

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HYPOCREA JECORİNA QM9414'DEN PULLULANAZIN SAFLAŞTIRILMASI

NURDAGÜL ORHAN

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞEGÜL PEKSEL**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HYPOCREA JECORİNA QM9414'DEN PULLULANAZIN SAFLAŞTIRILMASI

Nurdagül ORHAN tarafından hazırlanan tez çalışması 23 /05 / 2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

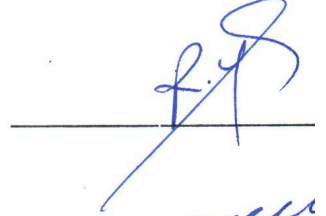


Jüri Üyeleri

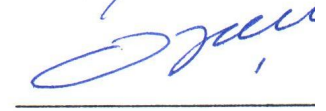
Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi



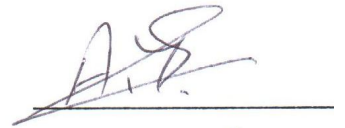
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşe CAN
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 28-01-02-05 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle doktora tez çalışmam süresince bana rehber olan, engin bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen, yakın ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e müteşekkîr olduğumu bildirir, saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışmam esnasında bilgi ve deneyimleriyle yolumu aydınlatan, destekleriyle hep yanımda olan saygıdeğer hocalarım İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ ile Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ayşen YARAT'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Yardımları ve dostluğuyla hep yanımda olan sevgili çalışma arkadaşım Arş. Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Son olarak yaşamımın her alanında benimle beraber olan ve maddî ya da manevî desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Meryem ORHAN, babam İlyas ORHAN ile kardeşlerim Uğur ORHAN, Canan ORHAN GÖNÜL ve Burak ORHAN'a da teşekkürü bir borç sayarım.

Mayıs, 2012

Nurdagül ORHAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET.....	xv
ABSTRACT	xvii
PURIFICATION OF PULLULANASE FROM HYPOCREA JECORINA QM9414	xvii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez	2
BÖLÜM 2.....	4
MİKROORGANİZMALARIN SINIFLANDIRILMASI VE GENEL ÖZELLİKLERİ.....	4
2.1 Mantarlar.....	6
2.1.1 Mantarların Fizyolojik Özellikleri	7
2.1.2 Mantarlarda Üreme	11
2.1.3 Mantarların Endüstride Kullanılması.....	11
2.2 <i>Hypocrea jecorina</i>	13
BÖLÜM 3.....	15
ENZİM KAYNAKLARI VE ENZİMLERİN ENDÜSTRİYEL ALANLARDAKİ UYGULAMALARI	15
3.1 Endüstride Kullanılan Enzim Kaynakları	15
3.1.1 Hayvansal Kaynaklar.....	15
3.1.2 Bitkisel Kaynaklar	16

3.1.3	Mikrobiyal Kaynaklar	16
3.2	Mikrobiyal Fermantasyon İle Enzim Üretimi	16
3.3	Enzimlerin Endüstriyel Alanlarda Kullanımı.....	18
BÖLÜM 4		24
PULLULANAZLAR		24
4.1	Pullulanazın Substratları.....	27
BÖLÜM 5		30
NİŞASTANIN SAKKARİFİKASYONU		30
BÖLÜM 6		37
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR		37
BÖLÜM 7		46
MATERYAL VE METODLAR		46
7.1	Kullanılan Materyaller Ve Cihazlar	46
7.2	Kullanılan Metotlar	52
7.2.1	Protein Miktar Tayini.....	52
7.2.2	Pullulanaz Spesifik Aktivitesinin Ölçülmesi.....	56
7.2.3	Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	58
BÖLÜM 8		59
DENEYSEL ÇALIŞMA		59
8.1	<i>Hypocrea jecorina</i> QM 9414 Hücrelerinin Geliştirilmesi.....	59
8.2	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan Pullulanaz İndüksiyonuna Etki Eden Optimum Koşulların Belirlenmesi	62
8.2.1	Pullulanaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	62
8.2.2	Karbon Kaynağının Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi	62
8.2.3	Ortamin pH'sının Üremeye Etkisi.....	62
8.2.4	Sıcaklığın Üremeye Etkisi	62
8.3	Pullulanazın Saflaştırılması	63
8.3.1	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan Ekstrasellüler Pullulanazın Elde Edilmesi.....	63
8.3.2	Dietilaminoetil (DEAE) -Selüloz Kolon Kromatografisi	64
8.3.3	Sefadeks G-100 Kolon Kromatografisi.....	65
8.3.4	Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ve Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	66
8.3.4.1	PAGE.....	67
8.3.4.2	SDS-PAGE	69
8.3.5	İnce Tabaka Kromatografisi ile Nişastanın Hidroliz Ürünlerinin Belirlenmesi.....	70

8.3.6	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan Elde Edilen Pullulanazın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi	70
8.3.6.1	Pullulanaz Aktivitesinin Değişik Substratlara Olan İlginin Belirlenmesi	71
8.3.6.2	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının optimum pH'sı	71
8.3.6.3	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının optimum sıcaklığı	71
8.3.6.4	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Aktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi	71
8.3.6.5	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Termal Stabilitesi.....	71
8.3.6.6	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	72
8.3.6.7	Çeşitli İyon ve Bileşiklerin <i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Etkileri	72
BÖLÜM 9		74
SONUÇLAR VE ÖNERİLER		74
9.1	<i>Hypocrae jecorina</i> 'da Pullulanaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşullar	74
9.1.1	İnkübasyon Süresinin ve Karbon Kaynağının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi	74
9.1.2	Kültür Ortamının pH'sının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi	78
9.1.3	Kültür Ortamının Sıcaklığının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi	79
9.2	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Saflaştırılması	80
9.2.1	Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu.....	80
9.2.2	DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	81
9.2.3	Sefadeks G-100 Kolon Kromatografisi.....	82
9.2.4	PAGE	84
9.2.5	SDS-PAGE	84
9.3	İnce Tabaka Kromatografisi ile Hidroliz Ürünlerinin Belirlenmesi.....	86
9.4	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan Elde Edilen Pullulanazın Bazı Özelliklerinin İncelenmesi	86
9.4.1	Substrat Spesifikliği	86
9.4.2	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Farklı Substratlara Göre Optimum pH'sı.....	87
9.4.3	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Farklı Substratlara Göre Optimum Sıcaklığı.....	87
9.4.4	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan Saflaştırılan Pullulanazın Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması	88
9.4.5	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Sıcaklık Stabilitesi.....	89
9.4.6	Substrat Konsantrasyonunun <i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Etkisi	89
9.4.7	<i>Hypocrea jecorina</i> Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Çeşitli İyon ve Bileşiklerin Etkisi	91

BÖLÜM 10.....	94
TARTIŞMA	94
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ.....	110

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
APS	Amonyum Persülfat
BSA	Sığır (Bovine) Serum Albümin
Da	Dalton
dk.	Dakika
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
cal	Kalori
cm	Santimetre
g	Gram
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
K _m	Enzimin substrata olan ilgisi
kDa	Kilodalton
kj	Kilojoule
L	Litre
M	Molar
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
R ²	Regresyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TCA	Trikloro Asetik Asit
TEMED	N,N,N',N' Tetrametil Etilendiamin

Tris	Tris (Hidroksimetil) Aminometan
Triton X -100	4-(1,1,3,3-tetrametilbütıl)fenil-polietilenglikol
Tween 20	Polioksietilensorbat Monolaurat
Tween 80	Polioksietilensorbat Monooleat
U	Ünite
$V_{\max}$	Enzimin maksimum hızı

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1	Başlıca mikroorganizma grupları	5
Şekil 2. 1	<i>Trichoderma reseei</i> 'nin üreme döngüsü	14
Şekil 2. 2	<i>Hypocrea jecorina</i> 'nın makroskopik görünümü	14
Şekil 2. 3	<i>Hypocrea jecorina</i> 'nın mikroskopik görünümü	14
Şekil 3. 1	Enzim üretim şeması	18
Şekil 4. 1	Amilolitik ve pullulolitik enzimlerin şematik gösterimi	26
Şekil 4. 2	Pullulanın moleküler yapısı	27
Şekil 4. 3	Nişastanın moleküler yapısı.....	29
Şekil 4. 4	Amilopektinin moleküler yapısı	29
Şekil 5. 1	Nişastayı parçalayan enzimler	31
Şekil 5. 2	Nişastanın hidrolizi ile glukoz, fruktoz ve maltoz üretimi	33
Şekil 7. 1	Total protein standart eğrisi.....	53
Şekil 7. 2	Ortamda serbest kalan şeker miktarının DNS yöntemi ile belirlenmesi sırasında gerçekleşen reaksiyon.....	56
Şekil 7. 3	Glukoz standart eğrisi	57
Şekil 8. 1	Katı besiyerinde büyütülmüş <i>Hypocrea jecorina</i> kültürü.....	61
Şekil 8. 2	Aşılama ve enzim üretim ortamlarına alınan <i>Hypocrea jecorina</i> misellerinin gelişme ortamı	61
Şekil 9. 1	Pullulan içeren ortamda pullulanaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi.....	75
Şekil 9. 2	Pullulan içeren ortamda protein miktarının inkübasyon süresine göre değişimi.....	75
Şekil 9. 3	Pullulan içeren ortamda inkübasyon süresinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi.....	75
Şekil 9. 4	Nişasta içeren ortamda pullulanaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi.....	76
Şekil 9. 5	Nişasta içeren ortamda protein miktarının inkübasyon süresine göre değişimi.....	76
Şekil 9. 6	Nişasta içeren ortamda inkübasyon süresinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi.....	77
Şekil 9. 7	Amilopektin içeren ortamda pullulanaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi.....	77

Şekil 9. 8	Amilopektin içeren ortamda protein miktarının inkübasyon süresine göre değişimi.....	78
Şekil 9. 9	Amilopektin içeren ortamda inkübasyon süresinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi.....	78
Şekil 9. 10	Kültür ortamının pH'sının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da pullulanaz indüksiyonuna etkisi.....	79
Şekil 9. 11	Kültür ortamının pH'sının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi	79
Şekil 9. 12	Kültür ortamının sıcaklığının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da pullulanaz indüksiyonuna etkisi.....	80
Şekil 9. 13	Kültür ortamının sıcaklığının <i>Hypocrea jecorina</i> 'da pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi	80
Şekil 9. 14	DEAE-selüloz kolon kromatografisi grafiği	82
Şekil 9. 15	Sefadeks G-100 kolon kromatografi grafiği.....	82
Şekil 9. 16	Pullulanazın saflaştırılması sırasında standart proteinin (Fruktoz-6-fosfat kinaz) ve Sefadeks G-100 kolon eluatına (FR II) ait aktivite bandının PAGE'de gösterilmesi	84
Şekil 9. 17	Pullulanazın saflaştırılması aşamalarında elde edilen örneklerin SDS-PAGE elektroforezi	85
Şekil 9. 18	SDS-PAGE sonucunda molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler yardımı ile eluantın molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan $\ln M_w$ -Rf grafiği.....	85
Şekil 9. 19	İnce tabaka kromatografisi ile hidroliz ürünlerinin belirlenmesi.....	86
Şekil 9. 20	Pullulanazın farklı substratlara olan ilgisi	86
Şekil 9. 21	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının farklı substratları için optimum pH değerleri.....	87
Şekil 9. 22	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının farklı substratları için optimum sıcaklık tayini	88
Şekil 9. 23	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazı aktivitesinin logaritması (log A) ile $1/T$ (K^{-1}) arasındaki ilişki	88
Şekil 9. 24	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının termal stabilitesi.....	89
Şekil 9. 25	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının %0,5-2,5 (w/v) amilopektin konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği	90
Şekil 9. 26	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının %0,5-2,5 (w/v) nişasta konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği	90
Şekil 9. 27	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının %0,5-2,5 (w/v) pullulan konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği	91

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3. 1	Çeşitli endüstriyel alanlarda ve onların uygulamalarında kullanılan enzimler.....	23
Çizelge 7. 1	Kullanılan kimyasal maddeler	46
Çizelge 7. 1	Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)	47
Çizelge 7. 1	Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)	48
Çizelge 7. 1	Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)	49
Çizelge 7. 1	Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)	50
Çizelge 7. 1	Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)	51
Çizelge 7. 2	A ₂₈₀ /A ₂₆₀ Warburg-Christian yöntemi ile protein miktar tayininde kullanılan faktör çizelgesi	54
Çizelge 7. 2	A ₂₈₀ /A ₂₆₀ Warburg-Christian yöntemi ile protein miktar tayininde kullanılan faktör çizelgesi (devamı)	55
Çizelge 9. 1	%10-90 doygunlukta (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi sonunda çöken protein miktarının absorbens değerleri	81
Çizelge 9. 2	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan pullulanazın saflaştırma evreleri.....	83
Çizelge 9. 3	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının aktivitesine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi.....	92
Çizelge 9. 3	<i>Hypocrea jecorina</i> pullulanazının aktivitesine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi (devamı)	93

HYPOCREA JECORINA QM 9414'DEN PULLULANAZIN SAFLAŞTIRILMASI

Nurdagül ORHAN

Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Bu çalışmada Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden temin edilen *Hypocrea jecorina* QM 9414'de ilk defa pullulanaz indüksiyonu gerçekleştirildi. Enzim indüksiyonu için optimum şartlar tayin edildi. Bu mikroorganizmadan pullulanaz [EC 3.2.1.41] ilk kez saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin bazı özellikleri incelendi.

Pullulanaz, *H. jecorina* QM 9414'den homojenizasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz ve Sefadeks G-100 kolon kromatografisi yöntemleriyle 11 kat saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi süresince sıcaklık +4°C'de tutuldu. Protein miktar tayini Bradford ve Warburg-Christian yöntemlerine göre; enzim aktivitesi ise 37°C'de Miller'in yöntemine göre, 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede tayin edildi.

H. jecorina pullulanazının PAGE sonucunda 130,56 kDa mol ağırlığına karşılık gelen tek aktivite bandı gösterdiği saptandı. SDS-PAGE sonucunda ise bu enzimin monomer yapıda olduğu bulundu. Enzimin optimum sıcaklığı 35°C-65°C arasında belirlendi. *Hypocrea jecorina* pullulanazının optimum pH'sı substrata göre değişiklik gösterdi. Optimum pH, amilopektin ve pullulan için 6,5, nişasta için 5,0 olarak bulundu. Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisi 0,6178 kcal.mol⁻¹ olarak hesaplandı. Enzimin amilopektin, nişasta ve pullulan substratlarına karşı K_m değerleri sırasıyla 10,7 mg/ml, 15,5 mg/ml ve 38,4 mg/ml; V_{max} değerleri ise sırasıyla 3,3145 ΔA/dk, 3,3211 ΔA/dk ve 3,818 ΔA/dk olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: Pullulanaz, *Hypocrea jecorina*, indüksiyon, optimizasyon, saflaştırma

ABSTRACT

PURIFICATION OF PULLULANASE FROM HYPOCREA JECORINA QM9414

Nurdagül ORHAN

Department of Chemistry
PhD. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

In this study, pullulanase induction was realized for the first time at *Hypocrea jecorina* QM 9414 obtaining from Vienna University of Technology, Institute of Chemical Engineering, Division Gene Technology and Applied Biochemistry. The optimum conditions were determined for the enzyme induction. Pullulanase [EC 3.2.1.41] was purified for the first time from this microorganism. Some properties of the purified enzyme were investigated.

Pullulanase was purified 11 fold from *Hypocrea jecorina* QM 9414 by the methods of homogenization, ammonium sulfate precipitation, DEAE cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. Temperature of +4 °C was maintained during the purification process. The protein content was determined according to the methods of Bradford and Warburg-Christian and the enzyme activity was measured spectrophotometrically at 37 °C according to the method of Miller at 540 nm.

The PAGE of the purified enzyme showed one activity band corresponding to 130,56 kDa molecular weight. SDS-PAGE showed that the enzyme was a monomer composed. The optimum temperature of enzyme was determined between at 35°C-65°C. The optimum pH of *Hypocrea jecorina* pullulanase was changed according to substrate. The optimum pH was found at 6.5 for amylopectin or pullulan; at 5.0 for starch. The activation energy of the reaction catalyzed by the enzyme was calculated as 0.6178 kcal.mol⁻¹. The affinity of the enzyme against the amylopectin, starch and pullulan was investigated. Km values were for amylopectin, starch and pullulan 10.7 mg/ml, 15.5 mg/ml ve 38.4 mg/ml, respectively. V_{max} values were for amylopectin, starch, and pullulan 3.3145 ΔA/min, 3.3211 ΔA/min ve 3.818 ΔA/min, respectively.

Key words: Pullulanase, *Hypocrea jecorina*, induction, optimization, purification

1.1 Literatür Özeti

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları düzenleyen biyolojik katalizörlerdir [1].

Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşulların sağlanması durumunda, etkilerini göstermelerinden dolayı pek çok alanda kullanılırlar. Enzimlerin uygulama alanlarının her geçen gün artması enzimlerin daha ekonomik, daha etkin tekniklerle üretilmesini daha da önemli kılmıştır. Endüstriyel boyutlarda enzim üretimine son yıllarda başlanmıştır. Bu nedenle büyük ölçekli enzim üretim tesislerinin kurulması ve optimizasyonu çalışmaları son yirmi yıldan beri gündemdedir. Enzimlerin aminoasitlerden kimyasal sentezleri teorik olarak mümkün olsa da pratikte uygulanabilirliği çok sınırlı olup ekonomik değildir. Bugün ticari olarak satılan tüm enzimler biyolojik kaynaklardan izole edilmektedir [2].

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; yan ürün oluşturmalarının az olması, mikroorganizmaların çok hızlı büyüme ve üreme güçleri nedeniyle aktivitelerinin yüksek olması, fermantasyonun kısa sürmesi ve fermantasyon ortamlarının hazırlanmasındaki maliyet düşüklüğü yüzünden büyük ölçekteki fermantasyon işlemlerinin daha ekonomik olması, daha kararlı olması, yüksek oranlarda ve saflıkta üretilibilmeleridir [3-4].

Bu mikroorganizmalar yalnızca üretme yeteneklerine göre değil mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmektedir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için endüstriyel enzimlerin eldesinde mikroorganizma kullanımı artmıştır [4].

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz ve %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selüloz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerin olduğu şeklinde bir dağılım belirlenmiştir [5].

1.2 Tezin Amacı

Pullulanazlar; nişasta, amilopektin ve diğer oligosakkaridlerdeki, α -(1,6) ve/veya α -(1,4) glikozidik bağlarını hidrolizleyen, dallanmayı bozan enzimlerdir. Glukoz ve maltoz şuruplarının üretimi için nişasta işleme endüstrisinde diğer amilolitik enzimlerle (α -amilaz, β -amilaz, glukoamilaz) birlikte kullanılan endüstriyel bakımdan önemli enzimlerdir. Pullulanazların kullanıldığı hidroliz, oldukça hızlı olmasından dolayı tercih edilmektedir. Bu nedenle pullulanazlar yüksek endüstriyel öneme sahip enzimlerdir. Ayrıca karbonhidratların yapı tayini çalışmaları için yararlı bir araç olarak da son yıllarda büyük önem kazanmışlardır [6-10].

Hypocrea jecorina pullulanazı ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada, nişasta sakkarifikasyonu için yeni bir pullulanaz kaynağı olarak, bu küf seçilmiştir. Pullulanazın elde edilmesi, saflaştırılması, enzimin kinetik özelliklerinin incelenmesi ve nişastanın sakkarifikasyonunda kullanılması amaçlanmıştır. Yeni bir pullulanaz kaynağı olarak *Hypocrea jecorina*'nın kullanılabilmesi ve bu mikrobiyal kaynaktan pullulanazın izole edilmesi ile ekonomik açıdan önemli bir kazanç sağlanabilecektir.

1.3 Hipotez

Günümüzde nişasta sakkarifikasyonunda kullanılan enzimlerin neredeyse hepsi genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalardan sağlanır. Mikrobiyal fermantasyonlar

kontrollü fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra sabit maliyet ve mevsimsel değişikliklerden bağımsız olma yönüyle polisakkarid üretimi üzerine eşsiz avantajlar sunar. İzole edilmiş enzimler kendilerini içeren mikroorganizmalara çoğu kez tercih edilmektedirler. Çünkü izole enzimler daha spesifik olarak etki etmekte, potansiyelleri daha iyi standardize edilmekte, satış ve saklama için kolaylıklar sağlamaktadır.

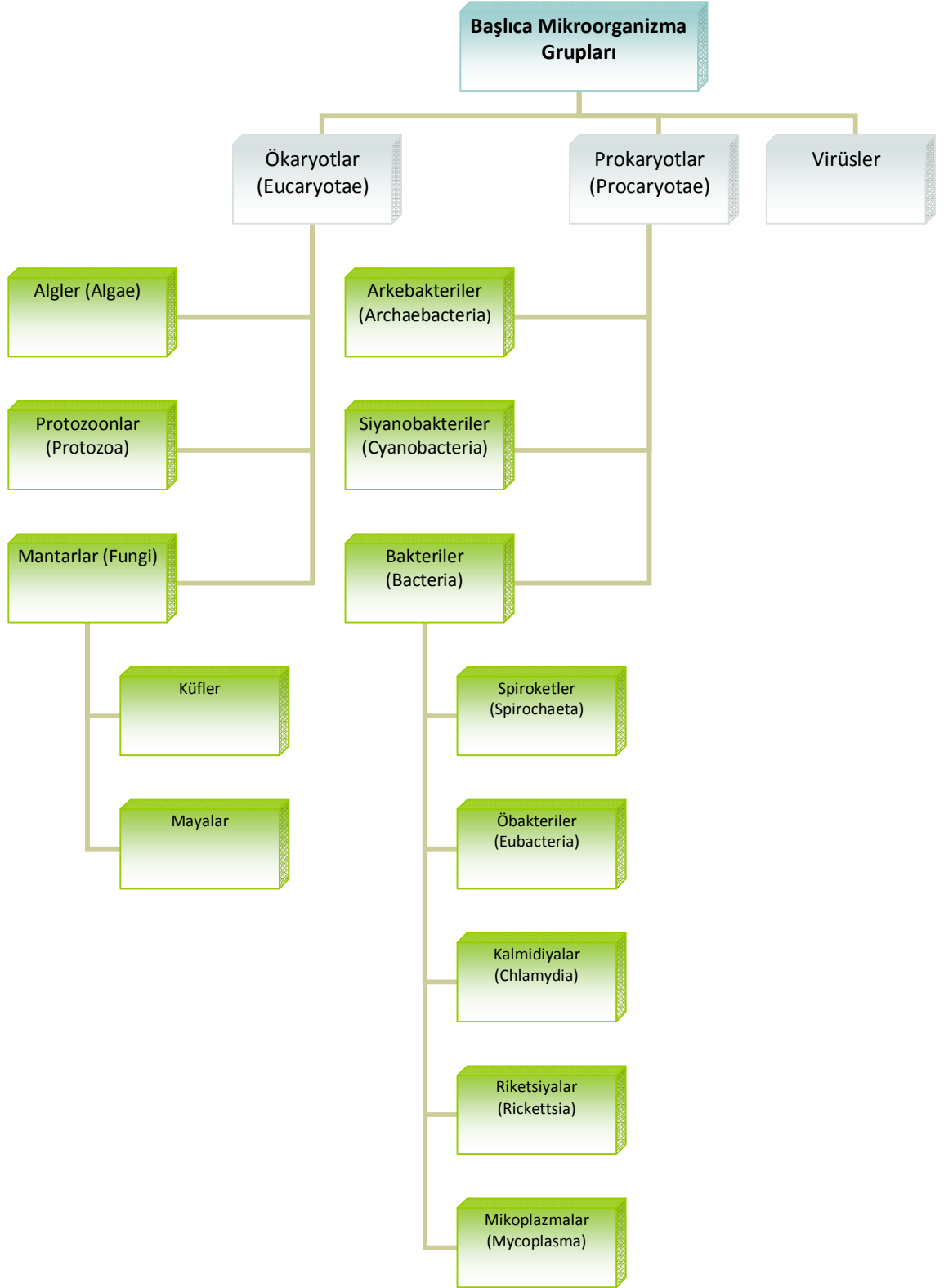
Filamentli küf mantarı *Hypocrea jecorina*, *Trichoderma reesei* anamorfudur. Biyoteknolojik olarak geniş miktarlarda, karbonhidratları parçalayan enzimleri salgılayan *Hypocrea jecorina*, endüstride selülitik ve hemiselülitik enzimlerin üretiminde kullanılan bir küftür [11].

BÖLÜM 2

MİKROORGANİZMALARIN SINIFLANDIRILMASI VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Mikroorganizmalar, çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük ve tek hücreli canlılardır. İnsanlar, hayvanlar ve bitkilerle birlikte ve ayrıca bunların dışındaki çevrede çok yaygın olarak her yerde bulunurlar. Bakteriler, mayalar, küfler, algler ve protozoa temel mikroorganizmalardır. Şapkalı mantarlar, yosunlar ve likenler de mikroorganizmadır fakat bunlar da farklılaşmış hücreler ve/veya birleşmiş hücreler olduğu için bitkilere benzeyen görünüme sahiptirler.

Yapılarına bakarak mikroorganizmaların üç büyük grupta toplanmaları uygun bulunmaktadır. Birinci grupta hücre yapıları bitki ve hayvan hücreleri yapısına benzerlik gösteren mikroorganizmalar yer alır. Bunlara gerçek çekirdekli anlamına ökaryotik (eucaryotae) mikroorganizmalar adı verilir. Başlangıçta mikroorganizmaları bitkiler ve hayvanlar evrenleri dışında ayrı bir evren olarak göstermek için kullanılmış olan protista terimi bu ökaryotik mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Ökaryotik mikroorganizmalar grubuna algler, protozoa, mantarlar girer. Mikroorganizmaların ikinci grubunda daha basit bir hücre yapısına sahip olan mavi-yeşil algler (Cyanobacteria), bakteriler ve yapıları prokaryotlarla ökaryotlar arasında bir geçiş yapısı gösteren archaeobacteria bulunur. Bu gruba prokaryotlar (procaryotae) denir. Mikroorganizmaların üçüncü grubunu bir hücre yapısı göstermeyen ve tek başlarına metabolizma aktiviteleri bulunmayan virüsler oluşturur [12]. Başlıca mikroorganizma grupları Şekil 1. 1’de görülmektedir.



Şekil 1. 1 Başlıca mikroorganizma grupları

Dünyada 500000-6000000 arasında farklı türde mikroorganizma olduğu sanılmaktadır. Günümüze kadar bunların %5'inden daha azı olduğu kabul edilen 3500 bakteri, 90000 fungi (maya, küf, şapkalı mantar), 100000 protist (alg ve protozoa) tanımlanabilmiştir.

Sınıflandırmanı amacı, yeryüzünde bulunan canlıları, akrabalık ilişkilerine göre gruplandırmak ve bu sayede de düzenli bir sistem içinde çalışılmasını kolaylaştırmaktır. Bu amaca hizmet veren bilim dalı ise "Sistematik" veya "Taksonomi" olarak bilinir. Günümüzdeki sınıflandırmanın mantığında asıl dayanak, akrabalık dereceleridir. Ancak buna ek olarak vücut simetrisi, vücut boşluklarının tipi, embriyonik gelişim evreleri, ortak kökenden gelen üyeler (kol, bacak, kanat gibi), iskelet tipi ve şekli, sindirim sisteminin tipi, larva durumları ve eşeyssel özellikler gibi başka karakterlerden de yararlanılır.

Canlılar âleminde geçerli olan esas taksonomik gruplar büyükten küçüğe doğru şu şekildedir:

Regnum, Kingdom (âlem), Divisio (bölüm), Phylum (şube), Classis (sınıf), Ordo (takım), Familia (aile/familya), Genus (cins) ve Species (tür).

2.1 Mantarlar

Mantar (fungus), şapkalı mantarların yanı sıra mayalar ve küfler gibi mikroorganizmaları içeren ökaryotik organizmaların büyük bir grubunun bir üyesidir. Mantarlar (fungi), bitkiler ve hayvanlardan ayrı olan bir âlem olarak sınıflandırılır [13]. Fungal hücre duvarı, glukanlar ve kitinden yapılmıştır. Glukanlar bitkilerde, kitin ise eklembacaklıların dış iskeletlerinde bulunmaktadır. Mantarlar hücre duvarında bu iki bileşeni birlikte bulunduran tek organizmadır. Bitkilerin aksine fungal hücre duvarı selüloz içermez [14]. Genetik çalışmalar, mantarların bitkilerden çok hayvanlara daha yakın olduğunu göstermesine rağmen; biyoloji bölümü botaniğin dalı olarak sayılan ve mikoloji olarak adlandırılan mantar çalışma alanını tahsis etmiştir.

Birçok mantar çok küçük olduğu için ve toprağın içinde, ölü materyalin üzerinde ve bitkilerin, hayvanların ve diğer mantarların simbiyontları olarak gizli yaşam biçimleri nedeniyle görünmezdir. Mantarlar, şapkalı mantarlar veya küfler gibi meyve verdiklerinde fark edilebilir hale gelirler.

Mantarlar organik maddelerin ayrıştırılmasında yaşamsal bir rol gerçekleştirirken; besin zincirinde ve transferinde de önemli rollere sahiptirler.

Mantarlar âlemi, çeşitli ekolojileri ile sınıfının aşırı çeşitliliğini, yaşam döngüsü stratejilerini ve morfolojilerini kapsar. Mantarlar âleminin gerçek biyoçeşitliliğinin çok azı bilinmektedir. 1,5 milyon civarında türün olduğu tahmin edilirken bunların resmi olarak sadece %5'i sınıflandırılmıştır. Mantarlar, 18. ve 19. yüzyıllarda Carl Linnaeus, Christian Hendrik Persoon ve Elias Magnus Fries'in taksonomik çalışmalarından beri mantar morfolojilerine (mikroskopik görünümleri veya spor renkleri gibi karakteristik özellikleri) veya fizyolojilerine göre sınıflandırılmıştır. Moleküler genetikteki gelişmeler taksonomide anonim olan DNA analizleri için yeni bir yol açarken; bazen morfoloji ve diğer özelliklere dayanan tarihi gruplandırma ile çatışır. Son on yılda yayımlanan filogenetik çalışmalar mantarlar âleminin sınıflandırılmasının yeniden şekillenmesine yardımcı olmuştur. Buna göre mantarlar âlemi bir alt âlem, yedi şube ve on alt şubeye bölünmüştür.

2.1.1 Mantarların Fizyolojik Özellikleri

Mantarların hücre duvarlarında kitin ve selüloz karakterinde maddelerin bulunması, bunların sürekli değişen ve çok çeşitli olan çevre koşullarına uymalarında çok yardımcı olurlar. Örneğin mantarlar, bakterilerin dayanamayacakları kadar yüksek konsantrasyondaki şeker (%50) solüsyonuna direnç gösterirler. Bu nedenle, reçel ve jöleler mantarlar tarafından kolayca kontamine edilebilirler. Ancak, bazı mantar türlerinin de %15 şeker yoğunluğunda üremelerinde sınırlanma oluşmaktadır.

Mantarlar genellikle düşük pH derecelerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Bu sebeple, mantarların minimum ve maksimum pH değerleri 2-11 arasında değişebilir. Asit karakterdeki meyveler veya meyve suları (özellikle, domates, portakal, limon, greyfurt, mandalina, vs.) buzdolabı ısısında olsalar bile mantarların üremeleri için iyi bir ortam oluştururlar. Hatta bazı türler, 1 N asetik asit ve 2 N sülfürik aside dirençlidirler. Bunlara karşın, mantarların türlerine göre değişmekle birlikte, optimum pH'ları, üreme ve çeşitli metabolit sentezi ile paralellik göstermeyebilir. Buna, diğer çevresel koşulların ve üreme ortamının yapısının da büyük etkisi bulunmaktadır.

İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan mantarların (patojenik mantarlar), üredikleri bölgelere ait pH değerleri, genellikle, kendileri için optimum olmaktadır.

Nem, mantarların üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki nem, genellikle, üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Nem azaldıkça, mantarların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Mantarların neme olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Bazı mantar türleri, relatif nemi %10-15 arasında bulunan ortamlarda veya suyu çok azalmış olan kuru tanelerde üreme yeteneğine sahiptirler. Patojenik mantarların, özellikle dermatofitlerin insan veya hayvan vücutlarında yerleşebilmesi ve hatta hastalık oluşturabilmesi için nem yine önemli bir faktördür. Eğer deri, su ile ıslanmış ise mantarların yerleşmesi ve üremesi daha kolay olmaktadır.

Mantarların üreme sıcaklık değerleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar, 0°-60°C arasında değişebilmektedir. Hifler, maksimum sıcaklık değerlerinin dışında kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek sıcaklığa ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterirler. Buzdolabı sıcaklığında üreyebilen ve gıdaların üzerinde olanlar ise 60°C nin üstünde gelişebilirler. Ancak optimum sıcaklık, üreme için en uygun olanıdır. Patojenik mantarlar için optimum sıcaklık, üzerinde veya içinde üredikleri canlının sıcaklık derecesi olarak kabul edilmektedir. Ancak, deride lokalize olan mantarlar dış ortamla da temasta bulunduklarından optimum sıcaklık, çevrenin sıcaklığı ile bir yakınlık göstermektedir. Bu nedenle, dermatofitler için optimum üreme sıcaklığı 20-25°C'ler arasındadır. Mantarlar, üreme sıcaklığı derecelerine göre başlıca 3 kısma ayrılırlar. Soğuk sevenler (psikrofilikler), genellikle 0° ile 15°C'ler; ılık sevenler (mesofilikler), 15° ile 40°C'ler arasında ve sıcak sevenler (termofilikler) ise 40°C'den yukarıda üreyebilme kabiliyetine sahiptirler. Çok fazla soğuk, mantarların muhafazasında kullanılmaktadır. (-)195°C'de mantarlar uzun süre canlı kalabilirler.

Mantarlar, genellikle, aerobik karakter taşırlar ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişirler ve ürerler. Bu nedenle, havada bulunduğu oran kadar oksijen, üreme için gereklidir. Oksijenin azlığı (mikroaerofilik koşullar) üremeyi ve gelişmeyi sınırlar.

Mantarların üremeleri için ışık, gereksinme duyulan önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler. Patojenik mantarlar da direkt ışık olmadan üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Direkt güneş ışınları, üremeyi ve gelişmeyi sınırlar. Ultraviyole ışınlar fungistatik bir etkiye sahip olmasına karşın iyonize ışınlar öldürebilirler (fungisid).

Mantarların klorofilleri olmadığı için fotosentez yapamazlar. Bu nedenle gıda gereksinimlerini dışardan karşılamak zorundadırlar. Bazı mantarlar basit yapıdaki ortamlarda (minimal ortam) gelişebildikleri halde, diğerlerinin üremeleri ve gelişmeleri için inorganik (C, H, O, K, P, N, S, Fe, Mn, Mo, Cu, Zn, Ca, vs.) maddelere ve özel üretim faktörlerine (tiyamin, biotin, vitamin B6, pantotenik asit, inositol, riboflavin, vs.) ihtiyaçları vardır. Mantarların karbon kaynaklarını, genelde karbonhidratlar, alkoller, organik asitler ve proteinler oluşturmaktadır. Azot kaynağı için amonyum tuzları, sitratlar, proteinler, pepton, peptid, aminoasit, üre, vs.den yararlanırlar. Bazı türler de amonyak ve nitratı bu amaç için kullanırlar. Mantarların bazıları kendilerine gereken vitamin veya diğer gerekli maddeleri sentez edebilme kabiliyetine sahiptirler. Patojenik mantarlardan bir kısmı için tiyamin, inositol veya biotin üremeyi artırıcı veya üretme faktörü olarak önemlidir. Örneğin *Trichopyton equinum* üremesi için nikotinik asit, *T. megnii* için de L-histidine gereksinim duyulur. Tiyamin, *T. tonsurans* 'ın üremesini artırır. Patojenik mantarları üretmek ve izole etmek için, laboratuvarlarda, bileşiminde çeşitli inorganik ve organik maddeler bulunan besi yerleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında en fazla Sabouraud dekstrozu agar, Brain-heart infusion kanlı agar, Czapek agar, Patates dekstrozu agar sayılabilir.

Mantarların bazıları kuvvetli enzimler sentezleyerek bunların aracılığı ile çevredeki gıda maddelerini ayrıştırır ve bunlardan yararlanırlar. Bu enzimler genellikle proteaz, karbonhidraz, nükleaz, hidrolaz ve lipaz karakterindedirler. Bazı mantarlar da birden fazla enzim sentez edebilmektedirler. Örneğin *Aspergillus niger* (amilaz, sellobiyaz, katalaz, lipaz, proteaz, maltaz, vs.) ve *A. oryzae* (amidaz, amilaz, katalaz, lipaz, proteaz, maltaz, vs.) ve *Penicillium camamberti* (amidaz, laktaz, lipaz, maltaz, proteaz, nükleaz, vs.) gibi.

Mantarlar, toprak veriminin sağlanmasında, peynirlerin olgunlaşmasında ve bazı önemli endüstri ürünleri elde edilmesinde çok büyük yararlar sağlarlar. Organik asitler (asetik, formik, fumarik, gallik, glukonik, laktik, malonik, sitrik, oksalik asitler ve diğerleri), alkoller (alkol, gliserol, eritritol, mannitol, vs.), enzimler (amidaz, amilaz, invertaz, lipaz, proteaz, maltaz, vs.), pigmentler (aleoamodin, auratin, beta karoten, aspergillin, vs.), polisakkaridler (glikojen, reguloz, nişasta, vs.), steroller (kolesterol, ergosterol, fungisterol, fitosterol, vs.), antifungal maddeler (griseofulvin, mikostatin, nistatin, vs.), antibiyotikler (penisilin, eritromisin, sikloserin, sefalosporin, kanamisin, streptomisin, vs.) ve diğer birçok önemli maddeler (vitaminler, proteinler, ergot alkaloidleri, lipidler, toksin ve diğer toksik substanslar) bu ürünlerin arasında yer alırlar.

Mantarlar insan gıdası olarak da kullanıldıklarından, beslenmede özel bir yerleri vardır. Bu amaçla, zehirsiz türde mantarlar üretilmekte ve yemek olarak kullanılmaktadırlar. Mayalardan ekmek yapımına ve içkilerin fermantasyonunda (bira, şarap, viski, vs.) da büyük yararlar elde edildiği gibi bazı peynirlerin (Roquefort, Camemberti, Gorgonzola, Stilton, vs.) olgunlaşmasında da önemli görevler yaparlar. Ayrıca, maya hücrelerinin sentezlediği vitaminler (tiamin, riboflavin, nikotinik asit, pentotenik asit, biotin, pridoksin, vs) de insan ve hayvanlarda kullanılan medikal önemleri olan maddeler arasındadır.

Mantarların sentezledikleri ve sekonder metabolitlerden olan toksinler (mikotoksinler) insan ve hayvan sağlığı için büyük tehlike göstermektedirler. Bunlar arasında *A. flavus*'un ve diğer mantarların sentezledikleri aflatoksin karaciğerde kanser oluşturacak etkiye sahiptir. Ayrıca, rubratoksin, okratoksin, fusariotoksin ve diğer toksik maddeler de çeşitli mantarlar tarafından oluşturulurlar.

Mantarlar, meyve, sebze, ağaç gövdelerinde, depolardaki çeşitli tanelerin ve diğer gıdaların da üzerinde veya içinde üreyerek bunların bozulmalarına, değerlerinin ve kalitelerinin düşmesine neden olurlar [15].

2.1.2 Mantarlarda Üreme

Mantarlar, sporlanma (sporulasyon) ile eşeysiz (aseksüel) ve eşeyli (seksüel) olarak üreme yeteneğine sahiptirler. Miselyumlar olgunlaşır ve yeterince gıda depo ederse veya çevresel koşullar sporlanmaya uygun ise hiflerden çeşitli şekillerde sporlar gelişirler. Sporlar, olgunlaştıktan sonra hiften ayrılarak serbest hale gelir ve uygun ortam ve koşullarda çimlenerek kendi türüne özgü mantarı oluştururlar. Mantar sporları çok değişik biçim ve görünümüne sahiptirler. Bu özellik, mantarların sınıflandırılmasında da oldukça yardımcı olur. Mantar sporları, değişen çevre koşullarına çok dayanıklıdır. Bu nedenle doğada uzun yıllar canlı ve bulaşıcı olarak kalabilirler.

Sporların içinde, seksüel veya aseksüel üreme sonucu oluşan bir veya birden fazla çekirdek bulunur. Karada yaşayan mantarların sporları etrafında kalın bir spor muhafazası (epispor) vardır. Bu tabakanın altında protoplasmayı çevreleyen endospor yer alır. Bazı mantar sporlarında da, sporu en dıştan saran başka bir tabaka (perispor) daha bulunabilmektedir. Sporların sitoplazmalarında çekirdek, vakuoller, lipid granülleri ve bir mantarın oluşumuna yetecek miktarda diğer inorganik ve organik moleküller vardır. Çimlenme (germinasyon, filizlenme) sırasında, sporlar su alarak şişerler, dışardan yeterince su ve gerekli diğer maddeleri alırlar ve sonra buradan dışarı doğru bir jerm tüpü uzanır. Bu tüp uygun ortamlarda hızla gelişerek ve büyüyerek kendi türüne özgü hifleri ve bunlardan da diğer çoğalabilen hifleri meydana getirir [15].

2.1.3 Mantarların Endüstride Kullanılması

Mantarlar, esansiyel ve esansiyel olmayan aminoasitleri içerdikleri için besin ve yem olarak çok besleyicidirler. Mantarlar, çok eski zamanlardan beri beslenme kaynağı olarak ve fermente içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğrudan gıda kaynağı olarak (şapkalı mantarlar ve yer mantarları), ekmek ve diğer unlu mamüller için maya olarak ve şarap, sake, bira, soya sosu gibi çeşitli gıda ürünlerinin fermantasyonunda kullanılmaktadırlar [16-19]. 1940'lardan beri antibiyotiklerin üretimi için kullanılmaktadırlar. Bazı mantar türleri farmakolojik olarak aktif uyuşturucuların başlıca kaynağı olan metabolitleri üretirler. Bu antibiyotikler, küçük peptidlerden sentezlenen

β -laktam antibiyotiklerinin penisilinleri de içeren bir grubudur. Penisilin G gibi doğal olarak oluşan penisilinler biyolojik aktivitenin dar bir spektrumuna sahip olmasına rağmen doğal penisilinlerin kimyasal modifikasyonu ile üretilebilen diğer penisilinler daha geniş bir spektruma sahiptir. Modern penisilinler başlangıçta fermantasyon kültürlerinden sağlanan yarı sentetik bileşiklerdi fakat daha sonra istenilen spesifik özellikler için yapısal olarak değiştirilmiştir [20], [21].

Bakteri ve parazitler gibi patojenik mikroorganizmalar ile besin ve ortam için aktif mücadele içindeki mantarlar tarımda yabancı otları ve bitki zararlılarını kontrol etmek için biyolojik ajan olarak kullanılmaktadır. Örneğin bazı türler; böcekler, nematodlar, yabancı otlar, keneler ve ürün bitkilerinin hastalanmasına sebep olan diğer mantarlar gibi zararlı bitki patojenlerinin büyümesini baskılamak ya da durdurmak için kullanılabilir [22]. Çoğu mantar bitkilerin, mantarların, insanlar ile diğer hayvanların patojenidir [23]. Gıda bozulmaları ve fungal hastalıklar sebebi ile olan kayıplar, insan gıda kaynakları ve yerel ekonomiler üzerinde büyük etkiye sahiptir [24-28].

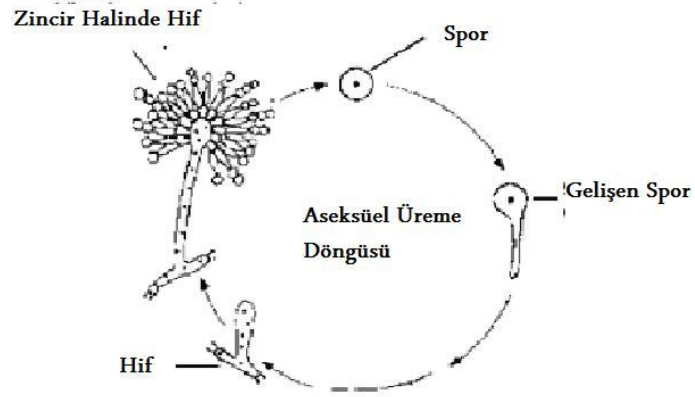
Birçok mantar türü bitkiler, insanlar ve hayvanlar için toksik olan alkaloidler ve poliketidler gibi mikotoksinler olarak adlandırılan biyoaktif bileşikler üretirler [29]. İnsanlar tarafından tüketilen fındık ve mısırların içinde veya üzerinde büyüyen bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen, yüksek oranda kanserojen metabolitler ve karaciğer toksinleri olan aflatoksinler dikkate değer diğer mikotoksinlerdir [30]. Mantarlar sitrik, glukonik, laktik ve malik asitler, antibiyotikler ve hatta taşlanmış kot pantolonların yapımı için kullanılan endüstriyel kimyasalları üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mantarlar ayrıca biyolojik deterjanlarda kullanılan lipazlar [31], amilazlar [32], selülazlar [33], invertazlar, proteazlar ve ksilanazlar [34] gibi endüstriyel enzimlerin kaynağıdır.

Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonların uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini doğurmuştur. Enzimatik işlemlerin, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir. Mikroorganizma kökenli enzimlerin

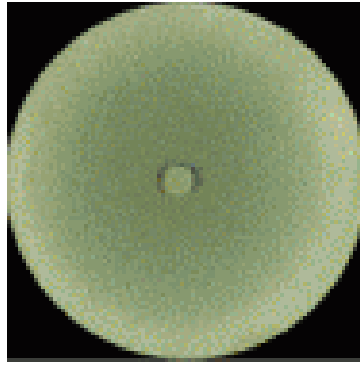
biyoteknolojik işlemlerle daha ekonomik biçimde üretimi ve suda çözünmeyen matrikslerle immobilize edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, mikrobiyal enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasındaki artış nedenleridir.

2.2 *Hypocrea jecorina*

Trichoderma reesei'nin anamorfı olarak bilinen *Hypocrea jecorina* (Ascomycota, Hypocreales), filamentli, tropikal, yumuşak ve çürükçül bir küftür [35]. *H. jecorina*, ilk olarak 2. Dünya Savaşı sırasında Solomon adalarında Amerikan Ordusu tarafından, çadır ve paraşüt gibi pamuklu materyallerin yol açtığı sorunların sebeplerinin araştırılması sırasında izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. *H. jecorina*, toprakta çürümüş ağaç üzerinde ve bozunmuş bitki maddesinde bulunmuştur. Daha sonra dünya üzerinde çeşitli yaşam alanlarında da izole edilmiştir. [36]. Saflaştırılan orijinal QM6a kültürü *T. viride* olarak isimlendirilmiş, ancak QM6a kültürünün morfolojik olarak diğer *T. viride* yapılarından farklı olduğu bulununca isim *T. reesei* olarak değiştirilmiştir. Bu, bilim adamları tarafından yeni bir mantarsı yapı olarak kabul edilmiş ve kültürü ilk olarak saflaştıran Elwyn T. Reese'den esinlenilerek isimlendirilmiştir. İlerleyen çalışmalarda, QM6a kültürünün başka bir *Trichoderma* türü olan *T. longibrachiatum*'dan ayrı tutulamayacağı belirtilmiştir. Son yapılan çalışmalarla *T. reesei*'nin, iyi tanımlanmış bir üreme döngüsüne sahip olan *H. jecorina*'nın klonal bir türevi olduğu kanıtlanmıştır. Doğada bitki liflerinde ve toprakta bulunur [37], [38]. *H. jecorina* tarafından salgılanan hidrolazlar; pulp ve kâğıt [39-41], gıda ve hayvan yemi [42-44], tekstil [45-47] endüstrilerinin yanı sıra biyoyakıt ve biyoenerji [48-50] gibi endüstriyel uygulamaların geniş bir alanında kullanılır. Şekil 2. 1 'de *T. reesei*'nin üreme döngüsü, Şekil 2. 2'de *H. jecorina*'nın makroskopik görünümü, Şekil 2. 3'de ise *H. jecorina*'nın mikroskopik görünümü gösterilmiştir.



Şekil 2. 1 *Trichoderma reesei*'nin üreme döngüsü



Şekil 2. 2 *Hypocrea jecorina*'nın makroskopik görünümü



Şekil 2. 3 *Hypocrea jecorina*'nın mikroskopik görünümü

ENZİM KAYNAKLARI VE ENZİMLERİN ENDÜSTRİYEL ALANLARDAKİ UYGULAMALARI

Doğada bulunan enzimler peynir, bira, şarap, sirke ve maya olarak kullanılan ekşi hamur gibi gıda ürünlerinin üretiminde ve deri, keten, çivit gibi malların yapımında antik zamanlardan beri kullanılmaktadır. Bu işlemlerin hepsi ya kendiliğinden büyüyen mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler ya da buzağı işkembesi veya papaya meyvesi gibi yapılarda ek olarak var olan enzimlerle gerçekleştirilmiştir [51]. Günümüzde ticari olarak üretilen ve kullanılan enzimler, başta mikroorganizmalar olmak üzere bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilmektedir. Bu enzimlerin üretiminde en büyük pay mikroorganizmalara ait olup, yaklaşık %90'ı bu organizmaların fermantasyonu ile sağlanmaktadır. Enzim üretiminde mikroorganizmaların bu kadar yüksek bir paya sahip olması, üretimi artırmak için modifiye edilmiş mikroorganizmaların kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla genetik mühendisliği teknikleri ile rekombinant suşlar geliştirilmiş ve enzim üretiminde kullanılmaya başlanmıştır.

3.1 Endüstride Kullanılan Enzim Kaynakları

3.1.1 Hayvansal Kaynaklar

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle tavuk yumurtalarının beyazı, domuz midesi, pankreas, geniş getirenlerin karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilebildiği için insan yiyeceklerinin hazırlanmasında da uzun zamandan beri kullanılmaktadır [52]. Hayvansal kökenli enzimlere ise pankreatik lipaz ve proteazlar, pepsinler, pregastrik

esterazlar ve rennetler örnek olarak verilebilir. Bitkisel kökenli enzimlerin hayvansal kökenli enzimlerin üretiminde, kesim için yetiştirilen hayvanları kontrol eden politik ve tarımsal kuruluşların izledikleri politikalar etkin rol oynamaktadır. Birçok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması, hayvanların ve hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınmasında katı kısıtlamaların uygulanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan hastalıkların (özellikle viral hastalıkların) hayvanlar ve hayvansal dokular vasıtasıyla bir ülkeden diğerine yayılması büyük endişelere sebep olmaktadır. Bütün bu sebepler hayvan ve hayvansal ürün ticaretini oldukça kısıtlamaktadır. Bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlerin üretilmesinde karşılaşılan bu sorunlar mikrobiyal kökenli enzimlere olan ilginin artmasını sağlamıştır [53].

3.1.2 Bitkisel Kaynaklar

Bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoteknolojik enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir. Toksik olmayan bu yiyeceklerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır. Bitkisel kökenli enzimlere örnek olarak; papain, bromelain, soya fasulyesi lipoksijenazı ve tahıl amilolitik enzimleri verilebilir. Bitkisel kökenli enzimlerin artan talebe karşılık verebilmesi; toprak işleme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi birkaç faktöre bağlıdır. Ayrıca tarımsal etkinlikleri kontrol eden ulusal ve uluslararası politik kuruluşların çalışmaları da önemli bir faktör olarak görülmektedir [53].

3.1.3 Mikrobiyal Kaynaklar

Mikrobiyal enzimler özel mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de belirlenmiştir. Gıda, alkol, hayvan yemi, tekstil, dericilik, kâğıt, deterjan, yakıt ve daha pek çok endüstriyel alanda mikrobiyal olarak elde edilmiş enzimler kullanılmaktadır.

3.2 Mikrobiyal Fermantasyon İle Enzim Üretimi

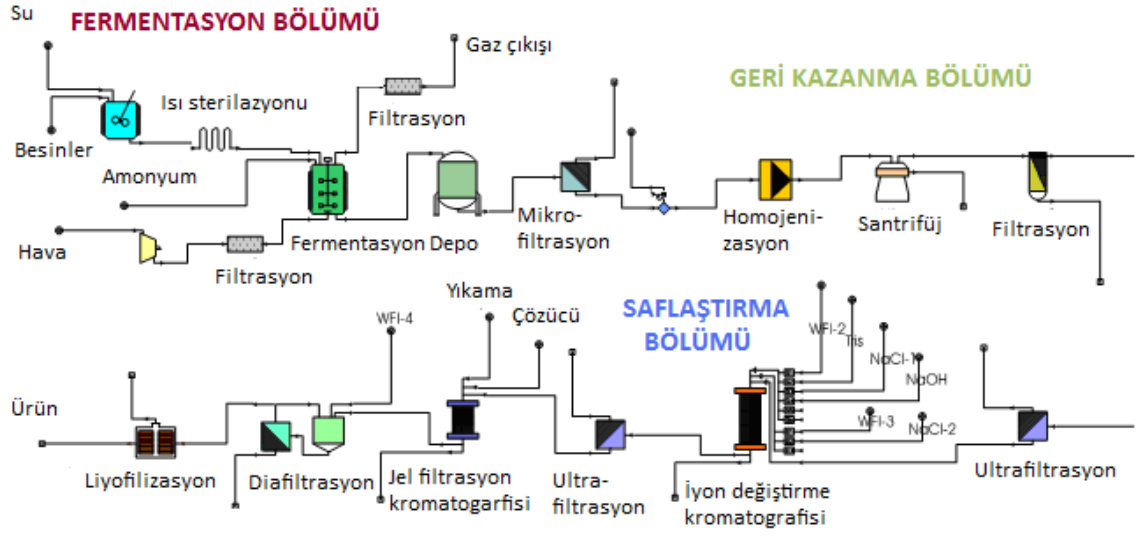
Enzimi üretecek mikroorganizma, genetik olarak istenen ürünlerin aşırı üretimi için işlenmektedir. Fermantasyon işleminin optimizasyonu; besiyeri bileşimini, kültürasyon

tipini ve işlem durumlarını içermektedir. Bu işlem hücrenin intraselüler mühendisliği kadar fazla çaba gerektirmektedir. Biyoişlem mühendisi öncelikle çalışmaya başlamadan önce şu sorulara cevap bulmalıdır:

- ✓organizma güvenli mi veya ekstra korunma önlemlerine ihtiyaç var mı,
- ✓organizmanın ihtiyaç duyduğu besinler nelerdir, bu besinlerin optimum veya ekonomik konsantrasyonu nedir,
- ✓besinler nasıl sterilize edilmelidir,
- ✓ihtiyaç duyulan reaktörün çeşidi nedir (kütle transferi, oksijenli, soğutmalı, buhar kontrollü),
- ✓ölçüm için gereken nedir ve işlem nasıl kontrol edilir,
- ✓organizma nasıl kültive edilmelidir (kesikli, beslemeli ve sürekli kültivasyon),
- ✓optimal büyüme koşulları nedir,
- ✓verim ve hacimsel verimlilik nedir,
- ✓reaktördeki hücre konsantrasyonu nasıl arttırılır,
- ✓salgılanan ürün hücre dışına nasıl çıkarılır, eğer ürün intraselüler ise hücre nasıl parçalanır,
- ✓ham materyallerin bazıları veya ürünler organizmayı inhibe eder mi,
- ✓son olarak ürünün geri kazanımı, saflaştırılması ve korunması nasıl olmalı

Tipik bir enzim üretim şeması Şekil 3. 1’de görülmektedir.

Endüstriyel enzimlerin büyük hacimleri 50-500 m³/lük fermentörlerde üretilmektedir. Ekstraselüler enzimler (vakum filtrasyonu, separatörler veya mikrofiltrasyon yoluyla) ultrafiltrasyon yoluyla hücre uzaklaştırıldıktan sonra geri kazanılmaktadır. Eğer gerek duyulursa saflaştırma iyon değiştirme veya jel filtrasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Son ürün ya tuzlar veya polioller gibi koruyucular katılarak sıvı halde konsantre edilerek veya alternatif olarak kurutularak granüller halinde elde edilmektedir.



Şekil 3. 1 Enzim üretim şeması [53]

3.3 Enzimlerin Endüstriyel Alanlarda Kullanımı

Enzimler; deterjan, tekstil, gıda, içecek, kâğıt gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Deterjanlar, mikrobiyal enzimler için ilk geniş ölçekli uygulama alanı olmuştur. Bakteriyel proteazlar hala en önemli deterjan enzimleridir ve deterjanların performansını yükseltmek için optimize edilmektedir. Bu enzim düşük sıcaklıklarda deterjanın etkin olmasını sağlamakta ve bu şekilde enerji tasarrufuna da yardımcı olmaktadır. 80'lerin sonlarında toz ve sıvı deterjanların üretiminde lipid parçalayan enzimler kullanılmıştır. Pazardaki en önemli lipaz *Humicola lunuginose*'den elde edilmiştir. Bu enzimin büyük ölçekte üretimi *Humicola* geninin klonlanmasından sonra *Aspergillus oryzae* tarafından yapılmaktadır. Amilazlar deterjanlarda nişasta bazlı lekelerin çıkarılması için kullanılmaktadır. Amilazlar, tekstil lifleri üzerine yapışmaya ve diğer leke bileşenleri ile bağlanmaya meyilli olan jelatinleşmiş nişastayı hidrolizlemektedir. Selülazlar, 1990'ların başından beri renk parlatici ve yumuşatici olarak deterjanlarda kullanılmaktadır. Bazik selülazlar *Bacillus* suşları tarafından; nötr ve asidik selülazlar ise *Trichoderma* ve *Humicola* küfleri tarafından üretilmektedir.

Nişasta endüstrisinde mikrobiyal enzimlerin geniş ölçekli uygulaması nişasta parçalayan enzimlerin kullanımı ile olmuştur. α -amilaz yüksek sıcaklıkta α - (1,4) bağlı glukoz polimerlerini kısa oligomerlere parçalar. Sıvılaştırma denilen bu adımı bakteriyal enzimler gerçekteştirmektedir. Sakkarifikasyon denilen diğer adımda ise glukoamilaz, oligomerleri glukozla hidrolizler. Bunu da α -amilazdan daha düşük pH ve sıcaklıkta çalışan fungal enzimler gerçekteştirmektedir. Bazen pullulanaz gibi dallanmayı bozucu enzimler, glukoz verimini arttırmak için eklenmektedir. Disakkarid maltozun üretimi için kullanılan β -amilaz arpa tanelerinden elde edilmektedir. Maltoz şurupları kek ve meşrubat yapımında kullanılmaktadır.

Alkol endüstrisinde enzimler, nişastadan fermente edilebilir şeker üretmek için kullanılmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda çevresel endişelerin çoğalması ve ham petrol fiyatlarının yükselmesi sonucunda fuel alkole olan ilgi artmıştır. Bu yüzden, fosil yakıtlarla mücadele edebilecek biyo-etanol üretmek için enzimlerin geliştirilmesi yolunda yoğun çabalar sarf edilmektedir.

Enzimlerin gıda sektöründe kullanımının ilk örneklerini fermente likör, malt ve kepek hazırlanması, üzüm suyundan şarap üretimi, papain enzimi ile etlerin gevrekleştirilmesi, ekmek yapımı ve küflerin farklı fermente gıda yapımında kullanımları oluşturmaktadır. Süt ürünleri ve peynire olan talebin karşılanabilmesi için mikrobiyal proteazlar, hayvansal kaynaklıların yerine kullanılmaya başlanmıştır. Mikrobiyal peynir-yoğurt mayası (rennet) özellikle *Mucor miehei*, *M. pusillus* ve *E. parasitica*'dan elde edilmektedir. *Aspergillus* ve *Mucor* türü mantarlardan elde edilen asit proteazların termofilik olanları peynir üretiminde kullanılmaktadır. *Aspergillus* proteazları soya soslarının hazırlanmasında, et artıklarından ve balıktan protein hidrolizatları hazırlanmasında geniş ölçüde yararlanılmaktadır. α -galaktozidaz, şeker fabrikalarında verimin artırılmasında; β -galaktozidaz (laktaz) ise sütteki ve peynir altı suyundaki laktozun hidrolizlenmesinde kullanılmaktadır. Laktaz, laktozu glikoz ve galaktoza parçalayan bir enzimdir ve gıda endüstrisinde laktozca zengin olmayan ürünlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Laktazlar genellikle *Kluveromyces lectis* ve *K. fragilis* gibi mayalardan veya *A. niger* ve *A. oryzae* gibi mantarlardan ekstrakte edilmektedir. Etin gevrekleştirilmesinde papain, bromelin ve fişin gibi bitkisel

proteinazlar kullanılmaktadır. Bu enzimler, bağ dokuyu ve kas proteinlerini parçalamaktadırlar.

Ekmek endüstrisinde enzimlerden; kalitesinin geliştirilmesi, bayatlamının geciktirilmesi, hamur oluşumu gibi alanlarda yararlanılmaktadır. Ekmeğin kalitesini arttırmak ve raf ömrünü uzatmak için α -amilazlar ile çalışılmaktadır. Bu amaçla hem fungal hem de bakteriyal amilazlar kullanılmaktadır. Doz aşımı hamurun yapışkan olmasına yol açabilir. Bu yüzden eklenen miktar dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir. Diğer katkı maddelerini azaltmak istendiği için enzimlerin hamur ve ekmek kalitesi üzerindeki etkileri incelenmektedir. Nişastaya ek olarak un, daha az miktarda arabinoksilan ve arabinogalaktan gibi hemiselülozlar, glukanlar ve selüloz içermektedir. Ksilanazların kullanımı su absorplamayı azaltır ve böylece fırınlamada eklenen su miktarını düşürür. Bu da daha dayanıklı hamur elde edilmesini sağlar. Proteazlar, hamurun elle işlenmesi özelliğinin geliştirilmesi için eklenmektedir. Glukoz oksidaz, kimyasal oksidanların yerine; lipazlar ise glutenin güçlendirilmesi için kullanılmaktadır. Böylece daha dayanıklı hamur ve daha iyi ekmek kalitesi elde edilmektedir.

Hayvan yemi endüstrisinde enzimleri kullanmak için yapılan çalışmalar 80'lerin başında yoğunlaşmıştır. İlk ticari başarı arpa bazlı yem diyetleri içerisine β -glukanazın eklenmesi olmuştur. Arpa, tavuk bağırsağında yüksek viskoziteye sebep olan β -glukan içermektedir. Buğday bazlı diyetlerde, enzimler daha sonra denenmiştir. Yapılan çalışmalarda ksilanazlar, buğday bazlı piliç yemine katıldığında metabolize edilebilen enerjiyi %7-10 arttırdığı için en etkin enzim olarak bulunmuştur. Hayvan yemine enzim eklenmesi besinlerin absorpsiyonunu yükselten viskoziteyi düşürmekte; hem parçalanamayan liflerin hidrolizi yoluyla hem de bu liflerin bloke ettiği besinleri kurtarmak yoluyla besinleri serbest bırakmakta ve dışkı miktarını azaltmaktadır. Bitki esaslı yem materyallerinde yaygın bir bileşik olan fitik asitten fosfatı serbest bırakan bir fosfoesteraz olan fitazın net etkisi dışkıda fosforu düşürmesidir. Bunun sonucunda da çevresel kirlenme de azalmaktadır. Yemde fitazın kullanımı yem diyetine fosforun eklenmesi ihtiyacını azaltmaktadır.

Enzimlerin içecek endüstrisinde birçok uygulaması vardır. β -galaktozidaz (Laktaz), süt endüstrisinde süt şekeri laktozunu glukoz ve galaktoza ayırmak için kullanılmaktadır. Bu

işlem, laktoz intoleransı olan tüketicilerin kullandığı süt ürünleri için yapılmaktadır. Enzimler, meyve suyu üretiminde de kullanılmaktadır. Meyve hücre duvarı pektin, hemiselüloz ve selüloz içermektedir. Pektinaz, ksilanaz ve selülazın eklenmesi meyveden, suyun serbest bırakılmasını sağlamaktadır. Ayrıca pektinazlar ve amilazlar meyve suyunun berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Mayalama yoluyla, bira gibi içkiler yapmak için enzimlerden faydalanılmaktadır. α -amilazlar, nişasta hidrolizine yardımcı olmak için; β -glukanazlar, maltta var olan β -glukanların sebep olduğu filtrasyon sorunlarını çözmek için; nötral proteinazlar, proteinleri hidrolizlemek için; papain, α -amilaz ve β -glukanaz olgunlaşma, filtrasyon ve depolama süresince bulanıklığı kontrol etmek için kullanılmaktadır. Lakkaz, meyve suyunun berraklaştırılması ve birada lezzet arttırımı için kullanılmaktadır.

Tekstil endüstrisinde enzimlerin kullanımı endüstriyel enzimolojide en hızlı gelişen alanlardan biridir. Nişasta dokuma fabrikalarında iplik dokuma ünitesine verilmeden önce nişasta pastası ile muamele edilerek ipliğin yüzeyi düzeltilir ve gerilmelere karşı direnci arttırılır. İplik dokunduktan sonra kumaş boyama ve ağartma işlemlerine alınmadan önce nişasta kalıntılarının uzaklaştırılması gerekmektedir. İşte bu amaçla tekstil liflerine zarar vermedikleri için α -amilazlar kullanılmaktadır. Kumaşın ağartılması işleminde liflere ve makinelere zarar veren volkanik lava taşlarının yerine selülazlardan yararlanılmaktadır. Klorin esaslı kimyasalların yerine ağartıcı ajanlar olarak hidrojen peroksitler denenmektedirler. Hidrojen peroksidi yıkan katalaz aşırı peroksidi parçalamak için kullanılmaktadır. Beyaz çürükçül küflerden üretilen lakkazlar tüm bitki materyallerinde bulunan aromatik polimer olan lignini parçalamak için kullanılmaktadır. Bakır içeren bir enzim olan lakkaz oksijen tarafından yükseltgenerek, boya pigmentleri gibi birçok farklı molekül tiplerini parçalayabilir.

Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde birçok farklı enzimin uygulanması için yapılan çalışmalar son 20 yıl süresince gerçekleştirilmiştir. 80'lerin başında peroksidazların lignini parçalamasının keşfi ile çalışmalar hız kazanmıştır. Ksilanazlar, kâğıt hamurunun ağartılmasında kullanılmaktadır. Ksilanazlar, artakalan ksilanı hidrolizleyerek lignin parçacıklarını serbest bırakmaktadır. Böylece klorin esaslı ağartıcı kimyasallara olan ihtiyaç azalmaktadır. Geri dönüşümden kazanılan selüloz lifinin kullanımında

mürekkebin uzaklaştırılması önemli bir adımdır. Lif; su, yüzey aktif madde ve mürekkep çözücüler eklenerek %1 konsantrasyona seyreltilip karışım havalandırıldığında mürekkep tanecikleri yüzeyde sürüklenmektedir. Selülozların eklenmesi mürekkep uzaklaştırma işlemini kolaylaştırmaktadır. Kâğıt yapımında özellikle önemli bir katkı maddesi olarak kullanılan nişastanın modifikasyonunda enzimlerden yararlanılmaktadır. Nişasta kâğıdın dayanıklılığını, sertliğini ve silinebilirliğini arttırmaktadır. Amilazların eklenmesiyle nişasta süspansiyonu katı bir viskoziteye sahip olmaktadır. Kızılçamın kâğıt hamurları hammadde olarak kullanıldığında lipidlerden oluşan zift sorun yaratmaktadır. Kâğıt makinelerinde ziftin sebep olduğu problemler lipazlar sayesinde çözülmektedir.

Deri endüstrisi, deri işlemede proteolitik ve lipolitik enzimleri kullanmaktadır. Alkali proteazlar, ıslatma aşamasında eklenmektedir. Bu enzimler, albümin ve globülin gibi lifsiz proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bakteriyal alkali proteazlar ve lipazlardan kıl ve yünlerin uzaklaştırılması aşamasında yararlanılmaktadır. Böylece işlem daha çevre dostu bir özellik kazanmakta (daha az atık su) ve deri kalitesi artmaktadır (daha güçlü, daha temiz bir yüzey, daha az lekeli ve daha kaliteli bir deri). Ayrıca lipazlar yün yağının uzaklaştırılması için de kullanılmaktadır. Pankreatik tripsinin kullanılmasıyla deriye yumuşaklık ve esneklik kazandırılmakta ve böylece deri tabaklama için hazır hale getirilmektedir.

Kişisel bakım ürünleri enzimler için yeni bir alandır. Proteinaz ve lipaz içeren enzim solüsyonları kontakt lens temizliği için kullanılmaktadır. Hidrojen peroksitten, kontakt lenslerin enfeksiyondan arındırılmasında yararlanılmaktadır. Enfeksiyondan arındırma işleminden sonra arta kalan hidrojen peroksit ise katalaz ile uzaklaştırılabilir. Bazı dış macunları glukoamilaz ve glukoz oksidaz içermektedir. Bunu sebebi glukoamilaz, α -amilaz tarafından üretilen nişasta bazlı oligomerlerden glukozu serbest bırakmakta ve glukoz oksidaz da glukozu glukonik aside dönüştürmektedir. Ayrıca protein parçalayan enzim solüsyonları protezlerin temizlenmesinde kullanılmaktadır [1], [51-53].

Enzimlerin endüstriyel alanlardaki uygulamaları Çizelge 3. 1’de özetlenmektedir.

Çizelge 3. 1 Çeşitli endüstriyel alanlarda ve onların uygulamalarında kullanılan enzimler

Endüstri	Enzim	Uygulama
Deterjan (çamaşır ve bulaşık)	Proteaz Amilaz Lipaz Selülaz	Protein boya uzaklaştırma Nişasta boya uzaklaştırma Lipid boya uzaklaştırma Temizleme, renk aydınlatma, tortu kalıntısına karşı
Nişasta ve yakıt	Amilaz Pullulanaz Glukoz izomeraz Ksilanaz	Nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyon Sakkarifikasyon Glukozu fruktoza dönüştürme Viskozite düşürme (yakıt ve nişasta)
Gıda (mandıra dâhil)	Proteaz Lipaz Laktaz Pektinaz	Süt kesme, koku, lezzet Kaşar peyniri lezzeti Laktoz uzaklaştırma (süt) Meyve esaslı ürünler
Fırıncılık	Amilaz Lipaz Glukoz oksidaz Proteaz	Ekmek yumuşaklığı ve hacmi, un ayarı Hamur kıvamı Hamur yoğunlaştırıcı Bisküviler, kurabiyeler
Hayvan yemi	Fitaz β -glukanaz Ksilanaz	Fitatın hazmedilebilirliği, fosforun serbest bırakılması Hazmedilebilirlik Hazmedilebilirlik
İçecek	Amilaz Lakkaz Pektinaz	Meyve suyu işlenmesi, düşük kalorili bira Berraklaştırma (meyve suyu), lezzet (bira), Pektinin uzaklaştırılması
Tekstil	Selülaz Katalaz Lakkaz Peroksidaz	Kot kumaşı, pamuk yumuşatma Ağartmayı sonlandırma Ağartma Aşırı boyayı uzaklaştırma
Kâğıt ve kâğıt hamuru	Lipaz Amilaz Selülaz Ksilanaz	Zift kontrolü, kirlilik kontrolü Nişasta kaplama, mürekkep uzaklaştırma Mürekkep uzaklaştırma, lif modifikasyonu Kâğıt hamurunun ağartılması
Deri	Proteaz Lipaz Tripsin	Albümin ve globülinin uzaklaştırılması Kıl, yün ve yün yağının uzaklaştırılması Derinin yumuşak ve esnek hale getirilmesi
Kişisel bakım	Glukoamilaz Glukoz oksidaz Peroksidaz	Antimikrobiyal (Glukoz oksidaz ile birlikte) Ağartıcı, antimikrobiyal Antimikrobiyal

BÖLÜM 4

PULLULANAZLAR

Genel olarak, pullulanı parçalayan enzimler olarak tanımlanan pullulanazlar (pullulan-6-glukanohidrolaz [EC 3.2.1.41], 13 glikozil hidrolazların α -amilaz ailesi olarak adlandırılan bir aileye aittir. Bu enzimler hayvanlarda, bitkilerde, küflerde, mayalarda, G (+) ve G (-) bakterilerde bulunmaktadır [54]. Son yıllarda yapılan biyokimyasal çalışmalar pullulanı parçalayan enzimlerin hepsinin pullulanın yanı sıra nişasta, amilopektin gibi bazı polisakkaridleri de parçalayabileceğini göstermiştir. Pullulanazlar; nişasta, amilopektin ve benzer oligosakkaridlerdeki α - (1,4) glikozidik bağlarını parçalayabilme yeteneğine dayanılarak tip I veya tip II (amilopullulanaz) olarak sınıflandırılmıştır. Tip I ve tip II pullulanazların her ikisi de pullulandaki α - (1,6) glikozidik bağlarını kırar ve maltotrioz birimlerinin açığa çıkmasına sebep olur (Şekil 4. 1). Tip II pullulanazların aksine tip I pullulanazlar α - (1,4) glikozidik bağlarını parçalayamazlar. Bütün pullulanazların siklodekstrinleri parçalamakta yetersiz olduğu bilinmektedir [9], [10].

(i) Tip I pullulanaz; gerçek pullulanaz, limit dekstrinaz, dallanmayı bozucu enzim, amilopektin-6-glukanohidrolaz veya α -dekstrin 6-glukanohidrolaz olarak da adlandırılır. Tip I pullulanaz, pullulan, nişasta, amilopektin veya benzer polisakkaridlerdeki özellikle α -(1,6) glikozidik bağlarını hidrolizleyen dallanmayı bozucu bir enzimdir ve hidroliz ürünleri sırasıyla lineer oligosakkaridler ve maltotriozdur. Bu enzim ne amilozdaki α -(1,4) bağlarını ne de glikojen ve panozdaki α -(1,6) bağlarını hidrolizler. İlk defa 1966'da Wallenfels ve arkadaşları tarafından *Aerobacter aerogenes*'nin bir kültüründen (*Klebsiella pneumoniae*) izole edilmiştir [55]. Enzim daha sonra *Streptococcus mitis*,

Bacillus no. 202-1 ve Klebsiella aerogenes W70 gibi birkaç mikroorganizmadan daha izole ve karakterize edilmiştir [56], [57].

(ii) Tip II pullulanaz; pullulan veya dallanmış oligosakkaridlerdeki α -(1,4) glikozidik bağlarına ek olarak α -(1,6) bağlarını da hidrolizler. Enzimin amilopektin üzerine etkisi glukoz maltoz ve maltotrioz gibi küçük şekerlerin oluşumuna izin verir [56]. Tip II pullulanaz, protein içindeki aktif sitelerinin sayısına dayanarak iki alt gruba bölünebilir. Termofilik anaeroblardan elde edilen amilopullulanazların çoğu tek bir aktif siteye sahiptir. Diğer yandan aerobik mikroorganizmalardan elde edilenler ise bir veya iki aktif siteye sahiptir [58].

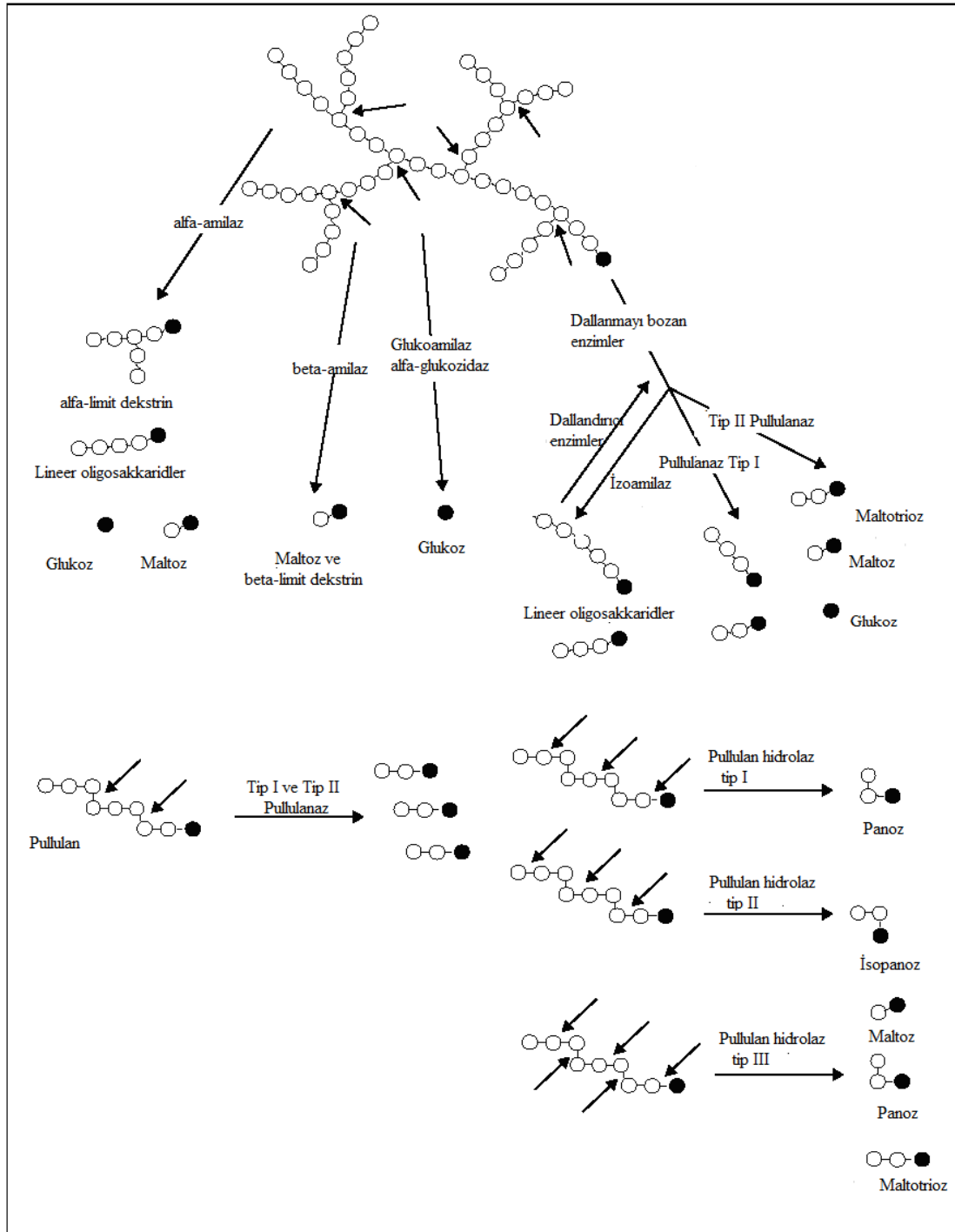
Wallenfels ve arkadaşları pullulanazın başlangıçta hücre yüzeyine bağlı olarak sentezlendiğini, aktif ve substrat için hazır olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin sentezi pullulan, maltotrioz veya maltoz tarafından teşvik edildiği görülmüştür. Enzim büyüme döngüsünün ileri evrelerinde ortama bırakılır. Büyüme ortamında galaktoz ile glukozun oluşması pullulanazı inhibe eder ve hücreye bağlı olan enzim serbest kalır [59].

Yapılan bazı çalışmalar pullulan hidrolaz tipi enzimlerin varlığını da göstermiştir. Pullulan hidrolaz tip I (neopullulanaz, [EC 3.2.1.135]) ve pullulan hidrolaz tip II (izopullulanaz, [EC 3.2.1.57]) pullulandaki α -(1,4) glikozidik bağlarını ayırabilir ve sırasıyla panoz (α -6-D-glukozilmaltoz) ve izopanoz (α -6-maltozilglukoz) oluşumuna izin verirler. Ayrıca siklodekstrinler üzerine de oldukça etkindirler. Son zamanlarda pullulan hidrolaz tip III tanımlanmıştır. Bu archeal enzim, pullulandaki α -(1,6) glikozidik bağlarının yanı sıra α -(1,4) glikozidik bağlarını da parçalayabilme yeteneğine sahiptir ve maltotrioz, panoz ve maltoz oluşumuna izin verir [9], [10], [58], [60], [61].

Pullulanı parçalayan enzimlerin çeşitliliği karbohidratların hidroliz mekanizmaları ve son degradasyon ürünlerinin çeşitliliği gıda, kimya ve ilaç endüstrileri için oldukça önemlidir. Pullulanazlar, glukoz ve maltoz verimini arttırmaları [54].

Son yıllarda pullulanaz nişastayı yıkan bir enzim olarak büyük önem kazanmıştır. Bu enzim, sakkarifikasyon oranını ve verimini arttırması sebebiyle çeşitli şeker şuruplarının üretimi için genellikle glukoamilaz, fungal α - ve β -amilaz ile birlikte kullanılır [62].

Ayrıca karbohidratların yapısal çalışmaları için kullanışlı bir araç olarak önem kazanmıştır [63].



Şekil 4. 1 Amilolitik ve pullulolitik enzimlerin şematik gösterimi [64]

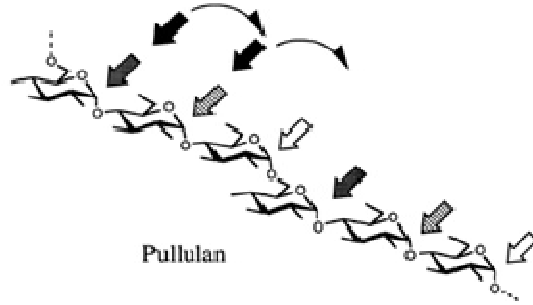
4.1 Pullulanazın Substratları

a- Pullulan

Pullulan glukoz veya sakkaroz içeren ortamda küf benzeri bir maya olan *Aeureobasisium pullulans* tarafından sentezlenen, fermantasyon yoluyla büyük miktarlarda üretilen bir kaç mikrobiyal polisakkaritten biridir [65], [66].

A.pullulans'nın birçok soyu bu polisakkariti büyük miktarlarda üretir. Pullulan, α -(1,4) bağı ile bağlanmış maltotrioz ünitelerinin α -(1,6) bağları ile birbirine bağlanması ile oluşan ekstrasellüler ve dallanmamış bir homopolisakkariddir [67-70].

Beyaz iplik veya toz haline getirilmiş liyofilize pullulan tatsız, kokusuz ve normal atmosfer koşulları altında nem çekmez formdadır. Metanol ve asetonda çözünmez fakat suda kolayca çözünerek şeffaf, renksiz, viskoz ve yapışkan bir çözelti oluşturur. Pullulan molekülü nötraldir ve moleküler ağırlığı 1500-810000 kDa arasındadır [54].



Şekil 4. 2 Pullulanın moleküler yapısı

Pullulan çok çeşitli endüstriyel ve medikal uygulamalara sahiptir [71]. α -(1,4) ve α -(1,6) bağlarının düzenli değişimi pullulana yapısal esneklik ve artan çözünürlük gibi iki farklı özellik kazandırmıştır [72]. Suda çözünen ve oksijen geçirmeyen pullulan membranlar filmlere şekil verir ve çeşnilik, toz çay ve kahve gibi bazı gıdalar için paketlenme ve kaplama materyali olarak kullanılır [73]. Ayrıca pullulan kaplı kâğıtlar kolayca bozunurlar; toksik değildirler; biyo-bozunabilirler ve çevreye zarar vermezler [66]. Pullulan in-vivo sindirim enzimlerine dayanıklı olduğu için düşük kalorili yiyeceklerde

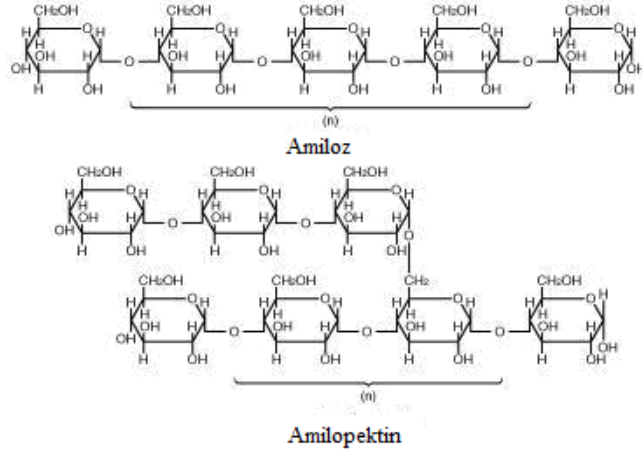
nişastanın yerine de kullanılabilir. Esterli ve eterli pullulan türevleri tutkal ve yapıştırıcı imalında kullanılabilir. Pullulan lifleri sebze lifleri ile birlikte veya yalnız kâğıt üretiminde kullanılabilir. Ayrıca pullulan pudra veya tablet biçimindeki ilaçların paketlenmesinde de kullanılır [74].

b- Nişasta

Dünya popülasyonunun çoğunluğu için temel enerji kaynağı olan nişasta; bolca bulunan, kolayca erişilebilen bir karbonhidrattır. İnsan beslenmesinde ve vücudun farklı fonksiyonlarını gerçekleştirmesi için gereken metabolik enerjinin desteklenmesinde en büyük rolü oynar [75].

Bitki hücreleri veya tohumlarında genellikle büyük granüller halinde sitoplazmada depolanan bir polisakkariddir. Mısır, buğday, patates ve pirinçte en fazla bulunur [8]. Nişasta granülleri amiloz ve amilopektin olarak adlandırılan α -D glukoz birimlerinden meydana gelmiş iki tip molekülden oluşmaktadır. Amiloz, glukoz birimleri arasında α -(1,4) glikozidik bağı ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıdır. Amilopektin ise glukoz birimleri arasında α -(1,4) bağlantısına ilaveten α -(1,6) glikozidik dallanma noktalarını da içermektedir. Amiloz ve amilopektin içeriği bitki türlerine bağlıdır. Örneğin, buğday nişastası yaklaşık %25 amiloz içerirken, mısır nişastası %97-99 oranında amilopektine sahiptir. Granüllerinin yapısı, şekli ve büyüklüğünde de farklılıklar vardır [76].

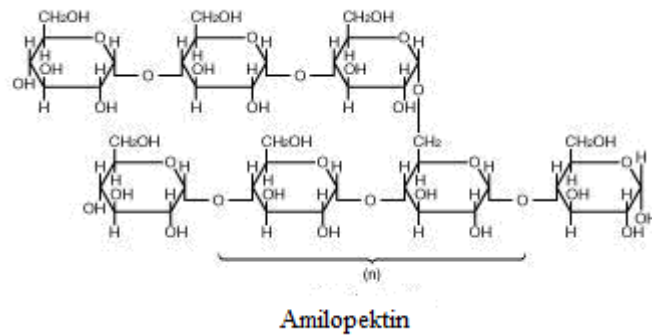
Mısır, buğday, patates ve pirinç gibi bitkiler, nişasta ve nişastanın gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan glukoz, fruktoz ve maltoz içeren şuruplara dönüşmesi için ucuz bir kaynaktır. Bu ürünler etanol üretimini içeren fermantasyon endüstrisinde substrat olarak da kullanılabilir. Bir nişasta granülü % 69-74 amilopektin, %31-36 amiloz, %11-14 su, % 0,2-0,4 protein, % 0,5-0,9 lipid, % 0,05-0,1 kül, % 0,02-0,03 fosfor ve % 0,1 pentosan içerir [8].



Şekil 4. 3 Nişastanın moleküler yapısı

c- Amilopektin

Nişastanın büyük molekül ağırlıklı iki bileşeninden biri olan amilopektin (%75-85), α -(1,4) glikozidik bağlarına ek olarak her 17-26 glukoz ünitesinde bir meydana gelen α -(1,6) bağlı dallanma noktalarını içeren, 10^4 - 10^5 kDa ağırlığında olan dallanmış, büyük bir polimerdir. Amilopektin çözeltide kolloidal veya miselimsi formlara sahip olabilir. Diğer bileşeni olan amiloz (%15-25) ise, α -(1,4) bağlı glukopiranoz kalıntılarını içeren ve 10 - 10^2 kDa ağırlığında olan lineer bir polimerdir [77].

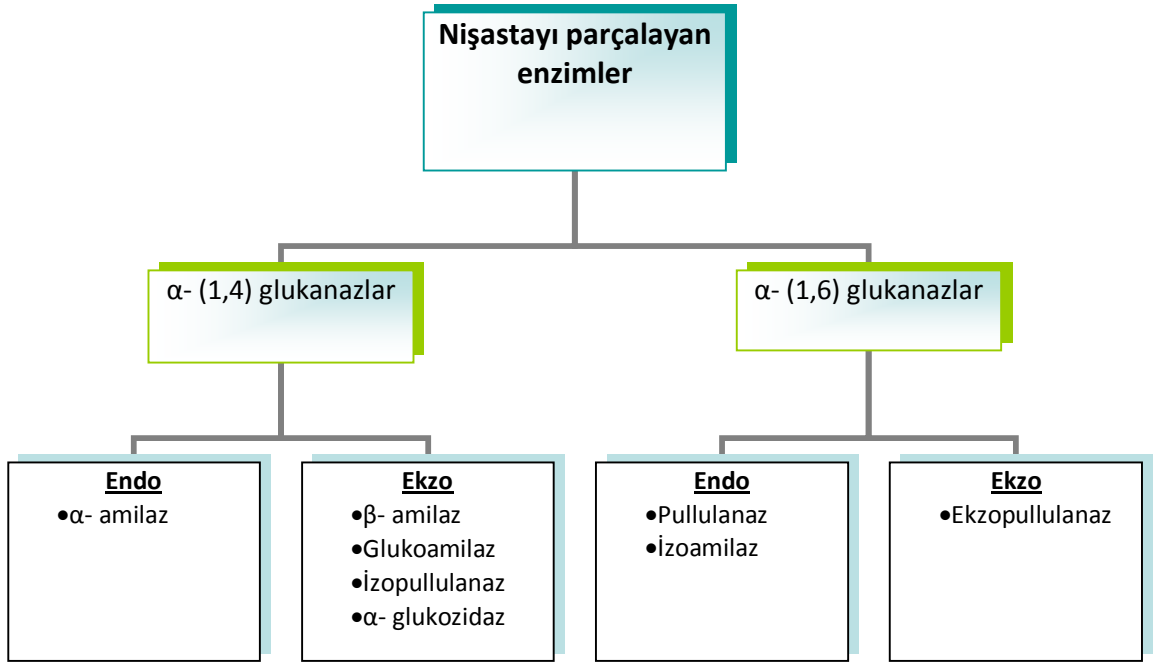


Şekil 4. 4 Amilopektinin moleküler yapısı

NIŞASTANIN SAKKARİFİKASYONU

Endüstriyel ürünlerin fiyat belirleme stratejilerinin çoğunluğunu, başlangıç fazındaki fraksiyonlama (ayırılma) adımı belirler. Bu adımda genellikle fiziksel metotlar kullanılır fakat bu metotlar tüm fraksiyonlama için yeterli değildir. Bu yüzden tamamlayıcı fiziksel, kimyasal veya biyolojik adımlar beraber kullanılır. Birçok uygulama başlangıç materyalini monomere (monosakkarit, yağ asidi, aminoasit veya nükleotid) indirgeyen bir ayırılma gerektirir. Bunu gerçekleştirmek için tipik olarak iki yol vardır: (i) kimyasal metot veya (ii) enzimatik metot.

Kimyasal metot evrensel olmasına rağmen nişastanın ısıtılmasına bağlı olarak insanlar için toksik olan furfural türevleri gibi sağlık risklerine sebep olabilen istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna sebep olabilir. Biyoyakıt üretimi veya gıda uygulamalarında kullanılmayan biyoplastik üretiminde bu önemli olmayabilir. Fakat gıda imalatında bu ciddi bir sorundur. Ayrıca yine kimyasal metotta ısıtma işlemine bağlı olarak (140-150 °C) üründe renk bozulmaları ve kül kontaminasyonu da meydana gelmektedir. Gerek kimyasal metot yöntemindeki bu olumsuzluklar gerekse enzim üretimindeki gelişmeler sebebiyle günümüzde nişastadan glukoz üretiminde kimyasal metodun yerini enzimatik metot almıştır. Enzimatik yaklaşımın en iyi örneklerinden biri nişasta endüstrisinde gözlenir [78], [79]. Geçmişte nişastayı özgün şekerlere ayırmak için güçlü asitler kullanılırdı, günümüzde bu işlem için enzimler kullanılmaktadır. Nişasta α -amilaz, β -amilaz, glukoamilaz, pullulanaz ve izoamilaz gibi amilolitik enzimler tarafından hidroliz edilir (Şekil 5. 1). Pullulanazlar, amilopektinin özellikle dallanma noktalarına etki eder, daha etkin ve daha hızlı dönüşüm reaksiyonlarına izin verdiği için tercih edilir.



Şekil 5. 1 Nişastayı parçalayan enzimler

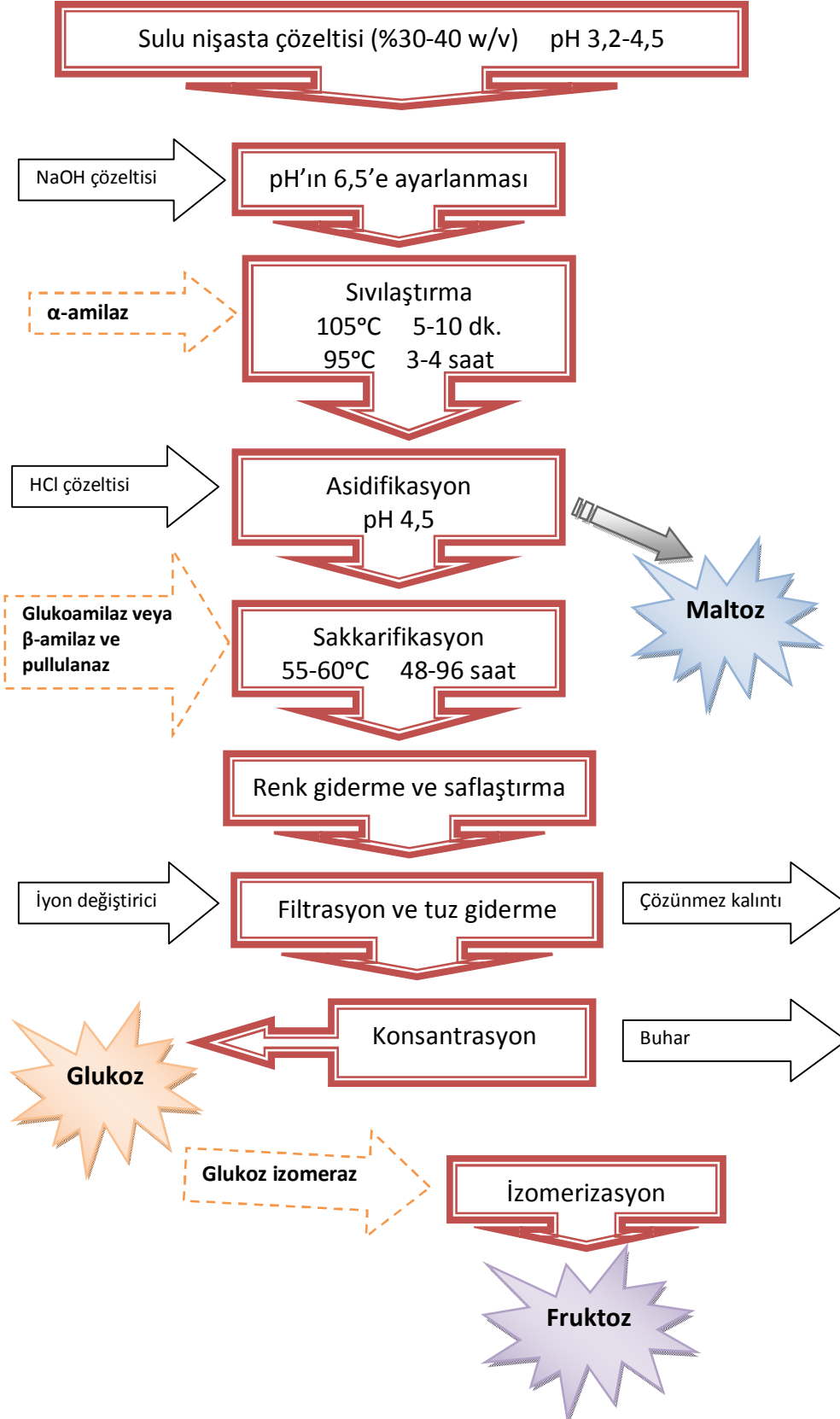
Nişasta bitkilerde özellikle mısır, buğday, patates ve pirinçte en fazla bulunan depo polisakkaritidir. Bu bitkiler nişasta ve nişastanın gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan glukoz, fruktoz ve maltoz içeren şuruplara dönüşmesi için ucuz bir kaynaktır. Böylece şekerler, şeker kamışı ve şeker pancarının yanı sıra bitki nişastasından da elde edilebilir. Elde edilen bu şekerler etanol, butanol, asetik asit, laktik asit veya furfural gibi çeşitli ürünlerin eldesi için ham materyal olarak kullanılabilir. Ayrıca düşük kalorili “light” bira üretimi için de kullanılır [80].

Gıda tatlandırıcıları olarak kullanmak için nişastanın glukoz, maltoz ve fruktoza enzimatik dönüşümü endüstriyel enzim kullanımında önemli büyüme alanına sahiptir. Yüksek dekstroz ekivalentli şurupların üretiminde kullanılan nişastaların çoğu %70-95 oranında amilopektin içerir. Nişastanın sakkarifikasyonunda kullanılan ekzo enzimler amilopektindeki α -(1,6) glikozidik bağlarını hidrolizleyemez. Dallanma noktaları, amilopektinde var olan toplam glikozid bağlarının %4-6’sını oluşturduğundan verimli bir sakkarifikasyon için engel oluşturur. Bu sorun tip I pullulanaz (gerçek pullulanaz) veya tip II pullulanaz (amilopullulanaz) kullanılarak çözülür [81]. Pullulanazın en önemli endüstriyel kullanımı glukoz veya maltoz şuruplarının üretimidir. Bu olay sakkarifikasyon işleminde pullulanaz sırasıyla glukoamilaz veya β -amilaz ile birlikte

kullanıldığı zaman gerçekleşir. 60°-100°C arasında aktif olan ve özellikle amilopektinin dallanma noktalarına etki eden termostabil pullulanazlar daha etkin ve daha hızlı dönüşüm reaksiyonlarına izin verdiği için özel bir ilgiye sahiptir. Pullulanazın etkisi, glukoamilaz için ideal substrat olan α -(1,4) bağlı glukoz ünitelerinin uzun polimerlerinin oluşumu ile sonuçlanır [82], [83].

Nişastanın enzimatik hidrolizi ile ilgili sanayide uygulanan işlemler Şekil 5. 2'de belirtilmiştir.

Nişastanın enzimatik dönüşümünde sıvılaştırma ve sakkarifikasyon olarak iki temel adım vardır. Sıvılaştırma adımı süresince nişasta granüllerinin konsantre sulu çözeltisi (%30-40 w/v) yüksek sıcaklıkta (90-110°C) jelatinleşir. İşlemin bu adımında şişmiş nişasta granüllerinden amilozun serbest kalması viskozitede ani artışa neden olur. Bu yüzden termostabil endoamilaz [EC 3.2.1.1] eklenerek nişasta çözeltisinin viskozitesindeki bu artış engellenir. α -amilaz tarafından amilozun enzimatik hidrolizi, reaksiyon ürünlerinin zincir uzunlukları 10-20 glukoz birimi olana kadar devam ettirilir. Bu noktada nişasta parçacıkları enzime bağlanmakta başarısız olurlar. Amilopektinin hidrolizi sadece amiloz hidrolizinde olduğu gibi lineer maltooligosakkaritlerin oluşumu ile değil aynı zamanda α -amilaz tarafından ayrılamayan α -(1,6) bağlarını içeren parçacıkların oluşumu ile sonuçlanır. Farklı destek maddeleri üzerine α -amilazın immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Nitekim reaksiyon veriminin substratın yüksek molekül ağırlığı ve yüksek çözelti viskozitesinin neden olduğu difüzyon sınırlamaları yüzünden güçlü biçimde etkilendiği bulunmuştur. Nişasta üzerine etkisi olmayan fakat nişasta işlenmesinde verimi arttıran diğer glikozil hidrolazlar ksilanazlar ve selülazlardır. Her ikisi de selüloz ve ksilanlardaki sırasıyla D-glukoz veya D-ksilopiranozun β -(1,4) bağı ile bağlanmış kalıntılarının ayrılmasında etkilidir. Ksilanazlar arabinoksilanları ve diğer ksilanları bozarak sulu buğday nişastasını çözeltisinin viskozitesini düşürür; hâlbuki selülazlar selüloz liflerinin kontaminasyonu yüzünden nişasta hidrolizinin son ürününün süzülebilirliğini pozitif yönde etkiler.



Şekil 5. 2 Nişastanın hidrolizi ile glukoz, fruktoz ve maltoz üretimi

Sakkarifikasyon adımı düşük sıcaklıkta gerçekleşir ve glukoamilaz [EC 3.2.1.3] veya β -amilazlar [EC 3.2.1.2] tarafından katalizlenen reaksiyonlarda oligosakkaritlerin hidrolizi ile sırasıyla glukoz veya maltoz oluşumuna öncülük eder. Nişasta hidrolizinin verimi glukoamilaz veya β -amilaz ile birlikte pullulanaz [EC 3.2.1.41] kullanılarak arttırılabilir. Pullulanazın kullanımı glukoz verimini %94 dolayına kadar arttırabilir.

Endüstriyel işlemlerin çoğunda nişasta granüllerinin jelatinasyonu 100°C civarında gerçekleştiği için termostabil α -amilaz kullanılır. Bu enzimler termofilik bakteri ve archaea arasında çok yaygındır ve mesofilik konaklarda bunların birkaçının geni klonlanmakta ve ifade edilmektedir. Nişasta sıvılaştırması için kullanılan *Bacillus licheniformis*'den meydana getirilen termamyl (bu mikroorganizmadan fermentasyon ile üretilmiş bir alfa amilaz) ve diğer α -amilaz hazırlanışları pH 5,5-6,0 ve 90°C üzerindeki sıcaklıklarda genellikle çok yüksek aktivite göstermektedir. Bu koşullar sıcaklığa çok duyarlı olan sonraki adımda kullanılan glukoamilazlar ve β -amilazlar için uyumlu değildir ve bu enzimler 60°C'nin üzerinde aktivitelerini kaybederler. Sınırlı enzim termostabilitesi sonraki adıma geçmeden önce substratın hızlı soğutulmasını gerektiğini ifade eder; fakat bu olay reaksiyon karışımının viskozitesinde artışa ve işlemin son veriminde azalmaya yol açar. Sulu nişasta çözeltisinin doğal pH'ı yaklaşık olarak 4,5'tir. Bu değer, substratın sıvılaştırılması süresince azami enzim aktivitesi için istenen değere ayarlanmalıdır ve sonra sakkarifikasyon adımından önce yeniden 4,5'e düşürülmelidir. Sıcaklık ve pH ayarlamasının zorunluluğu işlemin maliyetini arttırır ve buna ek olarak oluşan NaCl'nin uzaklaştırılması için son ürünün iyon değiştirme artırımını gerektirir.

Tek bir adımda nişasta parçalanmasının gerçekleştirilebilmesi önemli bir gelişme olmuştur. Bu, *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen enzime göre daha düşük pH değerlerinde çalışabilen ve ısıya daha dayanıklı α -amilazlar kullanılarak başarılabilmektedir. Bu amilazlar aktivite için kalsiyum tuzlarına ihtiyaç duymazlar. Yüksek ısının neden olduğu yıkımı geriye çevirmek için sıvılaştırma süresince daha fazla α -amilaz eklenmesinden kaçınılarak ısıya dayanıklılık geliştirilir. Farklı termofillerden elde edilen α -amilazlar, yukarıda sözü edilen özellikleri gösterirler; fakat henüz hiçbir ticari ölçekte üretilmemişlerdir. Bu koşullar altında α -amilaz ile birlikte sakkarifikasyonu

katalizleyen oligosakkarit depolimerizasyon enzimlerinin kullanılması gereklidir. Bu, sıvılaştırma ve sakkarifikasyondan önce sıcaklık ve pH ayarlanmasına ihtiyaç duymaksızın bütün enzimlerin birlikte uygulanmasını mümkün kılar. Son araştırmalar, nişasta üzerine α -amilazın hareketi süresince serbest kalan oligosakkaritlerin termostabil α -glukozidazlar [EC 3.2.1.20] tarafından hidroliz edilebileceğini göstermiştir. Bu enzimler indirgen olmayan uçtaki α -(1,4) ve α -(1,6) glikozid bağlarına etki eder ve son ürün olarak glukoz oluşur. Termofil ve mezofillerden elde edilen α -glukozidazların çoğu, en yüksek aktiviteyi maltoz ve izomaltoza doğru göstermiştir. Bu α -glukozidazlar, özellikle amilopektin molekülünün dallanma noktalarında meydana gelen α -(1,6) glikozid bağlarını hidrolizlemekte yeteneklidirler. Legin vd. [84] tarafından α -amilaz ve pullulanazla birlikte kullanılan termostabil *Thermococcus hydrothermalis* glukozidazı ile glukoz şurubunun üretiminin olanaklılığı gösterilmiştir.

Nişasta türevi glukozun fruktoza izomerizasyonu, gıda ve içecek ürünlerinin çoğunda yaygın olarak kullanılan şurubun daha tatlı hale dönüşmesine yol açar. Fruktoz bütün karbonhidratların en tatlısıdır ve azaltılmış sakkaroz içeriğine sahip düşük kalorili ürünlerin formülasyonu için veya insülin olmadan metabolize edilebildiğinden dolayı diyabetikler için tatlandırıcı olarak kullanımı uygundur. Bazı fırıncılık ürünlerinde katkı olarak fruktoz şurubunun katkı olarak kullanımı Maillard reaksiyonunun sonucu olarak istenen esmerleşme ile sonuçlanır. Ayrıca fruktoz, çözeltideki sakkarozu koruyan kristalizasyon inhibitörü olarak da davranır.

Fruktoz şurupları genellikle 55-60°C'de, immobilize glukoz (ksiloz) izomeraz [EC 5.3.1.5] ile katalizlenen sürekli işlemde yapılır. Bu koşullar altında glukozun sadece % 40-42'si fruktoza dönüşür. Bu işlem verimi, artan fruktoz konsantrasyonuna doğru izomerizasyon dengesinin yerinin değişmesine sebep olan yüksek sıcaklıklarda arttırılabilir. Bu, mezofilik kaynaklardan elde edilen enzimin yarı ömrünü sınırlar ve glukoz izomerazın maksimum aktivitesi için gereken hafif pH değerinde meydana gelen Maillard reaksiyonu tarafından oluşturulan ürünün miktarını arttırır. Fruktozun standart konsantrasyonunu (%55) içeren şurubu üretmek için karbonhidratların katyon değiştirme fraksinasyonu kullanılmıştır. Bu adım süresince glukoz ve daha yüksek sakkaritler kolonu terk ederken fruktoz kromatografik matriks üzerinde tutuklanır ve

izomerizasyon ünitesine geri döner. Absorblanmış fruktoz, daha sonra su ile elüe edilerek serbest kalır ve eluat %90'dan fazla fruktoz içerir. Ürün birçok uygulamada gereken son konsantrasyon için %42'lik fruktoz şurubu ile karıştırılır. Glukoz dönüşümü istenmeyen yan reaksiyonları azaltmak için gereken asidik pH değerinde yüksek aktiviteye sahip olan termostabil glukoz izomeraz tarafından katalizlendiği zaman bu kromatografik adım atlanabilir. Glukoz izomerazlar yüksek sıcaklıklarda aktif olduğu için *Thermus*'un çeşitli türleri ve bazı termofilik mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin gelecekteki endüstriyel uygulamaları ürün maliyetlerinde önemli bir azalmaya neden olacaktır [85].

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Jiao vd. [86] tarafından yapılan çalışmada aşırı termofilik, anaerobik archeon *Thermococcus siculi* suşu HJ21'den yeni bir ekstraselüler amilopullulanaz (tip II pullulanaz, EC 3.2.1.41) TsiApu kimliklendirilmiş, karakterize edilmiş ve heterolog biçimde ifade edilmiştir. HJ21 suşu modifiye edilmiş YPS ortamında azot ile ısıtılan kapalı şişelerde 88°C'de 10 saat statik olarak kültive edilmiştir. Hücreler sülfür granülleri ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak için 5 dk. 12000 rpm'de santrifüjlenmiş ve Milipore filtresinden filtre edilmiştir. Süpernatanta %60 doygunluğa kadar amonyum sülfat eklenmiş ve gece boyunca çökmesi için bırakılmıştır. Çökelti 12000 rpm'de 1 saat santrifüjlenerek biriktirilmiş ve pelet 0,2 M Na-asetat tamponunda (pH 6,0) suspende edilmiştir. Sonra süspansiyon diyaliz tüpleri ile 50 mM asetat tamponuna (pH 6,0) karşı diyaliz edilmiştir. Diyalizatlar 20 mM asetat tamponu (pH 6,0) ile dengelenmiş DEAE-52 (2x25 cm) kolonuna yüklenmiştir. Kolon aynı tamponla yıkanmış ve amilopullulanaz aktivitesine sahip fraksiyonlar biriktirilmiş ve 100 kDa ayırma membranlı centricon ile konsantre edilmiştir. Konsantre edilen fraksiyon 20 mM Na-asetat tamponu (pH 6,0) ile dengelenmiş Sefadeks G-100 kolonuna (2x70 cm) uygulanmıştır. Elue edilen fraksiyonlar konsantre edilmiş ve aynı tamponla dengelenmiş TSK G2000 SWXL HPLC kolonuna (30 cm x 7,8 mm) yüklenmiştir. Enzim aktiviteli fraksiyonlar biriktirilmiş ve liyofilizasyon yoluyla konsantre edilmiş ve sonra homojenliğinin ve molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE uygulanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 148,6 kDa olarak hesaplanmıştır. Pullulanaz aktivitesi %1 pullulanın hidrolizi süresince serbest bırakılan indirgen şeker miktarının dinitrosalisilik asit yöntemi ile ölçülerek belirlenmiştir. Maksimum pullulanaz aktivitesi 11,3 U/mg protein olarak bildirilmiştir. Enzimin

optimum sıcaklığı 80-120°C arasında değişen sıcaklıklarda, optimum pH'sı ise 4,0-9,0 arasında değişen pH değerlerinde araştırılmış ve sırasıyla 95°C ve pH 6,0 olarak bulunmuştur. Enzimin termostabilitesi ise enzim 5 saat boyunca farklı sıcaklıklarda (80, 90, 100 ve 110°C) inkübe edilerek araştırılmıştır. Her bir farklı sıcaklıkta bir saatlik inkübasyonun sonucunda enzimin kalan total aktivitesi sırasıyla % 96, 91, 70 ve 50 olarak belirlenmiştir.

Moubasher vd. [87] tarafından yapılan çalışmada *Aureobasidium pullulans*'dan pullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Maya ekstraktı, sakkaroz ile desteklenen Czapek's ortamında beş gün büyütülmüş ve 500 ml'lik sıvı ortama alınmış ve çalkalanan kültürler pullulanaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Miselya ve sporlardan protein çöktürülmesi iki hacim aseton eklenerek gerçekleştirilmiştir. Gece boyunca bekletilen örnek 4°C 10000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve havada kurutularak aseton uzaklaştırıldıktan sonra protein 20 mM asetat tamponu ile yeniden çözülmüştür. Örnekler diyalizlenmiş ve protein polietilen glikol kullanılarak konsantre edilmiştir. 50 mM Na-asetat tamponunda (pH 5,0) çözülen protein örneği aynı tampon ile dengelenmiş Sefadex G-100 kolonuna uygulanmış ve 1 ml'lik fraksiyonlar toplanmış ve protein konsantrasyonları A_{280} nm'de ölçülmüştür. Pozitif fraksiyonlar konsantre edilmiş ve enzim aktivitesi belirlenmiştir. Sonra bu fraksiyonlar Q-Sepharose anyon değiştirici kolona yüklenmiş ve artan KCl gradiyenti (100 mM-1M) ile mobil faz olarak kullanılan 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) uygulanmış ve toplanan 1 ml'lik fraksiyonların protein konsantrasyonları A_{280} nm'de ölçülmüştür. Pozitif fraksiyonlar biriktirilmiş, konsantre edilmiş ve enzim aktivitesi belirlenmiştir. Daha sonra bu fraksiyonlar SP-Sepharose katyon değiştirici kolona yüklenmiş ve artan NaCl gradiyenti (200 mM-1 M) ile mobil faz olarak kullanılan 50 mM Na-asetat tamponu (pH 4,0) uygulanmış ve toplanan 1 ml'lik fraksiyonların protein konsantrasyonları A_{280} nm'de ölçülmüştür. Pozitif fraksiyonlar biriktirilmiş, konsantre edilmiş ve enzim aktivitesi belirlenmiştir. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı belirlenmiş ve 73 kDa olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış enzimin çözünür nişasta, glikojen ve pullulan üzerine etkisini araştırmak için İTK yapılmış ve sadece maltotrioz bandı görülmüştür.

Singh vd. [88] tarafından yapılan çalışmada *Bacillus acidopullulytics* bakterisinden elde edilmiş saf pullulanaz ticari olarak alınmıştır. Çalışmanın amacı pullulanaz kullanarak pullulandan maltotrioz şurubu üretebilmektir. Pullulan fermantasyon sıvısından izopropanol çöktürmesi ile tek adımda saflaştırılmıştır. Ticari pullulanazı pullulanın hidrolizi için kullanmadan önce enzimin kinetik ve termodinamik karakterizasyonu yapılmıştır. Enzimin optimum pH'sını belirlemek için 3,5-7,0 aralığındaki pH değerlerinde 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 3,5-5,0) ve 0,1 M fosfat tamponu (6,0-7,0) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum pH değeri 5,0 olarak bulunmuştur. Pullulanazın optimum sıcaklık değeri ve aktivasyon enerjisi 40-70°C arasında değişen sıcaklıklarda araştırılmış ve optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Arrhenius eşitliği ile hesaplanan aktivasyon enerjisi E_a 34,29 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Saf pullulanazın pullulan, çözüdür nişasta ve dekstrana ilgisi bu substratlar ile enzimin inkübasyonu ile araştırılmış ve enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Kinetik sabitler farklı substratların çeşitli konsantrasyonları ile pullulanazın inkübasyonu ile belirlenmiştir. Buna göre K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla pullulan için 4 mg/ml ve 0,23 U/dk., çözüdür nişasta için 11,1 mg/ml ve 0,20 U/dk., dekstran için 40 mg/ml ve 1,25 U/dk. olarak bulunmuştur. K_m ve V_{max} arasındaki oranlar sırasıyla 0,57, 0,18 ve 0,31 olarak bulunmuştur. Buna göre en yüksek K_m / V_{max} oranı pullulan için görüldüğünden pullulanaz için en iyi substratın pullulan olduğu bildirilmiştir. Ayrıca pullulanaz aktivitesi üzerine potansiyel metal iyonlarının ve enzim inhibitörlerinin etkisi araştırılmıştır. Ca^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının eklenmesi enzim aktivitesini arttırmış, Cu^{+2} ve Hg^{+2} ise aktivitenin tamamen yok olmasına sebep olmuştur. Pullulanazın, saflaştırılmış pullulanın % 94,25±1,83'ünü hidrolizlediği ve oluşan maltotrioz şurubunun 3,77±0,07 mg/ml maltotrioz içerdiği belirlenmiştir.

Zareian vd. [10] tarafından yapılan çalışmada pullulanı glukoz, maltoz ve maltotrioz; nişastayı glukoz ve maltoza kadar hidrolizleyen yeni bir amilopullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Pullulanaz, İran'daki sıcak kaynak sularından izole edilen termofilik suş L14'den elde edilmiştir. 16S rDNA analizi ve biyokimyasal testler L14 suşunun *Geobacillus sterothrophilus* suşu olduğunu göstermiştir. *Geobacillus* sp. L14 suşunun kültürasyonu kompleks fermantasyon ortamında başlatılmıştır. Hücreler

5000 rpm'de 4°C'de 25 dk. santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Proteinler, kültür süpernatantına %75 doygunluğa kadar amonyum sülfat eklenerek çöktürülmüş ve çökelti 14000 rpm'de 4°C'de 25 dk. santrifüj edilmiş ve 50 mM Na-asetat (pH 5,5) tamponunda çözölmüş ve gece boyunca aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Bu konsantre enzim çözeltisi 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 9,0) ile dengelenmiş Q-Sepharose kolonuna (1,6x5 cm) yüklenmiştir. Protein 0-0,5 mM NaCl gradienti uygulanarak elue edilmiş ve 5 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Pullulitik aktivite gösteren fraksiyonlar toplanmış ve 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,5) ile dengeye getirilmiş DEAE-Sepharose kolona (1,6x5cm) uygulanmıştır. Kolon denge tamponu ile yıkanmış ve 0-0,5 M NaCl gradienti ile elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonlar konsantre edilerek protein ve enzim aktiviteleri analiz edilmiştir. Konsantre örnek gece boyunca 50 mM Na-asetat (pH 5,5) tamponuna karşı diyalizlenmiş ve aynı kolnla dengelenmiş Sefadeks G-100 kolona (1,5x96 cm) yüklenmiştir. Fraksiyonlar biriktirilmiş ve enzimatik aktivite belirlenmiştir. Saf proteinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiş ve 100 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH'sını belirlemek için 3,0-9,0 aralığındaki pH değerlerinde 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 3,0-6,0) ve 0,1 M Tris-HCl tamponu (6,5-9,0) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum pH değeri 5,5 olarak bulunmuştur. Pullulanazın optimum sıcaklık değeri ise 65°C olarak belirlenmiştir. Enzimin pullulan, nişasta ve maltooligosakkaridleri parçalayabildiği fakat α -siklodekstrin ile panoz karşısında aktivite göstermediği görölmüştür. Enzimin optimum pH'sını belirlemek için 3,5-7,0 aralığındaki pH değerlerinde 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 3,5-5,0) ve 0,1 M fosfat tamponu (6,0-7,0) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum pH değeri 5,0 olarak bulunmuştur. Pullulanazın optimum sıcaklık değeri ve aktivasyon enerjisi 40-70 °C arasında değışen sıcaklıklarda araştırılmış ve optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzim pullulan ile inkübe edildiğinde glukoz, maltoz ve maltotrioz birimlerini; nişasta ile inkübe edildiğinde ise glukoz ve maltoz birimlerini son ürün olarak oluşturduğu ince tabaka kromatografisi ile belirlenmiştir. Ayrıca enzimin farklı tiplerdeki maltooligosakkaridleri (maltotetroz, maltopentoz, maltoheksos vb.) hidroliz edebileceği saptanmıştır. Enzim hem pullulanın hem de dallanmış yapıdaki polisakkaridlerin α -D-(1,6) ve α -D-(1,4)

glikozidik bağlarını parçalayıp pullulandan glukoz oluşumunu gerçekleştirdiği için bu enzimin saflaştırılmış yeni bir *Geobacillus* sp. L14 amilopullulanazı olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayadi vd. [89] tarafından yapılan çalışmada, *Geobacillus thermoleovorans* US105 pullulanaz tip I pAD22 plazmid harbor edilen *E.coli* suşu ampisilinli LB ortamında 37°C'de kùltive edilmiştir. Saflaştırma için kùltürün periplazmik fraksiyonu 70°C'de 40 dk. ısıtılmış ve denatüre olan konak proteinler santrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Berrak süpernatantta kalan pullulanaz 100 mM Na-asetat tamponunda (pH 6,0) çözünmüş 0,15 M NaCl ile dengelenmiş Sephacryl HR S200 kolonuna (1,6x58 cm) yüklenmiştir. Proteinlerin elüsyonu aynı tamponla gerçekleştirilmiştir. Pullulanaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar konsantre edilmiş ve 50 mM Na-asetat tamponuna (pH 6,0) karşı diyalizlenmiştir. Diyalizat 25 mM Na-asetat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiş UNO-Q12 anyon değıştirici kromatografi kolonuna uygulanmıştır. Pullulanazın elüsyonu aynı asetat tamponunda 0-1 M NaCl gradienti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktif fraksiyonlar toplanmış, konsantre edilmiş ve tuzu uzaklaştırılmıştır. Saflaştırılmış pullulanazın moleküler kùtlesi SDS-PAGE ile belirlenmiş ve 160 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 70°C ve optimum pH değeri 6,0 olarak belirlenmiştir. Enzim 11 kez saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 36 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Kunamneni ve Singh [6] tarafından yapılan çalışmada Hindistan'da topraktan izole edilen termofilik *Bacillus* sp. AN-7 suşunun pullulanaz ürettiği bulunmuştur. Organizma 24 saat katı besiyerinde yetiştirilmiş, aşılama ortamına alınmış ve 48 saat üretim ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüj (3000 rpm, 10 dk.) edilerek ayrılmış ve süpernatant %50-70 amonyum sülfat doygunluğu ile çöktürölerek ayrılmıştır. Protein fosfat tamponunda (50 mM, pH 6,0) çözölmüş ve aynı tampona karşı diyalizlenmiştir. Bu konsantre enzim çözeltisi aynı tampon ile dengelenmiş DEAE-selölz DE52 kolonuna (3,0x16 cm) uygulanmıştır. Aktif enzim 50 mM fosfat tamponunda (pH 6,0) çözölmüş NaCl gradienti (0-0,6 M) geçişiyile elue edilmiştir. Fraksiyonlar biriktirilmiş ve enzim aktivitesi analiz edilmiştir. Aktif fraksiyonlar birleştirilmiş, ultrafiltrasyon ile konsantre edilmiş, protein ve enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Konsantre enzim çözeltisi 50 mM

fosfat tamponu ile dengelenmiş Sefadex G-100 kolonuna yüklenmiş ve bu tamponda çözünmüş 100 mM NaCl çözeltisi kolondan geçirilmiştir. Aktivite gösteren fraksiyonlar biriktirilmiş ve saflatırılmış enzim fraksiyonu olarak kullanılmıştır. Saf proteinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiş ve 106 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH'sını belirlemek için 3,0-9,0 aralığındaki pH değerlerinde 50mM sodyum asetat tamponu (pH 3,0-5,5), fosfat tamponu (6,0-8,0) ve Tris-HCl tamponu (8,8-9,0) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum pH değeri 6,0 olarak bulunmuştur. Pullulanazın optimum sıcaklık değeri 40-110°C arasında değişen sıcaklıklarda araştırılmış ve optimum sıcaklık 90°C olarak belirlenmiştir. Enzimin kinetik sabitleri V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 154 U/mg ve 1,3 mg/ml olarak bulunmuştur. Enzim, Hg^{+2} iyonları ile tamamen inhibe olmuştur. Ca^{+2} , ditiyoeritrol ve Mn^{+2} ise enzimin aktivitesini baskılamıştır.

Vishnu vd. [90] tarafından yapılan çalışmada nişasta gibi polimerik substratları hidrolizleme yeteneğine sahip bir amilopullulanaz enzimi, nişastanın laktik aside direkt fermentasyonu süresince *Lactobacillus amylophilus* GV6'nın kültür süpernatantlarından saflaştırılmıştır. Nişasta endüstri atığından izole edilen organizma 24 saat MRS ortamında büyütülmüştür. Süpernatant ekstraselüler enzim için kullanılmış, distile suda yıkanmış ve dağıtılmış hücreler hücre bağlı enzim için kullanılmıştır. %60 amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiş ermente sıvısının 15 dk. 8000 rpm'de soğuk santrifüjyonu ile süpernatant elde edilmiştir. Çökelti biriktirilmiş, tamponda çözölmüş ve diyaliz yolu ile tuzu uzaklaştırılmıştır. Elde edilen protein örneği liyofilizasyon ile konsantre edilmiş, dengelenmiş asetat tamponuyla dengelenmiş, Sephacryl S-200 kolonuna yüklenmiştir. Kolondan alınan aktif fraksiyonların protein içeriği 280 nm'de ölçölmüştür. Enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar biriktirilmiş, konsantre edilmiş ve aynı kolona yeniden yüklenmiştir. Saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile belirlenmiş ve 90 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH'sını belirlemek için 2,0-8,0 aralığındaki pH değerlerinde 0,1 M hidroklorür (pH 2,0-3,0), sodyum asetat tamponu (4,0-5,5) ve sodyum fosfat tamponu (6,0-8,0) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur. Pullulanazın optimum sıcaklık değeri 15-55°C arasında değişen sıcaklıklarda araştırılmış

ve optimum sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi 0,34 U/ml.dk. olarak belirlenmiştir. Nişastanın enzimatik hidrolizi glukoz, maltoz ve maltotrioz karışımı olarak sonuçlanmıştır. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} iyonları enzimi tümüyle inhibe etmiştir. 2,5 mM Ca^{2+} enzim aktivitesinde yükselmeye sebep olmuştur.

Bertoldo vd. [91] tarafından yapılan çalışmada *Anaerobranca gottschalkii*'den sıcaklık ve alkali stabil tip I pullulanazın klonlanması, sekansı ve karakterizasyonu yapılmıştır. Tip I pullulanaz gen kodlaması, anaerobik termoalkalifilik bakterisi A. gottschalkii'nin genom sekansından kimliklendirilmiştir. Ayrıca homolog gen, Anaerobranca horikoshii'nin gen kütüphanesinden izole edilmiş ve sekanslanmıştır. Fermantasyon yolu ile oluşturulan A. gottschalkii hücreleri 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) ile yıkanmış ve 4 mM Pefabloc SC PLUS içeren aynı tamponla resüspende edilmiştir. Hücreler 20 dakika 20000 x g'de santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatant 50 mM Tris-HCl'e karşı diyalizlenmiştir. Süpernatant 50 mM Tris-HCl ile dengelenmiş Q-Sepharose kolonuna yüklenmiştir ve proteinler 0-0,5 M NaCl gradienti ile elue edilmiştir. Aktif fraksiyonlar biriktirilmiş, ultrafiltrasyon ile konsantre edilmiş ve gece boyunca 50 mM Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlenmiştir. Pullulanazın spesifik aktivitesi 0,33 U/mg olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE'de 96 kDa aktif bir bant gözlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 70°C ve pH değeri 8,0 bulunmuştur. 50-250 mM konsantrasyonundaki NaCl veya KCl varlığı enzim aktivitesini etkilememiştir. Ayrıca 1 mM konsantrasyondaki Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , veya Fe^{2+} , gibi divalent katyonların klorürlü tuzları da aktiviteyi etkilememiştir. Ek olarak Zn^{2+} , Cd^{2+} veya Hg^{2+} enzimi tamamen inaktivite etmiştir. Test edilen bileşiklerin hiçbiri pullulanaz aktivitesi üzerinde pozitif etkiye sahip olmamıştır.

Gomez vd. [92] tarafından yapılan çalışmada aşırı termofilik *Rhodothermus marinus*'un 5 suşu amilolitik ve pullulitik aktivitelerinin üretimi için izlenmiştir. Seçilmiş R. marinus ITI 990 suşu için kültür ortamı enzim üretiminin gelişimini sağlamak amacıyla merkezi birleşik dizaynlar kullanılarak optimize edilmiştir. 1,5 g/l maltoz ve 8,3 g/l maya ekstraktı içeren modifiye ortamdan elde edilen pullulanazın aktivitesi 2,1 nkat/ml olarak belirlenmiştir. Bu enzimlerin oluşumu için, test edilen çeşitli karbon kaynakları arasında en etkin olanı maltoz ve daha sonra sırasıyla çözünür mısır nişastası, glikojen

ve pullulan olarak bulunmuştur. Ham amilaz ve pullulanaz pH 6,5-7,0 aralığında sırasıyla 85 ve 80°C'de maksimum aktivite göstermiştir. 85°C'de amilaz ve pullulanazın sırasıyla 3 saat ve 30 dk. yarılanma ömrüne sahip olduğu görülmüştür. *R. marinus* suşları 61°C'de kùltive edilmiştir. Kùltivasyonun sonunda enzimler hücre kùtlesinden ekstrakte edilmiştir. Kùltür sıvısı santrifüj edilerek temiz süpernatant elde edilmiştir. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 4,0-11,0 aralığındaki pH değerlerinde 25 mM fosfat tamponu (4,0-8,0) ve glisin-NaOH tamponu (9,0-11,0) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş ve enzimin optimum pH değeri 6,0 olarak bulunmuştur. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 50-95°C arasında değışen sıcaklıklarda çalışılmış ve optimum sıcaklık 80°C olarak belirlenmiştir.

Amitava vd. [93] tarafından yapılan çalışmada yakın zamanda izole edilen *Bacillus* sp. US 149'dan asidik pullulanaz tip II saflaştırılmış ve izole edilmiştir. Yüksek pullulanaz aktivitesine sahip US 149 suşu sıcak su kaynaklarına yakın Tunus toprağından izole edilmiştir. Bu suşun çubuk şeklinde ve G (+) olan hücreleri sadece asidik pH'da (4,5-5,0) ve 37-55°C aralığında yetiştirilmiştir. US 149 suşu fermentörde kùltürlenmiş ve hücreler 15 dk. 8000 rpm'de santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Süpernatant vakum evaporasyonu ile 11 kez konsantre edilmiştir. %80 doygunlukta amonyum sülfat eklenmiş ve gece boyunca çökmeye bırakılmış sonra 20000 rpm'de 1 saat santrifüj edilerek çökelti biriktirilmiş ve pellet 0,2 M asetat tamponunda (pH 5,6) süspende edilmiştir. Daha sonra örnek diyalizlenmiş ve amonyum tamamen uzaklaştırılmıştır. Diyalizad Bio-Gel P-2 kolonundan geçirilerek kalan tuzlar, peptidler ve karbonhidratlar uzaklaştırılmıştır. Yarı saf örnek 50 mM Tris-HCl (pH 9,5) ile dengelenmiş FPLC Mono Q anyon kolonuna uygulanmış ve protein 0-1 M NaCl gradienti ile elue edilmiştir. Enzim aktiviteli konsantre fraksiyon 100 mM asetat tamponu (pH 5,6) ile dengelenmiş jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir. Protein %13,3 geri kazanım ile saflaştırılmıştır. Elue edilen fraksiyonlar konsantre edilmiş ve HPLC uygulanmıştır. Enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar biriktirilmiş HPLC ve SDS-PAGE kullanılarak moleküler ağırlığının belirlenmesi için kullanılmıştır. HPLC 'de 200 kDa'luk tek bir pik gözlenirken SDS-PAGE'de 95 kDa'luk tek bir band gözlenmiştir. Bu bilgiler proteinin dimer yapıda olduğunu göstermiştir. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığının 60°C optimum

pH'sının ise 5,0 olduğu belirlenmiştir. Enzimin pullulanı hidrolizleyebildiği fakat amiloz ve maltoheptozu hidrolizleyemediği gözlenmiştir. Pullulanın son ürünü isopanoz olduğu için enzimin pullulanaz tip II'nin altında sınıflandırılmış isopullulanaz olduğu belirlenmiştir.

BÖLÜM 7

MATERYAL VE METODLAR

7.1 Kullanılan Materyaller Ve Cihazlar

Kullanılan Organizma: Çalışmamızda kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* QM 9414, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden temin edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler: Kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 7. 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 7. 1 Kullanılan kimyasal maddeler

KİMYASAL	FİRMA / KATOLOG NUMARASI
MgSO ₄ .7H ₂ O	Riedel-de Haen / 13142
Pepton	Sigma / P-6588
KH ₂ PO ₄	Merck / 1.04871
K ₂ H PO ₄	Fluka / 60356
D(+)-Glukoz	Riedel-de Haen / 16325

Çizelge 7. 1 Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

Trisodyum sitrat dihidrat	Riedel-de Haen / 32320
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Lachema / 30786
Agar-agar	Merck / 1.01613
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma / F 7002
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma / M-6528
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma / Z-4750
Pullulan	Sigma / P4516
Nişasta	Sigma / S2630
Amilopektin	Fluka / 10120
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen / 04272
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen / 04269
NaCl	Fluka / 71379
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck / 1.02539
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich / 110191
Sitrik asit monohidrat	Riedel-de Haen 12022
Et ekstraktı	Fluka / 70164

Çizelge 7. 1 Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

Sitrik asit	Merck / 1.438021
Maya ekstraktı	Sigma / Y1126
Amonyum sitrat	Sigma / A1332
HCl (%37)	Riedel / 07102
NaOH	Fluka / 71690
BaCl ₂	Aldrich / 217565
Tween 80	Merck / 1.067657
BSA	Fluka / 27815
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck / 1.00201
Etanol	Merck / 1.00573.2500
o-H ₃ PO ₄ (85%)	Sigma / T4428
Dializ kesesi	Aldrich / D-9777-100FT
Asetik asit	Merck / 1.00063
KOH	Riedel / 06009
Amonyum sitrat	Sigma / A1332
Sitrik asit	Merck / 1.438021
HCl (%37)	Riedel / 07102

Çizelge 7. 1 Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

Akrilamid	Fluka / 01699
Pullulanaz	Sigma / P1067
Marker high range	Sigma / S8320
N,N' metilenbisakrilamid	Sigma / M7279
Tris	Fluka / 93350
Sodyum dodesil sülfat	Fluka / 71729
Glisin	Merck / 1.04169
Gliserol	Riedel / 15523
β - merkaptotetanol	Fluka / 63700
Bromfenol mavisi	Merck / 1.0822
TEMED	Merck / 1.10732
APS	Sigma / A3678
Maltoz monohidrat	Merck / 105910
TCA	Fluka / 91233
Isopropil alkol	Sigma / I0398
DEAE selüloz	Sigma / D0909
Sefadeks G-100	Sigma / S6147

Çizelge 7. 1 Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Fluka / 44944
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Ridel / 12074
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Fluka / 44939
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Fluka / 63072
NiCl_2	Sigma Aldrich / 339350
NaCl	Fluka / 71376
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck / 7758
$\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fluka / 62609
AgNO_3	Merck / 13.8591
KI	Fluka / 60399
Triton X-100	Fluka / 93426
Tween 20	Fluka / 93773
DL-Ditiyothreitol	Fluka / 43817
Etilen-diamintetraasetik asit (EDTA)	Merck / 13.3546
Üre	Fluka / 51459
Galaktoz	Fluka / 48259

Çizelge 7. 1 Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

Maltotrioz	Fluka / 63430
Maltotetroz	Fluka / 63422
Maltopentoz	Fluka / 63417
Laktoz monohidrat	Fluka / 61339
Anilin	Fluka / 10410
İTK tabakası	Merck / F254

Kullanılan Cihazlar

- Sterilizasyon işlemi için: Certoklav LV18 marka masaüstü otoklav
- Destile su eldesi için : GFL marka 2001/4 destile su cihazı
- Enzim indüksiyonunu sağlamak için: Sartorius marka Certomat IS UHK çalkalamalı inkübatör
- Enzim aktivite ve protein tayini için: Philips marka PU8740 UV/VIS spektrofotometre
- Kullanılan tampon ve çözeltilerin pH kontrolü için: Sartorius marka pH metre
- Santrifüj için: SIGMA marka 3K 30 santrifüj
- Amonyum sülfat çöktürmesi için: Chiltern Hotplate HS31 manyetik karıştırıcı
- SDS-PAGE jel elektroforezi için : Thermo marka EC 120-2 mini dikey jel elektroforez sistemi
- Kullanılan tampon, çözelti ve kültürlerin saklanması için: Bosch marka buzdolabı kullanılmıştır.

- DEAE-selüloz ve Sefadeks G-100 kolon kromatografilerini gerçekleştirmek için:
Uğur derin dondurucu

7.2 Kullanılan Metotlar

7.2.1 Protein Miktar Tayini

H. jecorina'dan pullulanazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve %60'lık amonyum sülfat fraksiyonunun elde edilmesi aşamalarında, protein miktarı Bradford yöntemine göre tayin edildi [94]. DEAE-selüloz ve Sefadeks kolon kromatografileri ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise A_{280}/A_{260} Warburg-Christian [95] yöntemi kullanıldı.

a- Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Bu yöntem, Coomassie Blue G- 250 organik boyasının proteinin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek mavi renk oluşturmalarını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik aminoasitler) önemlidir. Coomassie Blue normalde 465 nm'de maksimum absorbanı verirken protein ile bağlandığı zaman 595 nm'de maksimum absorbanı verir.

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. Destile su ile 600 ml'ye tamamlandıktan sonra Whatman (No:1) süzgeç kâğıdından süzüldü ve 465 nm'deki suya karşı absorbanı $0.800 \pm 100A^\circ$ olacak şekilde seyreltilti. Hazırlanan bu renk reaktifi koyu renkli cam bir şişede saklanmalıdır.

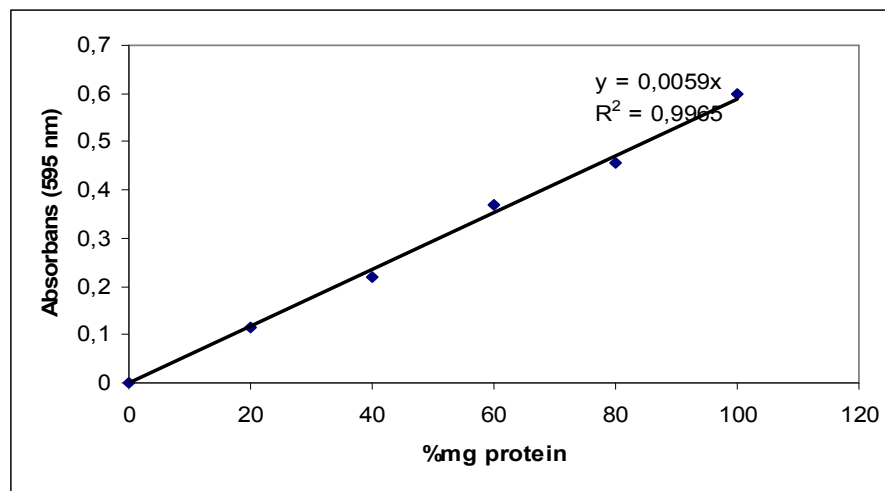
Deneyin Yapılışı

Bir eppendorf tüpüne 1000 µl Bradford ayırıcı konuldu. Üzerine 10 µl protein miktarı tayin edilecek çözeltiden eklendi. Tüp, Vorteks ile karıştırıldı. Oluşan mavi renkli çözeltinin absorbanı spektrofotometrede, 595 nm'de ayıraç körüne karşı okundu. Okunan bu absorbanı değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanması ile protein miktarı % mg olarak saptandı.

Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi

Sığır serum albuminin destile sudaki %100 mg'lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile %20 mg, %40 mg, %60 mg ve %80 mg'lık konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Bradford deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yöntemi uygulanarak serum albumini regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizilerek protein miktarları hesaplandı.

Çizilen standart eğri ve bu eğrinin regresyon denklemi aşağıda verilmiştir (Şekil 7. 1).



Şekil 7. 1 Total protein standart eğrisi

b- A_{280}/A_{260} Warburg-Christian Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar nedeniyle birçok proteinin 280 nm'deki maksimum absorpsiyon gösterme özelliğinden yararlanılarak örnekteki proteini miktarının yaklaşık olarak bulunması için kullanılan hızlı bir yöntemdir. 260 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren nükleik asitlerin 280 nm'de de absorpsiyon yetenekleri olduğundan nükleik asit artıkları ile kontamine durumdaki ilk kaba ekstratlar ile çalışıldığında hatalı sonuçlar elde edilebilir. Bunun önüne geçmek için Warburg ve Christian tarafından geliştirilmiş bir seri hata düzeltme faktörü kullanılır. Protein çözeltisinin saflık derecesi yükseldikçe hatalar da en aza indirildiğinden, bu yöntem daha çok yarı saf ve saf protein çözeltilerine uygulanır.

Deneyin Yapılışı

Kolondan elde edilen eluatların 280 ve 260 nm'deki absorbanları elue edildikleri tamponlara karşı spektrofotometrede okundu. A_{280}/A_{260} oranı hesaplandı ve bu değere uyan faktör çizelgeden bulundu. Çözeltinin içeriği protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı(* 1cm'lik ışık yolu).

$$\text{Protein mg/ml} = \text{Faktör} \times A_{280} \quad (7.1)$$

Çizelge 7. 2 A_{280}/A_{260} Warburg-Christian yöntemi ile protein miktar tayininde kullanılan faktör çizelgesi

A_{280} / A_{260}	% Nükleik Asit	Faktör*
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814

Çizelge 7. 2 A_{280}/A_{260} Warburg-Christian yöntemi ile protein miktar tayininde kullanılan faktör çizelgesi (devamı)

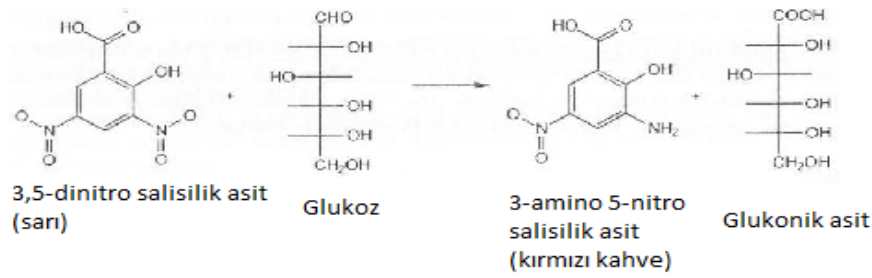
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
1,36	1,00	0,994
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

7.2.2 Pullulanaz Spesifik Aktivitesinin Ölçülmesi

Çalışmamızda *H. jecorina* QM9414 pullulanaz aktivitesi, indirgen şeker yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı [98]. Küfün optimizasyonu sırasında substrat olarak olarak 0,1 M sodyum asetat tamponunda (pH=6,5) çözölmüş %1 (w/v) pullulan kullanıldı.

Pullulanaz Aktivite Tayininde Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması

Pullulanaz aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemine göre ölçöldü [96]. Yöntem için kullanılan belirteç 3,5-dinitrosalisilik asit, sodyum-potasyum tartarat (Rochelle Tuzu), fenol ve sodyum hidroksitten oluşur. Rochelle tuzu belirteci çözönmüş oksijenden korumak için, fenol renk miktarını arttırmak için kullanılır. DNS indirgenirken şekerin yükseltgenmesi için ortamın bazik olması gerektiğinden NaOH kullanılır.



Şekil 7. 2 Ortamda serbest kalan şeker miktarının DNS yöntemi ile belirlenmesi sırasında gerçekleşen reaksiyon

Belirteç: 10 g 3,5-dinitrosalisilik asit, 10 g NaOH, 2 g Fenol ve 200 g Sodyum–potasyum tartarat 800 ml bidestile suda çözöldükten sonra 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti koyu renkli bir şişede saklanmalıdır.

0,1 M Sodyum asetat tamponu: 8,064 g sodyum asetat 980 ml destile suda çözöldü. Çözeltinin pH'sı 1N HCl ile 6,5'e ayarlandıktan sonra hacmi destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: Substrat olarak kullanmak için ağırlıkça %1 konsantrasyonda pullulan, nişasta veya amilopektinin 0,1 M sodyum asetat tamponundaki (pH=6,5) çözeltisi hazırlandı.

Pullulanaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Bir deney tüpünde 1000 µl substrat ve 1000 µl enzim çözeltisi karıştırıldı ve tüp 37°C'deki su banyosunda 30 dk. bekletildi. Sonra tüp, reaksiyonu durdurmak için 5 dk. buz banyosunda bekletildi. 3000 µl DNS belirteci eklendi ve 5 dk. kaynar su banyosunda tutuldu. Daha sonra tüpe 15 ml destile su eklendi ve karıştırıldı.

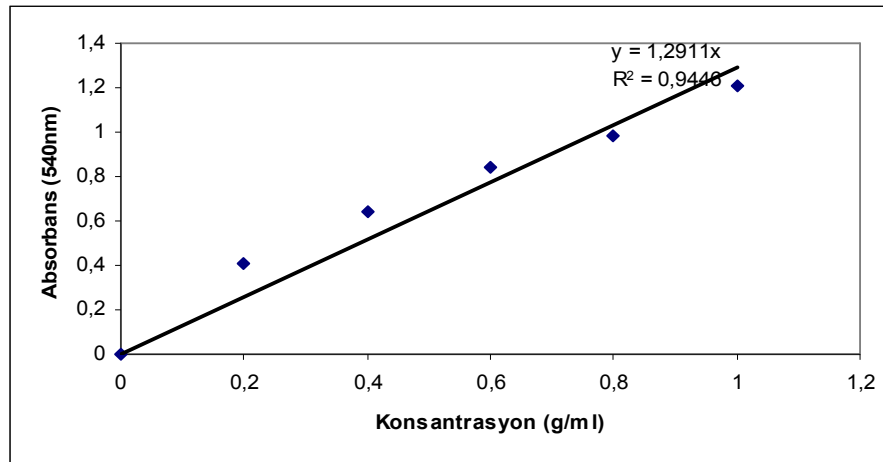
Aynı anda başka bir deney tüpüne substrat ve enzim çözeltilerinin yerine 2000 µl sodyum asetat tamponu (0,1 M, pH=6,5) konularak yukarıdaki deney aynen gerçekleştirilerek kör hazırlandı.

Pullulanazın substrat üzerine etkisi ile açığa çıkan glukoz yükseltgenirken 3,5 dinitro salisilik asidin indirgenmesi ile sarıdan kırmızı-kahverengiye dönüşen renk 540 nm dalga boyunda köre karşı ölçüldü.

Standart Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

0,1 M sodyum asetat tamponu (pH=6,5) içinde %1'lik glukoz çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,2-1,0 mg/ml konsantrasyonlarında seyreltik glukoz standartları hazırlandı. Enzim çözeltisi yerine bu seyreltik glukoz çözeltileri kullanılarak DNS metodu ile 540 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Her bir konsantrasyon için denemeler 10 kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanması ile glukozun regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizildi.

Çizilen standart eğri ve bu eğrinin regresyon denklemi aşağıda verilmiştir (Şekil 7. 3).



Şekil 7. 3 Glukoz standart eğrisi

7.2.3 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

1 ünite pullulanaz aktivitesi (U); standart koşullar altında bir dakikada substrattan 1 µmol glukoz oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

a- Protein Miktarının Hesaplanması

Total protein standart eğrisi denklemi kullanılarak bulunan %mg protein miktarları 100'e bölünerek ml'deki protein miktarı hesaplandı.

b- Total Ünitenin Hesaplanması

Standart glukoz eğrisi kullanılarak bulunan indirgen şeker miktarı aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite (U/ml) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/ml)} = [(\text{mg indirgen şeker} / \text{ml} \times 1000) / (t \times M_G)] \quad (7.2)$$

mg indirgen şeker / ml : örneğin absorbansına karşılık gelen indirgen şeker miktarı

t : inkübasyon zamanı (30 dk)

M_G : serbest bırakılan indirgen şekerin (glukoz) molekül
ağırlığı (180 g/mol)

c- Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünitenin ml'deki protein miktarına bölünmesi ile spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

BÖLÜM 8

DENEYSEL ÇALIŞMA

8.1 *Hypocrea jecorina* QM 9414 Hücrelerinin Geliştirilmesi

a- Katı Besiyerinin Bileşimi

H. jecorina QM9414 suşlarının büyüme ortamı için MM-2 katı besi yeri ortamı kullanıldı [97]. Bu besiyerinin bileşimi: 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g KH_2PO_4 , 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ve 20 g agar-agar 800 ml bidestile suda çözüldükten sonra pH'sı 2 olan eser element çözeltisinden 20 ml eklenerek bidestile su ile hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

Eser element çözeltisinin bileşimi: 250 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 70 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 800 ml bidestile suda çözüldü ve 2N H_2SO_4 ile pH=2 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan katı besi ortamı 20 dakika 121°C'de steril edildi. Daha sonra steril petri kaplarının 2/3'sini kaplayacak şekilde petrilere döküldü ve soğumaya bırakıldı.

b- Sıvı Besiyerinin Bileşimi

Katı besiyerinde büyüyen *H. jecorina* QM9414 suşlarının misel oluşturmaları için aşılandığı sıvı besiyerinin bileşimi: 10 g kazein pepton, 10 g et ekstraktı, 5 g maya ekstraktı, 20 g glukoz, 1 g Tween 80, 2 g K_2HPO_4 , 5 g sodyum asetat, 2 g amonyum sitrat, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 800 ml bidestile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 1 N NaOH ile 6,5'e ayarlandıktan sonra destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 500

ml'lik geniş boyunlu erlenlere 100'er ml olacak şekilde sıvı besiyeri paylaştırıldı. Erlenlerin ağızları gazlı bez ile kapatılarak 20 dk. 121°C'de otoklavda steril edildi

c- Pullulanaz İndüksiyonu İçin Kullanılan Besiyerinin Bileşimi

Sıvı besiyerinde yetiştirilen *H. jecorina* QM9414 misellerinin pullulanaz indüksiyonu için alındığı enzim üretim ortamının bileşimi: 10 g kazein pepton, 10 g et ekstraktı, 5 g maya ekstraktı, 20 g glukoz, 1 g Tween 80, 2 g K₂HPO₄, 5 g sodyum asetat, 2 g amonyum sitrat, 0,2 g MgSO₄.7H₂O ve 0,05 g MnSO₄.H₂O 800 ml bidestile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 1 N NaOH ile 6,5'e ayarlandıktan sonra destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 500 ml'lik geniş boyunlu erlenlere 100'er ml olacak şekilde sıvı besiyeri paylaştırıldı. Karbon kaynağı olarak glukoz yerine ağırlıkça % 0,1, 0,5 ve 1,0 konsantrasyonda pullulan, amilopektin veya nişasta ile desteklendi. Erlenlerin ağızları gazlı bez ile kapatılarak 20 dk. boyunca 121°C'de otoklavda steril edildi.

d- Sterilizasyon

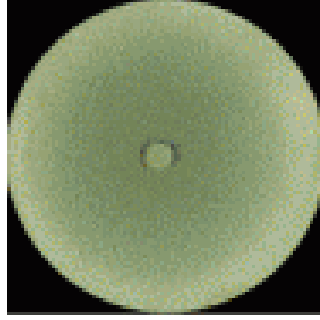
Hazırlanan katı ve sıvı besiyeri çözeltileri, yıkama ve spor çözeltisi hazırlamak için kullanılan destile sular 20 dk. 121°C'de otoklavda steril edildi. Kullanılan bütün cam ve metal malzemeler, mikro pipet uçları, eppendorflar 120°C'deki etüvde 24 saat tutularak steril edildi. Çalışmanın yapıldığı tezgah %70'lik etil alkol ile silindikten sonra bütün çalışmalar bek alevi yanında gerçekleştirildi.

e- *Hypocrea jecorina* Kültürünün Yenilenmesi

Küf kültürleri, petri kutularında +4°C sıcaklıkta saklandı. Kültürler, her ay taze katı besiyerine aşılama yapmak suretiyle yenilendi.

f- Katı Besiyerine *Hypocrea jecorina* Kültürün Ekilmesi

Hazırlanan katı besiyerine saf kültürden ekim yapıldı. Bunun için saf kültürden alınan küçük miktarlar petrideki katı besi ortamının ortasına bırakıldı ve 30°C'de, 5-7 gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, besi yeri yüzeyi tamamen sporlarla kaplandı. Saf kültürden bu yol ile çoğaltılan mikroorganizma, spor çözeltisi hazırlamak ve enzim üretim ortamına aşılama amacıyla kullanıldı.



Şekil 8. 1 Katı besiyerinde büyütülmüş *Hypocrea jecorina* kültürü

g- Spor Çözeltisinin Hazırlanması ve Sıvı Besiyerine Kültürün Aşılması

Katı besiyerinde büyütülen kültürün üzerine 5 ml steril destile su eklendi ve petrinin yüzeyindeki bütün sporlar dikkatli bir şekilde çözeltiye alındı. Bu şekilde mililitrede 5×10^8 spor içeren süspansiyon hazırlandı.

Daha önce hazırlanan steril sıvı besiyerlerine %1 (v/v) olacak şekilde spor çözeltisi aşılandı. Erlenler, 30°C sıcaklıkta, 160 rpm'de 48 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde bekletildi.

h- Yer Değiştirme Yöntemi İle Misellerin Enzim Üretim Ortamına Alınması

48 saat sonunda sıvı besiyerinde misel oluşumunu tamamlamış olan *H. jecorina* miselleri steril süzgeç kağıdından (Whatman no:1) vakum altında süzüldü. Miseller iki kez steril destile su ile yıkandıktan sonra steril spatül yardımıyla enzim üretim ortamına alındı. Erlenler, 30°C sıcaklıkta ve 160 rpm'deki çalkalamalı inkübatöre konuldu.



Şekil 8. 2 Aşılama ve enzim üretim ortamlarına alınan *Hypocrea jecorina* misellerinin gelişme ortamı

8.2 *Hypocrea jecorina*'dan Pullulanaz İndüksiyonuna Etki Eden Optimum Koşulların Belirlenmesi

8.2.1 Pullulanaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

İnkübasyon süresinin pullulanaz indüksiyonuna etkisinin saptanması için yer değiştirme yapılarak enzim üretim ortamına alınan miseller 30°C sıcaklıkta ve 160 rpm'deki çalkalamalı inkübatörde 120 saat inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte örnek alınarak pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

8.2.2 Karbon Kaynağının Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi

Kullanılan karbon kaynağının ve konsantrasyonunun enzim indüksiyonuna etkisinin saptanması için karbon kaynağı olarak amilopektin, pullulan veya nişasta ağırlıkça %0,1-0,5 ve 1,0 konsantrasyonda olacak şekilde enzim üretim ortamına eklendi. %2 glukoz ile desteklenmiş sıvı besiyerinde 48 saat yetiştirilmiş miseller üstte belirtildiği şekilde hazırlanmış olan ve glukoz içermeyen enzim üretim ortamına alınarak 30°C sıcaklıkta ve 160 rpm'deki soğutmalı-çalkalamalı inkübatörde 120 saat inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte örnek alınarak pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

8.2.3 Ortamın pH'sının Üremeye Etkisi

İnkübasyon ortamının pH'sının *H. jecorina*'dan pullulanaz üretimine etkisini incelemek için %2 glukoz ile desteklenen sıvı besiyerinin ve %0,5 amilopektin ile desteklenen enzim üretim ortamının pH'ları 4,5 – 7,5 arasında değişen değerlere ayarlandı. 24 saatin sonunda her bir ortamdan örnek alınarak pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

8.2.4 Sıcaklığın Üremeye Etkisi

Sıcaklığı 20-40°C arasında değişen sıvı besiyerinde yetiştirilen *H. jecorina* miselleri yer değiştirme yapılarak ağırlıkça %0,5 amilopektin içeren enzim üretim ortamına transfer edildi. Erlenler 20-40°C arasında değişen sıcaklıklardaki inkübatöre konuldu. 24 saatin

sonunda her bir ortamdan örnek alınarak pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

8.3 Pullulanazın Saflaştırılması

8.3.1 *Hypocrea jecorina*'dan Ekstrasellüler Pullulanazın Elde Edilmesi

H. jecorina, ağırlıkça %2 glukoz ile desteklenen, pH'sı 6,5 olan sıvı besiyerinde 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan miseller ağırlıkça %0,5 amilopektin içeren ve pH'sı 6,5 olan enzim üretim ortamına alındı. 30°C'de ve 160 rpm'deki inkübatörde 24 saat boyunca enzim üretim ortamında inkübe edilen *H. jecorina* misellerinin +4°C'de vakum altında süzülmesi ile kültür sıvısı elde edildi. Bu kültür sıvısında pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

a- Kültür Sıvısında Pullulanazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

H. jecorina pullulanazını çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 25 ml'lik 10 adet behere, 5'er ml kültür sıvısı konuldu. Birinci behere ortamdaki konsantrasyonu %10 olacak şekilde toz amonyum sülfattan yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Her beherde konsantrasyonu %10 arttırılarak, %90'a kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek karıştırıldı. Kültür sıvıları içindeki amonyum sülfat tamamen çözündükten sonra 30 dakika daha karıştırıldı ve ağzıları kapatılarak soğuk dolapta bir gece bekletildi. Ertesi gün, her beherdeki kültür sıvısı 0°C'de 15000 rpm'de 30'ar dakika santrifüj edildi. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi için çökeltideki protein miktarları belirlendi. Elde edilen sonuçlardan en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu saptandı.

b- Kültür Sıvısında Pullulanazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

H. jecorina pullulanazını çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu saptandıktan sonra kültür sıvısına ortamdaki konsantrasyonu %60 olacak şekilde toz amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Soğuk dolapta manyetik karıştırıcı ile

30 dakika karıştırıldıktan sonra ağzı kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün, 0°C'de 15000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atıldı. Çökelti pH'sı 6,5 olan 0,1 M sodyum asetat tamponunda çözöldü ve hacmi ölçöldü. Bu çözeltide pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

c- Diyaliz

Költür sıvısındaki pullulanaz, %60 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktüröldü. Elde edilen çökelti, amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla diyaliz kesesine (genişliğı 25 mm, çapı 16 mm) konuldu. Soğuk dolapta 0,1 M sodyum asetat tamponu ile çözelti sık sık değıştirilerek ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çözeltide sülfat iyonu kalmayıncaya kadar diyaliz işlemine devam edildi. Tamponun son kez değıştirilmesine karar verebilmek için, diyalizde olan tampondan bir miktar alınıp üzerine %2'lik BaCl₂ çözeltisinden 1-2 damla damlatıldı ve bulanıklık görölmemesi sonucu diyaliz bitirildi [98]. Diyaliz işlemi tamamlanmış olan çözelti, diyaliz kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla 0°C'de 15000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak çözelti alındı ve **%60 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı. Pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldıktan sonra uygun hacimlere bölünerek derin dondurucuda saklandı.

8.3.2 Dietilaminoetil (DEAE) -Selöloz Kolon Kromatografisi

a- DEAE-Selölozun Hazırlanması

10 g DEAE-selöloz 100 ml 1mM pH'sı 7,6 olan sodyum fosfat tamponunda manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Çökmesi beklendi. Üstteki bulanık sıvı atıldı. Üzerine tekrar aynı miktarda tampon ilave edildi. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Ertesi gün üstteki sıvı dököldü. Tekrar 1 mM tampon konuldu ve 30 dakika karıştırıldı. Bu yöntemle şişirilmiş olan DEAE-selöloz kullanılarak saflaştırma işlemlerine devam edildi.

b- DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

8.3.2-a'da belirtilen şekilde şişirilmiş olan DEAE-selüloz, 1,75 cm çapındaki alt ucu ince cam pamuğu ile kapatılmış alt kısmı musluklu bir cam kolona kolon yüksekliği 10 cm olacak şekilde dolduruldu ve üç kolon hacmi kadar pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. Kolona %60 amonyum sülfat kesiti uygulandı. Kolona sırasıyla 500 ml 0,5 mM sodyum fosfat tamponunda çözölmüş 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM ve 100 mM NaCl gradienti uygulandı. Fraksiyonlar her tüpte eşit hacim (3 ml) olacak şekilde toplandı. Tüplerdeki çözeltilerin absoransı elue edildikleri tampona karşı spektrofotometrede 280 nm'de okunarak elüsyon grafiğı çizildi. Ayrıca elüsyonlardaki pullulanaz aktivitesi tayin edilerek total ünite değeri aynı grafikte gösterildi. Enzimatik aktivite gösteren tüplerdeki çözeltiler bir araya toplandı ve bu çözeltilerin pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı. Çözelti uygun hacimlere bölünerek daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

8.3.3 Sefadeks G-100 Kolon Kromatografisi

a- Sefadeks G-100'ün Hazırlanması

2 g Sefadeks G-100 500 ml'lik bir beherin içine konuldu. Üzerine 100 ml destile su eklendi. Bir gece boyunca + 4°C'de şişmesi için bekletildi.

b- Sefadeks G-100 Kolon Kromatografisi

9.3.3-a'da anlatıldığı şekilde şişirilmiş olan Sefadeks G-100 manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, 1,75 cm çapındaki alt ucu ince cam pamuğu ile kapatılmış alt kısmı musluklu bir cam kolona kolon yüksekliği 12 cm olacak şekilde dolduruldu ve üç kolon hacmi kadar (75 ml) pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. DEAE-selüloz kolondan alınan ve 280 nm'de yüksek absoransı veren eluatların birleştirilmesi ile Fraksiyon I elde edildi. Elde edilen bu fraksiyona 1 mM NaCl gradiyenti uygulandı. Kolondan gelen fraksiyonlar her tüpe eşit hacim (2,5 ml) olacak şekilde toplandı. Tüplerdeki çözeltilerin absoransı elue edildikleri tampona karşı spektrofotometrede 280 nm'de okunarak elüsyon grafiğı çizildi. Ayrıca elüsyonlardaki pullulanaz aktivitesi tayin edilerek total ünite değeri aynı grafikte gösterildi.

8.3.4 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ve Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Enzimlerin moleküler ağırlıkları ve enzim fraksiyonuna ait aktivitenin analizi için SDS-PAGE ve PAGE sistemlerinden yararlanıldı. Ticari pullulanaz (P1067), ham örnek, %60 amonyum sülfat kesiti, DEAE-selüloz kolondan alınan FRI ve Sefadeks G-100 kolondan alınan FRII protein içerikleri aynı olacak şekilde hazırlanarak SDS-PAGE'ye tabi tutulurken Sefadeks G-100 kolondan alınan FR II, enzim fraksiyonuna ait aktivitenin belirlenmesi için PAGE'ye tabii tutuldu [99].

Kullanılan Çözeltiler

A- Akrilamid stok çözeltisi(g / 100 ml): 30 g akrilamid ve 0,78 g N,N'-metilenbisakrilamid 80 ml bidestile suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

B- Ayırma jeli tamponu (g / l): 181,5 g Tris ve 4,0 g SDS bir miktar destile suda çözüldü ve hacmi 980 ml'ye tamamlandı. Sonra 5 N HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.

C- Toplama jeli tamponu (g / l): 60,5 g Tris ve 4,0 g SDS bir miktar destile suda çözüldü ve hacmi 980 ml'ye tamamlandı. Sonra 0,1 N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.

D- Elektrod tamponu (g / l): 30 g Tris , 144 g glisin ve 10 g SDS bir miktar destile suda çözüldü ve hacmi 980 ml'ye tamamlandı. Sonra 5 N HCl ile pH'sı 8,55'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Tampon, kullanılacağı zaman on kez seyreltilerek kullanıldı.

E- Örnek tamponunu (g / 100 ml): 0,76 g Tris , 3,0 g SDS ,10 ml gliserol, 5 ml β -merkapto etanol ve 5,0 mg bromfenol mavisi bir miktar destile suda çözüldü ve hacmi 90 ml'ye tamamlandı. Sonra 5 N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Ayırma jeli tamponu, toplama jeli tamponu, elektrod tamponu ve örnek tamponu PAGE sistemi için kullanılacak ise SDS'siz olarak hazırlandı.

F- Amonyum persülfat çözeltisi (APS) (%10): 0,1g APS tartılarak 1 ml destile suda çözüldü.

Yukarıda hazırlanan stok çözeltiler kullanılarak SDS-PAGE ve PAGE sistemlerinde kullanılmak üzere ayırma jeli solüsyonu ve toplama jeli solüsyonu aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlandı.

A- Ayırma jeli solüsyonu (%12): 12,5 ml akrilamid çözeltisi, 7,5 ml ayırma jeli tamponu ve 10,5 ml bidestile su karıştırıldı. Vakum altında 5-10 dk gazı giderildi. Bu çözeltiye 18 µl N,N,N',N' tetrametil etilendiamin (TEMED) ve 300 µl APS %10 (w/v) eklendi. Bu solüsyon hemen kullanıldı.

B- Toplama jeli solüsyonu (%5): 2,25 ml akrilamid çözeltisi, 3,75 ml toplama jeli tamponu ve 9 ml bidestile su karıştırıldı. Vakum altında 5-10 dk gazı giderildi. Bu çözeltiye 30 µl TEMED ve 100 µl APS %10 (w/v) eklendi. Bu solüsyon hemen kullanıldı.

Boyama Çözeltisi

Boyama çözeltisi: 0,05 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml etanol ve 5 ml glasiyel asetik asit bir miktar destile suda çözüldükten sonra 50 ml'ye tamamlandı.

Cam plakanın arasından çıkarılan jel hazırlanan boya çözeltisinde bekletildi.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi

Boya uzaklaştırma çözeltisi: 25 ml etanol, 8 ml glasiyel asetik asit destile suda 100 ml'ye tamamlandı.

Jele bağlanan fazla boyanın uzaklaştırılması için jel, bir gece boyayı geri alma çözeltisinde bekletildi. Protein örneklerine bağlanan boya jelden çıkmadığı halde jelin diğer bölgelerindeki boya ortamdan uzaklaştırıldı ve örnekler görünür hale geldi.

8.3.4.1 PAGE

PAGE sistemi için kullanılacak jel bileşenleri (ayırma jeli tamponu, toplama jeli tamponu, elektrod tamponu ve örnek tamponu) 8.3.4 anlatıldığı gibi fakat SDS'siz olarak hazırlandı.

Jelin Hazırlanması

Cam plakalar, taraklar, mandallar ve jel dökme kabini destile su ile yıkandı, kurutuldu. Üzerlerinde leke kalmamasına dikkat edildi. Cam plakalar sandviç şeklinde birbirine birleştirilerek jel dökme kabinine takıldı ve mandallar yardımıyla sıkıştırıldı.

Cam plakaların yarısına gelecek şekilde ayırma jeli döküldü. Üzerine düzgün bir yüzey oluşturması için 500 µl n-butanol ilave edildi. Polimerizasyon için bir saat beklendi. Polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra n-butanol çözeltisi jel yüzeyinden alındı ve jel yüzeyi birkaç kez destile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kalan suyun uzaklaşması sağlandı.

Cam plakaların kalan kısmı toplama jeli ile dolduruldu. Kuyucukların açılması için tarak dikkatli bir şekilde jele takıldı. Polimerizasyon için bir saat beklendi.

Sonra dikkatlice tarak çekildi ve cam plakalar kabinden çıkarıldı. Yarısına kadar elektrod tamponu doldurulmuş tankın içerisine cam plaka yerleştirildi. Daha sonra cam plakayı içine alacak şekilde elektrod tamponu ilave edildi.

Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Polimerize olmuş jeldeki tarak, oluşan örnek yükleme gözleri yırtılmadan çıkarıldı ve örnek yükleme tamponu ile 1/3 oranında karıştırılmış FR II ve protein standardı olarak kullanılan fruktoz-6-fosfat kinaz enzimi kuyucuklara yüklendi.

Örnek yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 60 mA gerilim uygulanarak elektroforez başlatıldı. Örnekte bulunan bromfenol mavisi jelin diğer ucuna gelince elektroforez sonlandırıldı. Cam plaka tanktan çıkarıldı. FR II'yi ve protein standardını içeren jel ikiye bölünerek standardı içeren kısmı Coomassie Brilliant Blue G-250 boyar maddesini içeren boyama çözeltisinde konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün jel, boya uzaklaştırma çözeltisine konuldu.

FR II'yi içeren jel, %3 nişastalı Na-asetat tamponu (pH=5.0) içerisinde 50°C'de çalkalamalı inkübatör kullanılarak (50 dev/dak) 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lügol çözeltisi ile 5-10 dak. boyama yapıp, aktivite zonu arandı.

8.3.4.2 SDS-PAGE

Kuyucuklara Yüklenecek Örneklerin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Kolonlardan alınan FRI ve FRII eluantları için A_{280} / A_{260} oranı hesaplandı. Bulunan değere karşılık gelen faktör Warburg-Christian çizelgesinde bulundu (Çizelge 7. 2). Aşağıdaki formüle göre örnek içerisindeki protein miktarı hesaplandı. Ham örnek ve %60 amonyum sülfat kesitinin protein içerikleri Bradford yöntemi ile belirlendi.

Ticari pullulanaz ve denatüre edilmiş örneklerin 0,0367 mg protein içeren hacimleri hesaplanarak eppendorf tüplerine pipetlendi.

Protein Standardının Hazırlanması

Elektroforez işlemi sonunda moleküler ağırlıkları doğru saptamak için kuyulardan birine içeriği ve moleküler ağırlığı bilinen protein standardı (High range-Sigma S 8320) pipetlendi. Protein standartının içeriği gliseraldehid-3-P-dehidrojenaz (36 kDa), ovalbumin (45 kDa), glutamik dehidrojenaz (55 kDa), albumin (66 kDa), fosforilaz B (97,4 kDa), β -galaktozidaz (116 kDa) ve miyozin (200 kDa) şeklindedir.

Marker 100 μ l SDS-örnek tamponunda çözüldükten sonra -20°C'de saklanmalıdır.

3 μ l marker, 17 μ l SDS-örnek tamponunda seyreltilerek elektroforez jeline uygulandı.

Örneklerin Denatürasyonu ve Yüklenmesi

Örneklere 20 μ l %40'lık TCA eklendi. 30 dk. buz banyosunda bekletildi. 13000 rpm'de +4°C'de 20 dk. santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti birkaç damla %70'lik etanol ile yıkanarak kurutuldu. 40 μ l SDS-örnek tamponu eklendi. Çökelti tampona alındı. 5 dk. kaynayan su banyosunda tutuldu.

Jel üzerindeki kuyulara örneklerden 10'ar μ l, markerdan 3 μ l bırakıldı. Her örnek ilavesinden sonra pipet elektrod tamponu ile yıkandı.

Örnek yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 60 mA gerilim uygulanarak elektroforez başlatıldı. Örnekte bulunan bromfenol mavisini jelin diğer ucuna gelince elektroforez sonlandırıldı. Cam plaka tanktan çıkarıldı.

8.3.5 İnce Tabaka Kromatografisi ile Nişastanın Hidroliz Ürünlerinin Belirlenmesi

Sefadeks G-100 kolonundan alınan eluatın (FR II) son ürününün ne olduğunu belirlemek için İTK yapıldı. Bunun için cam tüplere FR II'den 40 µl pipetlendi, üzerine aynı miktarda Na-asetat tamponunda (pH 5.0, 0.1 M) çözünmüş nişasta çözeltisi (%1 w/v) eklendi. 30 dk 37°C'de inkübe edildi.

Glukoz, galaktoz, laktoz, maltoz, maltotrioz, maltotetroz ve maltopentoz standartlarının destile su ile %1'lik çözeltileri hazırlandı. 10x12 cm ebatındaki İTK tabakası kurşun kalemle altından 1 cm üstünden 0.5 cm olacak şekilde çizildi. Örnekler ve standartlar İTK tabakasının alt ucuna 4 µl hacimlerde uygulandı. Tabaka, içinde (5:3:2) oranında butanol:etanol:su karışımından oluşan mobil fazın bulunduğu tanka yerleştirildi. Yürüme bittikten sonra tabaka kuruması için bir gece oda ısısında bekletildi.

Spotların Boyanması

İTK sonucu oluşan spotlar anilin-fosforik asit ayırıcı ile boyanarak belirlendi. Ayıraç şu şekilde hazırlandı:

Çözelti A: 15 ml anilin n-butanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

Çözelti B: 30 ml o-fosforik asit n-butanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

Bir beherin içine 20 ml çözelti A ile 50 ml çözelti B konuldu. Oluşan çökelti çözünene kadar iyice karıştırıldı, çözünmeyen kısım süzülerek uzaklaştırıldı. Ayıraç sprej kutusuna konularak İTK tabakasında hiç boyanmamış yer kalmayana kadar püskürtüldü. Tabaka 125°C'deki etüvde 10-15 dk ısıtıldı.

8.3.6 *Hypocrea jecorina*'dan Elde Edilen Pullulanazın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

H. jecorina'dan elde edilen pullulanazın kinetik özelliklerini, sıcaklığın ve pH'nın etkisini incelemek için saflaştırılmış enzim çözeltisi kullanıldı.

8.3.6.1 Pullulanaz Aktivitesinin Değişik Substratlara Olan İlginin Belirlenmesi

0,1 M Na-asetat (pH=6,5) tamponunda %1 (w/v) konsantrasyonda amilopektin ve pullulan, 0,1 M Na-asetat (pH=5,0) tamponunda %1 (w/v) konsantrasyonda nişasta çözeltileri hazırlandı. Substrat olarak bu çözeltiler kullanılarak ayrı ayrı 37°C'de total ünite ve protein tayini yapıldı. Enzim spesifik aktivitesi hesaplandı.

8.3.6.2 *Hypocrea jecorina* pullulanazının optimum pH'sı

4-9 aralığındaki pH'larda farklı tamponlarda %1 (w/v) konsantrasyonda nişasta, amilopektin ve pullulan çözeltileri hazırlandı. pH=4-6,5 aralığında Na-asetat tamponu, pH=7'de Na-fosfat tamponu, pH=8-9 aralığında ise Tris/HCl tamponu kullanıldı.

Farklı pH'lardaki tamponlarda hazırlanan farklı substratlar kullanılarak 37°C'de total ünite ve protein tayini yapılarak enzim spesifik aktivitesi hesaplandı.

8.3.6.3 *Hypocrea jecorina* pullulanazının optimum sıcaklığı

En yüksek aktivite gösterdikleri pH değerlerindeki tamponlarda %1 (w/v) konsantrasyonda nişasta, amilopektin ve pullulan çözeltileri hazırlandı. 25°-85°C aralığındaki sıcaklıklarda substrat ve enzim çözeltisi 30 dk inkübe edildikten sonra normal aktivite deneyine devam edildi. Protein tayini ve farklı sıcaklıklarda total ünite tayini yapılarak spesifik aktivite hesaplandı.

8.3.6.4 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Aktivasyon Enerjisinin Belirlenmesi

H. jecorina pullulanazının, 25-65°C arasındaki aktivite değerlerinin logaritması ile sıcaklık 1/T (K⁻¹) arasında çizilen grafikten enzimin aktivasyon enerjisi hesaplandı.

8.3.6.5 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Termal Stabilitesi

H. jecorina pullulanazının termal stabilite özelliğini belirlemek amacıyla; enzimin 10-100°C arasında 5 dk. arayla 30 dk. süresince inkübasyonu sonrası, koruduğu enzim aktivitesi değerleri, pH=6,5 Na-asetat tamponunda çözölmüş, %1 (w/v) konsantrasyondaki amilopektin substrat olarak kullanılarak ölçüldü.

Her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü. Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi.

8.3.6.6 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Amilopektin, nişasta ve pullulan substratlarının 0,1 M Na-asetat tamponunda % 0,5-1,0-1,5-2,0-2,5 (w/v) konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı. Substrat olarak bu çözeltiler kullanılarak total ünite tayini yapıldı. Lineweaver–Burk doğru denkleminde ve grafikten bu substratlar için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

8.3.6.7 Çeşitli İyon ve Bileşiklerin *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Etkileri

Çalışmamızda yüzey aktif maddelerin, organik ve anorganik bileşiklerin *H. jecorina* pullulanaz aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

Organik bileşiklerin *H. jecorina* pullulanazının aktivitesine etkisini incelemek için 20 mM'lık etilen-diamintetraasetikasit (EDTA), 2-iyodoasetamid, üre, (1,4)-ditiyoeritrol, β -merkaptotanol, gliserol, formaldehit, üre ve %1'lik sığır serum albümini (BSA) gibi organik bileşiklerin sudaki çözeltileri hazırlandı.

+1, +2 ve +3 değerlikli bazı anorganik bileşiklerin *H. jecorina* pullulanaz aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Bu nedenle +1 değerlikli NaCl, KI ve gümüş nitratın 20 mM'lık; +2 değerlikli $FeCl_2$, $CaCl_2$, $CuSO_4$, $MgCl_2$, $LiSO_4$, , $NiCl_2$, $CoCl_2$, kurşun asetat'ın 20 mM'lık; +3 değerlikli $FeCl_3$ 'ün 20 mM'lık çözeltileri hazırlandı.

Yüzey aktif maddelerin *H. jecorina* pullulanaz aktivitesi üzerine etkilerini incelemek için Tween-80 ve Triton X-100 gibi deterjanların sudaki %1'lik çözeltileri hazırlandı.

Bu bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini tayin etmek için 200 μ l bileşiklerin sulu çözeltilerinden alındı. Üzerine 800 μ l enzim çözeltisi ve 1000 μ l substrat eklendi. Tüp 37°C'deki su banyosunda 30 dk. bekletildi. Sonra tüp, reaksiyonu durdurmak için 5 dk. buz banyosunda bekletildi. 3000 μ l DNS belirteci eklendi ve 5 dk. kaynar su

banyosunda tutuldu. Daha sonra tüpe 15 ml destile su eklendi ve karıştırıldı. 540 nm’de köre karşı absorbansı ölçüldü.

Amilopektin ile elde edilen sonuçlar (kontrol) 100 kabul edilerek her bir bileşik için % aktivite değeri hesaplandı.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

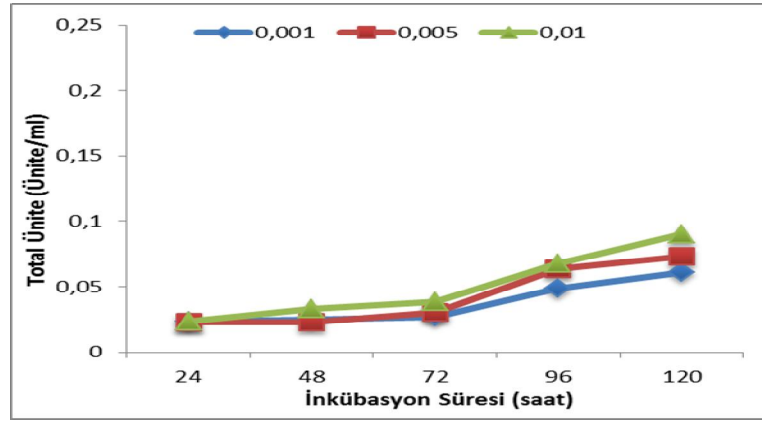
9.1 *Hypocrea jecorina*'da Pullulanaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşullar

9.1.1 İnkübasyon Süresinin ve Karbon Kaynağının *Hypocrea jecorina*'da Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi

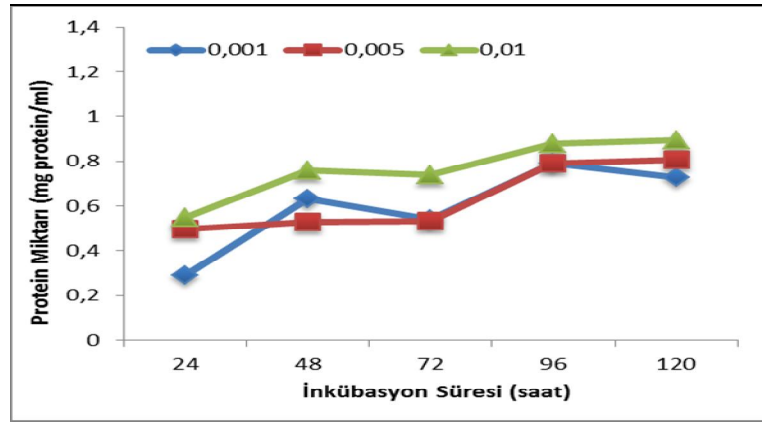
H. jecorina'dan pullulanaz üretimine, inkübasyon süresinin ve karbon kaynağının etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda enzim üretim ortamında karbon kaynağı olarak ağırlıkça % 0,1-0,5 ve 1,0 konsantrasyonlarda pullulan, amilopektin veya nişasta kullanıldı.

a- Pullulanın Enzim Üretimine Etkisi

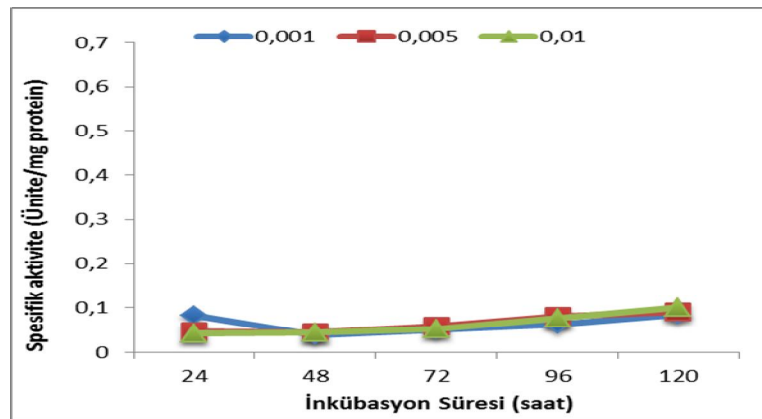
% 2 glukoz ile desteklenmiş ortamda 48 saat süresince kültive edilen *H. jecorina* bu sürenin sonunda % 0,1; 0,5 ve 1,0 konsantrasyonda pullulan ile desteklenen enzim üretim ortamında 120 saat süresince inkübe edildi. Her 24 saat sonunda alınan örneklerde total ünite ve protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (Şekil 9. 1, Şekil 9. 2 ve Şekil 9. 3) hesaplandı. % 1 pullulan ile desteklenen enzim üretim ortamındaki misellerin 120 saat sonunda en yüksek pullulanaz spesifik aktivitesine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 9. 1 Pullulan içeren ortamda pullulanaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi



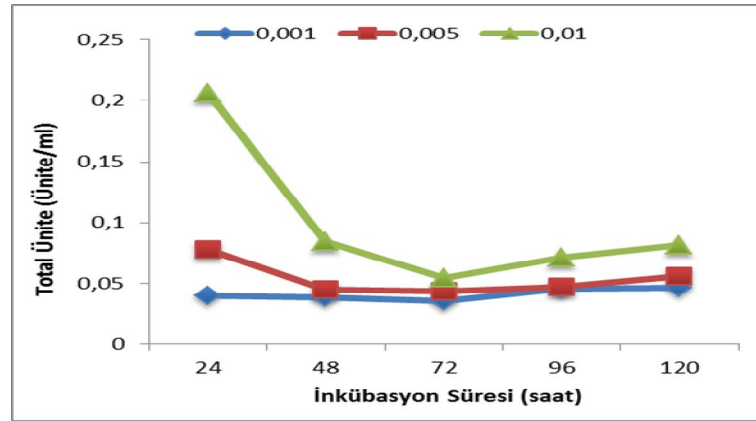
Şekil 9. 2 Pullulan içeren ortamda protein miktarının inkübasyon süresine göre değişimi



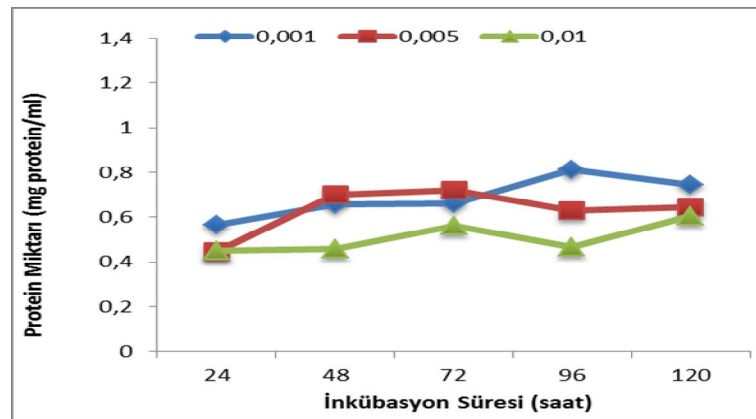
Şekil 9. 3 Pullulan içeren ortamda inkübasyon süresinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

b- Nişastanın Enzim Üretimine Etkisi

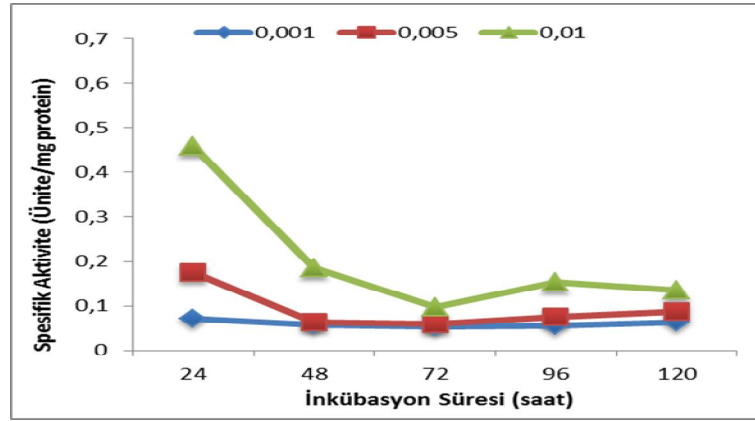
%2 glukoz ile desteklenmiş ortamda 48 saat süresince kültüre edilen *H. jecorina* bu sürenin sonunda %0,1; 0,5 ve 1,0 konsantrasyonda nişasta ile desteklenen enzim üretim ortamında 120 saat süresince inkübe edildi. Her 24 saat sonunda alınan örneklerde total ünite ve protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (Şekil 9. 4, Şekil 9. 5 ve Şekil 9. 6) hesaplandı. % 1 nişasta ile desteklenen enzim üretim ortamındaki misellerin 24 saat sonunda en yüksek enzim spesifik aktivitesine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 9. 4 Nişasta içeren ortamda pullulanaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi



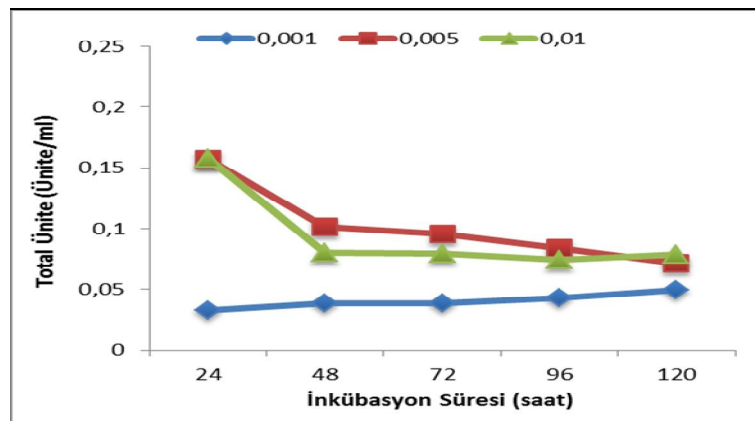
Şekil 9. 5 Nişasta içeren ortamda protein miktarının inkübasyon süresine göre değişimi



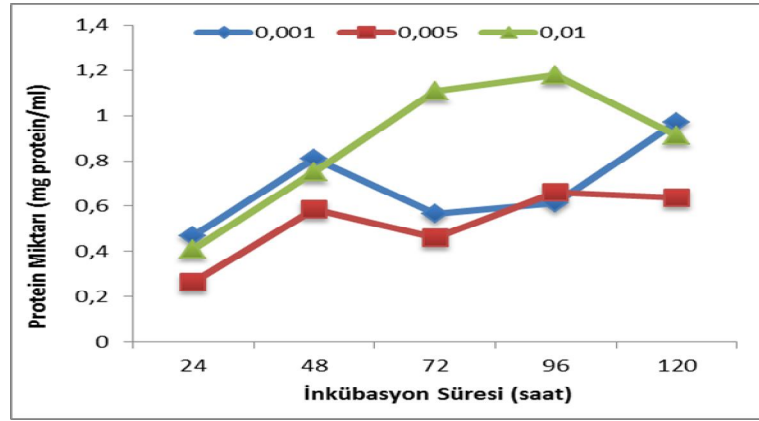
Şekil 9. 6 Nişasta içeren ortamda inkübasyon süresinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

c- Amilopektinin Enzim Üretimine Etkisi

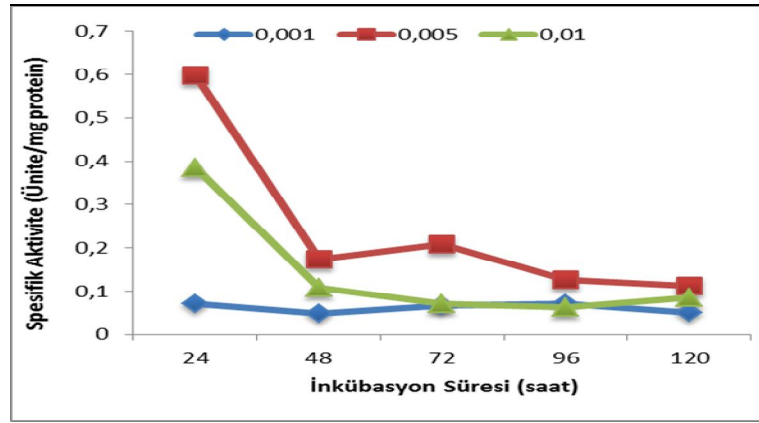
%2 glukoz ile desteklenmiş ortamda 48 saat süresince kültüre edilen *H. jecorina* bu sürenin sonunda %0,1; 0,5 ve 1,0 konsantrasyonda amilopektin ile desteklenen enzim üretim ortamında 120 saat süresince inkübe edildi. Her 24 saat sonunda alınan örneklerde total ünite ve protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (Şekil 9. 7, Şekil 9. 8 ve Şekil 9. 9) hesaplandı. % 0,5 amilopektin ile desteklenen enzim üretim ortamındaki misellerin 24 saat sonunda en yüksek enzim spesifik aktivitesine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 9. 7 Amilopektin içeren ortamda pullulanaz aktivitesinin inkübasyon süresine göre değişimi



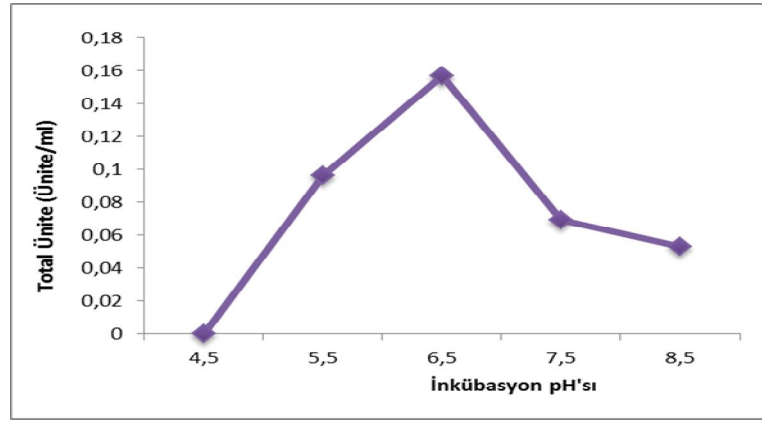
Şekil 9. 8 Amilopektin içeren ortamda protein miktarının inkübasyon süresine göre değişimi



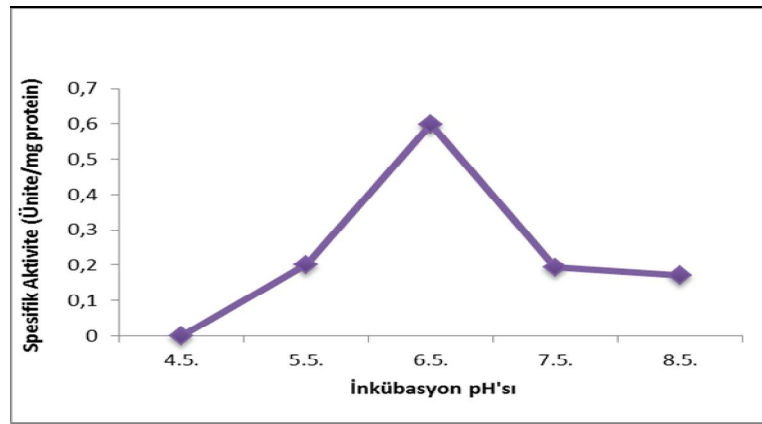
Şekil 9. 9 Amilopektin içeren ortamda inkübasyon süresinin pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

9.1.2 Kültür Ortamının pH'sının *Hypocrea jecorina*'da Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi

%2 glukoz ile desteklenen sıvı besiyerinin ve %0,5 amilopektin ile desteklenen enzim üretim ortamının başlangıç pH'ları 4,5-8,5 aralıklarına ayarlandı. Sıvı besiyerinde 48 saat büyütülen *H. jecorina* miselleri farklı pH değerlerine sahip enzim üretim ortamına alındı. İnkübasyondan 24 saat sonra alınan örneklerde total ünite ve protein miktar tayinleri yapıldı. pH'sı 6,5 olan enzim üretim ortamında en yüksek pullulanaz aktivitesi elde edilirken (Şekil 9. 10 ve Şekil 9. 11), pH=4,5'te mikroorganizmanın üremediği görüldü.



Şekil 9. 10 Kültür ortamının pH'sının *Hypocrea jecorina*'da pullulanaz indüksiyonuna etkisi

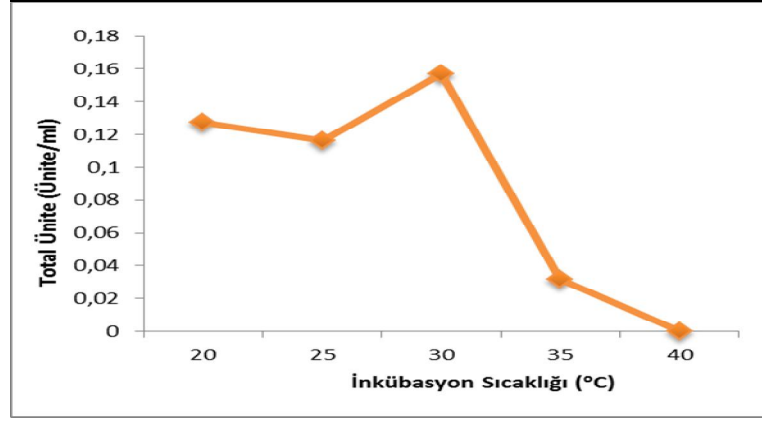


Şekil 9. 11 Kültür ortamının pH'sının *Hypocrea jecorina*'da pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

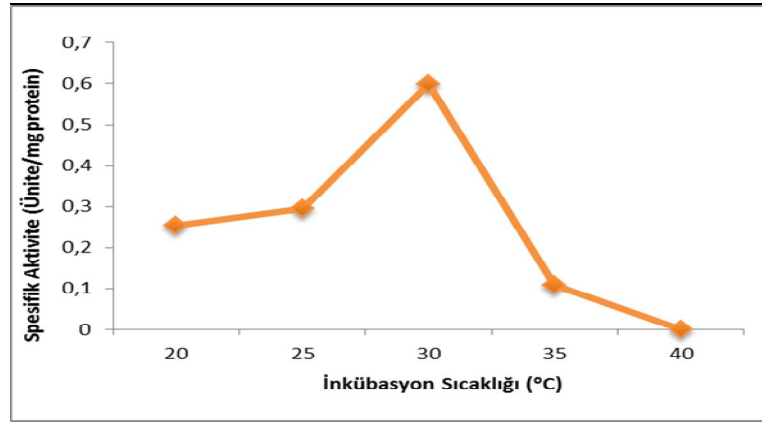
9.1.3 Kültür Ortamının Sıcaklığının *Hypocrea jecorina*'da Pullulanaz İndüksiyonuna Etkisi

İnkübasyon sıcaklığının *H. jecorina* tarafından indüklenen pullulanaz aktivitesine etkisini saptamak amacıyla hazırlanan enzim üretim ortamına sıvı besiyerinde üretilen mikroorganizma eklendi ve bu üretim ortamı 20°C - 40°C arasında değişen sıcaklıklarda, çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.

İnkübasyonun 24. saatinde alınan örneklerde yapılan total ünite ve protein ölçümleri sonunda ise 30°C sıcaklıkta pullulanaz aktivitesinin en yüksek değere ulaştığı tespit edildi. 40°C'de misel oluşumu gözlenmedi. Elde edilen sonuçlar Şekil 9. 12 ve Şekil 9. 13 'de gösterilmiştir.



Şekil 9. 12 Kültür ortamının sıcaklığının *Hypocrea jecorina*'da pullulanaz indüksiyonuna etkisi



Şekil 9. 13 Kültür ortamının sıcaklığının *Hypocrea jecorina*'da pullulanaz spesifik aktivitesine etkisi

9.2 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Saflaştırılması

9.2.1 Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu

H. jecorina kültür sıvısında pullulanazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonun; çöktürdeki protein absorbansı değerinin en fazla olduğu doygunluk derecesi olan %60 değeri olduğu belirlendi (Çizelge 9. 1).

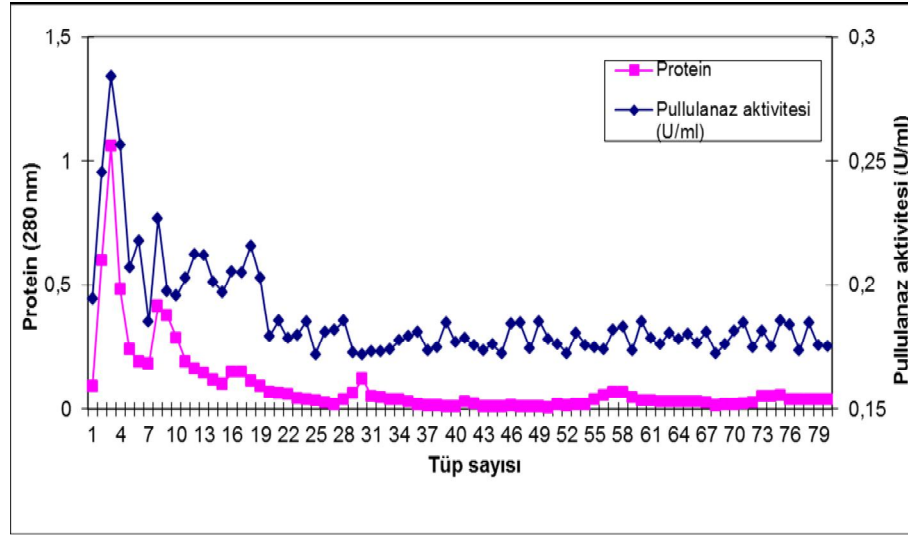
Çizelge 9. 1 %10-90 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonunda çöken proteinin absorbens değerleri

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Doygunluğu (%)	Çökeltideki Protein Absorbansı (595 nm)
10	0,062
20	0,080
30	0,124
40	0,135
50	0,200
60	0,242
70	0,180
80	0,160
90	0,062

9.2.2 DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

%60 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra dializlenen örnek dengeye getirilmiş DEAE-selüloz kolona verildi. Kolona sırasıyla 500 ml 0,5 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda çözölmüş 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM ve 100 mM NaCl gradienti uygulandı. 3 ml olacak şekilde toplanan fraksiyonların absorbensı elue edildikleri tampona karşı spektrofotometrede 280 nm'de okunarak elüsyon grafiğı çizildi. Ayrıca elüsyonlardaki pullulanaz aktivitesi tayin edilerek total ünite değerleri aynı grafikte gösterildi (Şekil 9. 14). Enzimatik aktivite gösteren 2., 3., 4., 5., 8., 9., 10.

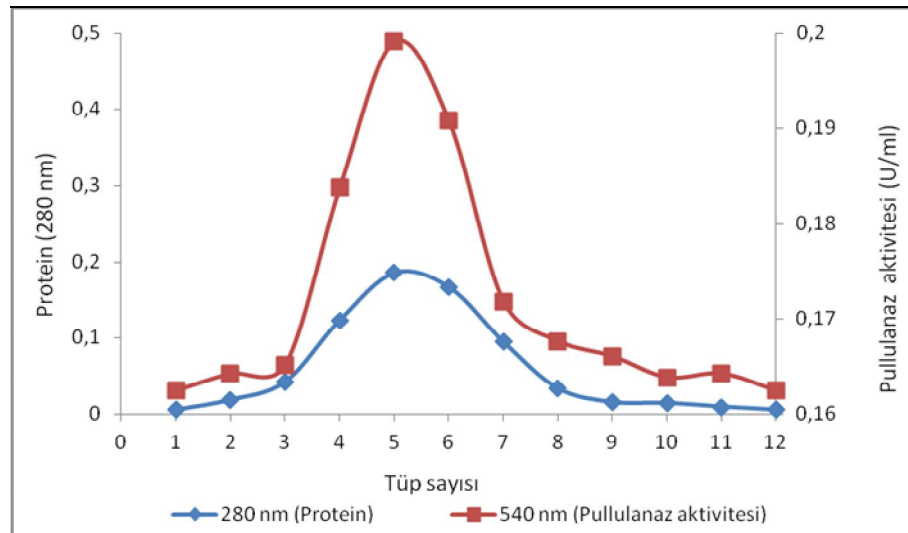
ve 11. tüplerdeki çözeltiler bir araya toplanarak fraksiyon I (FR I) elde edildi. Fraksiyon I'in pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.



Şekil 9. 14 DEAE-selüloz kolon kromatografisi grafiği

9.2.3 Sefadeks G-100 Kolon Kromatografisi

DEAE-selüloz kolonundan elde edilen fraksiyon I çözeltisine uygulanan Sefadeks G-100 kolon kromatografisi sonucunda kolondan alınan 5. eluatta en yüksek enzim aktivitesi saptandı (Şekil 9. 15).



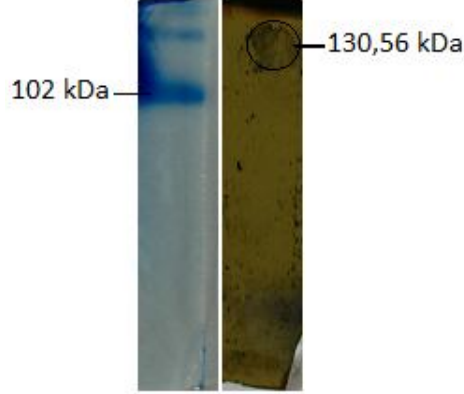
Şeki 9. 15 Sefadeks G-100 kolon kromatografi grafiği

Çizelge 9. 2 *Hypocrea jecorina*'dan pullulanazın saflaştırma evreleri

Saflaştırma Adımları	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Oranı	% Verim
Ham Ekstre	40	1,4915	59,66	0,1825	7,3023	0,1224	1	100
%60 (NH ₄) ₂ SO ₄ kesiti	10	0,9084	9,084	0,2052	2,0529	0,226	1,85	28
DEAE-Selüloz FR-I	8	0,4038	3,2304	0,2293	1,834	0,5679	4,63	25
Sefadeks G-100 FR-II	3	0,1467	0,44	0,1991	0,60	1,3572	11	8,2

9.2.4 PAGE

Pullulanazın *H. jecorina*'dan saflaştırılması sırasında elde edilen Sefadeks G100 eluatı FR II ve protein standardı olarak kullanılan fruktoz -6-fosfat kinazın (102 kDa) doğal jel elektroforezi sonucu Şekil 9.16'da görülmektedir. Şekil 9. 16'da görüldüğü gibi sefadeks G-100 eluatında tek bir aktivite bandı saptandı. Jelin aktivite boyaması sonucunda enzimin 130,56 kDa ağırlığında olduğu görüldü..



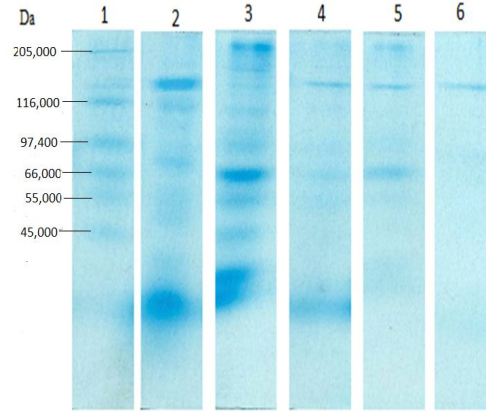
Şekil 9. 16 Pullulanazın saflaştırılması sırasında standart proteinin (fruktoz -6-fosfat kinazın) ve Sefadeks G -100 kolon eluatının (FR II) aktivite bantlarının PAGE'de gösterilmesi

9.2.5 SDS-PAGE

Pullulanazın *H. jecorina*'dan saflaştırılması sırasında elde edilen ham örnek, %60 amonyum sülfat kesiti, DEAE-selüloz ve Sefadeks G-100 çıkışlı eluatların saflığını kontrol etmek için yapılan SDS-PAGE sonuçları Şekil 9. 17'de görülmektedir. Aynı zamanda molekül ağırlığı bilinen standart protein bantları kullanılarak *H. jecorina* pullulanazının molekül ağırlığı da tayin edilmiştir. Şekil 9. 16'da görüldüğü gibi ham örnekte pek çok bant görülürken Sefadeks G-100 kolonundan çıkan eluatlarda tek bir bant görülmektedir.

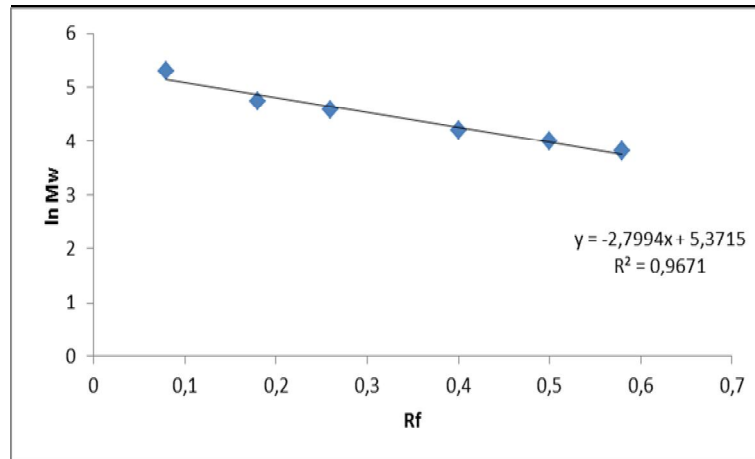
1. Protein Molekül Ağırlığı Standardı (High range-Sigma S 8320)
2. Pullulanaz (*Klebsiella pneumoniae*'den, Sigma 1067)
3. Ham örnek
4. %60 Amonyum sülfat kesiti

5. DEAE-selüloz kromatografisinden elde edilen FR-I
6. Sefadeks G-100 kromatografisinden elde edilen FR-II



Şekil 9. 17 Pullulanazın saflaştırılması aşamalarında elde edilen örneklerin SDS-PAGE elektroforezi

SDS-PAGE uygulanarak molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart proteinler ile çizilen eğriden, saflaştırılan pullulanazın molekül ağırlığının 130,56 kDa olduğu saptandı (Şekil 9. 18). Buna göre saflaştırılan enzimin monomer yapıda olduğu görüldü.

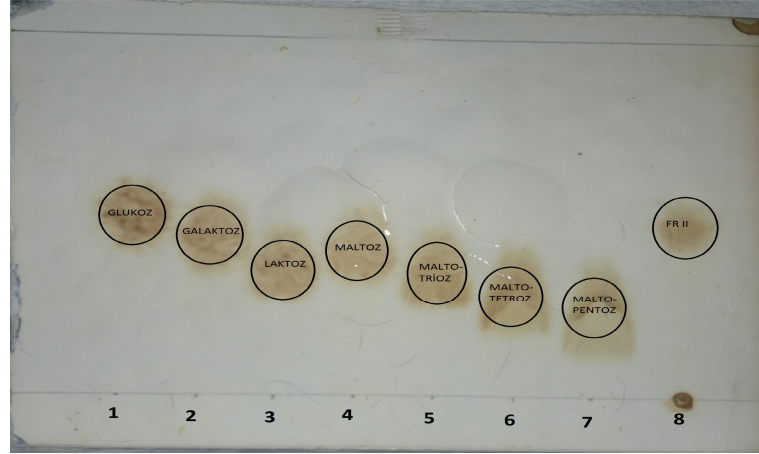


Şekil 9. 18 SDS-PAGE sonucunda molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler yardımı ile eluantın molekül ağırlığının hesaplanmasında kullanılan $\ln Mw - Rf$ grafiği

9.3 İnce Tabaka Kromatografisi ile Hidroliz Ürünlerinin Belirlenmesi

İTK plakası yüksek ısıli etüvde yakılarak spotlar görünür hale getirildi. Sefadeks G -100 kolon eluatının son ürününün glukoz olduğu görüldü (Şekil 9. 19). İTK'de görülen spotlar sırasıyla (soldan sağa) aşağıdaki maddelere karşılık gelmektedir:

1. Glukoz, 2. Galaktoz, 3. Laktoz, 4. Maltoz, 5. Maltotrioz, 6. Maltotetroz, 7. Maltopentoz, 8. Sefadeks G -100 kolon eluatı-FR II

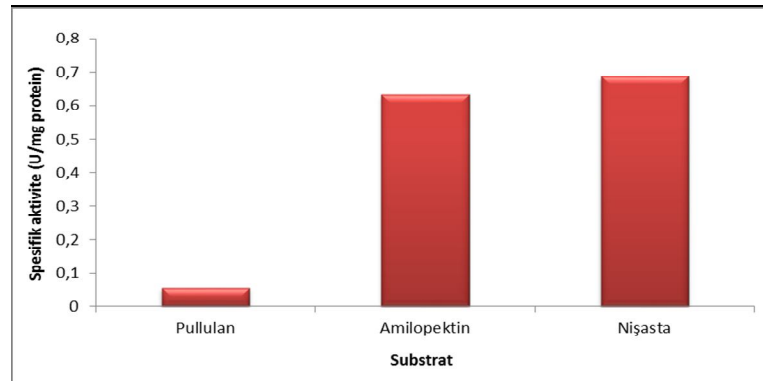


Şekil 9. 19 Şekil 9. 25 İnce tabaka kromatografisi ile hidroliz ürünlerinin belirlenmesi

9.4 *Hypocrea jecorina*'dan Elde Edilen Pullulanazın Bazı Özelliklerinin İncelenmesi

9.4.1 Substrat Spesifikliği

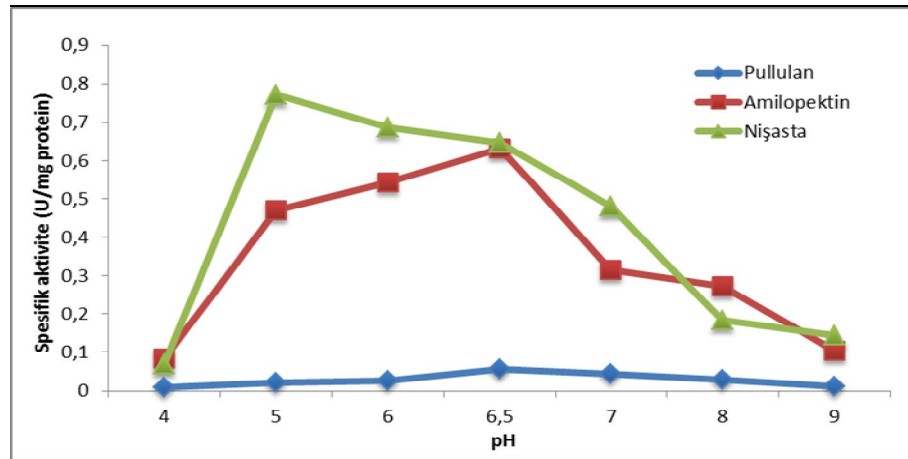
Pullulanazın değışik substratlara olan ilgisinin incelendiği çalışmanın sonunda elde edilen değerler Şekil 9. 20'de gösterildi. Bulgulara göre enzim amilopektin ve nişasta substratlarına yüksek ilgi göstermektedir.



Şekil 9. 20 Pullulanazın farklı substratlara olan ilgisi

9.4.2 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Farklı Substratlara Göre Optimum pH'sı

%1 (w/v) konsantrasyonundaki nişasta, amilopektin ve pullulanın substrat olarak optimum pH değerleri saptandı (Şekil 9. 21). Buna göre pullulan ve amilopektin için bu değer pH=6,5 iken nişasta için pH=5,0 olarak belirlendi. Nişasta ve amilopektinin asidik alanda etkin oldukları, pH bazik alana doğru kaydıkça enzimin bu substratlara karşı ilgisini azaldığı görüldü. Buna karşın enzimin pullulana olan ilgisi nötr ve bazik alanda artış gösterdi.

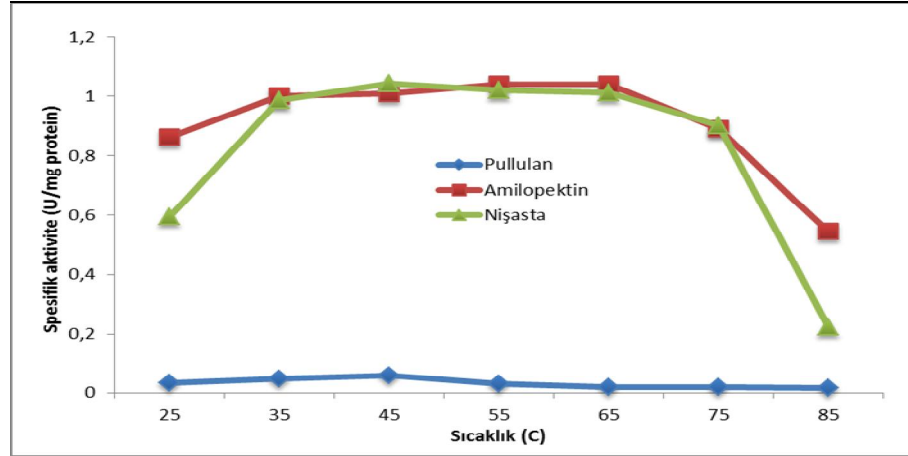


Şekil 9. 21 *Hypocrea jecorina* pullulanazının farklı substratları için optimum pH değerleri

9.4.3 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Farklı Substratlara Göre Optimum Sıcaklığı

Çalışmamızda *H. jecorina* pullulanazının geniş bir sıcaklık aralığında aktif olduğu gözlemlendi. Enzim aktivitesi için gereken optimum sıcaklık 35-65°C arasındadır. 85°C'de enzim aktivitesi azalmıştır. Bu sıcaklıkta nişasta optimum aktivitesinin %22'sini, amilopektin ise %55'ini korumuştur (Şekil 9. 22).

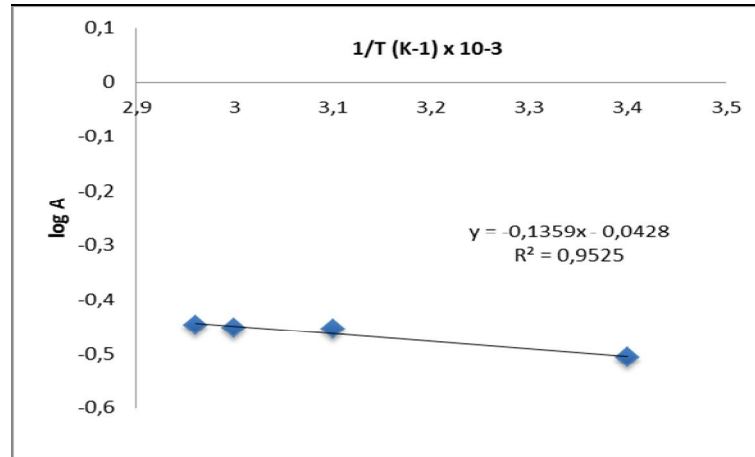
,



Şekil 9. 22 *Hypocrea jecorina* pullulanazının farklı substratları için optimum sıcaklık tayini

9.4.4 *Hypocrea jecorina*'dan Saflaştırılan Pullulanazın Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

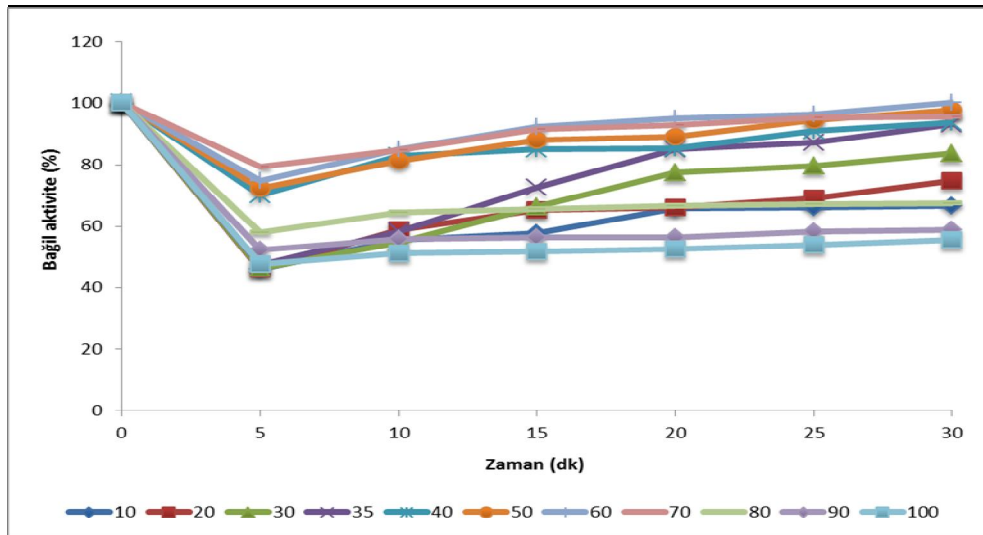
H. jecorina pullulanazının aktivasyon enerjisini hesaplamak amacıyla 25-65°C arasında ölçülen aktivite değerlerinin logaritmasına ($\log A$) karşı sıcaklık ($1/T$) değerleri arasında çizilen grafiğin doğru denkleminden enzimin aktivasyon enerjisi $0,6178 \text{ kcal.mol}^{-1}$ bulundu (Şekil 9. 23).



Şekil 9. 23 *Hypocrea jecorina* pullulanazı aktivitesinin logaritması ($\log A$) ile $1/T \text{ (K}^{-1})$ arasındaki ilişki

9.4.5 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Sıcaklık Stabilitesi

H. jecorina pullulanazının sıcaklık stabilitesi 10-100°C arasında çalışıldı ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak verildi. *H. jecorina* pullulanazı, 30 dk. süresince 40-70°C arasında sabit kaldı. Enzimin, 20°C ve 30°C sıcaklıklardaki 30 dk.'lık inkübasyonu sonucunda aktivitesinin sırasıyla %75 ve %84'ünü koruduğu gözlemlendi. Enzimin aynı inkübasyon süresinde 10°C ve 80°C'de aktivitesinin %33'ünü; 90°C ve 100°C'de ise %43'ünü kaybettiği görüldü (Şekil 9. 24). Bu sonuçlar *H. jecorina* pullulanazının nispeten termotabil bir enzim olduğunu ve yüksek sıcaklık gerektiren hidroliz işlemlerinde kullanılabileceğini gösterdi.

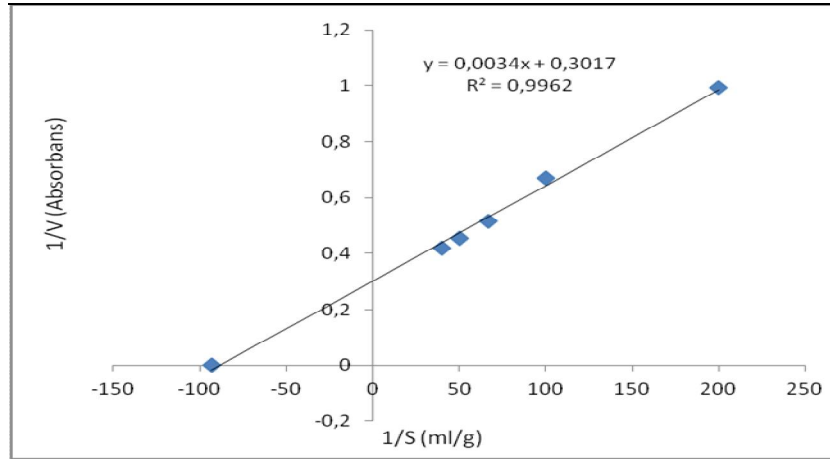


Şekil 9. 24 *Hypocrea jecorina* pullulanazının termal stabilitesi

9.4.6 Substrat Konsantrasyonunun *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Etkisi

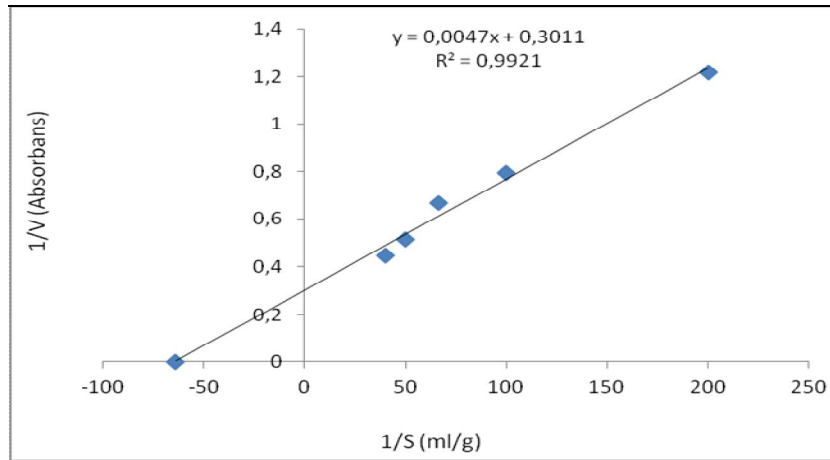
H. jecorina pullulanazının K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Substrat olarak amilopektin, nişasta ve pullulan kullanıldı.

y eksenine absorbans değerlerini x eksenine amilopektin konsantrasyonlarını yazarak Lineweaver-Burk grafiğini çizdiğimiz zaman $V_{max} = 3,3145 \Delta A/dk$, $K_m = 10,7 \text{ mg/ml}$ (0,0107 g/ml) olarak belirlendi (Şekil 9. 25).



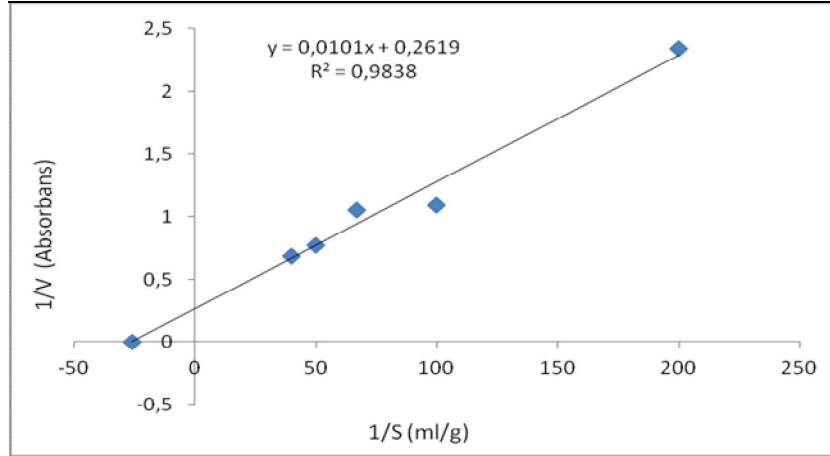
Şekil 9. 25 *Hypocrea jecorina* pullulanazının %0,5-2,5 (w/v) amilopektin konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği

y eksenine absorbans değerlerini x eksenine nişasta konsantrasyonlarını yazarak grafiği çizdiğimiz zaman $V_{\max} = 3,3211 \Delta A/dk$, $K_m = 15,5 \text{ mg/ml}$ (0,0155 g/ml) olarak belirlendi (Şekil 9. 26).



Şekil 9. 26 *Hypocrea jecorina* pullulanazının %0,5-2,5 (w/v) nişasta konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği

y eksenine absorbans değerlerini x eksenine pullulan konsantrasyonlarını yazarak grafiği çizdiğimiz zaman $V_{\max} = 3,818 \Delta A/dk$, $K_m = 38,4 \text{ mg/ml}$ (0,0384 g/ml) olarak belirlendi (Şekil 9. 27).



Şekil 9. 27 *Hypocrea jecorina* pullulanazının %0,5-2,5 (w/v) pullulan konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiği

9.4.7 *Hypocrea jecorina* Pullulanazının Aktivitesi Üzerine Çeşitli İyon ve Bileşiklerin Etkisi

Çeşitli bileşiklerin *H. jecorina* pullulanaz aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 8. 1’de verildi. Çeşitli iyonların enzim aktivitesine üzerine etkisi çalışıldı. Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının enzimi çok fazla etkilemediği görüldü. Fe^{3+} , Pb^{2+} , Ag^{1+} , Li^{2+} , Mg^{2+} , Na^{1+} , K^{1+} ve Ni^{2+} ve Co^{2+} iyonlarının ise enzim aktivitesi üzerine ılımlı bir etkiye sahip oldukları gözlemlendi. CoCl_2 ’ün % 26,90’lık aktivasyon yüzdesine sahip olduğu belirlendi. Bununla beraber Ca^{2+} iyonunu enzim aktivitesinde %2,26 oranında inhibisyona sebep oldu.

Tween 80 ve Triton X-100 gibi yüzey aktif maddelerin pullulanaz stabilitesi üzerine etkileri araştırıldı ve enzimin bu maddelerin varlığında oldukça stabil olduğu belirlendi. Tween 80 ve Triton X-100 maddelerinin aktivasyon yüzdeleri sırasıyla %1,40 ve %11,50 olarak bulundu.

Ayrıca çeşitli kimyasal ajanların etkisi de incelendi. *H. jecorina* pullulanazı aktivitesi üzerine çeşitli bileşiklerin etkisi incelendiğinde EDTA, iyodoasetamid, gliserol, ditiyoeritrol veya formaldehitin reaksiyon karışımına eklenmesinin enzimatik aktiviteyi arttırdığı görüldü. β -merkaptetanol ve ürenin enzimi inhibe ettiği bulundu.

Çizelge 9. 3 *Hypocrea jecorina* pullulanazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi

Madde	Konsantrasyon	Aktivite	Aktivasyon (%)
Kontrol		100	0
Tween 80	%1	101,40	1,40
EDTA	20 mM	101,75	1,75
FeCl ₂ .4H ₂ O	20 mM	104,29	4,29
CuSO ₄ .5H ₂ O	20 mM	104,29	4,29
FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mM	110,48	10,48
Triton X-100	%1	111,50	11,50
Kurşun asetat	20 mM	114,84	14,84
AgNO ₃	20 mM	115,40	15,40
İyodoaestamid	20 mM	120,96	20,96
LiSO ₄ .H ₂ O	20 mM	122,37	22,37
BSA	%1	122,47	22,47
Gliserol	20 mM	122,65	22,65
MgCl ₂ .6H ₂ O	20 mM	123,28	23,28
NaCl	20 mM	123,35	23,35

Çizelge 9. 3 *Hypocrea jecorina* pullulanazının aktivitesi üzerine çeşitli iyon ve bileşiklerin etkisi (devamı)

DL-Ditiyoeritrol	20 mM	123,70	23,70
KI	20 mM	123,91	23,91
NiCl ₂	20 mM	123,95	23,95
Formaldehit	20 mM	124,05	24,05
CoCl ₂ .6H ₂ O	20 mM	126,90	26,90
Madde	Konsantrasyon	Aktivite	İnhibisyon (%)
Merkaptoetanol	20 mM	98,48	1,52
CaCl ₂ .5H ₂ O	20 mM	97,74	2,26
Üre	20 mM	91,69	8,31

TARTIŞMA

Polisakkaridlerin enzimatik hidrolizi ve modifikasyonu biyoteknoloji alanında büyük bir ilgi yakalamıştır. Amilazlar, pullulanazlar, ve glukoamilazlar gibi nişasta hidrolizleyen termostabil enzimler gıda, kimya ve ilaç endüstrilerinde büyük bir öneme sahiptir. Bu doğal kaynaklı şekerlerin potansiyel kullanımı hem glukoz/fruktoz şuruplarının üretimi için hem de fermente olmayan karbonhidratların, antikanserojenik ve fırıncılıkta kullanılan antibiyotik ajanlarının sentezi için kullanışlıdır [64].

Nişastadan endüstriyel glukoz üretimi her biri nişasta üzerinde farklı etkiye sahip olan α -amilazlar, α -glukozidazlar, pullulanazlar gibi bir seri amilolitik enzimi içeren iki adımlı bir işlemdir. Birinci adım (sıvılaştırma), konsantre nişasta süspansiyonunu (%30-40'lık) farklı polimerizasyon derecelerine sahip çözünür dekstrin çözeltisine dönüştürür. İkinci adım boyunca (sakkarifikasyon) bu dekstrinler glukozla hidrolizlenir. Nişastanın enzimatik hidrolizi termofilik amilazlar kullanılarak artan sıcaklıklarda (90°-110°C) gerçekleştirilmektedir. Bu tip enzimler ya kimyasal modifikasyonlar veya mutajenez ile türetilmekte ya da doğal olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda aktif olan amilolitik enzimlerden direkt olarak nişasta işleme endüstrilerinde faydalanılmaktadır [100].

Yapılan literatür çalışmalarında pullulanazın *H. jecorina*'dan indüksiyonu, optimizasyonu ve saflaştırılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Pullulanazların çoğu bakteriyel ve arkesel kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Termostabil tip I pullulanazlar *Bacillus acidopullulolyticus*, *Bacillus flavocaldarius* KP1228, *Thermus aquaticus* YT-1, *Thermus caldophilus* GK-24, *Bacillus*

thermoleovorans gibi aerobik termofilik bakterilerden ve *Caldocellulosiruptor saccharolyticus*, *Fervidobacterium penivorans* ve *Thermotoga marinita* gibi anaerobik termofilik bakterilerden karakterize edilmiştir. *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermohydrosulfurogenes*, *Geobacillus* sp L4, *Bacillus* sp KSM-1378, *Bacillus* sp TS-23, *Bacillus circulans* F-2, *Bacillus* sp XAL601, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, *Thermoanaerobacterium thermosaccharoliticum* ve *Thermoanaerobacter* B6A gibi termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin çoğu tip II pullulanazlardır. Bu enzimler başlıca *Pyrrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis*, *Desulfurococcus mucosus*, *Thermococcus hydrothermalis*, *Pyrrococcus woessii* gibi termofilik arkealardan izole edilmiştir [10], [91]. Bu çalışma ile pullulanaz *H. jecorina*'dan ilk kez saflaştırıldı. Bu nedenle çalışmamızda pullulanaz *H. jecorina*'dan ilk kez saflaştırılmaya çalışılmıştır.

İlk olarak *H. jecorina*'nın büyümesine ve pullulanaz indüksiyonuna etki eden fiziksel koşullar incelendi. Karbon kaynağı olarak %2 glukoz içeren sıvı besiyerinde 48 saat 160 rpm hızında çalkalanarak büyütülen *H. jecorina* bu kültür ortamından alınarak, karbon kaynağı olarak glukoz yerine farklı konsantrasyonlarda pullulan, nişasta veya amilopektin polisakkaridlerini içeren enzim üretim ortamına konuldu. 24 saatlik kültür süpernatantında aktivitenin en yüksek olduğu ölçüldü. Kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak optimum inkübasyon süresi değişiklik göstermektedir. Bakteriyel pullulanazlar için Kunamneni ve Singh [6] ile Vishnu vd. [90] inkübasyonun 48., Gomes vd. [91] 16., Roy vd. [101] 20., Ramesh vd. [102] ise 24. saatindeki süpernatantta optimum aktiviteyi bulmuşlardır. Ayrıca amilopektin konsantrasyonlarının pullulanaz aktivitesinin indüksiyonu üzerine anlamlı bir etkiye sahip olduğu görüldü. Büyüme ortamının ve enzim üretim ortamının optimum pH değeri 6,5 ve optimum sıcaklığı 30°C olarak saptandı.

Enzim indüksiyonu için optimum koşullar belirlendikten sonra bu koşullarda indüklenen pullulanazı çöktürecek uygun $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunu belirlemek amacıyla %10-90 arasında değişen aralıklarda $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yapıldı ve en uygun değer %60 olduğu bulundu. Bu değerde çöktürülen ham enzim diyalizlenerek %60 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kesiti

elde edildi. Böylece kısmi olarak saflaştırılan pullulanaz elde edildi. Yapılan literatür çalışmasında amonyum sülfat çöktürmesi için en uygun doygunluk değeri %35-80 arasında bulunmuş ve bu değer genellikle %60 olarak çalışılmıştır [86], [90].

H. jecorina pullulanazının pullulan, nişasta ve amilopektin substratlarına olan ilgisi incelendi. Pullulanaz aktivitesi substrat olarak nişasta kullanıldığında 0,6879 U/mg protein olarak, amilopektin kullanıldığında ise 0,6321 U/mg protein olarak bulundu. En düşük enzim aktivitesi substrat olarak pullulan (0,0553 U/mg protein) kullanıldığı zaman elde edildi. Daha önceki çalışmalarda da pullulanazın substrat olarak guar galaktomannan, fitoglikojen, amilopektin, dekstrin gibi pullulandan başka maddeleri de substrat olarak kullandığı görülmüştür [103], [104]. *Anaerobranca gottschalkii* pullulanazının spesifik aktivitesi 0,33 U/mg protein [91], *Lactobacillus amylophilus* GV6 pullulanazının spesifik aktivitesi 0,34 U/ml.dk. [90], *Thermococcus siculi* HJ21 pullulanazının aktivitesi 11,3 U/mg protein [86] ve *Geobacillus thermoleovorans* US105 pullulanazının spesifik aktivitesi 36 U/mg protein olarak [89] bulunmuştur. Enzimin spesifik aktivitesi kullanılan enzim kaynağına göre değişiklik göstermektedir.

Pullulanazın pH aralığının 3,0-12,0 arasında değişiklik gösterdiği fakat optimum pH'sının genellikle 5,0-7,0 arasında bulunduğu çeşitli çalışmalarda görülmektedir. *Bacillus cereus* [105], *Thermoanaerobacter* suşları [106], *Bacillus acidopullulyticus* [107], *Fervidobacterium pennivorans* [108] ve *Desulfurococcus mucosus* [109], *Bacillus* sp. [6] pullulanazlarının optimum pH'ları 5,0 olarak; *Bacteroides thetaiotamicron* [110], *Lactobacillus amylophilus* GV6 [90] ve *Thermus aquaticus* [111] pullulanazlarının optimum pH'ları ise 6,5 olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda *H. jecorina* pullulanazının optimum pH'sı substrat olarak nişasta kullanıldığında 5,0; pullulan veya amilopektin kullanıldığında ise 6,5 olarak bulundu.

Pullulanazın optimum sıcaklığının 40-100°C arasında değiştiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Çalışmamızda *H. jecorina* pullulanazının 35-65°C arasında geniş bir optimum sıcaklık aralığına sahip olduğu gözlemlendi. Nişastanın sakkarifikasyonu işleminde sakkarifikasyon adımı 55-60°C aralığında gerçekleşmektedir. 60-100°C arasında aktif olan ve özellikle amilopektinin dallanma noktalarına etki eden termostabil pullulanazlar daha etkin ve daha hızlı dönüşüm reaksiyonlarına izin verdiği

için özel bir ilgiye sahip olmaktadır. Yapılan çalışmalar *Geobacillus stearothermophilus*, *Micrococcus* sp., *Geobacillus thermovoleovorans* US105, *Bacillus acidopullulyticus*, *Klebsiella aerogenes* ve *Klebsiella pneumoniae* pullulanazlarının da benzer sıcaklık aralıklarında aktif olduklarını göstermektedir [88], [112-115]. *H. jecorina* pullulanazının 85°C'de 30 dk.'lık inkübasyonu sonucunda aktivitesinin %55'ini koruduğu belirlendi. 90-100°C'de aralığında aynı inkübasyon süresinde ise aktivitesinin %43'ünü kaybettiği bulundu. Enzimler optimum sıcaklıklarına bağlı olarak mezofilik (40-60°C), termofilik (50-80°C) ve hipertermofilik (>80°C) olarak sınıflandırılabilirler. Saflaştırılan pullulanaz termofilik mikroorganizmalardan saflaştırılan pullulanazlar ile benzer etki göstermektedir. Bu optimum sıcaklık, saf enzimin potansiyel endüstriyel işlemler için uygun olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda *H. jecorina* pullulanazının kinetik değerleri amilopektin, nişasta ve pullulan için hesaplandı. Bu substratlar için K_m değerleri sırasıyla 10,7 mg/ml, 15,5 mg/ml ve 38,4 mg/ml olarak bulunurken V_{max} kinetik değerleri sırasıyla ve 3,3145 $\Delta A/dk.$, 3,3211 $\Delta A/dk.$ ve 3,818 $\Delta A/dk.$ olarak bulundu. Bu değerler aynı sırayla *Bacillus subtilis* pullulanazı için 27,609 U/dk. ve 1,284 mg/ml [116], termofilik *Bacillus* sp. AN-7 pullulanazı için 1,3 mg/ml ve 154 U/mg ve olarak bulunmuştur [6]. Singh [88], pullulanazın K_m ve V_{max} kinetik sabitlerini farklı substratlar kullanarak belirlemiştir. Buna göre sırasıyla bu değerleri pullulan için 4 mg/ml ve 0,23 U/dk., çözünür nişasta için 11,1 mg/ml ve 0,20 U/dk., dekstran için 40 mg/ml ve 1,25 U/dk. olarak hesaplamıştır.

PAGE elektroforezi sonucunda enzimin molekül ağırlığı 130,56 kDa olarak tayin edildi. Yapılan SDS-PAGE elektroforezi sonucunda ise enzimin monomer yapıda olduğu bulundu. Yapılan birçok araştırma çeşitli küf ve bakteri kaynaklarından elde edilen pullulanazların molekül ağırlıklarının 53-240 kDa arasında değiştiğini göstermiştir. Pullulanazın saflaştırılması ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda enzimin molekül ağırlığının *Geobacillus stearothermophilus*'da 53 kDa [113], *Thermus caldophilus*'da 65 kDa [117], *Bacillus acidopullulyticus*'da 97 kDa [118], *Zea mays*'da 100 kDa [119], *Bacillus* sp. [120], *Klebsiella aerogenes* ve *Klebsiella pneumoniae* [115], *Micrococcus* sp. [114], *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* [121] suşlarında 120 kDa, *Geobacillus*

thermoleovorans'da 160 kDa [89] ve *Fervidobacterium pennivorans*'da ise 240 kDa [108] olarak belirlenmiştir.

H. jecorina pullulanazının nişastayı hidrolizi ile oluşan son ürünün belirlenmesi ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Son ürün glukoz olarak belirlenmiştir. Bu sonuç daha önce yapılan çalışmalarla uygunluk göstermektedir [10, 90, 108].

Çalışmamızda *H. jecorina* pullulanazının aktivasyon enerjisi 0,6178 kal/mol olarak bulunmuştur. *Bacillus acidopullulytics* pullulanazının Arrhenius eşitliği ile hesaplanan aktivasyon enerjisi 34,29 kJ/mol olarak bulunmuştur [88].

Çeşitli bileşiklerin ve metal iyonlarının *H. jecorina* pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde Fe^{2+} , Cu^{2+} iyonlarının ve EDTA'nın enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği; Fe^{3+} , Pb^{2+} , Li^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Na^{1+} , K^{1+} , Ag^{1+} , iyonlarının ve ditiyoeritrolün ise enzim aktivitesi üzerine pozitif bir etkiye sahip oldukları gözlemlendi. Enzimin Tween 80 ve Triton X-100 gibi yüzey aktif maddelerin varlığında oldukça stabil olduğu belirlendi. Bununla beraber Ca^{2+} iyonunun, β -merkaptetanol ve üre gibi kimyasal ajanların enzim aktivitesinde önemsenmeyecek değerde inhibisyona sebep olduğu görüldü. Kobalt(II)klorürün enzim aktivitesini %26,90 arttırdığı belirlendi. *Bacillus acidopullulytics* pullulanazı aktivitesi üzerine potansiyel metal iyonlarının ve enzim inhibitörlerinin etkisi araştırılmış; Ca^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının eklenmesi enzim aktivitesini arttırmış, Cu^{+2} ve Hg^{+2} ise aktivitenin tamamen yok olmasına sebep olmuştur [88]. *Bacillus* sp. AN-7 pullulanazı, Hg^{+2} iyonları ile tamamen inhibe olmuştur. Ca^{+2} , ditiyoeritrol ve Mn^{+2} ise enzimin aktivitesini baskılamıştır [6]. NaCl veya KCl varlığı *Anaerobranca gottschalkii* pullulanazı aktivitesini etkilememiştir. Ayrıca Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , veya Fe^{2+} , gibi divalent katyonların klorürlü tuzları da aktiviteyi etkilememiştir. [91].

Sonuç olarak *H. jecorina*'dan pullulanaz ilk kez saflaştırılmıştır. Buna göre;

- Pullulanazın *H. jecorina*'dan indüklenmesi için optimum pH 6,5 ve sıcaklık 30°C olarak bulundu. En uygun karbon kaynağı ve konsantrasyonu % 0,5 amilopektin olarak belirlendi. Optimum inkübasyon süresi ise 24 saat olarak belirlendi. *H. jecorina*'dan pullulanaz 11 kez saflaştırıldı.

- *H. jecorina*'dan saflaştırılan pullulanazın moleköl ağırlığı PAGE elektroforezi sonucunda 130,56 kDa olduğu, SDS-PAGE elektroforezi sonucunda ise monomer yapıda olduğu bulundu.
- *H. jecorina* pullulanazının amilopektin ve pullulan substratlarına göre optimum pH'sı 6,5; nişasta substratına göre 5,0 olduğu bulundu.
- *H. jecorina* pullulanazının 35-65°C arasında geniş bir optimum sıcaklık aralığına sahip olduğu gözlemlendi.
- *H. jecorina* pullulanazının nişastayı hidrolizi ile oluşan son ürün İTK ile belirlendi. Hidroliz ürünün glukoz olduğu görüldü.
- *H. jecorina* pullulanazının kinetik değerleri amilopektin, nişasta ve pullulan için hesaplandı. Bu substratlar için K_m değerleri sırasıyla 10,7 mg/ml, 15,5 mg/ml ve 38,4 mg/ml olarak bulunurken maksimum reaksiyon hızı V_{max} kinetik değerleri sırasıyla ve 3,3145 ΔA/dk., 3,3211 ΔA/dk. ve 3,818 ΔA/dk. olarak bulundu.
- *H. jecorina* pullulanazının aktivasyon enerjisinin 0,6178 kal/mol olduğu belirlendi.
- *H. jecorina* pullulanazı aktivitesi üzerine bazı iyonların etkisi incelendiğinde Fe^{2+} (4.29%) ve Cu^{+2} (4.29%) iyonlarının enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği görüldü. Fe^{3+} (%10,48), Pb^{2+} (%14,84), Ag^{1+} (%15,40), Li^{2+} (%22,37), Mg^{2+} (%23,28), Na^{1+} (%23,35), K^{1+} (%23,91), Ni^{2+} (%23,95) ve Co^{2+} (%26,90) iyonlarının ise enzim aktivitesi üzerine ılımlı bir etkiye sahip oldukları gözlemlendi. Bununla beraber Ca^{2+} (%2,26) iyonunun ise enzimi inhibe ettiği belirlendi.
- Tween 80 ve Triton X-100 gibi yüzey aktif maddelerin pullulanaz stabilitesi üzerine etkileri araştırıldı. Tween 80'in %1,40 ve Triton X-100'ün %11,50 oranında enzimi aktive ettikleri bulundu.
- *H. jecorina* pullulanazı aktivitesi üzerine çeşitli bileşiklerin etkisi incelendiğinde EDTA'nın (%1,75), iyodoasetamidin (%20,96), gliserolün (%22,65), ditiyoeritrolün (%23,70) veya formaldehitin (%24,05) reaksiyon karışımına eklenmesinin enzimatik aktiviteyi arttırdığı görüldü. β-merkaptioetanolün %1,52, $CaCl_2$ 'nin %2,26, ürenin %8,31 oranında enzimi inhibe ettiği bulundu.

Elde edilen sonuçlara göre *H. jecorina*'dan indüklenen ve saflaştırılan pullulanazın termostabil bir enzim olduğunu söyleyebiliriz. *H. jecorina* pullulanazı geniş bir sıcaklık aralığında (35-60°C) aktiftir. Yüksek sıcaklıklarda (90-100 °C) aktivitesinin %43'ünü kaybetmiştir. Bu nedenle nişasta endüstrisinde yüksek sıcaklık gerektiren hidroliz işlemlerinde kullanılabileceği ve *H. jecorina*'nın bu enzim için geliştirilebilecek iyi bir indükleyici olabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., (1997). Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları, 249-305; Derleyen: Telefoncu, A., Enzimoloji, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- [2] Pazarlıoğlu, N., (1997). Enzim Üretimi ve Saflaştırılması, 139-176; Derleyen: Telefoncu, A., Enzimoloji, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- [3] Haki, G. D., Rakshit, S. K., (2003). "Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review", Biores. Technol., 89:17-34.
- [4] Kıran, Ö. E., Çömlekçiöğlu, U. ve Dostbil, N., (2006). "Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları", KSÜ, Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1):13-19.
- [5] Rao, M. B., Tanksale, A. M., Gathe, M. S. ve Deshpande, V. V., (1998). "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(3):597-635.
- [6] Kunamnenni, A. ve Singhi, S., (2006). "Improved High Thermal Stability of Pullulanase from a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus* sp. AN-7", Enzyme Microb. Technol., 39:1399-1401.
- [7] Repellin, A., Baga, M. ve Chibbar, R. N., (2008). "In vitro Pullulanase Activity of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Limit-Dextrinase Type Starch Debranching Enzyme is Modulated by Redox Conditions", J. Cereal Science, 47:302-309.
- [8] Valachova, K. ve Horvathova, V., (2008). "Starch Degradation by Glucoamylase Glm from *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 in the Presence and Absence of a Commercial Pullulanase", Chem. Biodivers., 4:874-880.
- [9] Kang, J., Park, K.M., Choi, K.H., Park, C.S., Kim, G.E., Kim, D. ve Cha, J., (2011). "Molecular Cloning and Biochemical Characterization of a Heat-Stable Type I Pullulanase from *Thermotoga neapolitana*", Enzyme Microb. Technol., 48:260-266.
- [10] Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi, M. ve Mollania, N., (2010). "Purification and Characterization of a Novel Amylopullulanase That Converts Pullulan to Glucose, Maltose, and Maltotriose and Starch to Glucose and Maltose", Enzyme Microb. Technol., 46:57-683.
- [11] Guangtao, Z., Hartl, L., Schuster, A., Polak, S., Schmoll, M., Wang, T., Seidl, V. ve Seiboth, B., (2009). "Gene Targeting in a Nonhomologous End Joining Deficient

Hypocrea jecorina", J. Biotechnol., 139(2):146-151.

- [12] Bilgehan, H., (1999). Uygulama Konuları İle Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Dokuzuncu Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir.
- [13] Bruns, T., (2006). "Evolutionary Biology: A Kingdom Revised", Nature, 443:758-61.
- [14] Bowman, S. M. ve Free, S. J., (2006). "The Structure and Synthesis of the Fungal Cell Wall", Bioassays, 28:799-808.
- [15] Arda, M., (2006). Temel Mikrobiyoloji 1, 46, Medisan, Ankara.
- [16] Hachmeister, K. A. ve Fung, D. Y., (1993). "Tempeh: a Mold-Modified Indigenous Fermented Food Made from Soybeans and/or Cereal Grains", Critical Reviews in Microbiol., 19(3):137-188.
- [17] Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F. ve Machida, M., (2006). "Impact of *Aspergillus oryzae* Genomics on Industrial Production of Metabolites", Mycopathologia, 162 (3):143-53.
- [18] Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., ve Compagno, C., (2006). "How did *Saccharomyces* Evolve to Become a Good Brewer?", Trends Genet., 22: 183-86.
- [19] Ghorai, S., Banik, S.P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S. ve Khowala, S., (2009). "Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing", Food Research International, 42:577-587.
- [20] Brakhage, A.A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H. ve Tüncher, A., (2004). "Regulation of Penicillin Biosynthesis in Filamentous Fungi", Advances in Biochemical Engineering/biotechnology, 88:45-90.
- [21] Pan, A., Lorenzotti, S. ve Zoncada, A., (2008). "Registered and Investigational Drugs for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection", Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery, 3(1):10-33.
- [22] Lopez-Gomez, J. ve Molina-Meyer, M., (2006). "The Competitive Exclusion Principle Versus Biodiversity Through Competitive Segregation and Further Adaptation to Spatial Heterogeneities", Theor. Popul. Biol., 69:94-109.
- [23] Bruns, T., (2006). "Evolutionary Biology: A Kingdom Revised", Nature, 443:758-61.
- [24] Talbot, N. J., (2003). "On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*", Annual Reviews in Microbiology, 57:177-202.
- [25] Paoletti, M., Buck, K. W. ve Brasier, C. M., (2006). "Selective Acquisition of Novel Mating Type and Vegetative Incompatibility Genes via Interspecies Gene Transfer in the Globally Invading Eukaryote *Ophiostoma novo-ulmi*", Mol. Ecol., 15:249-62.
- [26] Gryzenhout, M., Wingfield, B. D. ve Wingfield, M. J., (2006). "New Taxonomic Concepts for the Important Forest Pathogen *Cryphonectria parasitica* and Related Fungi", FEMS Microbiol. Lett., 258:161-72.

- [27] Yang, Y., Yang, E., An, Z. ve Liu, X., (2007). "Evolution of Nematode-Trapping Cells of Predatory Fungi of the Orbiliaceae Based on Evidence from rRNA-Encoding DNA and Multiprotein Sequences", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104(20):8379–84.
- [28] Paszkowski, U., (2006). "Mutualism and Parasitism: The Yin and Yang of Plant Symbioses", *Curr. Opp. Plant Biol.*, 9:364–70.
- [29] Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R. ve Breitenbach, M., (2008). "The Spectrum of Fungal Allergy", *Int. Arch.Allergy Imm.*, 145(1):58–86.
- [30] van Egmond, H. P., Schothorst, R. C. ve Jonker, M. A., (2007). "Regulations Relating to Mycotoxins in food: Perspectives in a Global and European Context", *Anal. Bioanal. Chem.*, 389:147–57.
- [31] Joseph, B., Ramteke, P. W. ve Thomas, G., (2008). "Cold Active Microbial Lipases: Some Hot Issues and Recent Developments", *Biotechnol. Advances*, 26(5):457–70.
- [32] Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. ve DiNovi, M. J., (2006). "Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms-A Review", *Regul.Toxicol.Pharm.*, 45(2):144-158.
- [33] Kumar, R., Singh, S. ve Singh, O. V., (2008). "Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35(5):377-91.
- [34] Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. ve Amorim, D. S., (2005). "Xylanases from Fungi: Properties and Industrial Applications", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67(5): 577-91.
- [35] Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T. and Kubicek, C. P., (1996). "Molecular Evidence that the Asexual Industrial Fungus *Trichoderma reesei* is a Clonal Derivative of the Ascomycete *Hypocrea jecorina*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7755–7760.
- [36] Schmoll, M., (2008). "The Information Highways of a Biotechnological Workhorse-Signal Transduction in *Hypocrea jecorina*", *BMC Genomics*, 9:438, 1-25.
- [37] Desmet, T., Cantaert, T., Guaalfetti, P., Nerinckx, W., Gross, L., Mitchinson, C. ve Piens, K., (2006). "An Investigation of the Substrate Specificity of the Xyloglucanase Cel74A from *Hypocrea jecorina*", *The FEBS Journal*, 274:356-363.
- [38] Sandgren, M., Berglund G. I., Shaw, A., Stahlberg, J., Kenne, L., Desmet, T. ve Mitchinson, C., (2004). "Crystal Complex Structures Reveal How Substrate is Bound in the - 4 to the + 2 Binding Sites of *Humicola grisea* Cel12A", *J. Mol. Biol.*, 342:1505–1517.
- [39] Noe, P., Chevalier, J., Mora, F., ve Comtat, J., (1986). "Action of Xylanases on Chemical Pulp Fibers. Part II. Enzymatic Beating", *J. Wood Chem. Technol.*, 6:167–184.
- [40] Welt, T., ve Dinus, R. J., (1995). "Enzymatic Deinking-A Review", *Prog. Pap. Recycl.* 4:36-47.

- [41] Buchert, J., Oksanen, T., Pere, J., Siika-aho, M., Suurnakki, A. ve Viikari, L., (1998). Applications of *Trichoderma reesei* Enzymes in the Pulp and Paper Industry, p. 343–357. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis, Ltd., London, United Kingdom.
- [42] Lanzarini, G. ve Pifferi, P. G., (1989). Enzymes in the Fruit Juice Industry, p. 189–222. In C. Cantarelli and G. Lanzarini (ed.), *Biotechnology Applications In Beverage Production*, Elsevier Science, London, United Kingdom.
- [43] Galante, Y. M., Monteverdi, R., Inama, S., Caldini, C., De Conti, A., Lavelli, V. ve Bonomi, F., (1993). “New Applications of Enzymes in Wine Making and Olive Oil Production”, *Ital. Biochem. Soc. Trans.*, 4:34.
- [44] Walsh, G. A., Power, R. F., ve Headon, D. R., (1993). “Enzymes in the Animal Feed Industry”, *Trends Biotechnol.*, 11:424–430.
- [45] Pedersen, G. P., Screws, G. A., ve Cereoni, D. A., (1992). “Biopolishing of Cellulosic Fabrics”, *Can. Text. J.*, December:31–35.
- [46] Koo, H., Ueda, M., Wakida, T., Yoshimura, Y. ve Igarashi T., (1994). “Cellulase Treatment of Cotton Fabrics”, *Text. Res. J.*, 64:70–74.
- [47] Kumar, A., Lepola, M., ve Purtell, C., (1994). “Enzyme Finishing of Man-Made Cellulosic Fabrics”, *Text. Chem. Color.*, 26:25–28.
- [48] Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Liden, G. ve Zacchi, G., (2006). “Bio-Ethanol-the Fuel of Tomorrow from the Residues of Today”, *Trends Biotechnol.*, 24:549–556.
- [49] Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W.J., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, J. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R., ve Tschaplinski, T., (2006). “The Path forward for Biofuels and Biomaterials”, *Science*, 311:484–489.
- [50] Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. ve Foust, T. D., (2007). “Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production”, *Science*, 315:804–807.
- [51] Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang C.C, (2002). “Industrial Enzyme Applications”, *Curr. Opp. Chem. Biol.*, 13:345-351.
- [52] Godfrey, T. ve West, S. I., (1996). *Introduction to Industrial Enzymology*, In *Industrial Enzymology*, Macmillan Press1-8, London.
- [53] Leisola, O., M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen O. ve Schoemaker, H., (2006). “Industrial Use of Enzymes”, <http://www.tkk.fi>, 28 Haziran 2011.
- [54] Doman-Pytka, M. ve Bardowski, J.,(2004). “Pullulan Degrading Enzymes”, *Crit. Rev. Microbiol.*, 30:107-124.
- [55] Brandt, C. J., Catley, B. J. ve Awad, Jr. W., (1976). “Extracellular and Protease-Released Pullulanases”, *J. Bacteriol.*, 501-508.
- [56] Bertoldo C. ve Antranikian G., (2001). “Amylolytic Enzymes from

Hyperthermophiles”, *Methods Enzymol*, 330:269-289.

- [57] Mikami, B., Iwamoto, H., Malle, D., Yoon, H. J., Demirkan-Sarikaya, E., Mezaki, Y. ve Katsuya, Y., (2006). “Crystal Structure of Pullulanase: Evidence for Paralel Binding of Oligosaccharides in the Active Site”, *J. Mol. Biol.*, 359:690–707.
- [58] Kim, J. H., Sunako, M., Ono, H., Murooka, Y., Fukusaki, E. ve Yamashita, M., (2009). “Characterization of the C-Terminal Truncated from of Amylopullulanase from *Lactobacillus plantarum* L137”, *J. Biosci. Biotechnol.*, 107 (2):124-129.
- [59] Wallenfels, K., H. Bender, H. ve Rached, J. R., (1966). “Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*; Production in a Cell-bound State. Purification and Properties of the Enzyme”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22:254-261.
- [60] Kuriki, T., Park, J. H. ve Imanaka, T., (1989). “Characteristics of Thermostable Pullulanases from *Bacillus stearothermophilus* and the Nucleotide Sequence of the Gene”, *J. Ferment. Bioeng.*, 69:204–210.
- [61] Sakano, Y., Higuchi, M. ve Kobayashi, T., (1972). “Pullulan 4-Glucan-Hydrolase from *Aspergillus niger*”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 153:180–187.
- [62] Norman, B. E., (1982). “A Novel Debranching Enzyme for Application in the Glucose Syrup Industry”, *Starch/Starke* 34:340-346.
- [63] Whelan, W. J., (1971). “Enzymic Explorations of the Structure of Starch and Glycogen”, *Biochem. J.*, 122:609-622.
- [64] Bertoldo, C ve Antranikan, G., (2002), “Starch-Hydrolyzing Enzymes from thermophilic Archaea and Bacteria”, *Curr Opp Chem Biol*, 6, 151-160.
- [65] Pollock, T. J., Thorne, L. ve Armentrout, R. W., (1992), “Isolation of New *Aureobasidium* Strains that Produce High Molecular-Weight Pullulan with Reduced Pigmentation”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:877–883.
- [66] Kachhawa, D. K., Bhattacharjee, P. ve Singhal, R.S., (2003). “Studies on Downstream Processing of Pullulan”, *Carbohydr. Polym.*, 52:25-28.
- [67] Bouveng, H.O., Kiessling, H., Lindberg, B., McKay, J., (1963). “Polysaccharides Elaborated by *Pullularia pullulans*”, *Acta Chem.Scand.*, 17:797–800.
- [68] Catley, B.J. ve Whelan, W.J., (1971). “Observations on the Structure of Pullulan”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 143:138–142.
- [69] Taguchi, R., Kikuchi, Y., Sakano, Y. ve Kobayashi, T., (1979). “Structural Uniformity of Pullulan Produced by Several Strains of *Pullularia pullulans*”, *Agric. Biol. Chem.*, 37:1583–1588.
- [70] Catley, B.J., Ramsay, A., Servis, C., (1986). “Observations on the Structure of Fungal Extracellular-Polysaccharide, Pullulan”, *Carbohydr. Res.*, 153:79–86.
- [71] Aoki, H. ve Sakano, Y., (1997). “Molecular Cloning and Heterologous Expression of the Isopullulanase Gene from *Aspergillus niger* A.T.C.C. 9642”, *Biochem. J.*, 323:757-764.
- [72] Leathers, T.D., (1993). “Substrate Regulation and Specicity of Amylases from

- Aureobasidium* Strain NRRL Y-12,974", FEMS Microbiol. Lett., 110: 217–222.
- [73] McNeil, B. ve Kristiansen, B., (1990). "Temperature Effects of Polysaccharide Formation by *Aureobasidium pullulans* in Stirred Tanks", Enzyme Microb. Technol., 12:521–526.
 - [74] Yuen, S., (1974). "Pullulan and Its Applications", Process Biochem., 9:7–22.
 - [75] Miao, M., Jiang, B. ve Zhang, T., (2009). "Effect of Pullulanase Debranching and Recrystallization on Structure and Digestibility of Waxy Maize Starch", Carbohydr. Polym., 76:214–221.
 - [76] Buleon, A., Ball, S., Planchot, V. ve Colonna, P., (1998). "Starch Granules: Structure and Biosynthesis", Int. J. Biol. Macromol., 23:85–112.
 - [77] Dauville, D., Mestre, V., Colleoni, C., Slomianny, M. C., Mouille, G., Delrue, B., d'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J. M. ve Ball, S., (2000). "The Debranching Enzyme Complex Missing in Glycogen Accumulating Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Displays an Isoamylase-Type Specificity", Plant Science, 157:145–156.
 - [78] Bentley, I.S ve Williams, E.C., (1996). "Starch Conversion. Industrial Enzymology, Second Edition, Editör: Godfrey, T. ve West, S. Stockton Press, New York.
 - [79] Duchiron, F., Legin, E., Ladrat, C., Gandelet, H. ve Barbier, G., (1997). "New Thermostable Enzymes for Crop Fractionation", Industrial Crops and Products, 6:265–270.
 - [80] Macgregor, A. W., Bazin, S. L. ve Schroeder, S. W., (2002). "Effect of Starch Hydrolysis Products on the Determination of Limit Lextrinase and Limit Dextrinase Inhibitors in Barley and Malt", J. Cereal Science, 35:17–28.
 - [81] Ben Messaoud, E., Ben Ammar, Y., Mellouli, L. ve Bejar, S., (2002). "Thermostable Pullulanase Type I from New Isolated *Bacillus thermoleovorans* US105: Cloning, Sequencing and Expression of the Gene in *E. coli*", Enzyme Microb. Technol., 31:827–832.
 - [82] Cowan, D., (1996). "Industrial Enzyme Technology", Trends Biotechnol., 14:177–178.
 - [83] Crabb, W. D. ve Mitchinson, C., (1997). "Enzymes Involved in the Processing of Starch to Sugars", Trends Biotechnol., 15:349–352.
 - [84] Legin, E., Copinet, A. ve Duchiron, F., (1998). "A Single Step High Temperature Hydrolysis of Wheat Starch", Starch/Strärke, 50:84–89.
 - [85] Synowiecki, J., (2007). The Use of Starch Processing Enzymes in the Food Industry; Derleyen: Polaina, J. ve MacCabe, A.P., Industrial Enzymes, Springer.
 - [86] Jiao, Y.L., Wang, S.J., Lv, M.S., Xu, J.L., Fang, Y.W. ve Liu, S., (2011). "A GH57 Family Amylopullulanase from Deep-Sea *Thermococcus siculi*: Expression of the Gene and Characterization of the Recombinant Enzyme", Curr. Microbiol, 62:222–228.
 - [87] Moubasher, H., Wahsh, S.S. ve El-Kassem, N.A., (2010). "Purification of

- Pullulanase from *Aureobasidium pullulans*", Microbiology, 79(6):759-766.
- [88] Singh, R.S., Saini, G.K. ve Kennedy, J.F, (2010). "Maltotioz Syrup Preparation from Pullulan Using Pullulanase", Carbohydr. Polym, 80:401-407.
 - [89] Ayadi, D.Z., Ben Ali, M., Jemli, S., Ben Mabrouk, S., Mezghani, M., Ben Messaoud, E. ve Bejar, S., (2008). "Heterologous Expression, Secretion and Characterization of the Geobacillus thermoleovorans US105 Type I Pullulanase", Appl. Microbiol. Biotechnol., 78:473-481.
 - [90] Vishnu, C., Naveena, B.J., Altaf, Md, Venkateshwar, M. ve Reddy, G., (2006). "Amylopullulanase-A Novel Enzyme of *L. amylophilus* GV6 in Direct Fermentation of Starch to L (+) Lactic Acid", Enzyme Microb. Technol., 38:545-550.
 - [91] Bertoldo, C., Armbrrecht, M., Becker, F., Schaefer, T., Antranikian, G. ve Liebl, W., (2004). "Cloning, Sequencing, and Characterization of a Heat- and Alkali-Stable Type I Pullulanaz from *Anaerobranca gottschalkii*", Appl. Environ. Microbiol., 70(6):3407-3416.
 - [92] Gomes, I., Gomes, J. ve Steiner, W., (2003). "Highly Thermostable Amylase and Pullulanase of the Extreme Thermophilic Eubacterium *Rhodothermus marinus*: Production and Partial Characterization", Biores. Technol., 90:207-214.
 - [93] Amitava, R., Ben Messaoud, E. ve Bejar, S., (2003). "Isolation and Purification of an Acidic Pullulanase Type II from Newly Isolated Bacillus sp. US149", Enzyme Microb. Technol., 33:720-724.
 - [94] Bradford, M. M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", Anal. Biochem., 72:248-254.
 - [95] Warburg, O. ve Christian, W., (1931). "Aktivierung von Kohlehydrat in Roten Blut Zellen", Biochem. Z., 238:131.
 - [96] Miller, G. L., (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Anal. Chem., 31:426-428.
 - [97] Mandels, M.M. ve Andreotti, R.E., (1982). "The Cellulose to Cellulase Fermentation", Process Biochem., 13:6-13.
 - [98] Trautwein, G. ve Kuhlmann, K. P., (1982). Immunofluoreszenz, Theorie und Praxis, Hannover, 52.
 - [99] Laemmli, U. K., (1970). "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature, 227:680-685.
 - [100] Leveque, E., Janecek, S., Haye, B. ve Belarbi, A., (2000). "Thermophilic Archaeal Amylolytic Enzymes", Enzyme Microb Technol, 26,3-14.
 - [101] Roy, A., Messaout, E.B. ve Bejar, S., (2003). "Isolation and Purification of an Acidic Pullulanase Type from Newly Isolated *Bacillus* sp. US149", Enzyme Microb. Technol., 33:720-724.
 - [102] Ramesh, B., Reddy, P. R. M., Seenayya, G. ve Reddy, G., (2001). "Effect of Various

- Flours on the Production of Thermostable β -Amylase and Pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2", *Biores. Technol.*, 76:169-171.
- [103] Wu, C., Colleoni, C., Myers, A.M. ve James, M.G., (2002). "Enzymatic Properties and Regulation of ZPU1, the Maize Pullulanase-Type Starch Debranching Enzyme", *Arch. Biochem. Biophys.*, 406:21-32.
- [104] Shobha, M.S. ve Tharanathan, R.N., (2008). "Nonspecific Activity of *Bacillus acidopullulyticus* Pullulanase on Debranching of Sugar Galactomannan", *J. Agric. Food Chem.*, 56:10858-10864.
- [105] Takasaki, Y., (1976). "Purification and Enzymatic Properties of Beta-Amylase and Pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*", *Agric. Biol. Chem.*, 40:1523-1530.
- [106] Koch, R., Zabłowski, P. ve Antranikian, G., (1987). "Highly Active and Thermostable amylases and Pullulanase from Various Anaerobic Thermophiles", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27:192-198.
- [107] Kusano, S., Nagahata, N., Takahashi, S., Fujimoto, D. ve Sakano, Y., (1988). "Purification and Properties of *Bacillus acidopullulyticus* Pullulanase", *Agric. Biol. Chem.*, 52:2293-2298.
- [108] Koch, R., Canganella, F., Hipe, H., Jahnke, K.D. ve Antranikian, G., (1997). "Purification and Properties of a Thermostable Pullulanase from a Newly Isolated Thermophilic Anaerobic Bacterium *Fervidobacterium pennavorans* Ven5", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:1088-1094.
- [109] Duffner, F., Bertoldo, C., Andersen, J.T., Wagner, K. ve Antranikian, G., (2000). "A New Thermoactive Pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: Cloning, Sequencing, Purification, and Characterization of the Recombinant Enzyme after Expression in *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol.*, 182:6331-6338.
- [110] Smith, K. A. ve Salyers, A. A., (1989). "Cell-Associated Pullulanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: Cloning, Characterization, and Insertional Mutagenesis to Determine Role in Pullulan Utilization", *J. Bacteriol.*, 171:2116-2123.
- [111] Plant, A. R., Morgan, H. W. ve Daniel, R. M., (1986). "A Highly Stable Pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1", *Enzyme Microb. Technol.*, 8:668-672.
- [112] Kuriki, T., Park, J., Okada, S. ve Imanaka, T., (1988). "Purification and Characterization of Thermostable Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and Molecular Cloning and Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2881-2883.
- [113] Kambourova, M.S. ve Emannuilova, E.I., (1992). "Purification and General Biochemical Properties of Thermostable Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* G-82", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 33:193-203.
- [114] Kimura, T., ve Horikoshi, K., (1990). "Characterization of Pullulan-Hydrolysing Enzyme from an *Alkalopsychotropic micrococcus* sp.", *Appl. Microbiol.*

Biotechnol., 34:52-56.

- [115] Yamashita, M., Nakagawa, A., Katsuragi, N. ve Murooka, Y., (1992). "Role of Lipid Modification on a Starch-Debranching Enzyme, *Clepsiella pullulanase*: Comparison of Properties of Lipid-Modified and Unmodified Pullulanases", Mol. Microbiol., 6:389-394.
- [116] Aoki K., Miyamoto, K., Murakami, S., ve Shinke, R., (1995). "Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and Characterization of the Enzymes", Soil Biol. Biochem., 27(11):1377-1382.
- [117] Kim, C.H., Nashiru, O. ve Ko, J.H., (1996). "Purification and Biochemical Characterization of Pullulanase Type I from *Thermus caldophilus* GK-24", FEMS Microbiol. Lett., 138:147-152.
- [118] Stefanova, M.E., Schwerdtfeger, R., Antranikian, G. ve Scandurra, R., (1999). "Heat-Stable Pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*: Characterization and Refolding after Guanidinium Chloride-Induced Unfolding", Extremophiles, 3:147-152.
- [119] Beatty, M.K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A.M, ve James, M.G., (1999). "Purification and Molecular Genetic Characterization of ZPU1, a Pullulanase- Type Starch- Debranching Enzyme from Maize", Plant Physiol., 119:255-266.
- [120] Kim, C. H., Choi, H. I. ve Lee, D. S., (1993). "Pullulanase of Alkaline and Broad pH Range from a Newly Isolated Alkalophilic *Bacillus* sp. S-1 and *Micrococcus* sp. Y-1", J. Ind. Microbiol., 12:48-57.
- [121] Spreinat, A. ve Antranikian, G., (1990). "Purification and Properties of a Thermostable Pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfurogenes* EM1 which Hydrolyses both Alpha-1,6 and Alpha-1,4-Glycosidic Linkages", Appl. Microbiol. Biotechnol., 33:511-518.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Nurdagül Orhan
Doğum Tarihi ve Yeri	04.03.1977 / Niğde
Yabancı Dili	İngilizce
E-posta	nurdagulorhan@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2005
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	1999
Lise	Fen/Matematik	Çemberlitaş Kız Lisesi	1994

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2003-2012	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2002-2003	Kansuk Laboratuvarı A.Ş.	Kimyager

YAYINLARI

Makale

1. Peksel, A., Imamoglu, S., Altas-Kiyimaz, N., **Orhan, N.**, “Antioxidant and Radical Scavenging Activities of *Asphodelus aestivus* Brot. extracts”, International Journal of Food Properties, (Yayına kabul edildi), 2011.

Bildiri

1. **Orhan, N.**, Peksel, A. ve Altaş-Kiyimaz, N., (2010). “Hypocrea jecorina’dan Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran-02 Temmuz 2010, Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak.
2. **Orhan, N.**, Peksel, A. ve Arısan, İ., (2009). “Amilopektin İçeren Ortamlarda Hypocrea jecorina QM9414 Tarafından Pullulanaz İndüksiyonuna Fizyolojik Koşulların Etkisi”, V. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 20-24 Mayıs 2009, Balıkesir.
3. **Orhan, N.**, Peksel, A. ve Arısan, İ., (2008). “The Effect of Different Carbon Sources to Induction of Pullulanase from Hypocrea jecorina QM9414”, International Enzyme Engineering Symposium, 01-05 Ekim 2008, Aydın
4. Altaş-Kiyimaz, N., **Orhan, N.** ve Peksel, A., (2007). "Hypocrea jecorina QM9414 Kültürlerinde β -Galaktozidazın Kısmi Saflaştırılması", XV. Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim 2007, Antalya.
5. **Orhan, N.**, Peksel, A., Altaş-Kiyimaz, N. ve Arısan, İ., (2006). “Nişasta İçeren Ortamda Trichoderma atroviride ve Hypocrea jecorina Tarafından Pullulanaz Üretiminin İncelenmesi”, 20. Ulusal Kimya Kongresi, 04-08 Eylül 2006, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

6. **Orhan, N.**, Peksel, A., Altaş-Kıymaz, N. ve Arısan, İ., (2006). “*Aspergillus niger* Tarafından Pullulanaz İndüksiyonu ve Optimizasyonu”, 20. Ulusal Kimya Kongresi, 04-08 Eylül 2006, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
7. **Orhan, N.**, Peksel, A. ve Arısan, İ., (2005). “*Trichoderma atroviride*’den Kitinazın İndüksiyonu ve Karakterizasyonu”, 19. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-04 Ekim 2005, Ege Üniversitesi Aydın.
8. **Orhan, N.**, Peksel, A. ve Arısan, İ., (2005). “*Aspergillus niger*’den Kitinazın İndüksiyonu”, 19. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-04 Ekim 2005, Ege Üniversitesi, Aydın.
9. **Orhan, N.**, Peksel, A. ve Arısan, İ., (2004). “Determination of Chitinase Activity in Different Fungi “, International Workshop on Bioengineering; Problems and Perspectives, 20-23 October 2004, İstanbul.

Proje

1. Nişastanın *Hypocrea jecorina*’dan Saflaştırılan Pullulanaz ile Sakkarifikasyonu”

Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Peksel

Proje Ekibi: **Nurdagül Orhan**, Nilay Altaş, İnci Arısan Ataç

Destekleyen Kuruluş: Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu

Proje Başlama-Bitiş Tarihi: 2008-2011

Proje No: 28-01-02-05
2. “*Hypocrea jecorina*’dan β -Galaktozidazın Karakterizasyonu ve Kısmen Saflaştırılması”

Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Peksel

Proje Ekibi: **Nurdagül Orhan**, Nilay Altaş, İnci Arısan Ataç

Destekleyen Kuruluş: Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu

Proje Başlama-Bitiş Tarihi: 2006-2009

Proje No: 26-01-02-05

3. “*Trichoderma* Kitinazlarının Biyokontrol Mekanizmasının Araştırılması”

Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. İnci Arısan Ataç

Proje Ekibi: Ayşegül Peksel, **Nurdagül Orhan**, Nilay Altaş

Destekleyen Kuruluş: Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu

Proje Başlama-Bitiş Tarihi: 2003-2006

Proje No: 24-01-02-02

4. “*Aspergillus niger*’de Kitinaz Oluşumu ve Karakterizasyonu”

Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. İnci Arısan Ataç

Proje Ekibi: Ayşegül Peksel, **Nurdagül Orhan**

Destekleyen Kuruluş: Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu

Proje Başlama-Bitiş Tarihi: 2001-2004

Proje No: 21-01-02-04