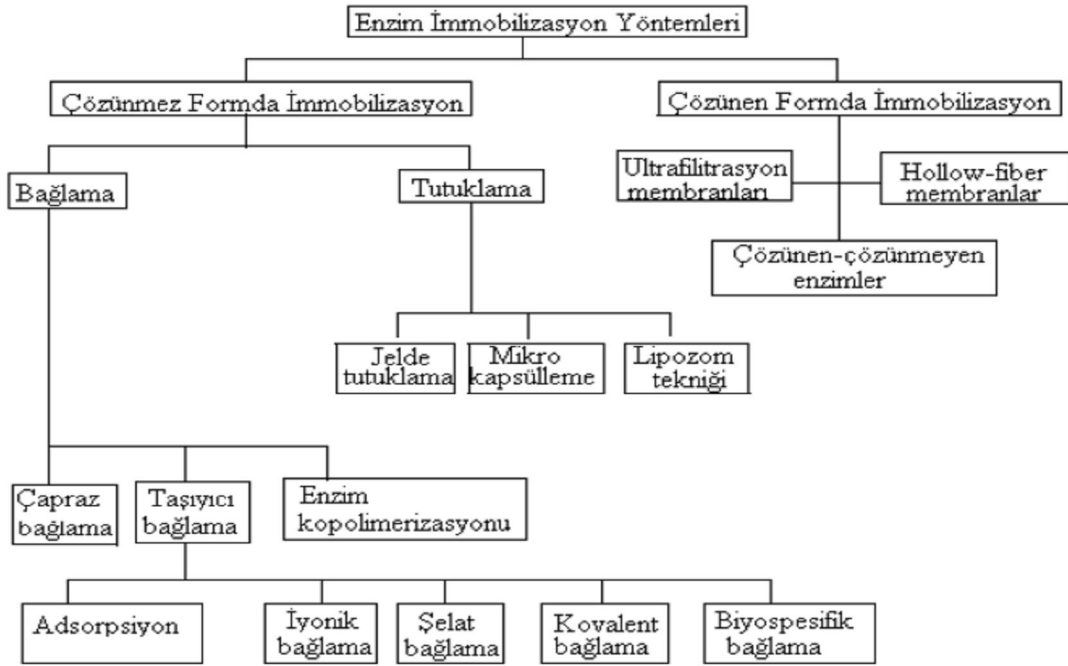
Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin de hareketleri gerçekten sınırlandırılmış olmaktadır.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzime göre daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.

Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır.

İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber Şekil 3.19'da verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür (Telefoncu, 1997).



Şekil 3.17 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu, 1997)

3.7.1 Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır.

3.7.1.1 Bağlama Yöntemleri

Bağlama yöntemi çapraz bağlama, taşıyıcıya bağlama ve enzim kopolimerizasyonu olmak üzere sınıflandırılmıştır.

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar.

Doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal taşıyıcı olarak kullanılır.

Çizelge 3.5 Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

Anorganik	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Aktif karbon	Nişasta	İyon değiştirici reçineler
Titandioksit	Kitin ve kitosan	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Poliakrilamid

Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılacak Taşıyıcıda Aranılan Nitelikler: Hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli yapı, mekanik stabilite uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel grupları taşıması (Yener, 2007).

Enzime kovalent bağlanma, reaktif taşıyıcıda ve enzimde bulunan fonksiyonel gruplar ile gerçekleşir. Burada dikkat edilecek en önemli nokta bağlanma enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmamalıdır. Taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktivite edilirler. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda gerçekleştirilir. Kovalent bağlanmada kullanılan aminoasitlerin fonksiyonel grupları: Amino grubu, hidroksil grubu, karboksil grubu, imidazol grubu, fenolik grubu, tiol grubu, indolil grubu, sülfhidril grubudur. Kovalent bağlanma reaksiyonları: Açılma reaksiyonu, alkilleme, diazolama, karbamilasyon, polimerik aldehydler ile reaksiyonlar olmak üzere değişik reaksiyonlarla gerçekleşir.

İyonik bağlama, iyon değiştirme yeteneğine sahip taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe neden olmaz.

Şelat bağlama, bazı geçiş metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde gerçekleşir. Enzimler bu yolla organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanabilirler.

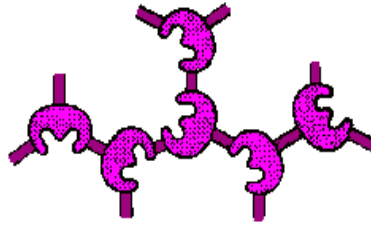
Biyospesifik bağlama enzimler, antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanır.

Adsorpsiyon yöntemi, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlanmada Van der Waals kuvvetleri etkilidir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan

adsorbanlar aktif karbon, silikajel, nişasta ve kalsiyum fosfattır. Enzimin taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi faktörlere çok bağlıdır. Basit bir işlemdir, immobilizasyonun yanında enzim saflaştırılmasını da sağlar; ancak desorpsiyon gerçekleşebilir. Desorpsiyon durumunda ürün kirlenmesi görülür (Telefoncu, 1997).

Küçük moleküllü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yapmaktadırlar. Bu yöntemle immobilizasyona çapraz bağlama yöntemi denilmektedir.

Bu yöntem ile immobilizasyon enzimin yalnız biofonksiyonel reaktif ile reaksiyonu veya biofonksiyonel reaktif ile aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu gibi yöntemlerle gerçekleştirilir. En çok kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri: glutaraldehid, kloroformat, geçiş metal iyonlarıdır.



Şekil 3.18 Çapraz bağlama yöntemi [9]

Kopolimerizasyon yönteminde, enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylece polimer matrikse bağlanmış olur.

Yöntem polimer matrikste tutuklamaya benzer fakat enzim kaçışını engelleme gibi bir üstünlüğü vardır.

3.7.1.2 Tutuklama Yöntemleri

Enzim molekülü belirli bir mekanda durmaya zorlanır. Bu işlem polimer matriks içinde kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemin en önemli farkı enzimin fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamasıdır.

Polimer matrikste tutuklama yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanır ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenir.

Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Bu yöntemde çapraz bağ yüzdesinin miktarı oldukça önemlidir. Bunun aşırı olması substratın enzimin aktif merkezine ulaşmasını engeller.

İmmobilize edilecek enzimin substratı küçük moleküllü olmalıdır (Telefoncu, 1997).

Mikrokapsülleme yöntemi ise enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir.

Sürekli mikrokapsüllerde ve süreksiz mikrokapsüllerde enzim immobilizasyonu olmak üzere ikiye ayrılır.

Sürekli mikrokapsüllerde immobilizasyonda mikrokapsülü çevreleyen membran yarı geçirgendir, enzim moleküllerinin kapsül dışına çıkışı engellenirken daha küçük molekül yapısındaki substrat molekülleri kapsül içine girebilir.

Süreksiz mikrokapsüllerde immobilizasyon (Lipozom Tekniği) ise 1968 yılında bulunmuştur. Bu yöntem sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır.

Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktive olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır (Telefoncu, 1997).



Şekil 3.19 Mikrokapsülleme tekniği [9]

3.7.2 Çözünür Formda İmmobilizasyon

Enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir.

Küçük moleküllü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir.

Çizelge 3.6 İmmobilize mikroorganizmalartarafından üretilen enzimler (Uygun, 2006)

Enzim	Mikroorganizma	Destek materyali
β -amilaz	<i>Bacillus megaterium</i>	Akrilamid
Glukoamilaz	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ca-alginat
Pektinaz	<i>Aspergillus niger</i>	Buğday
Pullulanaz	<i>Clostridium sp.</i>	Ca-alginat
α -amilaz	<i>E. coli</i>	k- carregenan
Selülaz	<i>Trichoderma reesei</i>	Selülozik fiber
Kitinaz	<i>Micromonospora chalybeata</i>	Ca-alginat
İnvertaz	Maya	Polimer

3.7.3 İmmobilizasyon Yöntemi Seçimi

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde 4 ana kriter göz önüne alınır:

- Güvenilirlik
- Maliyet
- Aktivitenin korunması
- Kararlılık

Özellikle enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılan reaktifler zehirli yan ürünlerin oluşmasına da sebep olabilir. Bu şekilde hazırlanan biyokatalizatorlerin gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılması mümkün değildir.

Laboratuarda gerçekleştirilen birçok immobilizasyon tekniği büyük miktarda üretim için maliyet açısından uygun olamayabilir.

Bir enzimin immobilizasyonu için çok değişik yöntemler seçilebilir. Bunların içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir (Telefoncu, 1997).

3.7.4 İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

İmmobilizasyon sonucunda enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir.

Taşıyıcıya bağlanma sonucunda enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi doğaldır. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kimyasal kovalent bağlanma durumunda yükü ve kimyasal yapısı değişir.

Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktivitesinde düşme beklenir. Fakat hiç değişmediği veya arttığı durumlara da literatürde rastlanmaktadır. Enzim aktivitesindeki düşmenin başlıca sebepleri: Enzimin immobilizasyon sırasında denatüre olması, aktif merkez üzerinden bağlanma sebebiyle denatürasyon, birçok noktadan bağlanma sebebiyle inaktivasyondur.

Doğal ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklık etkisi genellikle "optimum eğriler" çizilerek izlenir. Grafikten belirlenen optimum sıcaklık inkübasyon süresine çok bağlıdır ve inkübasyon süresi arttıkça optimum sıcaklık düşer.

İmmobilizasyondan sonra enzimin optimum pH değerinden kayma gözlenir. Polianyonik yapılu taşıyıcılarda immobilize enzimin optimum pH'ı bazik bölgeye, polikasyonik taşıyıcılarda ise asidik bölgeye kaymaktadır. (Telefoncu, 1997).

4. ASPERGILLUS NIGER

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır; doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalidir; doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir, biyodegradasyonda rol alırlar. Bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar. Uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Yaşam çevrimlerini tamamlamak için insana gereksinimleri yoktur. Üreme hız ve kapasiteleri yüksektir. Atmosfere dağılan konidyumlar havada asılı kalabilir, toz ve diğer parçacıklarla her yere taşınabilirler, havada en yüksek yoğunlukta bulunan mantarlardan biridir (Kantarcioglu ve Yücel, 2003).

Mantarlar genelde bol karbonlu yüzeylerde glukoz gibi monosakkaritler ile büyümelerine karşın, *Aspergillus* amilaz enzimleri salgıladığı için nişasta gibi polisakkaritleri de kullanabilir. Bu yüzden *Aspergillus* türleri ekmek ve patates gibi nişastalı yiyeceklerin bozulmalarında sıkça görülür, ayrıca çoğu bitki ve ağaç üzerinde de büyürler.

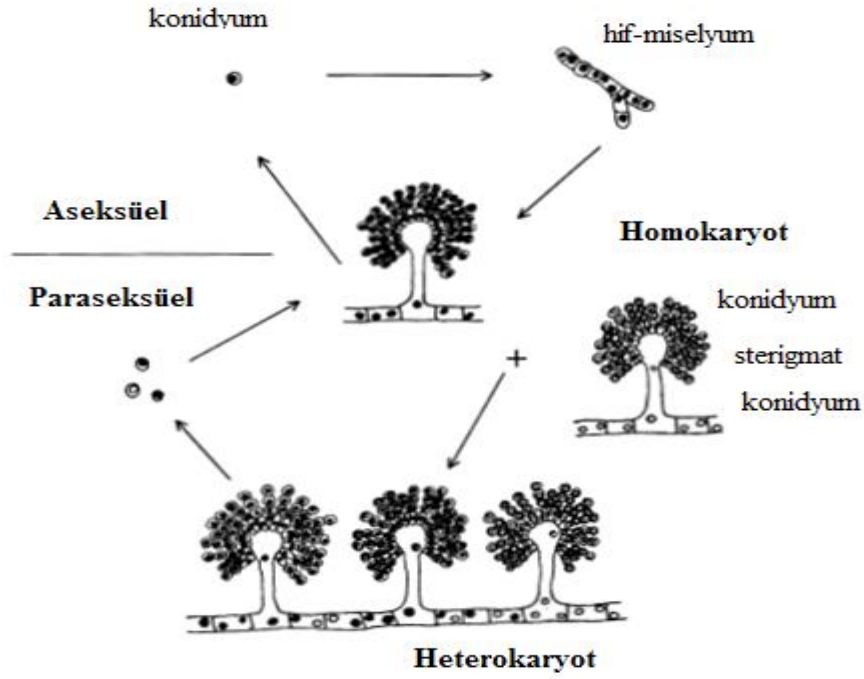
Glukoz, fruktoz, maltoz ve nişasta gibi karbon kaynakları ile büyüebilmelerinin yanı sıra çoğu *Aspergillus* türü besin maddelerinin çok düşük konsantrasyonda olduğu veya başka organizmaların kullanmadığı besin kaynaklarının olduğu ortamlarda da büyüme yeteneğine sahiptir. Bunun başlıca örneği olan *A. niger*, nemli duvarlar üzerinde büyür, banyolardaki küfü oluşturur [8].

Aspergillus türleri, hem birincil hem ikincil metabolitlerin üretimi nedeniyle ticari önemi en büyük olan mantar türü sayılabilir. *Aspergillus niger* biyoteknolojide kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir. Yıllardır ekstraselüler enzim ve sitrik asit üretiminde kullanılmaktadır. Bunun yanında *A. niger*'den biyotransformasyon ve suyun arıtılması proseslerinde de yararlanılmaktadır.

Endüstriyel olarak öneminin artması ilk defa 1919 yılında sitrik asit üretiminde kullanılmasıyla gerçekleşmiştir. Sitrik asit gıda ve meşrubat üretiminde ayrıca yumuşak içkiler, reçeller, tatlılar, şekerlemeler ve şarap gibi gıdalarda kullanılmaktadır. *A. niger* bundan başka ekonomik önemi daha az olan fumarik asit ve glukonik asit üretiminde de kullanılır. 1960'lı yıllardan beridir nişasta, gıda endüstrisinde kullanılan birçok enzimin üretiminde bir kaynak olarak kullanılmaya başlanmıştır. *A. niger* zengin bir enzim kaynağıdır. Pektinaz, proteaz, amiloglukozidaz yüzey kültürü yöntemiyle *A. niger*'den elde

edilmişlerdir. Yine bu mikroorganizmadan üretilen glukoz oksidaz ve katalaz enzimleri tanısal enzim kitleri ile glukoz belirlemede kullanılır.

A. niger güvenilir bir mikroorganizma olarak kabul edilir. İnsanlar *A. niger* sporlarına gün boyunca maruz kalsalarda hiçbir hastalık belirtisi görülmez. Ancak birkaç durumda *A. niger* insan vücudunda kolonize olur. Bu tip durumların görüldüğü hastaların tümü şiddetli bir hastalık geçmişine sahiptir (Schuster vd., 2002).



Şekil 4.1 Siyah *Aspergillus*'un aseksüel ve paraseksüel yaşam döngüsü (Swart vd., 2000)

5. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son yıllarda meydana gelen biyoteknolojik gelişmeler ile beraber araştırmacıların enzimle ilgili yapılan çalışmalara olan ilgisi artmıştır.

Günümüzde endüstri daha ekonomik, verimli, işletme şartlarına uyum sağlayabilecek enzimlerle ilgilenmeye başlamıştır. Böylece enzimlerle ilgili yapılan çalışmalara, günümüz teknolojisinin sağladığı imkanlarla birlikte rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak daha kararlı enzimlere sahip mikroorganizmaların üretilmesi, farklı immobilizasyon teknikleri ile kararlılığı artırılmış enzimlerin eldesi konularında yapılan çalışmalar eklenmektedir.

Yapılan literatür çalışması ile pullulanaz enzimi ile ilgili gerçekleştirilen bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Zhang vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada serbest pullulanaz ve manyetik kitosan tanelerine immobilize edilmiş pullulanazın spesifik aktiviteleri ve kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Çalışmada *Klebsiella pneumoniae* pullulanazı kullanılmıştır. Manyetik kitosan taneleri, manyetik Fe₃O₄ sulu çözeltisinde fotokimyasal polimerizasyon ile hazırlanmıştır. Manyetik kitosan taneleri düzgün küresel şekilde, 86 nm çapında ve süperparamanyetik özelliğindedir. Pullulanaz enzimi manyetik kitosan tanelerine çapraz bağlama yöntemiyle (çapraz bağlama reaktifi glutaraldehit) immobilize edilmiştir. Bu şekilde toplamda 180 µg pullulanazın, 1 mg manyetik kitosan tanesine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilize pullulanazın optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. Bu değer serbest pullulanazın optimum sıcaklığıyla aynıdır. Ancak 50°C sıcaklıkta immobilize pullulanaz serbest pullulanaza göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Serbest haldeki pullulanazın optimum pH değeri 5,5 iken, immobilize pullulanazın optimum pH değeri 5 olarak bulunmuştur ve immobilize pullulanaz daha geniş bir pH aralığında kararlılığını koruyabilmektedir. Immobilize pullulanazın kinetik sabiti K_m değerinin, serbest pullulanazın K_m değerine göre 3 kat arttığı görülmüştür. Sonuç olarak immobilize pullulanazın aktivite değeri, kararlılığı ve termal stabilitesinin serbest pullulanaza göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir ve manyetik kitosan tanelerinin pullulanaz immobilizasyonu için kullanılabilir uygun bir kaynak olduğu gösterilmiştir.

Singh R. vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada pullulanaz enzimi kullanılarak pullulandan maltotrioz şurubu üretilmiştir. Bu çalışma için önce çalkalamalı inkübatörde pullulan üretilmiş, pullulan tek adımda saflaştırma yöntemiyle izopropanol çöktürmesi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış pullulandan maltotrioz şurubu pullulanaz enzimi kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Saf pullulanaz enzimi (*Bacillus acidopullulyticus*'den indüklenmiş) dışarıdan satın alınmış ve enzimin öncelikle kinetik ve termodinamik karakterizasyonu yapılmıştır. Pullulanaz enziminin optimum pH'nın belirlenebilmesi için pH 3,5-5,0 aralığında 0,1 M sodyum asetat tamponu; pH 6-7 arasında ise 0,1 M fosfat tamponu kullanılmış ve 50°C sıcaklıkta incelenen enzim aktivitesi sonuçlarına göre enzimin optimum pH değeri 5,0 olarak bulunmuştur. Pullulanaz enziminin optimum sıcaklık değeri ve aktivasyon enerjisi substrat olarak % 0,1 konsantrasyonda pullulan çözeltisi ve uygun miktarda enzim çözeltisi ile 0,1 M pH 5,0 fosfat tamponunda 40-70°C arasında değişen sıcaklıklarda araştırılmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. Arrhenius denklemi yardımıyla hesaplanan aktivasyon enerjisi E_a ise 34,29 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Substrat spesifikliğı ve kinetik sabitlerin tespiti için substrat çözeltileri olarak farklı konsantrasyonlarda (% 0,25-1,75 (m/v)) pullulan, nişasta ve dekstran kullanılarak 50°C sıcaklık, pH 5,0 değerinde Lineweaver-Burk grafiğı yardımıyla K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla pullulan için 4 mg/mL ve 0,23 U/dak., nişasta için 11,1 mg/mL ve 0,20 U/dak., dekstran için 40 mg/mL ve 1,25 U/dak. olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre pullulanaz enzimi için en iyi substrat pullulan olarak değerlendirilmiştir. Pullulanaz enziminin, saflaştırılmış pullulanın % 94'ünü hidroliz ettiği görülmüş, oluşan maltotrioz şurubunun 3,77 mg/mL maltotrioz içerdiği belirlenmiştir.

Zareian, S., (2009) tarafından pullulanı glukoz, maltoz ve maltotrioz'a; nişastayı glukoz ve maltoza kadar parçalayan yeni bir tür amilopullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonukonusunda çalışma yapılmıştır. Enzim İran'ın sıcak topraklarından ayrıştırılmış termofilik cins L14'den elde edilmiştir. Bu mikroorganizmaya 16S rDNA gen analizi yapılmış ve *Geobacillus sterothermophilus* cinsi olduğu bulunmuştur. Bu mikroorganizmadan elde edilen enzime önce % 75 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış, ardından Q-Sepharose ve DEAE-Sepharose iyon değiştirici kolonları ile anyon değişim kromatografisi gerçekleştirilmiş ve son olarak da Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu ile jel filtrasyon kromatografisi yapılarak enzim saflaştırılmıştır. Elde edilen saf proteinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE elektroforezi uygulanarak 100 kDa bulunmuştur. Saflaştırılmış enzimin optimum pH değerinin 5,5, sıcaklık değerinin ise 65°C olduğu görülmüştür. Enzimin pullulan, nişasta ve maltooligosakkaritleri parçalayabildiğı ancak α -siklodekstrin ile panoz karşısında etkinlik göstermediğı ortaya çıkmıştır. Enzimin kinetik sabitleri substrat pullulan çözeltisi için K_m 0,48 g/L, V_{max} 44 μ mol/dak., nişasta çözeltisi için K_m 5 g/L, V_{max} 80 μ mol/dak. olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış enzime ince tabaka kromatografisi uygulanarak enzimatik reaksiyonun sonucunda pullulandan glukoz, maltoz ve

maltotrioz birimleri; nişastadan ise glukoz ve maltoz birimlerinin son ürün olarak elde edildiği görülmüştür. Ayrıca enzimin farklı tiplerdeki maltooligosakkaritleri (maltotetroz, maltopentoz, maltoheksos vb.) hidroliz edebileceği saptanmıştır. Enzim hem pullulanın hem de dallanmış yapıdaki polisakkaritlerin α -D-1,4 ve α -D-1,6 glikozidik bağlarını parçalayıp, pullulandan glukoz oluşumunu gerçekleştirdiği için bu enzimin saflaştırılmış yeni bir *Geobacillus sp.* L14 amilopullulanazı olduğu sonucuna varılmıştır.

Nair vd., (2006) tarafından yapılan çalışmada Tapoica toprağında ayrıştırılan yeni bir tür *Bacillus cereus* FDTA 13 mikroorganizmasından, termostabil pullulanazın üretimi için fermentasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için her seferinde sadece bir bileşenin miktarı değiştirilip, diğer bileşenlerin miktarı minimum olacak şekilde sabit tutulmuştur (one-factor-at-a-time). Pullulanaz aktivitesini yaklaşık 3,6 kat arttıran fermentasyon ortamı g/L için: nişasta 20, yeast ekstrakt 5, NaCl 2, MgSO₄ 0,1, K₂HPO₄ 0,17 olarak belirlenmiştir. Fermentasyon ortamına Mn⁺² iyonları ilave edilmiş ve bunun aktiviteyi 1,4 kat daha arttırdığı görülmüştür. *Bacillus cereus* FDTA 13 mikroorganizmasının mutanı, optimize edilmiş aynı fermentasyon şartlarında kullanıldığında pullulanaz üretiminin 2 kat arttığı ortaya çıkmıştır.

Kuroiwa vd., (2004) tarafından yapılan çalışmada *Klebsiella pneumoniae*'dan indüklenmiş ticari pullulanaz enziminin, aktifleştirilmiş agar jel ve kitosan tanelerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve iki immobilize enzimin serbest enzime göre kararlılıkları karşılaştırılmıştır.

Aktif agar jelde immobilizasyon, enzimdeki amino grupları ile jel yüzeyindeki aldehit grupları arasında birçok noktadan kovalent bağlanma yöntemiyle gerçekleşmiştir. Pullulanazın aktif agar jele immobilizasyonunda, pullulanaz içeren 120 mL 0,1 M pH 10 borat tamponunda 15 g aktifleştirilmiş agar jel çözülmüştür. Elde edilen çözelti, 25°C'de 24 saat boyunca karıştırılmış, ardından 240 mg NaBH₄ ilave edilmiş ve karışım 30 dakika süresince karıştırılmaya devam edilmiştir. Çözelti 0,1 M, pH 10 fosfat tamponu ve destile su ile yıkanarak süzölmüş ve jel elde edilmiştir. Aktif agar jele immobilizasyonda termal kararlılığın, immobilizasyon veriminin ve enzim aktivitesinin, jel üzerinde bağlanmayı gerçekleştirecek aldehit gruplarının yoğunluğuna bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Enzimin kitosan tanelerine immobilizasyonunda ise enzim fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Bu işlem için kitosan taneleri pH 7'de 0,1 M fosfat tamponunda bir gece boyunca bekletilmiş, ardından 5 g kitosan, bir miktar pullulanaz ile fosfat tamponunda süspansiyon haline getirilmiş ve 25°C'de 1 saat boyunca yavaşça karıştırılmıştır. Kitosan taneleri fosfat

tamponu ve destile su ile yıkanmış ve süzölmüştür. Pullulanaz aktivitesi ölçümü için substrat olarak 0,1 M, pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış % 0,5 (m/v) konsantrasyonda pullulan çözeltisi kullanılmıştır.

Serbest pullulanaz 8 saatlik inkübasyon süresinin ardından inaktif hale gelmiştir. Kitosan tanelerine adsorbe edilen enzimin kararlılığının, daha önce aynı çalışma grubu tarafından yapılan bir başka çalışmadaki, kitosan tanelerine önce adsorpsiyon ardından çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş pullulanaza göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Aktif agar jele immobilize edilen pullulanazın 48 saat inkübasyon süresinin sonunda kararlılığının % 30'unu hala koruduğu görölmüştür.

Roy I. ve Grupta M.N., (2004) tarafından yapılan çalışmada nişastanın hidrolizi Ca-alginat tanelerine ayrı ayrı olarak 3:2 oranında tutuklanmış glikoamilaz ve pullulanaz enzimleri karışımıyla gerçekleştirilmiştir. Brbirinden bağımsız olarak tutuklanmış enzimlerin 55°C sıcaklıkta daha fazla termostabilite gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmada ticari *Bacillus acidopullulyticus* pullulanazı ve *A. niger* glikoamilaz enzimi kullanılmıştır. Nişastanın sakkarifikasyonu sırasında α -1,6 bağlarını parçalamak için glikoamilaz enzimi kullanılır; ancak bu işlemin verimi yüksek glukoz konsantrasyonlarında oluşan yan ürünler nedeniyle oldukça düşüktür. Bu nedenle glikoamilaz enzimi pullulanaz gibi bir dal koparıcı enzim ile beraber kullanılır. Böylece nişastadan oluşan glukoz verimi artar. Bu iki enzimin çalıştığı pH değeri aynı olduğu için bir arada kullanılmaları yararlı olmaktadır.

İmmobilize enzim karışımı, içerisinde nişasta bulunan akışkan ve dolgulu yataklı reaktörlerde kullanılmış ve DE 96, 95 olarak elde edilmiştir. İmmobilize glikoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin bir arada, eş zamanlı olarak kullanılmasının, glikoamilazın tek başına kullanıldığı ya da iki enzimin farklı zamanlarda (önce glikoamilaz, ardından pullulanaz enzimi) kullanılarak ilk enzimin ürününün diğer enzimi inhibe ettiği sistemlerden daha verimli ve kullanışlı olduğu görölmüştür.

6. MATERYAL ve METODLAR

6.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Materyaller

6.1.1 *Aspergillus niger*

Deneysel çalışmada kullanılan suş olan *Aspergillus niger*, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Enstitüsü, Mikoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi.

6.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 6.1'de verilmiştir.

Çizelge 6.1 Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

KİMYASAL	FİRMA\NO
Kazein pepton	Sigma-P6588
Et ekstraktı	Merck-103979
Maya ekstraktı	Merck-103753
Glukoz	Merck-108342
Tween 80	Fluka-93780
K ₂ HPO ₄	Riedel-04248
Na- Asetat	Merck-106268
Amonyum sitrat	Sigma-A1332
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-M1880
MnSO ₄ .H ₂ O	Sigma-M7634
Coomassie Blue G-250	Sigma-B0770
Etanol	Merck-100983
o-Fosforik asit	Riedel-4107
2-Hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit	Fluka-42260
NaOH	Riedel-06203
Pullulan	Sigma-P4516
Nişasta	Riedel-33615
Amilopektin	Sigma-10120
Dekstrin	Fluka-31400
Tris	Fluka-93950
(NH ₄) ₂ SO ₄	Fluka-09978
Cam Boncuk	Sigma-G9143
Kitosan	Fluka-50494
PEG 6000	Merck-807491

6.1.3 Kullanılan Cihazlar

Sterilizasyon işlemi için:

Certoclav marka otoklav

Enzim indüksiyonu için:

Sartorius marka inkübatör

Enzim aktivite ve protein tayini için:

Unicam marka UV\VIS spektrofotometre

GFL 1086 marka su banyosu

pH kontrolü için:

CyberScan pH 500 pHmetre

Santrifüj için:

Sigma marka soğutmalı santrifüj

Kullanılan tampon, çözelti ve kültürlerin saklanması için:

Bosch marka buzdolabı

Karıştırma işlemleri için:

Chiltern HS31 hotplate manyetik karıştırıcı

6.2 Kullanılan Metotlar

6.2.1 Kültür Ortamı

6.2.1.1 Saf Kültür Ortamı

Aspergillus niger % 3 malt ekstraktı ve % 2 agar-agar içeren katı besiyeri üzerinde üretildi. İnkübasyon süresi 30°C sıcaklıkta 3-5 gündür. Bu şekilde hazırlanan suş +4°C'de 4 ay muhafaza edilir.

6.2.1.1.1 Spor Çözeltinin Hazırlanması

Saf kültürden çoğaltılan mikroorganizmadan spor çözeltisi hazırlamak üzere, katı besiyerinde üreyen mikroorganizma üzerine 10 mL steril destile su eklenerek, öze yardımıyla sporlar hafifçe kazınarak çözeltiliye alındı.

6.2.1.2 Enzim Üretim Ortamı

Bu çalışmada kullanılan modifiye enzim üretim ortamının bileşimi (g/L) (Vishnu vd., 1998):

Kazein pepton	10,0 g
Et ekstraktı	10,0 g
Maya ekstraktı	5,0 g
Glukoz	20,0 g
Tween 80	1,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Na-asetat	5,0 g
Amonyum sitrat	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05 g

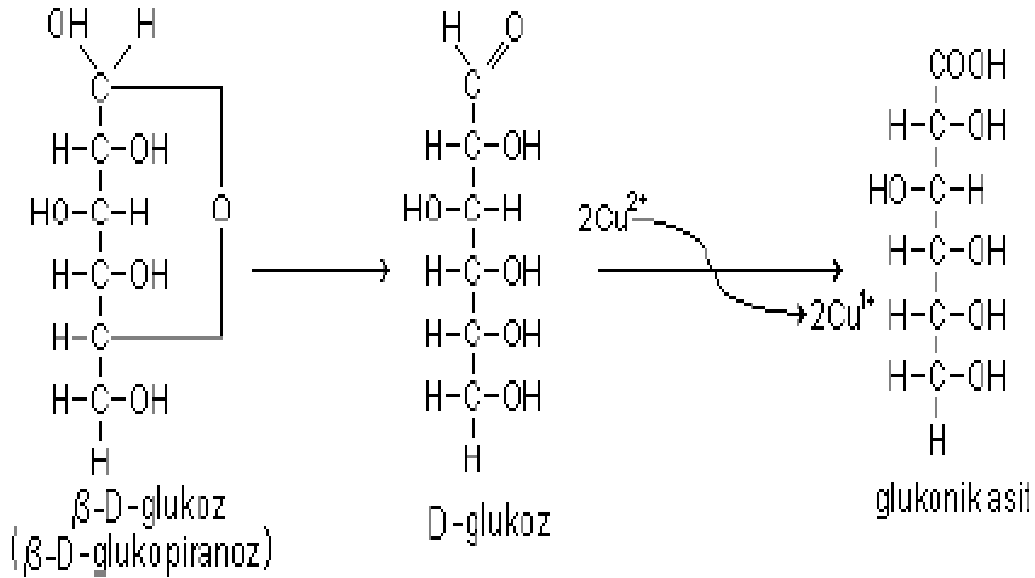
Ortamın pH'ı 0,1 M asetik asit ve 1 N NaOH ile 6,5 olarak ayarlandı. Hazırlanan ortamlar 500 mL'lik erlenlerde 100'er mL olacak şekilde erlenlere alındı ve kullanılmadan önce 20 dakika 121°C buharlı basınçta steril edildi. Daha sonra 1 mL spor çözeltisi ile aşılama yapıldı. İnkübatörde 48 saat boyunca 160 rpm, 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sırasında ortamda sadece misel oluşumu sağlandı. Çünkü besiyeri hazırlanırken karbon kaynağı olarak glukoz kullanılır. Enzim aktivite deneyinde, enzim tarafından hidroliz edilerek açığa çıkacak olan glukoz konsantrasyonu belirlendiğinden, hidroliz sonucu açığa çıkan glukoz ile mikroorganizmaların büyümesi için sıvı besiyerine konulan glukozun karıştırılmasını engellemek için yer değiştirme yöntemi tercih edilir. Bu nedenle 48 saatlik inkübasyonun ardından yer değiştirme yöntemi uygulandı. Bu sürenin sonunda büyüyen miseller ortamdan alındı, steril destile su ile yıkandı ve glukozdan arındırılan miseller, glukozun yerine optimum pullulanaz üretimini sağlayacak karbon kaynağının ve konsantrasyonunun tespiti amacıyla

dört farklı karbon kaynağı nişasta, amilopektin, dekstrin veya pullulanın üç farklı konsantrasyonunun (% 0,1, % 0,5 veya % 1) bulunduğu 500 mL'lik erlenlerdeki 100'er mL'lik yer değiştirme ortamlarına alındı.

6.2.2 Pullulanaz Aktivitesinin Tayini

Pullulanaz aktivitesi DNS indirgen şeker tayini ile gerçekleştirildi. Örneklerdeki pullulanaz enziminin katalitik etkisi ile substrat çözeltisi parçalanarak ortaya çıkan glukoz miktarı 540 nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

Şekeri indirgeyerek ortaya çıkan rengin spektrofotometrik olarak okunmasını sağlayan birçok yöntem vardır. 3,5-dinitrosalisilik asit belirteci ilk defa Sumner tarafından idrardaki şekeri tayin etmek amacıyla kullanılmıştır. DNS yönteminde 2-Hidroksi-3,5-Dinitrobenzoik asit, 3-Amino-5-Nitrosalisilik asite indirgenirken; glukoz birimleri glukonik asite yükseltgenir (Miller, 1973).



Şekil 6.1 Glukozun yükseltgenmesi [2]

Çözeltiler

1. 0,1 M, pH 6,5 Asetat Tamponu: 50 μL asetik asit ve 4,032 gr Na-asetat çözeltileri karıştırıldı. Destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. 1 N NaOH ile pH 6,5'a ayarlandı.
2. DNS Çözeltisi: 10 g 2-Hidroksi-3,5-Dinitrobenzoik asit, 10 g NaOH, 2 g fenol ve 200 g Na-K tartarat karıştırıldı. Hacmi destile su ile 1000 mL' ye tamamlandı.

3. % 1'lik Substrat Çözeltileri: Substrat çözeltisi olarak kullanılacak pullulan, nişasta, amilopektin ve dekstrinden 1'er g alınarak ayarlanılmak istenen pH değerindeki 0,1 M asetat tamponunda çözüldü ve balon jofede 100 mL'ye tamamlandı.

Enzimin aktivite tayininde 0,25 mL enzim örneği üzerine, 0,25 mL substrat çözeltisi eklendi. Kör deneme için 0,5 mL 0,1 M pH 6,5 asetat tamponu kullanıldı. Her iki numune 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Numuneler 5 dakika buz banyosunda soğutularak reaksiyon sonlandırıldı. Ardından hem örneğe hem de kör tüplere 0,75 mL DNS belirteci ilave edildi ve 5 dakika kaynayan suda tutuldu. Tüplerin herbirine 3,75 mL destile su eklenerek absorbans değerleri 540 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Bulunan değerlerden, standart glukoz eğrisi yardımıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkan glukoz miktarı $\mu\text{mol/dakika}$ olarak belirlendi ve enzim aktivitesi hesaplandı.

6.2.3 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite pullulanaz aktivitesi (U); standart koşullar altında bir dakikada pullulandan bir μmol glukoz oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı ve enzim aktivitesi total ünite olarak U/mL cinsinden ifade edildi.

Şekil 6.2' deki standart glukoz grafiği kullanılarak bulunan glukoz konsantrasyonları aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite (U/mL) hesaplandı.

$$\text{Total ünite (U/mL)} = \frac{\frac{(mg)glukoz}{(mL)} \times 1000}{t \times Mg} \quad 6.1$$

(mg) glukoz \ (mL) : Örneklerin absorbanslarına karşılık gelen glukoz miktarı

t : İnkübasyon zamanı (30 dak.)

M_G : Serbest bırakılan glukozun ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) molekül ağırlığı (g/mol)

Bir ünite enzim aktivitesi; standart koşullar altında bir dakikada pullulan'dan 1 μmol glukoz oluşmasını sağlayan enzim miktarıdır.

6.2.3.1 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

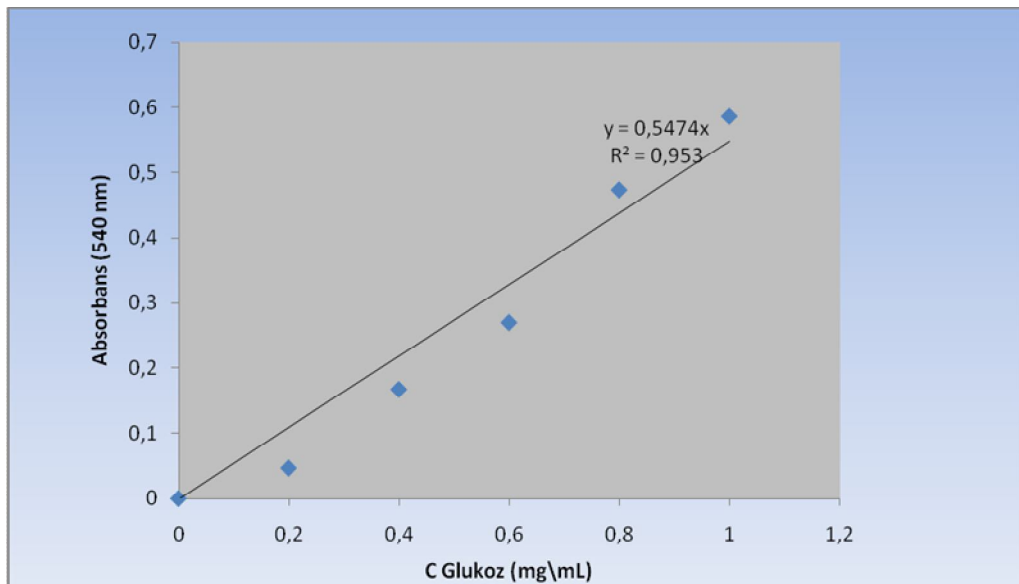
Total ünite değerleri mL' deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

6.2.4 Glukoz Standart Eğrisinin Çizilmesi

Glukoz standart eğrisi için 1 mg\mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi hazırlanarak, bu çözeltiden 0,2-1 mg\ml konsantrasyon aralığında seyreltik glukoz çözeltileri hazırlandı. Elde edilen farklı konsantrasyonlardaki glukoz çözeltilerine enzim aktivite deneyi uygulandı. 0,25 mL glukoz çözeltisinin üzerine 0,25 mL substrat çözeltisi eklendi. Kör olarak 0,5 mL asetat tamponu kullanıldı. Deney her konsantrasyon için beş kez tekrarlandı ve beş ölçümün ortalamaları alındı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplandı ve standart eğri grafiği çizildi. Çizelge 6.2'de farklı konsantrasyon değerlerine karşılık olarak 540 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalamaları verilmiştir.

Çizelge 6.2 Glukoz standart eğrisi için absorbans değerleri

X	Y
0	0
0,2	0,0468
0,4	0,167
0,6	0,270
0,8	0,474
1	0,587



Şekil 6.2 Glukoz standart eğrisi

6.2.5 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktar tayini sığır serum albümin (BSA) kullanılarak Bradford (1976) Yöntemi'ne göre yapıldı.

Bradford yöntemi için renk reaktifinin hazırlanması:

100 mg Coomassie Blue G-250, 50 mL % 96 (v/v) etanolde çözüldükten sonra 100 mL % 85 (v/v) o-fosforik asit eklendi. Son hacim destile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Çözelti 1 numaralı Whatman kağıdından süzöldükten sonra renk reaktifi koyu renkli cam bir şişede saklandı.

Bu yöntemde kuru, temiz test tüplerine 1 mL renk reaktifi koyuldu, üzerine örnek çözeltilerden 0,01 mL eklendi. Kör test tüplerine ise 1 mL renk reaktifi koyuldu ve 0,01 mL destile su eklendi. Örnekler köre karşı 595 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen absorbans değerlerinin BSA ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla protein miktarı mg/mL olarak belirlendi.

6.2.5.1 Protein Miktarının Hesaplanması

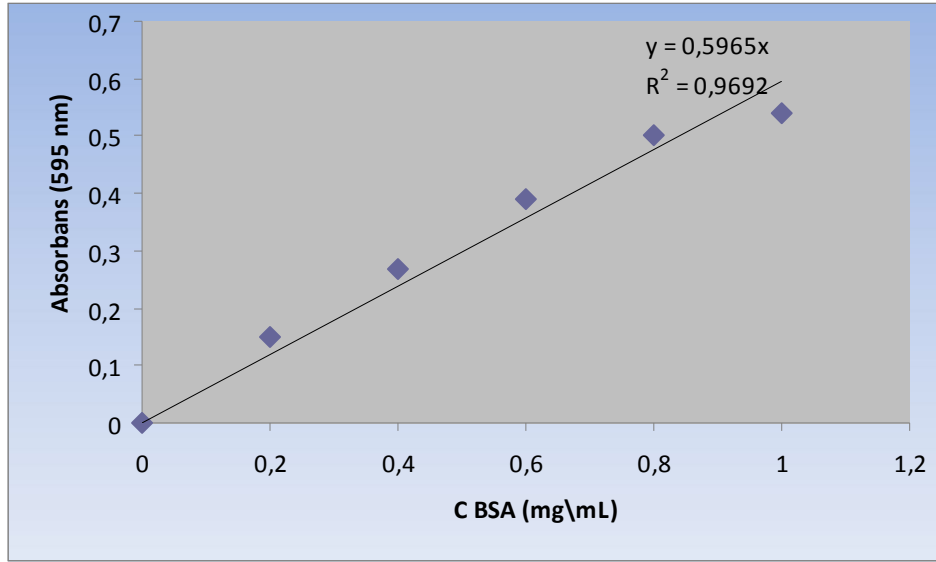
Şekil 6.3'deki BSA standart eğri grafiği kullanılarak mL' deki protein miktarları hesaplandı.

6.2.6 Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi

BSA, 1 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde destile suda çözümlenerek stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,2-1 mg/mL konsantrasyon aralığında seyreltilmiş protein standart çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Bradford deneyi uygulandı. Deney her konsantrasyon için beş kez tekrarlandı ve beş ölçümün ortalamaları alındı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplandı ve grafik çizildi. Çizelge 6.3'de farklı konsantrasyon değerlerine karşılık olarak 595 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalama verilmiştir.

Çizelge 6.3 Protein absorbans değerleri

X	Y
0	0
0,2	0,149
0,4	0,268
0,6	0,391
0,8	0,502
1	0,539



Şekil 6.3 Protein standart eğrisi

6.2.7 Kültür Ortamında Pullulanaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

6.2.7.1 Farklı Konsantrasyonlardaki Farklı Substratların Pullulanaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Enzim üretimi için kullanılan yer değiştirme ortamlarında karbon kaynağı olarak dört farklı substrat ayrı ayrı kullanıldı. Ortamlar nişasta, dekstrin, amilopektin veya pullulan ile desteklenerek enzim üretimi sağlandı. Kullanılan farklı substratlar % 0,1, % 0,5 veya % 1 (m/v) konsantrasyonlarda olmak üzere ortamlara ayrı ayrı ilave edildi.

6.2.7.2 Pullulanaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

İnkübasyon süresinin pullulanaz üretimine etkisinin saptanması amacıyla enzim üretim ortamına farklı konsantrasyonlarda farklı karbon kaynakları eklendikten sonra kültürler 30°C'de 160 rpm'de 120 saat süresince inkübe edildi. 24 saat aralıklarla kültür ortamından alınan örneklerde aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

6.2.7.3 pH'nın Pullulanaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Enzim üretim ortamında *A. niger*'den pullulanaz üretimine pH'ın etkisini saptamak amacıyla % 0,1 g nişastayla desteklenmiş ortamlar 0,1 M asetik asit ve 1 N sodyum hidroksit kullanılarak 4-9 arasındaki farklı pH değerlerine ayarlandı. Kültürler 30°C, 160 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

6.2.7.4 Sıcaklığın Pullulanaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Enzim üretim ortamında *A. niger*'den pullulanaz üretimine sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla % 0,1 g nişastayla desteklenmiş ortamlar 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40°C sıcaklıkta 160 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi.

6.2.8 Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması

6.2.8.1 *A. niger*'den Pullulanaz Eldesi

Enzim üretim ortamı bölüm 6.2.1.2'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve 48 saat inkübasyon süresinin sonunda miseller süzülüp yıkandı. Optimum koşullara göre karbon kaynağı olarak içinde % 0,1 nişasta bulunan yer değiştirme ortamlarına aktarıldı. Kültürler optimum koşullar olan pH 6.5 ve 30°C sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültür örnekleri enzimin aktivitesinde kayıp olmaması için buz banyosu içinde süzüldü ve süzüntü 0°C sıcaklıkta, 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen **süpernatanta** enzim aktivitesi ve protein miktar tayini uygulandı.

6.2.8.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

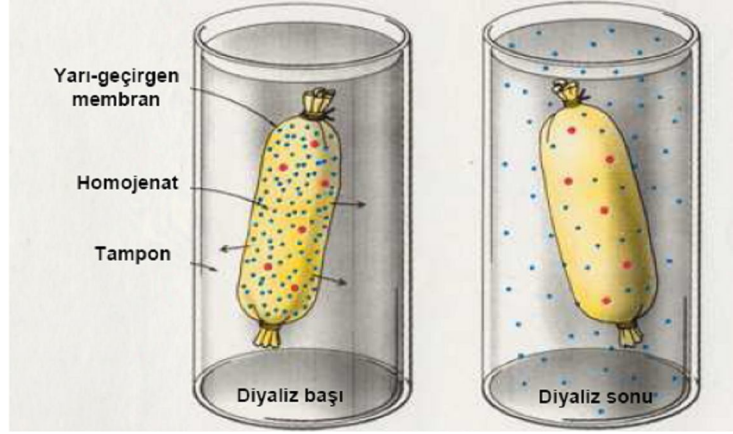
6.2.8.1.1.1 *A. niger* Pullulanazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Bulunması

A. niger pullulanazını çöktürecek uygun miktarda amonyum sülfat konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla 25 mL'lik beherlerin her birine 5'er mL süpernatant eklendi.

Beherlere sırasıyla %10-90 amonyum sülfat olacak şekilde dokuz farklı konsantrasyonda amonyum sülfat eklenerek çözünmesi sağlandı. Süpernatant içinde amonyum sülfatın tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra beherlerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı ve yarım saat daha karışmaya bırakıldı. Ardından her beher +4°C'deki buzdolabına bir gece beklemek üzere konuldu. Ertesi sabah içerisinde amonyum sülfat çözülmüş bu süpernatantlar 0°C sıcaklıkta, 10 000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. En uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun saptanması amacıyla oluşan çökelti ve süpernatantlar ayrıldıktan sonra protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlardan *A. niger* pullulanazı için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 60 olduğu bulundu.

6.2.8.1.1.2 *A. niger* Pullulanazının % 60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

Pullulanazı çöktürecek en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu bulunduktan sonra süpernatanta uygun miktarda amonyum sülfat azar azar eklendi. Amonyum sülfatın tamamı süpernatantta çözüldükten sonra beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp yarım saat daha manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. Ardından bir gece beklemek üzere +4°C sıcaklıkta buzdolabına konuldu. Ertesi sabah 0°C sıcaklıkta, 10 000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan çökelti ve süpernatant ayrıldı ve çökelti 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 6,5) içerisine alınarak oluşan çözelti **% 60 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı. Bu çözeltinin enzim aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi. Amonyum sülfatı uzaklaştırmak için % 60 amonyum sülfat kesidi dializ kesesi içine konuldu ve +4°C sıcaklıkta 0.1 M sodyum asetat tamponu (pH 6,5) içerisinde dialize bırakıldı. Dializ sırasında kullanılan tampon sık sık değiştirildi, işlem manyetik karıştırıcıda gerçekleşti ve çözeltideki amonyum sülfat tuzu bitinceye kadar dializ devam etti. Dializ tamamlandıktan sonra dializ kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla çözelti, 0°C sıcaklıkta, 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında çöken kısım uzaklaştırılarak üstteki berrak kısım alındı ve bu çözelti **1. Dializat** olarak adlandırıldı. Bu çözeltide de enzim aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra kalan kısım uygun hacimlerde derin dondurucuda -20°C sıcaklıkta saklandı.



Şekil 6.4 Diyaliz (Bellur, 2008)

6.2.9 Kısmi Olarak Saflaştırılmış *A. niger* Pullulanazının Karakterizasyonu

6.2.9.1 Pullulanazın Substrat Spesifikliği

A. niger pullulanazının aktivite tayini kısmi saflaştırma sonunda elde edilen dializatta substrat olarak % 1 (m\ v) dekstrin, nişasta, amilopektin, pullulan çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. Substrat çözeltileri, 0,1 M pH 6,5 sodyum asetat tamponu içinde çözülerek hazırlandı. Enzimin aktivite tayininde her substrat için ikişer deneme yapıldı ve bu denemelerin ortalaması alınarak hesaplandı.

6.2.9.2 Pullulanazın Aktivitesine pH Etkisi

Pullulanaz aktivitesi için optimum pH çalışması, pH 4-6 arasında 0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 7-9 arasında 0,1 M Tris/HCl tamponu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla substrat olarak dekstrin çözeltisi % 1 (m\ v) konsantrasyonda olacak şekilde pH 4-9 arası değerlerde hazırlandı ve protein miktarları ölçülerek enzim aktivitesi tayinleri yapıldı.

6.2.9.3 Pullulanazın Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

Pullulanaz aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklığı bulabilmek için 20-80°C arası sıcaklık değerlerinde çalışıldı. % 1 (m\ v) konsantrasyonda substrat çözeltisi olarak dekstrin çözeltisi için belirlenmiş optimum pH değerinde hazırlandı ve verilen sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi ile protein miktarları tayin edildi.

6.2.9.4 Pullulanazın K_m ve V_{max} Değerleri

A. niger pullulanazı için enzim kinetikleri substrat olarak dekstrin kullanılarak çalışıldı. Optimum koşullar altında değişik substrat konsantrasyonlarında (50, 100, 150, 200, 250 mg/mL) pullulanaz reaksiyonunun hızı ölçüldü. Kinetik veriler substrat konsantrasyonu ile aktivite arasında çizilen grafik ile gösterildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplandı.

6.2.10 *A. niger* Pullulanazının İmmobilizasyonu

Kısmi olarak saflaştırılmış pullulanaz enzimi cam boncuk üzerine adsorbe edilerek immobilizasyonu gerçekleştirildi.

6.2.10.1 Pullulanaz Enziminin Cam Boncuklara İmmobilizasyonu

Pullulanaz enziminin cam boncuklara immobilizasyonunda 5 g cam boncuk, safsızlıklardan temizlenmek amacıyla 4 M HCl asit ile 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Cam boncuklardan asiti uzaklaştırabilmek için destile su ile yıkama yapıldı ardından cam boncuklar 120°C sıcaklıkta etüvde 2 saat boyunca kurutuldu. Kurutulan cam boncuklar Kloroform:Metanol (1:1) çözücü sistemi ile yıkandı ve yarım saat 150°C sıcaklıkta etüvde kurutuldu. Bu yöntemle safsızlıkları giderilen cam boncuklardan 1 g alınarak 5 mL enzim çözeltisinde 2 saat boyunca + 4°C sıcaklıkta karışmaya bırakıldı. Bu işlemde sonra enzim çözeltisi adi süzgeç kağıdı kullanılarak süzülde, süzülen cam boncuklar ilk olarak aseton, sonra pH 5, 0,1 M sodyum asetat tamponu, ardından destile su ile yıkandı. Yıkama sularında ayrı ayrı protein miktar tayinleri yapıldı. Süzgeç kağıdının üzerinde kalan cam boncuklar vakumlu desikatörde 1 gece boyunca +4°C sıcaklıkta kurutuldu. Ertesi gün 10 mg immobilize enzim (enzim+cam boncuk), 2,5 mL destile su içerisinde bir deney tüpünde 1 dakika boyunca çalkalanarak immobilize enzim çözeltisi elde edildi. Bu çözelti bir süzgeç kağıdından süzülerek, elde edilen süzüntüde immobilize pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

6.2.10.2 Pullulanaz Enziminin PEG İçeren Kitosan Boncuklara İmmobilizasyonu

Pullulanaz enziminin PEG içeren kitosan boncuklara immobilizasyonunda 0,1 g kitosan ve 0,1 g PEG 6000 (1:1) oranında tartılıp 9 mL % 1'lik asetik asit çözeltisinde çözününceye kadar karıştırıldı ve çözeltiye 5 mL enzim çözeltisi ilave edilerek +4°C sıcaklıkta % 1 NaOH-Metanol-dH₂O (1:10:10 v\|v) çözeltisine bir damlalık yardımıyla damlatıldı. Oluşan boncuklar 30 dakika karıştırıldıktan sonra süzülüp yıkama suları toplandı ve yıkama sularında ayrı ayrı

protein miktar tayinleri yapıldı. Süzgeç kağıdının üzerinde kalan boncuklar vakumlu desikatörde 1 gece boyunca +4°C sıcaklıkta kurutuldu. Ertesi gün 10 mg immobilize enzim (enzim + boncuk), 2,5 mL destile su içerisinde bir deney tüpünde 1 dakika boyunca çalkalanarak immobilize enzim çözeltisi elde edildi. Bu çözelti bir süzgeç kağıdından süzülerek, elde edilen süzüntüde immobilize pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

6.2.10.3 İmmobilize *A. niger* Pullulanazının Karakterizasyonu

6.2.10.3.1 İmmobilize Pullulanazın Aktivitesine pH Etkisi

immobilize edilen pullulanaz aktivitesi için optimum pH çalışması, pH 4-6 arasında 0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 7-9 arasında 0.1 M Tris\HCl tamponu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla substrat çözeltisi olarak dekstrin çözeltisi % 1 (m\v) konsantrasyonda olacak şekilde pH 4-9 arası değerlerde hazırlandı ve protein miktarları ölçülerek enzim aktivitesi tayinleri yapıldı.

6.2.10.3.2 İmmobilize Pullulanazın Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

İmmobilize pullulanaz aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklığı bulabilmek için 20-80°C arası sıcaklık değerlerinde çalışıldı. % 1 (m\v) konsantrasyonda optimum pH değerinde hazırlanan dekstrin çözeltisi kullanılarak belirlenen sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi ile protein miktarları tayin edildi.

6.2.10.3.3 İmmobilize Pullulanazın K_m ve V_{max} Değerleri

Michealis sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerini belirleyebilmek için substrat olarak değişik konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200, 250 mg\mL) dekstrin çözeltisi 0.1 M Tris\HCl, pH 7 tamponunda hazırlanarak kullanılmış ve enzim aktivitelerine 37°C sıcaklıkta bakılmıştır. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanmıştır.

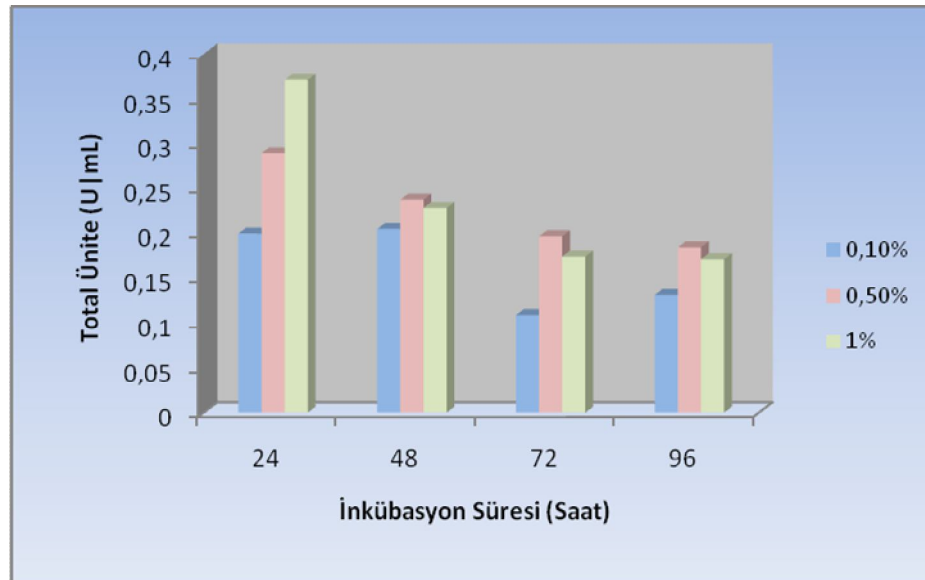
7. SONUÇLAR

7.1 Kültür Ortamında Pullulanaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

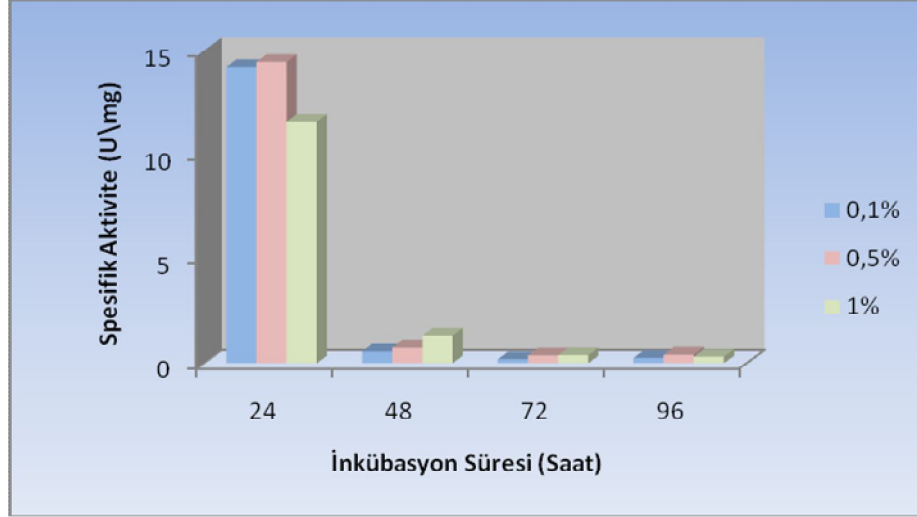
7.1.1 Nişastanın Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi.

Karbon kaynağı olarak en çok kullanılan bileşikler karbonhidratlardır. Mikroorganizmanın üreyebilmesi için karbon kaynağı seçerken karbon kaynağının hem ucuz hem de çevrede bol miktarda bulunabilen yaygın maddeler olmasına önem gösterilir. Mikroorganizmanın üremesi ve gelişmesi için en uygun karbon kaynağı seçildikten sonra bu karbon kaynağının hangi miktarda kullanılacağı da önemli bir konudur. Karbon kaynağı belirli düzeyin üzerinde alındığında katabolik bastırıcı (repressör) etkisi göstererek enzim üretimi azalabilir. Dolayısıyla besi ortamına konulacak karbon kaynağının en iyi biçimde kullanılma koşullarının saptanması gerekir.

Karbon kaynağı nişastanın farklı konsantrasyonlarının pullulanaz üretimine etkisini saptamak için enzim üretim ortamlarına % 0,1, % 0,5 veya % 1 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda nişasta ilave edildi. 24 saatte bir alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümü yapılarak spesifik aktivite hesaplandı.



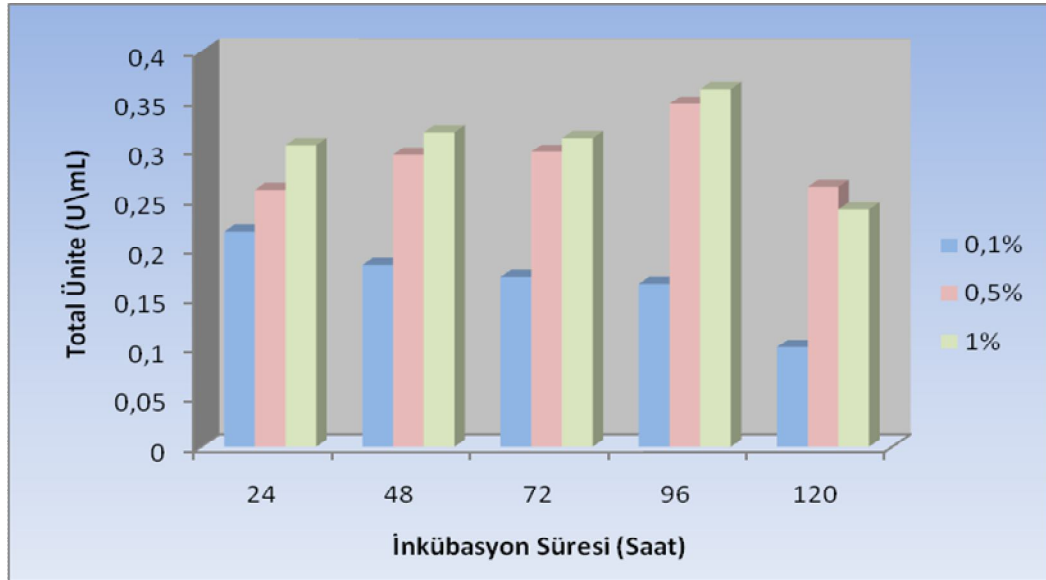
Şekil 7.1 Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı nişastanın konsantrasyonuna göre değişimi



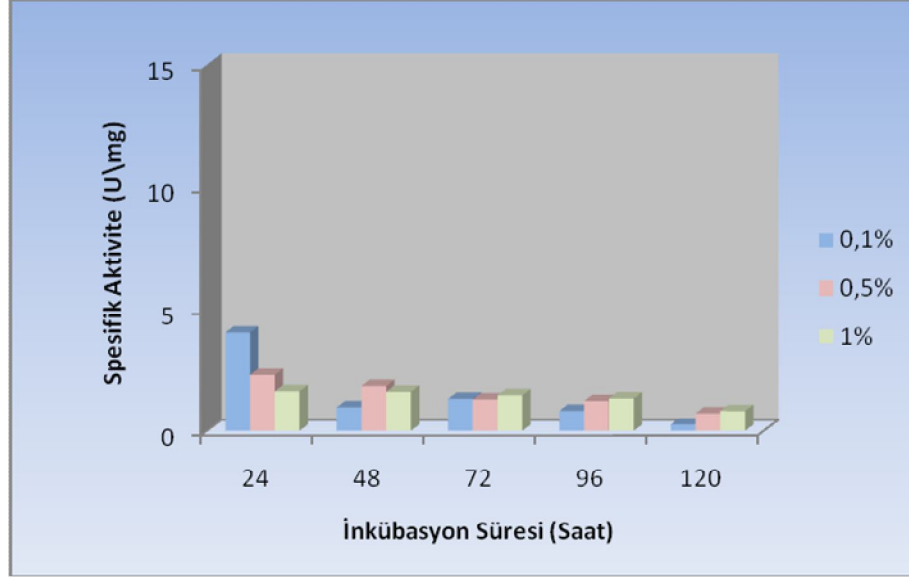
Şekil 7.2 Karbon kaynağı nişastanın farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi

7.1.2 Amilopektinin Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı amilopektinin farklı konsantrasyonlarının pullulanaz üretimine etkisini saptamak için yer değiştirme ortamlarına % 0,1, % 0,5 veya % 1 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda amilopektin ilave edildi. 24 saatte bir alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümü yapılarak spesifik aktivite hesaplandı.



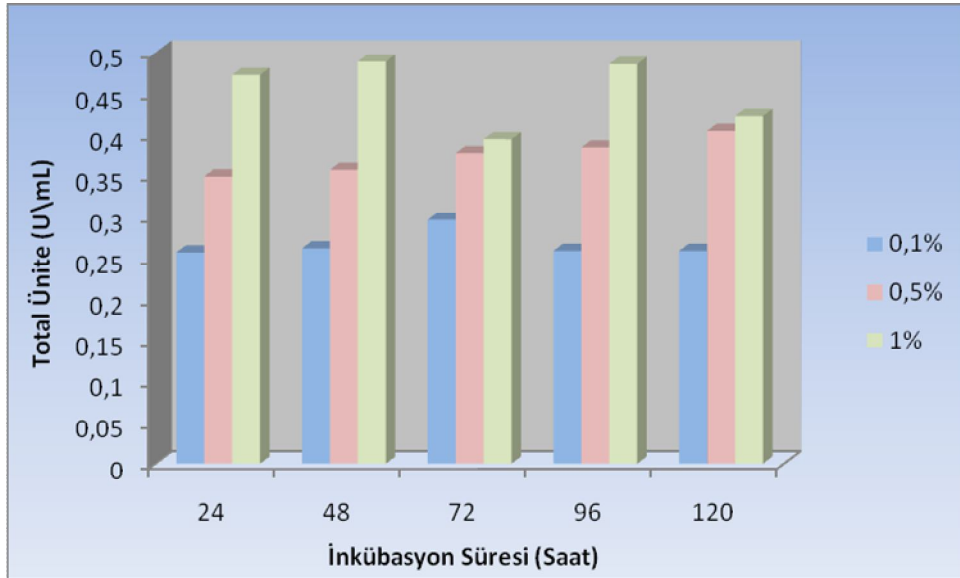
Şekil 7.3 Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı amilopektinin konsantrasyonuna göre değişimi



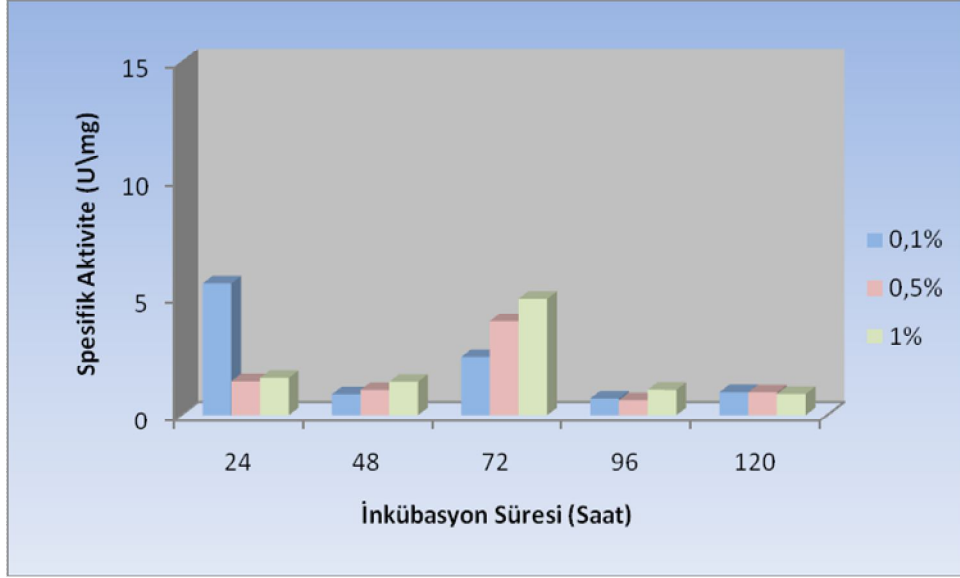
Şekil 7.4 Karbon kaynağı amilopektinin farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi

7.1.3 Dekstrinin Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı dekstrinin farklı konsantrasyonlarının pullulanaz üretimine etkisini saptamak için yer değiştirme ortamlarına % 0,1, % 0,5 veya % 1 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda dekstrin ilave edildi. 24 saatte bir alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümü yapılarak spesifik aktivite hesaplandı.



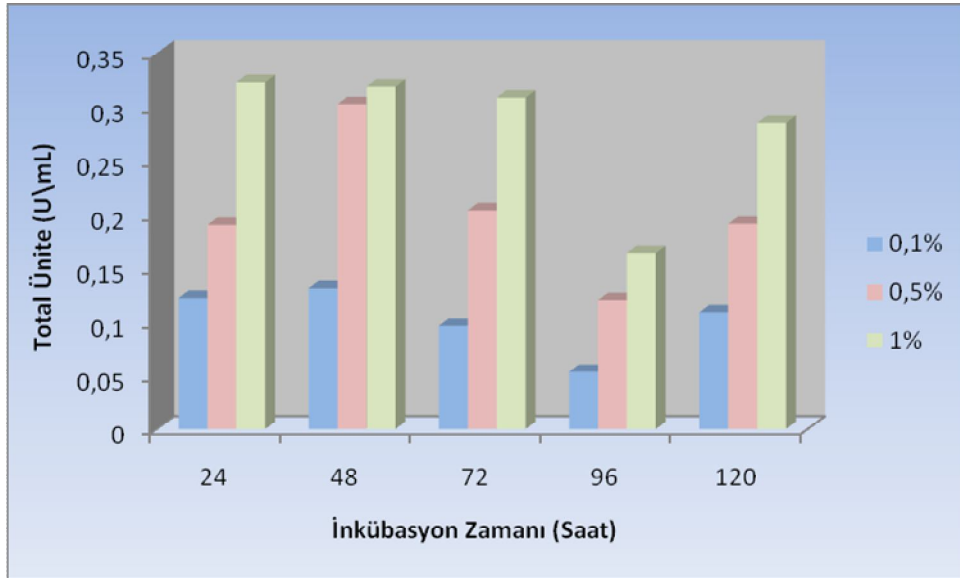
Şekil 7.5 Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı dekstrinin konsantrasyonuna göre değişimi



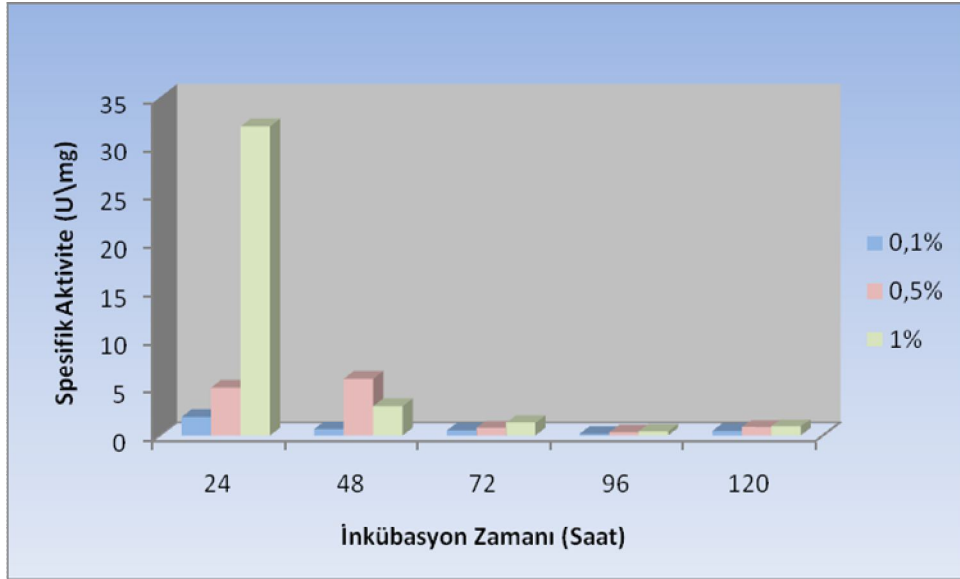
Şekil 7.6 Karbon kaynağı dekstrinin farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi

7.1.4 Pullulanın Farklı Konsantrasyonlarının Pullulanaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı pullulanın farklı konsantrasyonlarının pullulanaz üretimine etkisini saptamak için yer değiştirme ortamlarına % 0,1, % 0,5 veya % 1 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda pullulan ilave edildi. 24 saatte bir alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümü yapılarak spesifik aktivite hesaplandı.



Şekil 7.7 Pullulanaz aktivitesinin karbon kaynağı pullulanın konsantrasyonuna göre değişimi



Şekil 7.8 Karbon kaynağı pullulanın farklı konsantrasyonlarının spesifik aktiviteye etkisi

Farklı karbon kaynakları kullanıldığında elde edilen maksimum enzim aktiviteleri: karbon kaynağı olarak % 0,1 konsantrasyonda nişasta kullanıldığında 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda 14,21 U/mg; % 1 konsantrasyonda pullulan kullanıldığında 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda 31,98 U/mg; % 0,1 konsantrasyonda amilopektin kullanıldığında 24 saat inkübasyon süresinin sonunda 4,037 U/mg; % 0,1 konsantrasyonda dekstrin kullanıldığında 5,574 U/mg olarak bulunmuştur. Bütün karbon kaynakları için elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında % 1 konsantrasyon değerindeki pullulan için hesaplanan enzim aktivitesinin, farklı karbon kaynakları içerisinde elde edilen en yüksek enzim aktivite değeri olduğu görülmüştür. Ancak pullulanın pahalı bir madde olması onun endüstriyel uygulamalarda kullanılmasını olanaksız hale getirmektedir. Bu nedenle % 0,1 nişasta ile desteklenen yer değiştirme ortamındaki pullulanaz aktivitesinin yüksek olması, karbon kaynağı olarak nişastanın ucuz ve kolay bulunabilir özellikte olması dikkate alınarak pullulanaz üretimi için optimum karbon kaynağı olarak % 0,1 konsantrasyon değerindeki nişasta seçilmiştir.

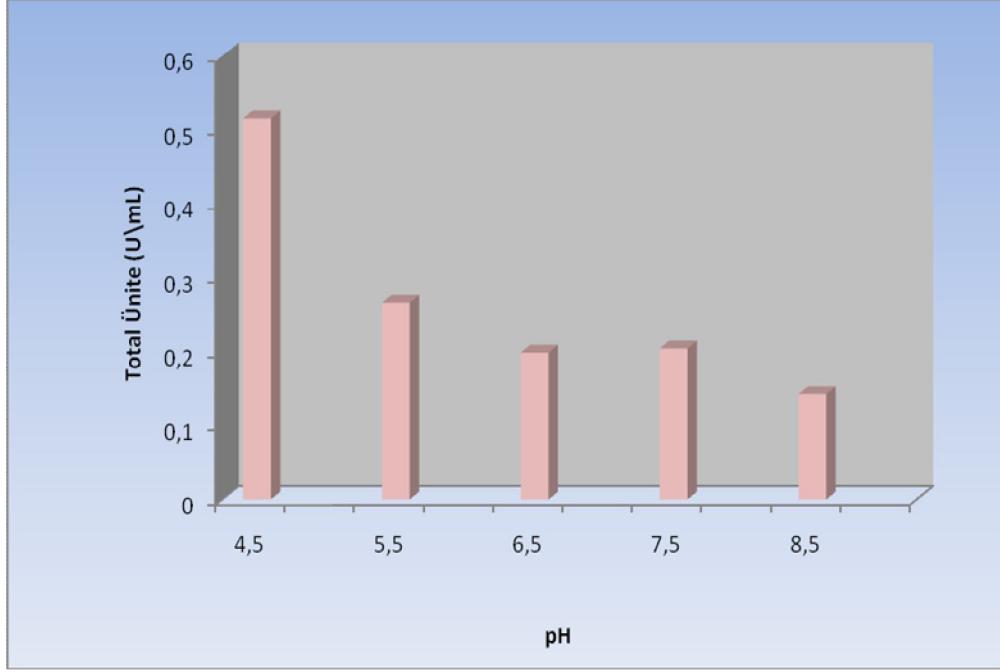
7.1.5 pH'ın Pullulanaz Üretimine Etkisi

Kültür ortamının pH'sı mikroorganizmaların besinlerden yararlanma verimleri üzerine etki etmektedir. Bu nedenle ortamın pH'nın optimum değerinde bulunması zorunludur.

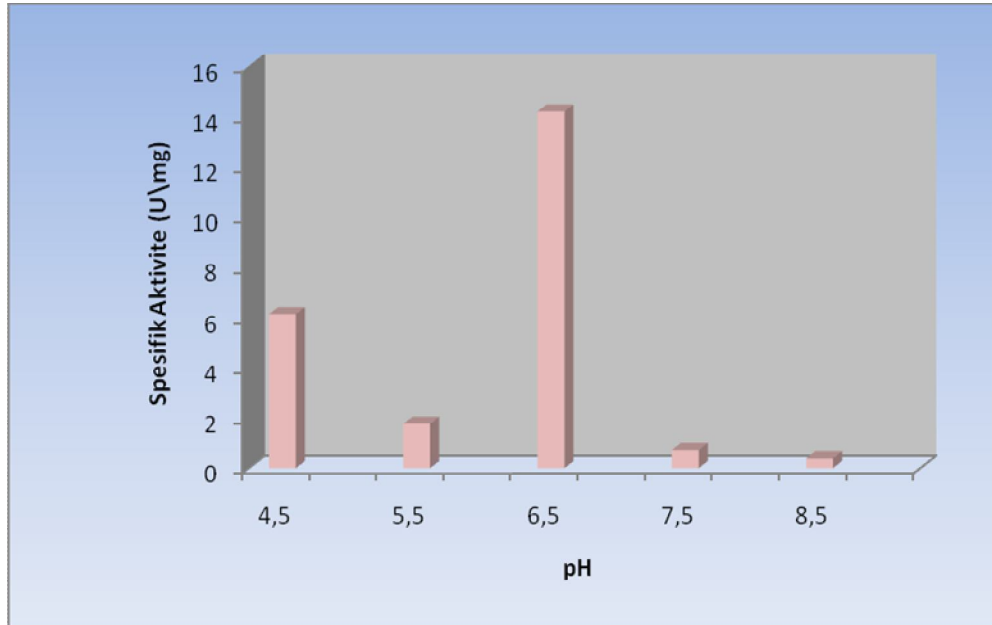
Enzim üretim ortamı, bölüm 6.2.1.2'de anlatıldığı şekilde pH 6,5 olacak şekilde hazırlandı ve *A. niger* spor çözeltisi ile aşılandı. 48 saatlik inkübasyon sonunda miseller % 0,1 nişasta ile desteklenen steril yer değiştirme ortamına alındı. Bu ortamın pH değerleri pH 4-9 arasında

değişen değerlere ayarlandı ve 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından aktivite ve protein miktarları tayin edilerek spesifik aktivite değerleri hesaplandı.

En yüksek pullulanaz aktivitesi 14,214 U/mg değeriyle pH değeri 6,5 olan enzim üretim ortamında elde edildi.



Şekil 7.9 Pullulanaz üretiminin farklı pH değerlerine göre değişimi



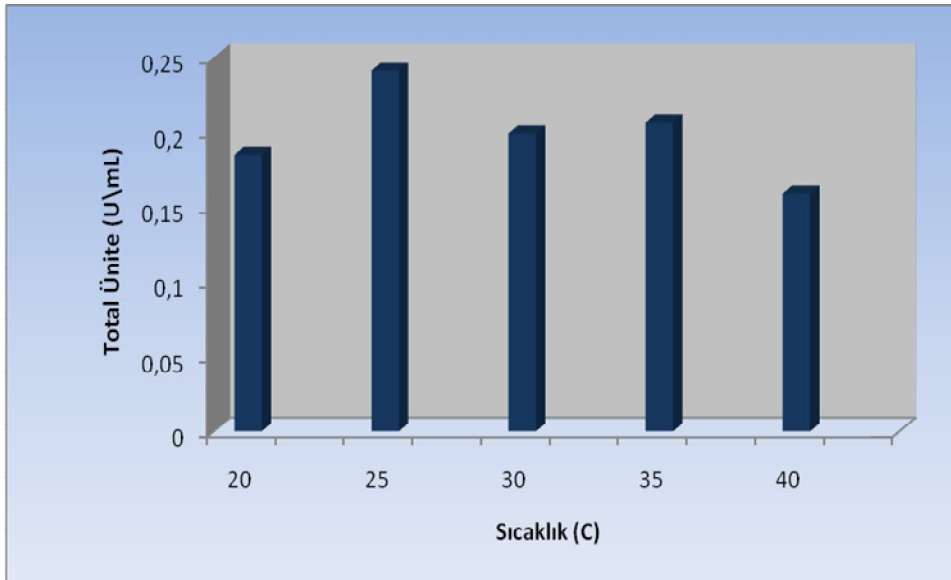
Şekil 7.10 Farklı pH değerlerinde pullulanaz üretiminin spesifik aktiviteye etkisi

7.1.6 Sıcaklığın Pullulanaz Üretimine Etkisi

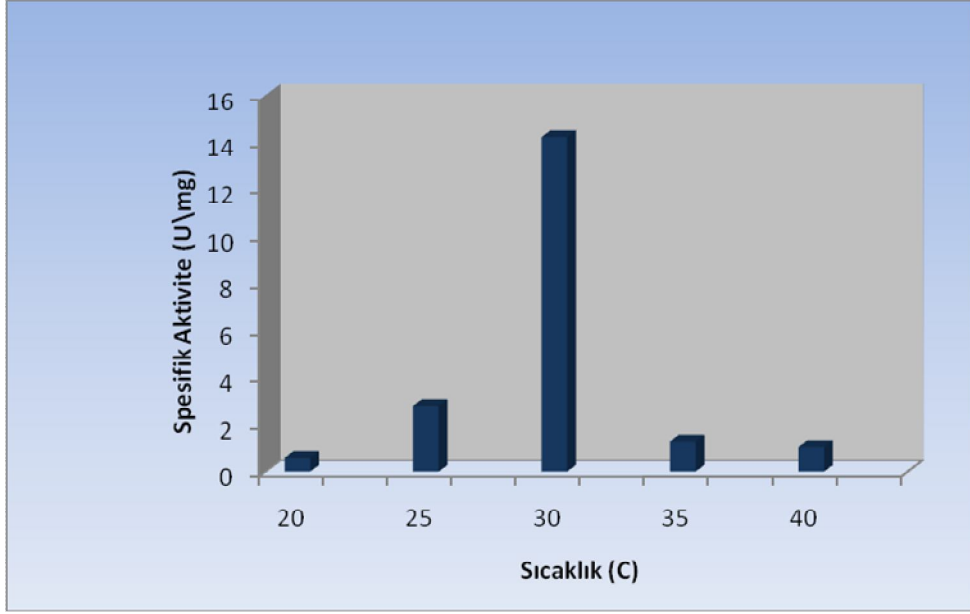
Sıcaklığın enzim üretimine etkisi olduğu bilinmektedir. Besi ortamının sıcaklığı karbon ve enerji kaynaklarının gelişme verimi üzerine etkisini de değiştirmektedir. Sıcaklık düşüncü daha fazla enerjiye ihtiyaç olacağından karbon ve enerji kaynağının verimi de düşer. Bu nedenle enzim üretim ortamının optimum sıcaklık değerinde bulunması önemlidir.

Enzim üretim ortamında *A. niger*'den pullulanaz üretimine sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla % 0,1 nişasta eklenmiş ortamlar 20, 25, 30, 35 ve 40°C'de 160 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 24 saatlik inkübe edildi. İnkübasyon süresinin alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümü tayinleri yapılarak spesifik aktivite değerleri hesaplandı.

En yüksek pullulanaz aktivitesi, inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu enzim üretim ortamında elde edildi.



Şekil 7.11 Pullulanaz üretiminin farklı sıcaklık değerlerine göre değişimi



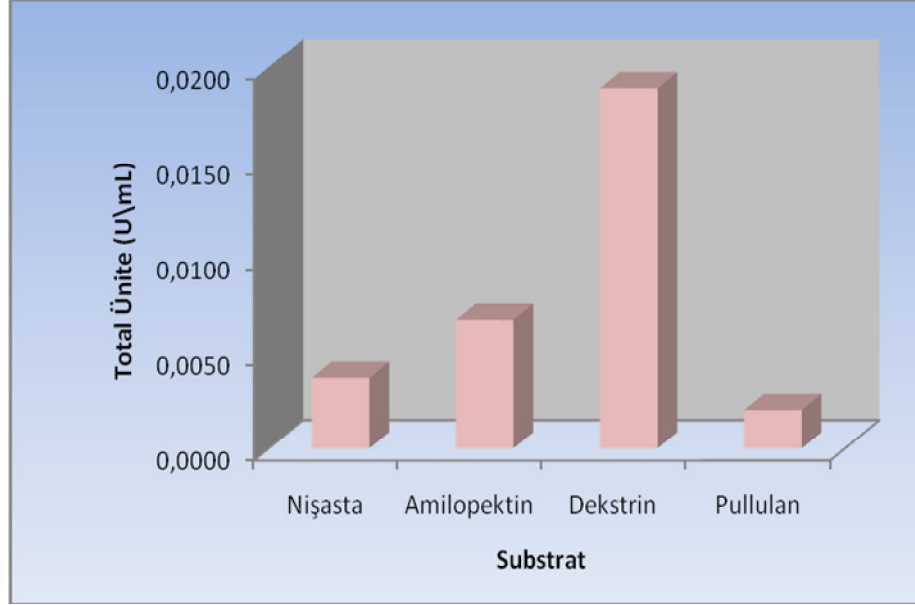
Şekil 7.12 Farklı sıcaklık değerlerinde pullulanaz üretiminin spesifik aktiviteye etkisi

7.2 Kısmi Olarak Saflaştırılmış Pullulanaz Enziminin Karakterizasyonu

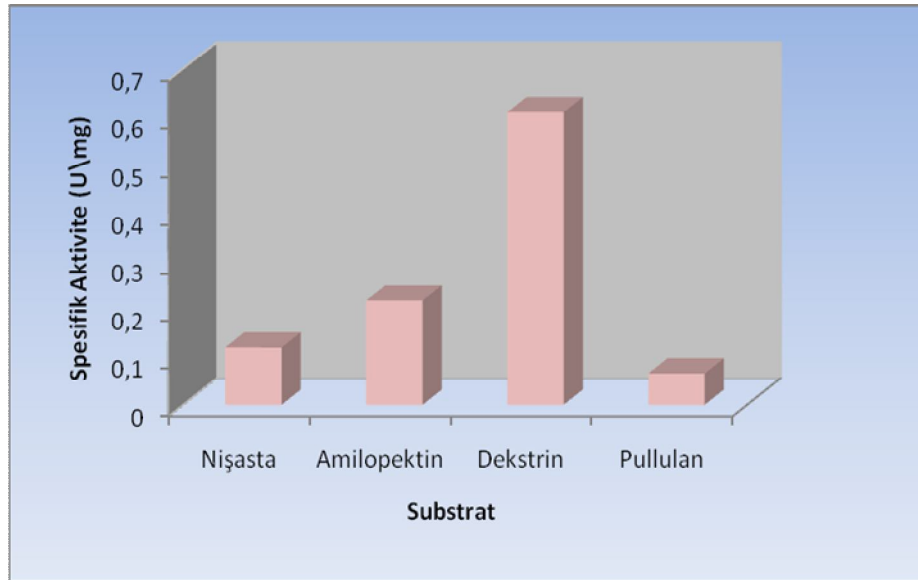
7.2.1 Pullulanazın Substrat Spesifikliğı

Pullulanaz enziminin en yüksek aktiviteyi göstereceğı substratın belirlenebilmesi için % 1 (m/v) konsantrasyonda nişasta çözeltisi, amilopektin çözeltisi, dekstrin çözeltisi ve pullulan çözeltisi optimum pH değerlerinde hazırlandı ve her bir substrat çözeltisinde enzim aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi.

Aspergillus niger pullulanazı, nişasta, amilopektin, dekstrin ve pullulan üzerine etki ederken en yüksek aktiviteyi (0,610 U/mg) % 1 konsantrasyonda dekstrin çözeltisi kullanıldığında gösterdi.



Şekil 7.13 Pullulanaz aktivitesinin farklı substratlara göre değişimi

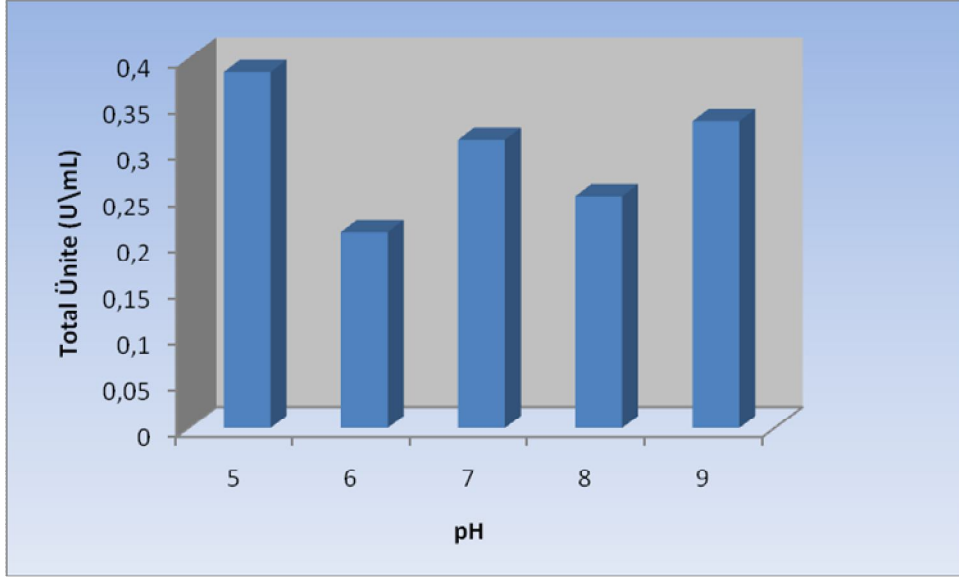


Şekil 7.14 Farklı substratların pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

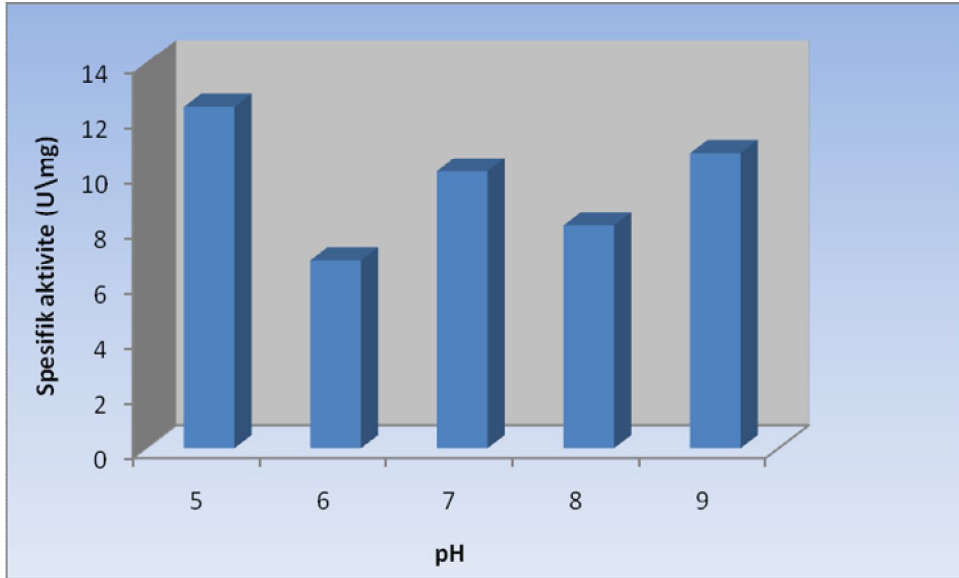
7.2.2 Pullulanaz Aktivitesine pH Etkisi

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir pH veya pH aralığı vardır. Enzimlerin maksimum reaksiyon hızına sahip oldukları pH değerine optimum pH denir.

Pullulanaz aktivitesi için optimum pH çalışması, pH 4-9 değerleri arasında gerçekleştirildi. Bu amaçla dekstrin çözeltisi % 1 (m/v) konsantrasyonda olacak şekilde pH 4-9 arası değerlerde hazırlanarak aktivite tayini ve protein miktarları hesaplandı. Dekstrin çözeltisi maksimum aktiviteyi (12,428 U/mg) pH 5 değerinde gösterdi.



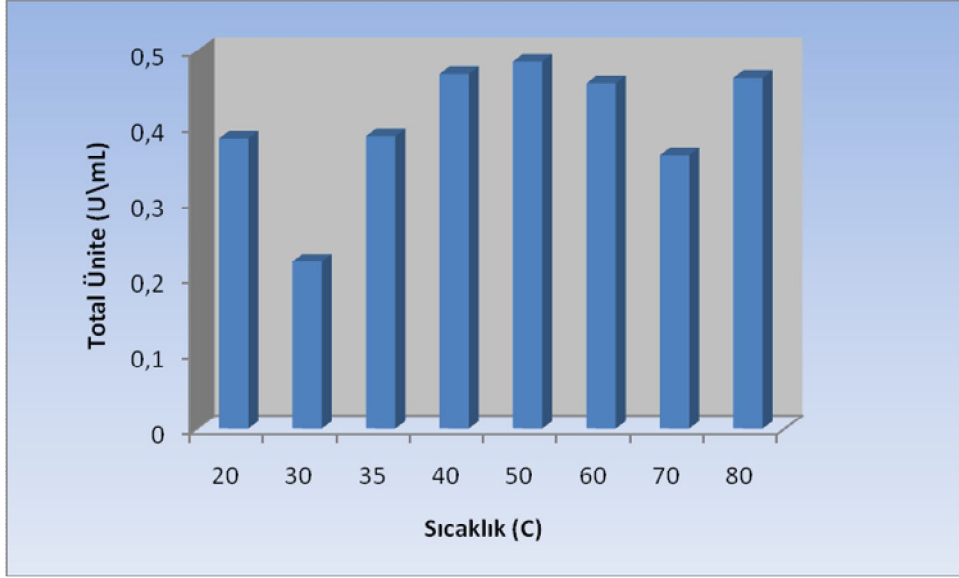
Şekil 7.15 Pullulanaz aktivitesinin farklı pH değerlerine göre değişimi



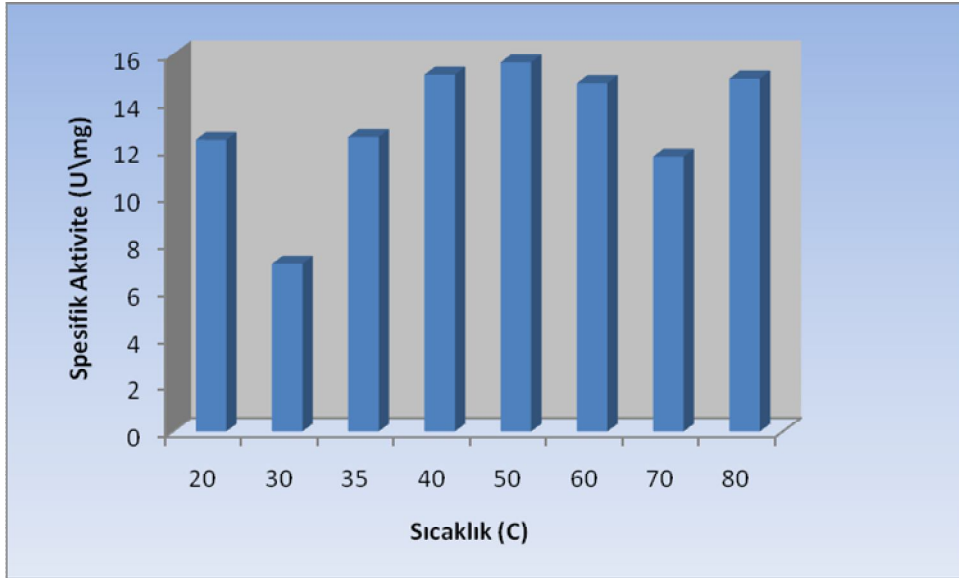
Şekil 7.16 Farklı pH değerlerinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

7.2.3 Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

Pullulanaz aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklığı bulabilmek için % 1 (m/v) pH 5 dekstrin çözeltisi, 20-80°C arası sıcaklık değerlerinde hazırlanarak aktivite tayini ve protein miktarları hesaplandı. Maksimum aktivite 50°C sıcaklık değerinde 15,146 U/mg olarak bulundu.



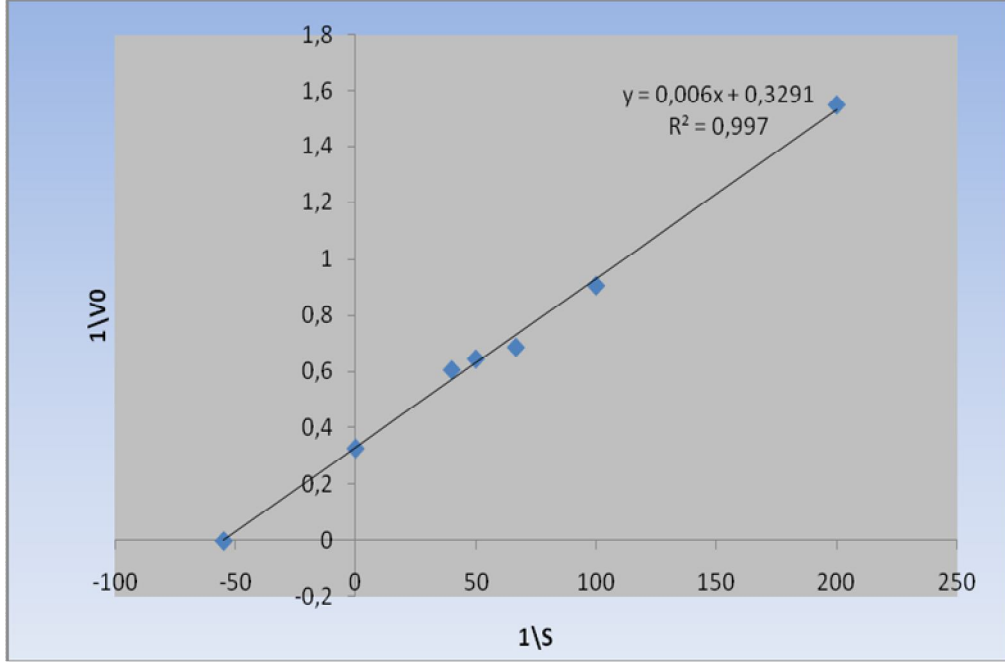
Şekil 7.17 Pullulanaz aktivitesinin farklı sıcaklıklara göre değişimi



Şekil 7.18 Farklı sıcaklıkların pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

7.2.4 Pullulanazın K_m ve V_{max} değerleri

Lineweaver-Burke grafiği *A. niger* pullulanazının kinetik parametrelerini ve bunlar arasındaki lineer ilişkiyi göstermek amacıyla kullanılmıştır. Şekil 7.19'da 0,5-2,5 g/mL konsantrasyon değerlerinde hazırlanan dekstrin çözeltisi için elde edilen reaksiyon hız kinetiği gösterilmiştir. *A. niger* pullulanaz enziminin K_m değeri 1,823 g/mL, maksimum reaksiyon hızı ise (V_{max}) 3,038 U/mL olarak elde edilmiştir.



Şekil 7.19 *A. niger* pullulanaz aktivitesine substrat konsantrasyonu etkisi

7.3 Pullulanaz Enziminin İmmobilizasyonu

7.3.1 Pullulanaz Enziminin Cam Boncuklara İmmobilizasyonu

Kısmi olarak saflaştırılmış *A. niger* pullulanaz enzimi cam boncuk üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 7.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 7.1 Pullulanaz enziminin cam boncuklara immobilizasyonu

Çözelti	Total Ünite (U\mL)	Total Protein (mg\mL)	Spesifik Aktivite (U\mg)	İmmobilizasyon Verimi % (Aktivite)	İmmobilizasyon Verimi % (Protein)
Serbest enzim	0,99	0,096	10,25	-	-
Cam boncuklara immobilize enzim	0,82	0,029	28,60	82,49	29,56

7.3.2 Pullulanaz Enziminin PEG İçeren Kitosan Boncuklara İmmobilizasyonu

Kısmi olarak saflaştırılmış *A. niger* pullulanazı PEG İçeren Kitosan Boncukların üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Sonuçları Çizelge 7.2’de gösterilmektedir.

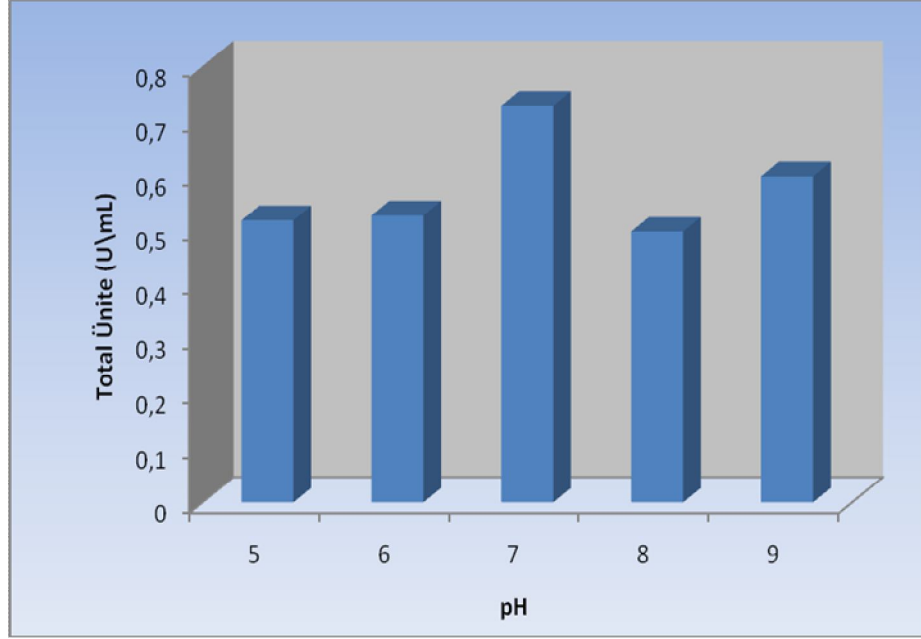
Çizelge 7.2 Pullulanaz enziminin PEG içeren kitosan boncuklara immobilizasyonu

Çözelti	Total Ünite (U\mL)	Total Protein (mg\mL)	Spesifik Aktivite (U\mg)	İmmobilizasyon Verimi % (Aktivite)	İmmobilizasyon Verimi % (Protein)
Serbest enzim	0,40	0,136	2,956	-	-
PEG içeren kitosan boncuklara immobilize enzim	0,49	0,042	11,547	120,65	30,88

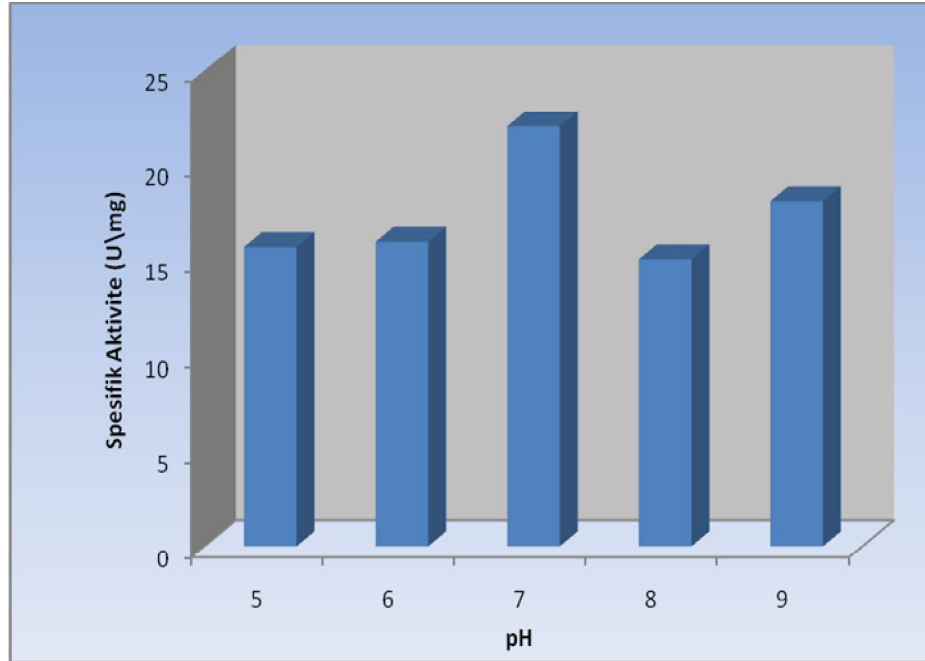
A. niger pullulanazının immobilizasyonu çalışmasında, PEG içeren kitosan boncuklara immobilizasyondan daha iyi sonuç alınmasına rağmen PEG içeren kitosan boncuklar deforme olduğundan, immobilize enzimin karakterizasyonu çalışmasında cam boncuklara immobilizasyonu gerçekleştirilmiş pullulanaz enzimi ile devam edilmiştir.

7.3.3 İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine pH Etkisi

Cam boncuklara immobilizasyonu gerçekleştirilen pullulanaz enziminin optimum pH’ı spesifik aktivitesi 22,06 U\mg olarak bulunan pH 7 değeri olarak belirlenmiştir.



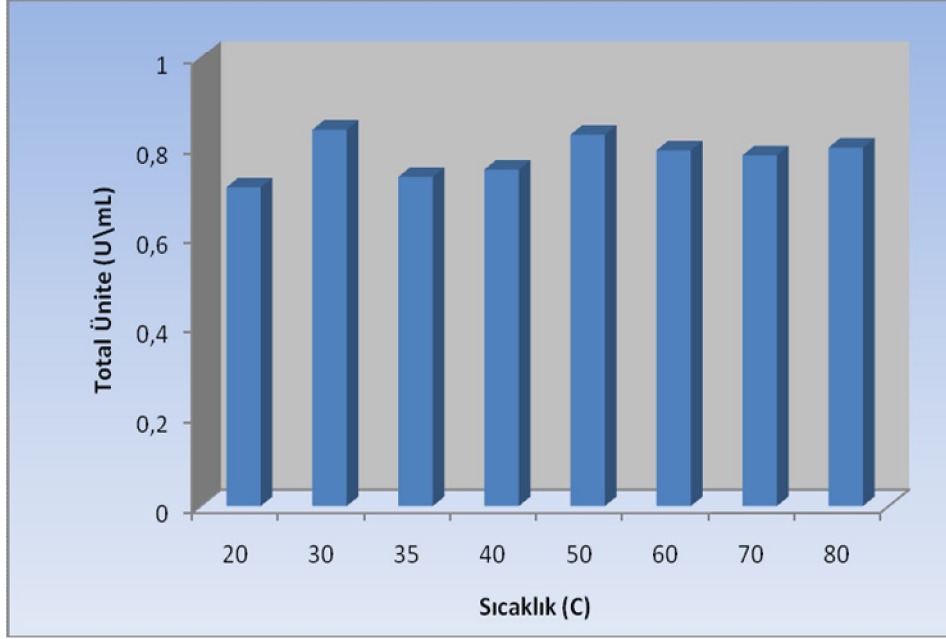
Şekil 7.20 İmmobilize pullulanaz aktivitesinin farklı pH değerlerine göre değişimi



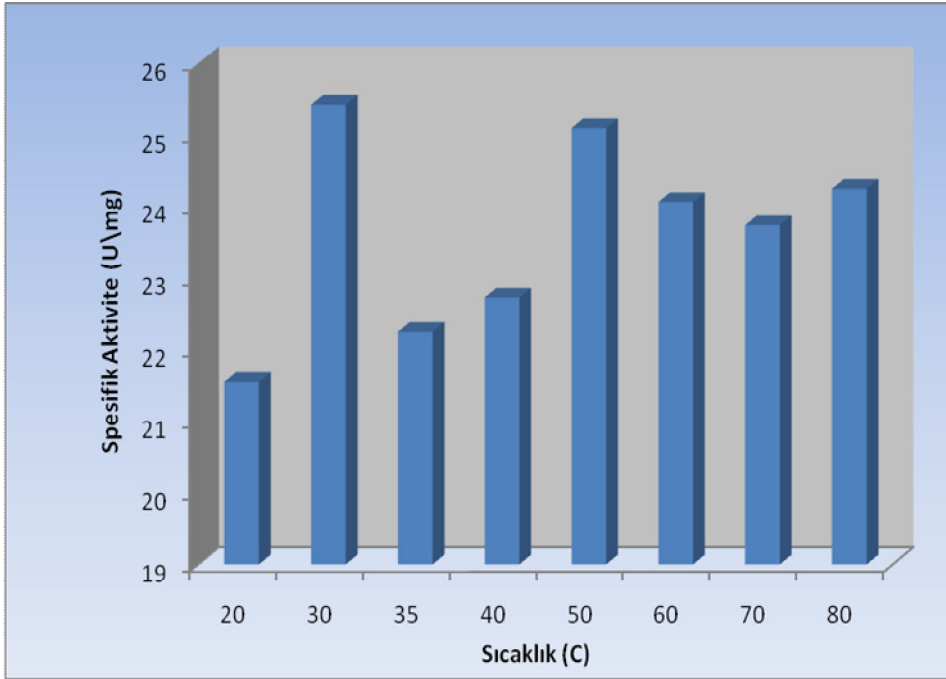
Şekil 7.21 Farklı pH değerlerinin immobilize pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

7.3.4 İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

İmmobilize pullulanaz aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklığı bulabilmek için 20-80°C arası sıcaklık değerlerinde çalışıldı. Optimum sıcaklık değeri immobilize pullulanaz için spesifik aktivite değeri 25,424 U/mg olarak bulunan 30°C sıcaklık olarak belirlenmiştir.



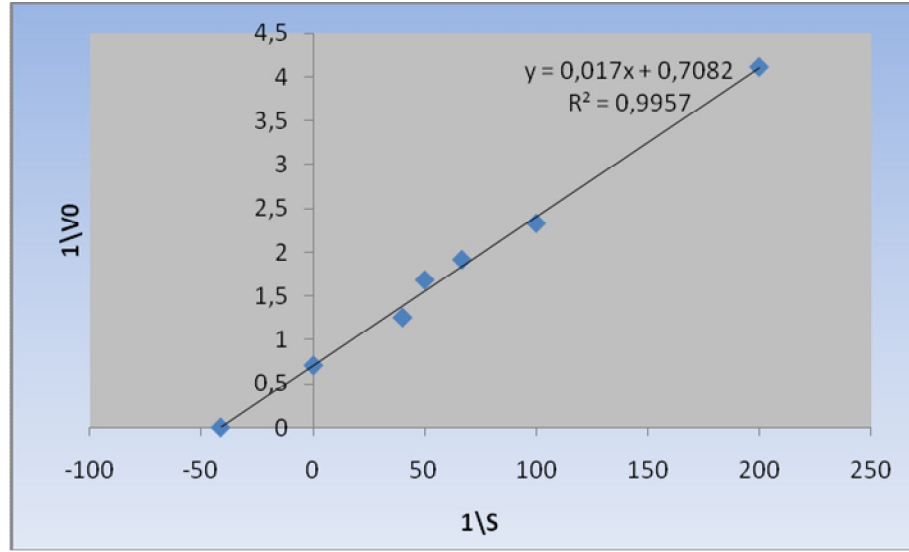
Şekil 7.22 İmmobilize pullulanaz aktivitesinin farklı sıcaklık değerlerine göre değişimi



Şekil 7.23 Farklı sıcaklık değerlerinin immobilize pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

7.3.5 İmmobilize Pullulanazın K_m ve V_{max} Değerleri

Lineweaver-Burke grafiği immobilize *A. niger* pullulanazının kinetik parametrelerini ve bunlar arasındaki lineer ilişkiyi göstermek amacıyla kullanılmıştır. Şekil 7.24'de 0,5-2,5 g/mL konsantrasyon değerlerinde hazırlanan dekstrin çözeltisi için elde edilen reaksiyon hız kinetiği gösterilmiştir. İmmobilize *A. niger* pullulanaz enziminin K_m değeri 2,4 g/mL, maksimum reaksiyon hızı ise (V_{max}) 1,412 U/mL olarak elde edilmiştir.



Şekil 7.24 İmmobilize *A. niger* pullulanaz aktivitesine substrat konsantrasyonu etkisi

8. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Pullulanaz, nişasta ve pullulan gibi maddelerin α -1,6 glikozidik bağlarına etki eden bir enzimdir; nişastayı hidroliz ederek nişastadan glukoz ve maltoz eldesi verimini arttırır; bu yüzden nişasta endüstrisinde kullanılan önemli bir enzimdir.

Aspergillus niger küf mantarından pullulanaz enzimi indüksiyonu, saflaştırılması ya da immobilizasyonu ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde pullulanaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalarda daha çok termostabil ve geniş pH aralıklarında çalışılabilecek enzim elde etme amacıyla *Desulfurococcus mucosus*, *Thermococcus aggregans* gibi ekstremezofilik bakterilerden enzim eldesi yoluna gidilmiş böylece daha termostabil olan pullulanaz enziminin karakterizasyonu, immobilizasyonu konularında incelemeler yapılmıştır.

Bu çalışmada *A. niger*'den pullulanaz enzimi üretimi için gereken optimum karbon kaynağı ve karbon kaynağı konsantrasyonu çalışması sonuçları değerlendirildiğinde:

Karbon kaynağı olarak % 0,1, 0,5 ve 1 konsantrasyonlarında nişasta, amilopektin, dekstrin ve pullulan kullanılmış ve 24 saat süreyle besiyer ortamından örnek alınarak enzim aktiviteleri incelenmiştir. Enzim aktivite değerlerinin konsantrasyona bağımlı olmadığı ve inkübasyon süresi arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gerçekleştiği görülmüştür.

Optimum karbon kaynağı 24 saat inkübasyon süresinin ardından 14,21 U\mg değeri ile % 0,1 nişasta ile desteklenen yer değiştirme ortamı seçilmiştir.

Pullulanaz üretimi için optimum sıcaklık çalışması sonuçlarına bakıldığında:

20, 25, 30, 35 ve 40°C sıcaklık değerlerinde çalışılan pullulanaz üretim ortamlarında 30°C sıcaklığa kadar enzim aktivitesi giderek artmış bu sıcaklıktan sonra giderek azalma göstermiştir. En yüksek enzim aktivitesi 14,214 U\mg değeri ile 30°C sıcaklıkta görülmüştür.

Pullulanaz üretimi için optimum pH çalışması sonuçlarına bakıldığında:

pH 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 ve 8,5 değerlerinde çalışılan pullulanaz üretim ortamlarında pH 4,5 (6,1456 U\mg) ve pH 6,5'da (14,21 U\mg) yüksek olan enzim aktivitesi pH 6,5 değerinden sonra azalmaya başlamış ve en düşük aktivite pH 8,5 (0,3893 U\mg) değerinde görülmüştür. En yüksek aktivite pH 6,5'da bulunmuştur.

Pullulanaz kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra enzim karakterizasyonu çalışması sonuçlarına bakıldığında:

Pullulanaz enziminin substrat spesifikliği çalışmasında, enzim aktivite deneyi pH 6,5 ve 37°C'de, % 1 konsantrasyonda nişasta, amilopektin, dekstrin ve pullulan substrat çözeltileriyle gerçekleştirildi. En yüksek aktivite değeri substrat olarak dekstrin çözeltisi kullanıldığında 0,61 U/mg olarak bulundu.

Enzimin en yüksek aktivite göstereceği pH değerinin belirlenebilmesi için substrat olarak % 1 (m/v) dekstrin çözeltisi ile pH 4-9 arasında çalışıldı. Maksimum aktivite pH 5 dekstrin çözeltisinde 12,428 U/mg olarak bulundu.

Enzimin en yüksek aktiviteyi göstereceği sıcaklık değerinin belirlenebilmesi için substrat olarak % 1 dekstrin çözeltisi ile enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 5'de 20-80°C arası sıcaklıklarda çalışıldı. Sıcaklık arttıca enzimin aktivitesinde de artış görüldü. En yüksek aktivite 50°C sıcaklıkta 15,644 U/mg olarak bulundu.

Literatürde farklı mikroorganizmalardan elde edilen pullulanaz enzimlerinin aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerleri incelendiğinde; *Bacillus acidopullulyticus* pullulanazı 50°C sıcaklık ve pH 4,5'da; *Bacillus subtilis* pullulanazı 40°C, pH 6 değerinde; *Desulfurococcus mucosus* pullulanazı 85°C, pH 5'de; *Pyrococcus woessei* pullulanazı 100°C ve pH 6'da maksimum aktivite göstermiştir [7].

Pullulanaz enziminin substrata olan ilgisi K_m değerleri, 0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 g/mL konsantrasyonlarında pH 5 dekstrin çözeltisi ile 37°C sıcaklıkta incelendi ve K_m değerleri 1,823 g/mL, V_{max} değerleri 3,038 U/mL olarak bulundu. Literatürde *Bacillus acidopullulyticus* pullulanazının substrat pullulana karşı K_m değerleri 4 mg/mL, V_{max} 0,23 U/min; substrat nişastaya karşı K_m değerleri 11,1 mg/mL, V_{max} 0,20 U/min olarak bildirilmiştir (Singh vd., 2009). K_m değerleri ne kadar düşük olursa bir enzimin o substrata olan ilgisi o kadar yüksektir ve düşük bir K_m kuvvetli bağlanmayı ifade eder. Bulduğumuz *A. niger* pullulanazının substrat dekstrine karşı olan ilgisinin literatürdeki değerlerle karşılaştırıldığında iyi bir sonuç elde edildiği söylenilebilir.

Pullulanaz enziminin immobilizasyonu sonuçlarına bakıldığında:

A. niger pullulanazının cam boncuklara immobilizasyonu sonucu immobilizasyon verimi % 82,49, protein bağlanma verimi ise %29,564 olarak; PEG içeren kitosan boncuklara immobilizasyonu verimi %120,647, protein bağlanma verimi % 30,882 olarak bulunmuştur. Protein bağlanması düşük oranda gerçekleştiğinden farklı immobilizasyon yöntemleri, farklı taşıyıcılar kullanılarak *A. niger* pullulanazının immobilizasyonundan daha iyi sonuçlar elde

edilebilir. Yapılan literatür çalışmasında çeşitli mikroorganizmalardan elde edilmiş pullulanaz enzimlerinin aktif agar jel, kitosan, kalsiyum-alginat küreleri üzerine ya adsorpsiyon yada tutuklama yöntemleriyle immobilizasyonlarının gerçekleştirildiği görülmüştür. Çalışmalarda immobilizasyon sonucunda enzimin daha kararlı hale geldiği bildirilmiştir. Örneğin aktif agar jel üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen pullulanaz enziminin 250 saatlik inkübasyon süresinin ardından ilk aktivitesinin % 60'ını hala koruduğu belirtilmiştir. Oysa aynı enzimin serbest halde iken 72 saat inkübasyon süresinin ardından aktivitesinin tamamını kaybettiği görülmüştür.

İmmobilize pullulanazın karakterizasyonu çalışması değerlendirildiğinde:

İmmobilizasyon sonucunda enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişme görülebilir. Cam boncuklara immobilize edilen pullulanazın pH 5, 6, 7, 8, 9 değerlerindeki aktivite sonuçları incelendiğinde en yüksek aktivite pH 7'de (22,06 U/mg) elde edildi. Ancak diğer pH değerlerinde enzim aktivitesinde çok büyük düşüşler görülmedi; immobilizasyon sonrasında enzimin pH değişikliklerine karşı daha kararlı hale geldiği söylenebilir. Serbest pullulanazın optimum pH değeri ise pH 5 olarak bulunmuştu.

Cam boncuklara immobilize edilen pullulanazın 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri incelendiğinde, sıcaklık arttıkça enzim aktivitesinin arttığı görüldü. Maksimum enzim aktivitesi 25,424 U/mg olarak 30°C sıcaklıkta bulundu. Serbest enzimin optimum sıcaklık değeri 50°C olarak elde edilmişti.

İmmobilize pullulanazın substrata olan ilgisi K_m değeri, 0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 g/mL konsantrasyonlarında pH 7 dekstrin çözeltisi ile 37°C sıcaklıkta incelendi ve K_m değeri 2,4 g/mL, V_{max} değeri 1,412 U/mL olarak bulundu. İmmobilize pullulanaz ile serbest pullulanazın K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırıldığında immobilizasyon sonrasında enzimin katalitik aktivitesinde ve substrat ile bağlanmasında bir azalmanın meydana geldiği fakat enzimin daha kararlı bir hal aldığı söylenebilir.

Elde edilen sonuçlara göre *A.niger* iyi bir pullulanaz kaynağıdır. Mikroorganizmanın veya doğrudan kültür koşullarının modifikasyonu ile daha yüksek aktiviteli enzim elde edilebilir. Endüstriyel uygulamalarda orta saflıkta enzim kullanımı maliyet açısından daha uygun olduğundan dolayı enzimin kısmen saflaştırılması yeterlidir. İmmobilizasyon ile enzim ekstrem koşullara dayanıklı hale gelmiştir. Farklı taşıyıcılar ile istenilen formda enzim preparatları hazırlanabilir.

KAYNAKLAR

- Aiyer, P.V., (2005), "Amylases and Their Applications", African Journal of Biotechnology, 4:1525-1529.
- Ataç A., İ. ve Peksel, A., (2006), Biyoteknolojinin Temel İlkeleri, Yıldız Teknik Üniversitesi Basım-Yayın Merkezi, İstanbul.
- Bellur, E., (2008), "Pektin Metilesterazın Siyah Havuçtan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bertoldo, C. ve Antranikian G., (2002), "Starch-Hydrolyzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria", Current Opinion in Chemical Biology, 6:151–160.
- Bilgehan, H., (2005), Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir.
- Bradford, M.M., (1976), "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Coşkun, A., (2010), "Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Halkman, A.K., (2005), Anonymous Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- Kalaycıoğlu L., Serpek, B., Nizamlioğlu M., Başpınar, N. ve Tiftik, A.M., (2010), Biyokimya, Nobel Yayınevi, Ankara.
- Kantarcıoğlu, A.S. ve Yücel, A., (2003), " *Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleri", Cerrahpaşa J. Med., 34:140-157.
- Kuroiwa, T., Shoda, H., Ichikawa, S., Sato, S. ve Mukatak, S., (2004), "Immobilization and Stabilization of Pullulanase from *Klebsiella Pnömaniae* by a Multipoint Attachment Method Using Activated Agar Gel Supports", Process Biochemistry, 40:2637-2642.
- Leathers, T.D., (2003), "Pullulan", Fermentation Biotechnology Research Unit, Applied Microbiology Biotechnol., 62(5-6):468-73.
- Miller, G.L., (1959), "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Analytical Chemistry, 31:426.
- Nair, S.U., Singhal, R.S. ve Kamat, M.Y., (2006), "Enhanced Production of Thermostable Pullulanase Type 1 Using *Bacillus cereus* FDTA 13 and Its Mutant", Food Technol. Biotechnol., 44:275-282.
- Roy, I. ve Gupta, M.N., (2004), "Hydrolysis of Starch by a Mixture of Glucoamylase and Pullulanase Entrapped Individually in Calcium Alginate Beads", Enzyme and Microbiological Technology 34:26-32.
- Schuster, E., Colemann, N. D. ve Frisvad, J. C., (2002), "On the Safety of *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 59:426–435.

Singh, S. R., Saini, G. K. ve Kennedy, J. F., (2008), "Pullulan: Microbial Sources, Production and Applications", *Carbohydrate Polymers*, 73:515–531.

Singh, S. R., Saini, G. K. ve Kennedy, J. F., (2009), "Maltotriose Syrup Preparation From Pullulan Using Pullulanase", *Carbohydrate Polymers*, 80:401-407.

Swart, K., Debets, A.J.M., Bos, C.J., Slakhorst, M., Holub, E.F. ve Hoekstra, R.F., (2001), "Genetic Analysis in the Asexual Fungus *Aspergillus niger*", *Acta Biologica Hungarica*, 52:335-343.

Tatar, S. (2007), "Termofil Moderately Halofilik *Bacillus sp.* Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Telefoncu, A.,(1997), Enzimoloji, Yüksek Lisans Yaz Okulu, Kuşadası, Aydın.

Uygun, M., (2006), "*Aspergillus niger* ATCC 9642'nin Ca-Alginat Küreleri Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.

Vishnu, C., Sudha R.K., Gopal, R. ve Seenayya, G., (1998), "Amylolytic Bacteria Producing Lactic Acid", *Lit. J. Sci. Ind. Res.*, 57:600-3.

Yener, F., (2007), "Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi ve M., Mollania, N., (2009), "Purification and Characterization of a Novel Amylopullulanase that Converts Pullulan to Glucose, Maltose, and Maltotriose and Starch to Glucose and Maltose", *Enzyme and Microbial Technology*, 46:57–63.

Zhang, L., Zhu, X., Zheng, S. ve Sun, H., (2009), "Photochemical Preparation of Magnetic Chitosan Beads for Immobilization of Pullulanase", *Biochemical Engineering Journal* 46:83-87.

İnternet Kaynakları

[1] www.bayar.edu.tr/~gida/unite%206%20enzim%20teknolojisi.doc

[2] <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/sunularim.htm>

[3] tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Temel_tip/.../Enzim%20kinetiği.ppt

[4] cygm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/.../enzimlerin_ozellikleri.pdf

[5] www.ncpri.ro/pullulan/en/index.htm

[6] <http://www.natural-preservative.com/images/pullulan2.gif>

[7] http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.41

[8] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aspergillus>

[9] <http://www.cheric.org/ippage/e/ipdata/2004/02/file/e200402-1001.pdf>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	31.03.1986	
Doğum Yeri	İstanbul	
Lise	2000-2004	Bayrampaşa Anadolu Lisesi
Lisans	2004-2008	Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fak., Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek lisans	2009- 2011	Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı