

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ASPERGILLUS SECTION NIGRI* ÜYELERİNİN AMİLAZ ÜRETME  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Meryem Tuğçe KARACA**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Gıda Mühendisliği Programı**

**HAZİRAN 2018**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ASPERGİLLUS SECTION NİGRİ* ÜYELERİNİN AMİLAZ ÜRETME  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Meryem Tuğçe KARACA  
(506141522)**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Gıda Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER**

**HAZİRAN 2018**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506141522 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Meryem Tuğçe KARACA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*ASPERGİLLUS SECTION NİGRİ* ÜYELERİNİN AMİLAZ ÜRETME ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Dr. Öğretim Üyesi Ash CAN KARAÇA** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Öğr. Gör. Dr. Ayşegül MUTLU İNGÖK** .....  
Düzce Üniversitesi

**Teslim Tarihi**      :   **04 Mayıs 2018**  
**Savunma Tarihi**   :   **04 Haziran 2018**



*Sevdiklerime,*





## ÖNSÖZ

*Aspergillus section Nigri* üyelerinin amilaz üretme özelliklerinin incelenmesi konulu tezimde bu zorlu yolculuk boyunca benden desteğini, güler yüzünü, hoşgörüsünü ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen emeğini asla ödeyemeyeceğim, kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum çok kıymetli hocam Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamın her aşamasında benimle bilgi ve deneyimlerini paylaştığı için kendilerine minnettarım. Benden yardımlarını esirgemeyen hocam Ceren DAŞKAYA DİKMEN'e de teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik hayatımda benim için her zaman destekleyici güç olan biricik anneciğim Berrin KARACA'ya ve tüm aile bireylerime de ayrı ayrı teşekkür ediyorum.

Haziran 2018

Meryem Tuğçe Karaca  
(Gıda Mühendisi)



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
SEMBOLLER .....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY.....	xxi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>3</b>
2.1. Enzimler .....	3
2.1.1. Amilazlar.....	5
2.1.2. Proteazlar .....	7
2.2. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> .....	8
2.2.1. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> 'nin Metabolitleri .....	10
2.2.2. Mikotoksin üretimi.....	11
2.2.2.1. Okratoksin A .....	12
2.2.2.2. Fumonisin B <sub>2</sub> .....	14
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>15</b>
3.1. Küf İzolatları .....	17
3.2. <i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i> Üyelerinin Proteaz ve Amilaz Üretme Potansiyellerinin Katı Besiyerinde İncelenmesi .....	18
3.2.1. Amilaz üretme potansiyelinin katı besiyerinde incelenmesi.....	18
3.2.2. Proteaz üretme potansiyelinin katı besiyerinde incelenmesi .....	18
3.3. Amilolitik Aktivite Tayini.....	18
3.3.1. Küf süspansiyonun hazırlanması .....	18
3.3.2. Ekim ve inkübasyon.....	19
3.3.3. DNS metodu kullanılarak amilaz aktivitesinin belirlenmesi .....	20
3.3.4. İstatistiksel Analiz.....	22
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>23</b>
4.1. <i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i> Üyelerinin Proteaz ve Amilaz Üretme Potansiyellerinin Katı Besiyerinde İncelenmesi .....	23
4.1.1 Amilaz üretme potansiyellerinin katı besiyerinde incelenmesi .....	23
4.1.2. Proteaz üretme potansiyellerinin katı besiyerinde incelenmesi .....	25
4.2. Amilolitik Aktivite Tayini.....	28
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR.. .....</b>	<b>37</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>51</b>



## **KISALTMALAR**

<b>BC</b>	: Before Christ
<b>BEN</b>	: Balkan Endemik Nefropati
<b>BK</b>	: Buğday Kepeği
<b>DNS</b>	: Dinitrosalicylic Acid
<b>EC</b>	: Enzyme Comission
<b>FB<sub>2</sub></b>	: Fumonisin B <sub>2</sub>
<b>GRAS</b>	: Generally Recognized as Safe
<b>IARC</b>	: International Agency for Research on Cancer
<b>IUB</b>	: International Union of Biochemistry
<b>IUPAC</b>	: International Union of Pure And Applied Chemistry
<b>MEA</b>	: Malt Extract Agar
<b>OTA</b>	: Ochratoxin A
<b>SmF</b>	: Submerged Fermantation
<b>SSF</b>	: Solid State Fermantation
<b>TSB</b>	: Tryptic Soy Broth



## **SEMBOLLER**

<b>g/L</b>	: Gram per litre
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>Rpm</b>	: Revolutions per minute
<b>U/mL</b>	: Units per mililitre
<b>°C</b>	: Celsius
<b><math>\alpha</math></b>	: Alpha







## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 3. 1 : Çalışmada kullanılan küfler.....	17
Çizelge 3. 2 : Standart besiyeri (TSB).....	19
Çizelge 3. 3 : Buğday Kepeği besiyeri .....	19
Çizelge 3. 4 : Enzim aktivitesi için koşullar .....	22
Çizelge 4. 1 : Küf izolatlarının amilaz enzimi hidroliz zonu ve koloni çapları.....	23
Çizelge 4. 2 : Küf izolatlarının proteaz enzimi hidroliz zonu ve koloni çapları.....	26
Çizelge 4. 3 : Küf izolatlarının 15°C ve farklı inkübasyon sürelerinde, BK besiyerinde ürettikleri amilaz enzim aktivite değerleri.....	28
Çizelge 4. 4 : Küf izolatlarının 15°C ve farklı inkübasyon sürelerinde, standart besiyerinde (TSB) ürettikleri amilaz enzim aktivite değerleri.....	29
Çizelge 4. 5 : BA-11 küf izolatının BK besiyerinde, farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde ürettikleri amilaz enzim aktivite değerleri.....	30
Çizelge 4. 6 : BA-14 küf izolatının BK besiyerinde, farklı derece ve inkübasyon sürelerinde ürettikleri amilaz enzim aktivite değerleri.....	31
Çizelge A. 1 : BA11'in amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	46
Çizelge A. 2 : BA11'in amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	46
Çizelge A. 3 : BA14'ün amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	46
Çizelge A. 4 : BA14'ün amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	46
Çizelge A. 5 : BA19'un amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	47
Çizelge A. 6 : BA19'un amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	47
Çizelge A. 7 : BA21'in amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	47
Çizelge A. 8 : BA21'in amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi .....	47
Çizelge A. 9 : BA11'in amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi ...	48
Çizelge A. 10 : BA14'ün amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi	48
Çizelge A. 11 : BA19'un amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi	49
Çizelge A. 12 : BA21'in amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi .	49
Çizelge A. 13 : BA-11'in amilaz üretimine sıcaklık ve sürenin etkisi.....	50
Çizelge A. 14 : BA-14'ün amilaz üretimine sıcaklık ve sürenin etkisi.....	50



## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1: Nişastayı hidroliz eden farklı enzimlerin fonksiyonları .....	7
Şekil 3. 1 : Kalibrasyon eğrisi.....	21
Şekil 4. 1 : BA-1 küf izolatının amilaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.....	24
Şekil 4. 2 : BA-16 küf izolatının amilaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.....	24
Şekil 4. 3 : BA-17 küf izolatının amilaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.....	24
Şekil 4. 4 : BA-11 küf izolatının proteaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.....	25
Şekil 4. 5 : BA-21 küf izolatının proteaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.....	26



## ***ASPERGILLUS SECTION NIGRI* ÜYELERİNİN AMİLAZ ÜRETME ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

### **ÖZET**

Endüstride geniş kullanım alanına sahip olan enzimler; hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal kaynaklı olabilmektedirler. Enzimlerin en temel özelliği biyokimyasal reaksiyonları katalizlerken hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyondan çıkmalarıdır. Enzimler katalizledikleri tepkimeyi hızlandırmasının yanı sıra reaksiyonun kendine özgü olmasını sağlarlar.

Günümüzde birçok enzimin eldesinde kaynak olarak mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Mikrobiyal enzim üretimi daha ekonomik, daha kararlı ve daha yüksek katalitik aktiviteye sahip enzim eldesi imkanı sağlamaktadır. Enzim pazarının büyük bir kısmını oluşturan amilaz ve proteazlar birçok endüstri alanında kullanılmaktadırlar. Amilaz ve proteaz enzimleri mikrobiyal olarak küflerden elde edilmektedirler ve fermantasyon, tekstil, kâğıt, şeker, damıtma, gıda üretim süreçleri, deterjan sanayileri gibi birçok dalda kullanılmaktadırlar.

Bu çalışmada farklı bölgelerdeki kuru incirlerden izole edilmiş *Aspergillus section Nigri* üyesi küflerin soğuk ortamda amilaz ve proteaz enzimi üretme potansiyelleri belirlenerek, soğuk ve mezofilik ortamda amilaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada daha önceden tanımlanmış, okratoksin A ve fumonisin üreticisi olmadığı belirlenmiş izolatlar kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında küf izolatlarının düşük sıcaklıklarda enzim üretme potansiyellerini tespit etmek amacı ile 15°C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda nişasta içeren besiyerinde amilaz enzimi, süt tozu içeren besiyerinde ise proteaz üretimi incelenmiştir. Küf izolatlarının enzim üretme potansiyelleri oluşturdukları hidroliz alan büyüklüğü ile değerlendirilmiştir. Çap ölçümleri milimetrik olarak yapılmıştır. Tüm örneklerin içerisinde en fazla proteaz ve amilaz enzim üretme potansiyelleri gösteren 4 küf izolatı; BA-11, BA-14, BA-19 ve BA-21 devam eden çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Küf izolatlarının enzim üretme potansiyelleri incelendiğinde oluşturdukları hidroliz alanlarının amilaz enzimi için daha büyük olduğu tespit edildiğinden çalışmanın devamında küf izolatlarının sıvı ortamda amilaz enzimi üretimleri araştırılmıştır.

Deneyin ikinci aşamasında küflerin soğukta aktif enzim üretme özelliklerini tespit etmek amacı ile literatür çalışmaları göz önüne alınarak standart ve buğday kepeği besiyeri kullanılmış, küf izolatlarının 15°C'de 4,6,8 ve 10. günlerdeki enzim aktiviteleri incelenmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler santrifüj edilerek supernatantları ayrılmış ve DNS metodu ile enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Amilaz aktivitesi, amilaz enziminin dakikada ürettiği indirgen şekerin 1µmol glukoz eşdeğer kabul edilmesi ile hesaplanmıştır. Ölçülen değerlerin hesaplanabilmesi için kalibrasyon eğrisi farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış glukoz çözeltisiyle çizilerek elde edilmiştir. Elde edilen eğri denklemi kullanılarak izolatların ürettiği amilaz aktivitesi hesaplanmıştır. Çalışmada tüm analizler 3 tekrarlı yapılmıştır. 15°C'de iki

farklı besiyerinde enzim aktiviteleri incelenen izolatların gösterdikleri en yüksek aktivite değeri buğday kepeği besiyerinde, 8 gün inkübasyon sonucunda BA-14 izolatı için 1,371 U/mL'dir. Farklı besiyerlerindeki küflerin enzim aktiviteleri incelendiğinde 15°C'de en yüksek aktivite gösteren 2 küf izolatı BA-11 ve BA-14'dür. Yapılan istatistiksel analizlerde tüm izolatlar için buğday kepeği ve standart besiyerinde amilaz aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda küf izolatlarının amilaz üretimine inkübasyon süresi etkisinin istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

Buğday kepeği besiyerinde standart besiyerine göre daha yüksek enzim aktiviteleri elde edilmesi nedeniyle çalışmanın son kısmında BA-11 ve BA-14 izolatlarının amilaz enzim üretimine sıcaklığın etkisi buğday kepeği besiyerinde incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda küf izolatlarının oluşturduğu en yüksek amilaz aktivitesi değeri, BA-14 izolatı ile 35°C'de 6 gün inkübasyon sonucunda 2,690 U/mL olarak elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde sıcaklık ve inkübasyon süresinin BA-11 ve BA-14 izolatlarının amilaz üretimine etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



## **INVESTIGATION OF AMYLASE PRODUCTION FROM MEMBERS OF *ASPERGILLUS SECTION NIGRI***

### **SUMMARY**

Enzymes have been used in the food industry for hundreds of years, and play an important role in many other industries, such as washing agents, textile manufacturing, pharmaceuticals, pulp and paper. Enzymes which have recently been widely used in the industry; they may be animal, plant or microbial origins. The most basic feature of enzymes is that they catalyze biochemical reactions while leaving the reaction without any changes. Enzymes are liable for many necessary biochemical reactions in microorganisms, plants, animals, and human beings. Not only enzymes without consumed accelerate the reaction that catalyzing by them, but also they supply unique reaction.

Enzymes work efficiently in temperate climatic conditions and at medium pH values. Chemical structures are deformed at high fluctuations of temperature and pH. In addition to being affected by temperature and pH values, enzymes depend on lots of parameters such as enzyme-substrate concentration, incubation time, detergents, metal ions and mechanical stress.

In recent years, microorganisms can be used as enzyme sources. Microbial enzyme production provides a more economical, more stable and production higher catalytic activity. In addition to these advantages, microbial resources are preferred in the industrial enzyme market due to the low selectivity, easy analysis of the results and easy adaptation to environmental conditions. Amylases and proteases, which have a large part of the enzyme market, are used in many industries. These enzymes are the most important enzymes for biotechnological applications. Amylase and protease enzymes are obtained from mold species and they are used in many areas such as fermentation, textile, paper, sugar, distillation, food production processes and detergent industry.

Amylase family is one of the most popular enzyme groups in food industry because it has a biocatalysts role. Amylase enzymes are so significant for their wide area of potential application as they employed in processed-food industry such as baking, brewing, preparation of digestive aids, production of cakes, fruit juices and starch syrups. The first industrially produced enzyme was an amylase from a fungal source in 1894, and it was used for the treatment of digestive ailments in pharmaceutical industry. Thermostable  $\alpha$ -amylases are generally preferred because they minimize contamination risk and reduce reaction time and provide energy saving. For production of various amylase enzymes, different methods have been used such as; submerged fermentation and solid-state fermentation. Submerged fermentation (SmF) is tradition and modern method for production of industrial enzymes. On the other hand, solid state fermentation (SSF) is an old technology and has been used since 2600 BC. However, today SSF has been developed with the biotechnological tools. Nowadays, in production method spectrum of  $\alpha$ -amylase

extends in many other areas such as analytical chemistry, clinical and medicinal industry. Wheat bran, spent brewing grain, maize bran, rice bran, rice husk, coconut oil cake, mustard oil cake, corn bran being agro-industrial residues are generally regarded the substrates for fermentation processes. Enzyme usage supplies less toxic process and economical advantage, they decrease costs associated with the production process. In the future enzymes will be possible to use in every process.

Industrially amylase enzymes are produced from filamentous fungi, especially *Aspergillus* and *Rhizopus* spp. *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* produce wide range of enzymes that are used extensively in the industry. *Aspergillus* is the largest group of molds and is the most common mold on earth. *Aspergillus niger*, also known as black aspergilla. Black aspergilli group contains 18 species, 6 species of which are frequently found, the other 12 species can be found in tropical regions. *Aspergillus* molds use all the organic substances by using the enzymes they produce and live as saprophytes. The *Aspergillus* species are the most commonly used molds in enzyme production processes due to their high capacity to produce extracellular enzymes. *Aspergillus* section *Nigri* members with properties such as rapid growth and pH tolerance, ability to develop on different substrates cause contamination in coffee, cocoa, dry fruits, nuts, grains and fresh fruits. *Aspergillus niger* is commonly found in temperate climates and hot weather areas.

Fungi and fungal spores are easily to colonize and penetrate deep into the crops and produce mycotoxins during preharvest, postharvest, processing and storage periods. Until today many researches have noticed that more than 300 different mycotoxins being synthesized under suitable biological, chemical, and physiological conditions. Also toxin production related to lots of parameters such as; temperature, substrate type, moisture content, relative humidity, water activity, connection with other fungi, physical damage, fungicides usage, and storage atmosphere. Moreover, climate changes affect contamination of mycotoxin in food and feedstuffs.

Mycotoxin contamination of foodstuffs is a worldwide problem and contamination of food affects human and animal health negatively. In addition, it causes significant economic losses in both developing and developed countries. Fungal spoilage estimated that lost of 5–10% the world's production. Cereals (wheat, rice, maize, and sorghum), oilseeds (sunflower, peanut, cottonseed, and soybean), spices (black pepper, chillies, turmeric, coriander, and ginger), tree nuts (pistachio, almond, coconut, and walnut) are the most necessary contamination suppliers with mycotoxins. Ochratoxin A is the most known mycotoxin contamination is decided by *Aspergillus* section *Nigri* members found in generally dried fruits. Ochratoxin A and fumonisins have negative affect on human and animal health. They are cited as potential carcinogen by International Agency for Research on Cancer (IARC).

In this study, amylase and protease enzyme production potentials of *Aspergillus* section *Nigri* molds isolated from the dried figs in different regions were determined and amylase enzyme activities are investigated in cold & mesophilic environment. It has been determined that all 18 tested isolates are not producers of OTA and fumonisins in previous studies and their morphological characteristics are known. Production of amylase and protease by tested isolates were investigated on starch-containing and skim milk-containing medium at 15°C respectively.

Firstly, initial stage of the experiment is determining the activity of mold isolates in cold temperatures. Production of amylase enzyme was investigated on starch-



containing medium and protease enzyme was investigated on skimmed milk containing medium at 15°C incubation for determining enzyme production potentials. Mold strains enzyme production potentials are measured by their light field production. Diameter measurements were calculated the unit of millimeter. Four mold isolates; BA-11, BA-14, BA-19 and BA-21 showed the highest hydrolysis zone and they selected for the next steps of study.

In the second stage of the study, the standard medium and wheat bran medium were used in order to determine the enzyme activity of the selected isolates at 15°C for 4, 6, 8 and 10 days. It has been determined that selected molds developed enzymes in the sample media. At the end of the incubation periods, samples were centrifuged, the supernatants were separated and enzyme activity was determined by using the DNS method. Amylase activity was calculated by assuming that the reducing sugar produced by the amylase enzyme per minute was equivalent to 1  $\mu$ mol of glucose. In order to calculate the enzyme activity, the standard curve used that was drawn using the glucose solution prepared at different concentrations. Enzyme activity was calculated by using the slope of curve. All experiments were performed at 3 replicates. The highest enzyme activity value was determined on 8 days of incubation on wheat bran medium at 15°C: BA-14 (1,371 U/mL). To contrast the previous studies the enzyme activity value obtained was low. The statistical analysis revealed that the difference between the amylase activities of wheat bran and standard medium for all isolates was statistically significant ( $p < 0.05$ ). At the same time, the effect of the incubation period on amylase production of isolates was found statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Finally, enzyme activities of the mold BA-11 and BA-14, which were showed the highest enzyme activity than standard media, effects of temperature on enzyme activity were investigated in wheat bran medium. The enzyme activities of the samples were determined by the DNS method as previously explained. As a result of experiments, the highest amylase activity value was measured as 2,690 U/mL, which was the value of BA-14, incubation at 35°C for 6 days. In statistical analyzes, the effect of temperature and incubation time on the amylase production of BA-11 and BA-14 isolates were found to be significant ( $p < 0,05$ ).

The aim of the study is analyzing amylase enzyme activity at the cold temperature. Obtaining measurements of the experiment were not sufficient for the industrial enzyme production. In future studies optimization of experiment conditions should be performed.



## 1. GİRİŞ

Hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal kaynaklı olabilen enzimler, endüstride yaygın kullanılmaları nedeni ile büyük önem taşımaktadırlar. Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve reaksiyonların optimum verimle sonuçlanmalarını sağlayan düzenleyicilerdir. Kendileri değişikliğe uğramayarak tepkime hızına etki ederler ve reaksiyonun kendine özgü olmasını sağlarlar. Gıda, tekstil, deterjan, kağıt, deri ve ilaç endüstrisi gibi birçok farklı alanda enzimlerden yararlanılmaktadır.

Enzimlerin çalışma koşulları genellikle ılıman sıcaklıklar ve ortalama pH değerleridir. Fakat son zamanlarda soğukta aktif enzimler de birçok proseste tercih edilmektedir. Soğukta aktif enzimler gıda süreçleri sonunda ürünün doğallığını bozmazken aynı zamanda üretim maliyetlerini düşürmektedir (Ramya ve Pulicherla, 2014). Cabeza ve diğ. (2011) yaptıkları çalışmada özellikle bira yapımında soğukta aktif enzimlerin tercih edildiğini, bu enzimlerin ekstraksiyon ve klarifikasyon aşamalarına etki ederek aroma ve renk bileşenlerinin tercih edilen düzeyde olmasını sağladıklarını belirtmişlerdir. Yüksek sıcaklık seviyelerinde veya çok düşük, çok yüksek pH değerlerinde kimyasal yapıları bozulmaktadır. Enzimlerin verimlilikleri aynı zamanda enzim-substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, deterjanlar, metal iyonları ve mekanik strese bağlı olarak değişim göstermektedir (Koç, 2015).

Önceleri enzim kaynakları olarak hayvanlar ve bitkiler kullanılmakta iken, günümüzde birçok enzim eldesinde mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Cherry ve diğ., 2004). Mikrobiyal enzim eldesi daha ekonomik ve aynı zamanda diğer kaynaklara kıyasla daha stabil ve daha yüksek katalitik aktiviteye sahip enzim üretme imkanı sunmaktadır. Mikroorganizmaların reaksiyon seçiciliğinin az olması, ortam koşullarına kolay adapte olması, analiz sonuçlarının kolay taranabilir olması, ucuz kaynaklarda gelişebilmesi ve çok çeşitli olması sebebi ile enzim kaynağı olarak daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Novic ve diğ., 2005).

Enzim pazarının geniş bir bölümünü oluşturan amilazlar ve proteazlar, birçok endüstri alanında kullanılmaktadırlar. Nişastayı basit şekerlere parçalayan amilazlar

ve peptid bağlarını katalize eden proteazlar mikrobiyal olarak küf türlerinden üretilmektedirler (Nelson ve Cox, 2004). Amilolitik enzimler (alfa amilaz, beta amilaz ve glukoz amilaz) ve proteazlar (asit ve alkali proteazlar) mayalama, tekstil, kağıt, şeker, damıtma, gıda prosesleri, deterjan gibi birçok endüstri alanında kullanılan en önemli enzimlerdir (Negi ve Banerjee, 2010).

Küf, maya ve bakterilerden elde edilen  $\alpha$ -amilazların bakteri ve küf kaynaklı olanlarının endüstriyel kullanımı daha yaygındır. *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Rhizomucor miehei* ve *Rhizomucor pusillus* türleri  $\alpha$ -amilaz üretme potansiyeli olan küflerden en bilinenleridir (Velioğlu ve Çelikyurt, 2016).

*Aspergillus* section *Nigri* üyesi küfler enzim üretimine elverişli küfler olup, sanayinin birçok alanında kullanılmaktadırlar. Kahve, kakao, kuru meyveler, kabuklu yemişler, hububatlar ve taze meyvelerde bulunan *Aspergillus* section *Nigri* üyesi olan *Aspergillus niger* küfü organik asit ve hücre dışı enzim üretimlerinde ve birçok endüstri alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Nielsen ve diğ, 2009).

Bu çalışmada kuru incirden elde edilmiş *Aspergillus* section *Nigri* üyesi izolatların proteaz ve amilaz enzim üretim potansiyellerinin ve seçilen küflerin amilaz üretim potansiyeline sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisinin daldırma fermantasyon yöntemiyle incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Enzimler

Enzimler amino asit zincirlerinin katlanması sayesinde üç boyutlu yapı gösteren globüler proteinlerdir. Enzimlerin birbirlerinden ayrışmasını sağlayan kendilerine özgü amino asit dizilimleridir. Birçok biyokimyasal reaksiyondan sorumlu olan enzimler, hayvanlar ve insanlar için hayati fonksiyonları katalizlemektedirler. Gıda endüstrisinde ürün kalitesini artırma ve proses süresini kısaltma gibi temel görevleri bulunmaktadır.

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları hızlandırarak reaksiyonu hiçbir değişime uğramadan neticelendirirler ve ardından başka bir reaksiyonu başlatma özelliğine sahiptirler. Biyokatalizör özellikleri nedeni ile geçmişten günümüze kadar yiyecek endüstrisinde kullanılmaktadırlar. Gıda sektörünün yanı sıra tekstil, deterjan, ilaç, kağıt gibi birçok endüstri kollarında da önemli rol oynamaktadırlar. Bir veya daha fazla polipeptid zincir içermeleri nedeni ile proteinlerle aynı özellikleri göstermektedirler. Enzimler reaksiyonları katalizlemek için kofaktör veya koenzimlere ihtiyaç duyabilmektedirler (Koç, 2015). Enzimlerin anahtar-kilit ilişkisi kurduğu moleküllere substrat denir. Enzimlerin amino asit yapıları kendilerine özgüdür ve aynı zamanda enzimler substratlara özgüdürler. Endüstride enzimler genellikle tek kullanımlıktır ve katalitik eylemden sonra atılmaktadırlar. Katalitik özellik gösteren bazı RNA enzimleri (ribozimler) dışındaki bütün enzimler protein yapısında veya bir kısmı protein olan biyomoleküllerdir (Moşjov, 2012).

Enzimler, hücrelerde biyokatalizör olarak görev yaparken aynı zamanda biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığına zarar vermemektedir. Enzimler, kendileri hiçbir değişikliğe uğramayarak hücre içerisinde meydana gelen bütün tepkimelerin hızını ve özgüllüğünü düzenleyebilmektedir. Enzimler, molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar (Uçar, 2011).

Enzimlerin uygun çalışma koşulları genellikle ılımlı sıcaklıklar altında oluşmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda enzimlerin üç boyutlu yapıları bozulmaktadır. Enzimler aynı

zamanda çok yüksek veya çok düşük pH değerlerinde aktivite gösterememektedirler. Enzimatik reaksiyonlar bu parametlerin yanı sıra enzim-substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, deterjanlar, metal iyonları ve mekanik strese bağlı olarak gerçekleşmektedirler (Koç, 2015).

1970'lerin başına kadar enzim kaynağı olarak bitki ve hayvan materyalleri kullanılmaktaydı (Cherry ve diğ., 2004). Günümüzde hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere kıyasla mikroorganizma kaynaklı enzimler daha çok üretilebilmekte, ucuza mal edilebilmekte aynı zamanda yüksek katalitik aktiviteye sahip ve stabil özellikte olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı endüstriyel alanlardaki birçok enzim mikrobiyal kaynaklıdır (Kıran ve diğ., 2006). Mikroorganizmaların enzim üretme kabiliyetlerinin yanı sıra toksik veya patojen özellik gösterme derecesi önem taşımaktadır. Enzimlerin diğer kaynaklara oranla daha çok mikroorganizmalar tarafından üretilmelerinin sebepleri şöyle sıralanabilmektedir (Novic ve diğ., 2005).

- Mikroorganizmalar birçok reaksiyona uyum göstermektedirler.
- Farklı ortam koşullarına kolay adapte olabilmektedirler.
- Ucuz karbon ve azot kaynaklarında kolay gelişebilmektedirler.
- Mikroorganizmalar kısa süre içerisinde basit tarama işlemleri ile incelenebilmektedirler.
- Çok geniş mikroorganizma türleri olması sebebiyle birçok farklı enzim sentezlenebilmektedir.

Günümüzde 2000 den fazla enzim kaynağı bulunmakta olup, 100 tanesi ticari kullanıma uygun iken sadece 18 tanesi endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda genel olarak yüksek sıcaklıklarda stabil özellik gösteren immobilize enzimler kullanılmaktadır. Termofilik mikroorganizmalardan üretilen termofilik özellik gösteren amilazlar endüstriyel alanda büyük öneme sahiptir (Kurakake ve diğ., 1997; Tanrıseven ve diğ., 2002). Yüksek sıcaklıklarda dayanıklı olan termostabil amilazlar endüstriyel üretim kapasitesi yüksek olması nedeni ile önem taşımaktadırlar (Sunna ve diğ., 1997). Mezofilik ve termofilik gruplar arasında olan fakültatif termofil özellik gösteren amilazlar genellikle mezofilik sıcaklık aralığında (optimum 45°C) etki göstermektedirler (Nielsen ve Borchert, 2000).

Enzimlerin temel özelliğinin katalitik fonksiyonları olması sebebiyle sınıflandırılmaları da katalitik fonksiyonlarına göre yapılır. 1956 yılında Uluslararası

Enzim Komisyonunu (E.C.), enzimlerin düzenlenmesi ve sınıflandırılması için, Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından kurulmuştur. E.C. sınıflandırma sistemine göre enzimler temel fonksiyonlarına bağlı olarak 6 sınıfa ayrılmaktadır: Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olarak isimlendirilmektedir. Bir hücrede her reaksiyon türü için farklı bir enzim bulunmaktadır. Yaygın olarak bilinen enzimler; nişastayı basit şekerlere yıkan amilazlar, proteinleri yıkan proteazlar, selülozu parçalayan selülazlar, yağları yağ asidi ve gliserole parçalayan lipazlardır (Nelson ve Cox, 2004).

Amilolitik enzimler (alfa amilaz, beta amilaz ve gluko amilaz) ve proteazlar (asit ve alkali proteazlar) mayalama, tekstil, kâğıt, şeker, damıtma, gıda prosesleri, deterjan gibi birçok endüstri alanında kullanılan en önemli enzimlerdir (Negi ve Banerjee, 2010).

### **2.1.1 Amilazlar**

Nişastayı basit şekerlere indirgeyen amilazlar, enzimler içerisinde hidrolaz sınıfında yer almaktadır. Endüstriyel alanda büyük önem taşıyan nişastayı parçalayan amilolitik enzimler; fırıncılık, şeker, kâğıt, eczacılık, tekstil, meyve suyu endüstrisinde kullanılmasının yanı sıra alkol fermantasyonunda ve nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılmaktadır (Gupta ve diğ., 2003; Uçar, 2011). Mikroorganizmalar enzim üretiminde kullanılmakta ve bu sayede sanayi için çok verimli hale gelmektedirler (Naidu ve Saranraj, 2013). Biyoteknolojik olarak büyük önem taşıyan amilazlar dünya enzim piyasasının % 25'lik kısmını oluşturmaktadırlar (Nguyen ve diğ., 2002; Rajagopalan ve Krishnan, 2008; Reddy ve diğ., 2003).

$\alpha$ -Amilazlar 'sıvılaştırıcı enzim' olarak da bilinirler, bunun nedeni viskozitede azalmalara neden olmasıdır. Aynı zamanda hidroliz sonucunda dekstrin oluşturması nedeni ile 'deksrejenik enzim' olarak da anılmaktadır. Günümüzde ticari amaçla üretilen amilazların kaynağı yüksek oranda mikroorganizmalar iken, bitkisel veya hayvansal kaynaklı da olabilmektedirler (Koç, 2015). Hayvansal kaynaklı  $\alpha$ -amilaz üretiminde sığır ve domuz pankreası tercih edilirken, bitkisel kaynaklı eldesinde genellikle arpa maltı tercih edilmektedir. Küf, maya ve bakterilerden elde edilen  $\alpha$ -amilazların bakteri ve küf kaynaklı olanlarının endüstriyel kullanımı daha yaygındır. *Aspergillus ozyae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus foetidus*, *Rhizomucor miehei* ve

*Rhizomucor pusillus* türleri  $\alpha$ -amilaz üretme potansiyeli olan küflerden en bilinenleridir (Velioğlu ve Çelikyurt, 2016). Başlıca *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* olmak üzere *Bacillus* ve *Aspergillus* türleri ise küf üretimi endüstriyel uygulamalarında en çok kullanılanlarıdır (Gupta ve diğ., 2003). Amilazların ilk endüstriyel üretimi 1984 yılında küf kaynağından elde edilmiş olup, daha sonrasında sindirim sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Mosjov, 2012).

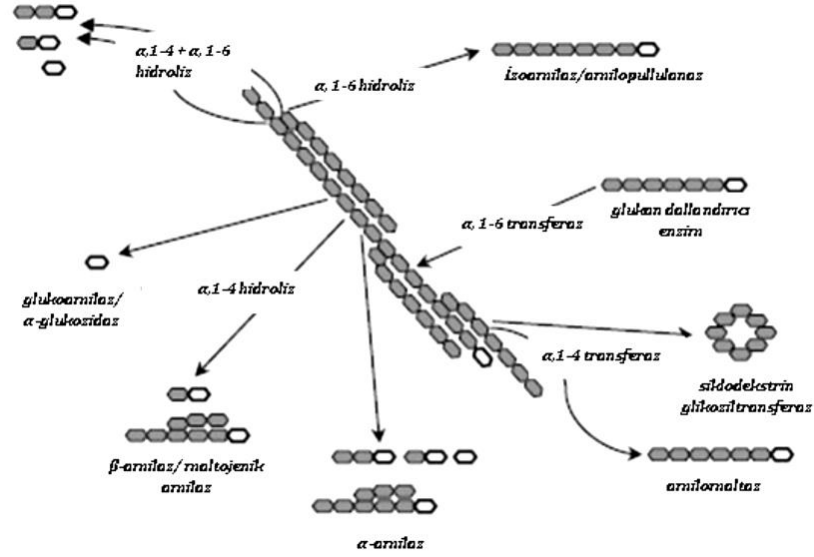
$\alpha$ -Amilaz üretimini artırmak amacı ile son yıllarda genetik mühendisliği çalışmaları ve besin ortamı kombinasyonları araştırılmaktadır. Fakat besin ortamının değiştirilmesi enzim üretimi açısından daha stabil ve verimli sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Tanyıldızı ve diğ., 2005). Bu sebeple birçok tarım ürünü veya tarım artığı maddeler  $\alpha$ -amilaz üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır (Velioğlu ve Çelikyurt, 2016). Enzim üretim maliyeti substrat ve besiyeri maliyetlerinin yüksek olması nedeni ile artmaktadır. Bu neden ile maliyetler en aza indirgenmeye çalışılmaktadır (Sümengen ve diğ., 2016). Enzimlerin düşük maliyetlerle tarımsal ürünler kullanılarak üretilebilmesi, endüstriyel açıdan cazip hale gelmelerini sağlamaktadır (Rajagopalan ve Krishnan 2008).

Amilazlar endoamilazlar, ekzoamilazlar, dallanma kırıcı enzimler ve transferazlar olarak dört gruba ayrılmaktadırlar. Nişastayı hidroliz eden farklı enzimlerin fonksiyonları Şekil 2.1. de gösterilmektedir (Van der Maarel ve diğ., 2002).

Endoamilazlar grubunun bir üyesi olan  $\alpha$ -amilazlar farmakolojiden gıda endüstrisine kadar geniş bir uygulama alanına sahip olan önemli endüstriyel enzimlerdir (Pandey ve diğ., 2000; Sivaramkrishnan ve diğ., 2006).

$\alpha$ -Amilazların aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan analiz metotları genel olarak modifiye ve çözünür nişastaya etkisine dayanmaktadır. Metotların prensipleri olarak; viskozitenin düşmesi, substrat renk bileşiminin azalması, indirgenen şekerin artış göstermesi, nişasta-iyot renk karışımının yoğunluğunun düşmesi verilebilir (Gupta ve diğ., 2003).  $\alpha$ -Amilazların substrata olan duyarlılığı mikroorganizma çeşitliliğine göre farklılık göstermektedir. Optimum gelişme gösterdiği pH aralığı 2,0-12,0 iken, gelişme sıcaklığı mikroorganizmaya bağlılık göstermektedir (Uçar, 2011).





**Şekil 2. 1:** Nişastayı hidroliz eden farklı enzimlerin fonksiyonları (Van der Maarel ve diğ., 2002).

Glukoamilaz, endüstriyel enzimlerin önde gelenlerinden olup, proteazların ardından dünya pazarında 2. sırada yer almaktadır. Ekmek endüstrisinde, bira ve dekstroz üretiminde glukoamilazlardan yararlanılmaktadır. Glukoamilazlar sanayide ilk kez nişasta kullanılarak üretilen glukoz şuruplarında kullanılmıştır (Bhatti ve diğ., 2007). Yüksek sıcaklığa dayanıklı ve aktivitesi yüksek olan enzimler bu reaksiyonları başarı ile tamamlamaktadır. Termostabilite sağlayan enzimler, yüksek sıcaklıklarda kontaminasyonu en düşük seviyede ve reaksiyon hızını optimum seviyede tutmaktadırlar (Koç ve Metin, 2010). Birçok çalışmaya göre *Aspergillus niger* gibi küflerden elde edilen glukoamilazlar genellikle asidik pH değerlerinde ve 50-60°C'deki termofilik sıcaklıklarda etkilidirler (Norouziyan ve diğ., 2006).

$\alpha$ -Amilazlar, alkol ve bira üretiminde işçilik maliyetini en aza indirerek üretim süresini kısaltmakta, nişasta endüstrisinde nişasta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmakta ve ekmek sanayinde kaliteyi artırarak bayatlamayı geciktirmektedir. Aynı zamanda tekstil sanayinde dokuma sırasında ipliklerin dayanıklılığını artırmakta, kağıt sanayinde düşük viskozite sağlayarak mekanik zararları önlemekte ve meyve suyu endüstrisinde elma, armut suyunu berraklaştırmaktadır (Dönmez, 1986; Eksi, 1998; Elgün ve Ertugay, 1995; Gupta ve diğ., 2003; Sarıkaya, 1988).

### 2.1.2 Proteazlar

Proteolitik enzimler, enzim hidrolazlarının alt sınıfında yer almaktadırlar. Bu enzimler peptid bağlarını katalize ederek proteinleri, küçük peptidlere ve

aminoasitlere parçalamaktadırlar. Proteazlar tek bir enzimi değil proteinaz, peptidaz ve amidaz karışımlarını içermektedir. Proteinazlar, protein moleküllerini proteozlara, peptonlara ve bazı aminoasitlere hidrolize ederler. Peptidazlar, peptonları hidroliz ederken, amidazlar aminoasitleri hidroliz ederler ve amonyak açığa çıkarırlar (Mukhtar, 2009).

Proteazlar, endüstriyel enzimlerin en önemli sınıfıdır ve dünyadaki ticari enzimlerin %25'lik kısmını oluştururlar. Proteazlar; asit, nötr ve alkali olmak üzere 3 grupta sınıflandırılırlar (Radha ve diğ., 2011). Gıda, deterjan, et, bira, peynir, ilaç, deri, ipek ve fotoğraf sanayii gibi dallarda kullanılması nedeni ile geniş çapta birçok farklı uygulama alanına sahiptir (Hajji ve diğ., 2007; Sümengen ve diğ., 2016). Bu enzimler genel olarak süt endüstrisinde süt pıhtılaştırma ajanı ve gıda endüstrisinde et yumuşatma ajanı olarak kullanılmaktadırlar. Klinik ve medikal alanlarda ise doku enflamasyonunun azaltılmasında görev almaktadırlar. Bakteri, mantar, maya ve aktinomisetesler gibi birçok mikroorganizma çeşitleri bu enzimleri üretmektedirler. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* cinsi küfler proteaz üretme potansiyeli açısından oldukça güçlüdürler ve bu küf türleri güvenli olarak kabul edilmektedir (Radha ve diğ., 2011). Proteazlar yüksek alkalın aralığında ve yüksek sıcaklıklarda, yüksek aktivite ve stabilite göstermesi nedeni ile biyomühendislik ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadırlar. pH değerleri 9,0-12,0 aralığında olan alkali proteazlar temel olarak deterjan sanayiinde kullanılmaktadır (Hajji ve diğ., 2007). Bu enzimlerin endüstriyel proseste geniş uygulama sahasına sahip olmasının sebebi, enzimlerin yüksek ısıya dayanıklı, üstün fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalarıdır. Bu özellikleri nedeniyle gelecekteki biyoteknolojik uygulamalar için uygun görülmektedir. Proteaz kaynakları olarak bitkiler, hayvan dokuları ve mikroorganizmalar bilinmektedirler. Fakat bu kaynaklardan proteaz üretiminin az olmasından dolayı proteazlar genel olarak maya, bakteri veya küf içeren mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler (Mukhtar, 2009).

## **2.2 *Aspergillus Section Nigri***

*Aspergillus*'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan küflerdir. *Aspergillus*, küflerin en geniş grubu olup, çok çeşitli yaşam şartlarında bulunan 300-350 adet türleri bulunmaktadır (Uçar, 2011). *Aspergillus niger* grubu 18 tür içermektedir; *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus brasiliensis*,

*Aspergillus acidus*, *Aspergillus carbonarius*, ve *Aspergillus ibericus* en yaygın olanları olmakla birlikte diğer türlere tropikal bölgelerde nadir olarak rastlanmaktadır (De Rossi ve diğ, 2012; Spadaro ve diğ, 2010). Siyah Aspergilli olarak da bilinen *Nigri* sınıfının 6 türü doğada sıkça bulunmaktadır ve bu küflerin 145 adet farklı ikincil metaboliti tespit edilmiştir (De Rossi ve diğ, 2012; Ferranti ve diğ, 2017; Spadaro ve diğ, 2010). Endüstriyel önemlerine rağmen siyah Aspergilli'lerin (*Aspergillus section Nigri*) taksonomisi net değildir. *Aspergillus section Nigri*'de birbirinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin yanı sıra *Aspergillus niger aggregate* (*Aspergillus niger agg.*) gibi birbirine oldukça benzer morfolojik özelliklere sahip üyeler de bulunmaktadır. Bu sebeple *Aspergillus section Nigri* üyesi küflerin sınıflandırılması sürekli değişkenlik göstermektedir (Abarca ve diğ., 2004).

*Aspergillus* küfleri ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yasarlar. Uygun ortam koşullarında bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilmektedirler. Gelişme hızları çok yüksektir ve çok miktarda konidya üretirler, konidyaları gelişimlerini tamamladıklarında çevreye yayılırlar. Hava ile taşınan konidyalar genelde 2-5 µm çapındadırlar. Konidyalar tek hücreli, pürüzlü veya düz duvarlı, dikenli; pigmentli veya şeffaf olabilirler (Uçar, 2011). Birçok türleri konidyalar halinde yaşamakla birlikte kalıtım zinciri keşfedilemeyen birçoğu doğada mevcuttur. Üreme şekilleri homotalik ve heterotalik olarak ikiye ayrılmaktadır. Paraseksüel döngüye de *Aspergillus* türleri içinde rastlanmaktadır (Varga ve diğ, 2014).

*Aspergillus* küfleri yüksek hücre dışı enzim üretme kapasitesine sahip olmaları sebebiyle enzim üretme işlemlerinde en yaygın kullanılan küflerdir. Örneğin, bazı *Aspergillus* suşlarının 25 g/L' ye kadar glikoamilaz salgıladığı bildirilmektedir (Ahamed ve diğ, 2007). Hızlı gelişim ve pH toleransı gösterme, farklı substratta gelişebilme gibi özelliklere sahip *Aspergillus section Nigri* üyeleri, kahve, kakao, kuru meyveler, kabuklu yemişler, hububatlar ve taze meyvelerde (üzüm ve üzüm ürünleri) bulunmakta olup, hasat sonrasında ürünlerin kontamine olmalarına sebep olmaktadır (Nielsen ve diğ, 2009).

*Aspergillus niger*, ılıman iklim bölgelerinde, sıcak hava koşullarının hakim olduğu sahalarda yaygın olarak bulunmaktadır. *Aspergillus niger* kserofilik küf türü olup, minimum 6-8°C, maksimum 45-47°C ve optimum 35- 37°C ve 0,77 su aktivitesinde gelişim göstermektedir (Değirmenci, 2013; Duarte ve diğ., 2010). En yüksek hızda

gelişme gösteren türü *Aspergillus fumigatus*'tur ve 37°C'de çimlenme hızı 5-12 saatir (Uçar, 2011). Bu değerler substrat, izolat, ve coğrafi koşullar gibi parametrelere bağlı olarak farklılık oluşturabilmektedir (Değirmenci, 2013). Bazı *Aspergillus* türlerinin 37°C'de gelişmeme özelliği, suşun patojen olup olmadığını tespit etmek adına faydalıdır. Hastalık oluşturması ve patojen özellik göstermesi küfün gelişme hızı ile ilişkilidir (Uçar, 2011).

*Aspergillus* cinsi küfler, en sık görülen ve dünya çapında en çok bilinen küflerdir. Türleri ekonomik alanda oldukça önem taşımaktadır (Pitt ve Hocking, 2009). *Aspergillus section Nigri* grubu küfler, son yıllarda endüstriyel biyoteknoloji alanını, besin kaynaklarını kullanılabilir hale getirme ve gelişme koşullarını iyileştirme noktalarında ileriye taşımaktadır.

### **2.2.1 *Aspergillus section Nigri*'nin metabolitleri**

Siyah aspergilli (siyah sporlu küfler) olarak bilinen *Aspergillus niger* grubu ya da *Aspergillus section Nigri* üyeleri büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar için kullanılmakta ve dünya çapında yayılım göstermektedir. Yararlı birçok ürünün eldesinde ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Eltm ve Taşkın, 2005). Kullanıldığı diğer uygulamalara örnek olarak medikal alanda ksenobiotiklerin biyotransformasyonu, biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme) ve atık geri dönüşümü gösterilebilir (Pitt ve Hocking, 2009).

*Aspergillus niger* organik asit ve hücre dışı enzim üretimlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve birçok endüstri dalına ilham olmaktadır. Örneğin, sitrik asit üretiminde *Aspergillus niger* küfünün kullanılması yüksek oranda verim sağlayarak asit üreticilerinin ufkunu genişletmektedir (Brandl ve Andersen, 2015). Sitrik asit üretimi sayesinde gıda, kozmetik ve ecza bilimi alanlarında *Aspergillus section Nigri* türlerinden yararlanılmaktadır (Palencia ve diğ., 2010).

*Aspergillus section Nigri* üyeleri tarafından üretilen Penisilik asit de bu uygulamalara örnek olarak gösterilebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda penisilik asit ile okratoksin A arasında sinerjistik bir etki olduğu tespit edilmiştir. Penisilik asidin hem bakteri inhibisyonu sağlaması hem de antibiyotik özellik göstermesi ecza biliminde kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Nielsen ve diğ., 2009).

Lezzet ve bulanıklılık kontrolü sağlayan polifenolik bileşiklerden olan tanninler gıda endüstrisinde tannaz enzimi tarafından katalizlenmektedirler. LaraVictoriano ve diğerleri (2017) çalışmalarında tannaz enziminin *Aspergillussection Nigri* üyeleri tarafından sentezlendiklerini tespit etmişlerdir.

Bunlara ek olarak 1960'tan günümüze kadar gıda endüstrisinde sıkça kullanılan  $\alpha$ -amilazlar, selülazlar ve pektinazlar gibi enzimlerin üretilmesinde *Aspergillus niger* verimli bir kaynaktır (Nielsen ve diğ, 2009). Amilolitik enzimler (alfa amilaz, beta amilaz ve gluko amilaz) ve proteazlar (asit ve alkali proteazlar) mayalama, tekstil, kağıt, şeker, damıtma, gıda prosesleri, deterjan gibi birçok endüstri alanında kullanılan en önemli enzimlerdir (Negi ve Banerjee, 2010). Nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonunda kullanılan amilaz enzimleri gıda endüstrisi için büyük önem arz etmektedir. Yapılan çalışma neticesinde funguslarda *Aspergillus fumigatus*'un  $\alpha$ -amilaz üretiminde verimli olduğu tespit edilmiştir (Uçar, 2011).

Gıda endüstrisinin %25 lik kısmını oluşturmakta olan pektinazlar içecek ve şarap üretimi uygulamalarında berraklaştırma prosesi için temel rol oynamaktadırlar. Gıda proseslerinde meyve gelişiminde kullanılması nedeni ile önem taşıyan pektinolitik enzimlerden olan poligalakturonaz'ın *Aspergillusniger* tarafından üretilmesi Maciel ve diğ. (2013) tarafından incelenmiştir ve çalışma sonucunda verimli sonuçlar elde edilmiştir.

Birçok çeşitliliğe sahip biyoaktif komponentler siyah Aspergilli küfler tarafından üretilmekte ve endüstriye yeni doğal komponent keşifleri için ışık tutmaktadır. Tüm bunlara ek olarak biyosentetik kapasitelerinin geliştirilmesi ile gen dizilimi alanında erişilebilirlik sağlamaları söz konusu olarak düşünülmektedir (Brandl ve Andersen, 2015). Tüm bunların yanı sıra gıda ve yem takibinde kullanılan komponentlerin birçoğu (malforminler, kotaninler, naphtho- $\gamma$ -pyronlar) siyah Aspergilli tarafından üretilmektedir (De Rossi ve diğ, 2012; Spadaro ve diğ, 2010). *Aspergillus section Nigri* üyeleri biyoaktif birçok bileşik üretimlerinin yanında toksin gelişimi de göstermektedirler (Nielsen ve diğ, 2009).

### **2.2.2 Mikotoksin üretimi**

Mikotoksinler, küfler tarafından sentezlenen, hayvansal veya bitkisel kaynaklı ikincil metabolitler olup insan ve hayvan sağlığına zarar vermektedirler. İklimsel koşullara ve gıda üretim işlemlerine bağlı olarak mikotoksijenik küflerin yoğunluğu ve son

üründeki oluşumları farklılık göstermektedir (Mutlu-İngök ve Karbancıoğlu-Güler, 2015).

### 2.2.2.1 Okratoksin A

Okratoksin A (OTA), okratoksinler grubunun en toksik mikotoksinidir. Kristaller halinde toz bir bileşik olan OTA, renksizdir ve yüksek sıcaklıklarda dahi stabilitesini bozmamaktadır. Güneş ışığı ve ortam havasından kolay etkilenerek, bozunabilmektedir (Ünal, 2009).

*Aspergillus section Nigri* üyelerinden, *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus niger* OTA üretiminden sorumlu başlıca küflerden gösterilmektedirler (Hayat ve diğ., 2012). Bunların yanı sıra grup üyelerinden *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus* OTA üretiminde etkili olan küflerdir (Anlı ve Alkıs, 2010; Copetti ve diğ., 2013).

*Aspergillus niger* izolatlarının yalnızca düşük bir oranı OTA üretimi gösterebilmektedir (Ferranti ve diğ., 2017). OTA kontaminasyonundan başlıca sorumlu grup olarak *Aspergillus section Nigri* üyeleri gösterilmekte iken, bu grup üyelerinden olan *Aspergillus carbonarius* özellikle üzümde yüksek seviyelerde OTA üretimi göstermektedir (De Rossi ve diğ., 2012; Spadaro ve diğ., 2010).

Suşların OTA geliştirme özellikleri birbirinden farklılık göstermekte iken OTA gelişimi birden çok parametreye bağlıdır (Astoreca ve diğ., 2009). OTA oluşumu sıcaklık dalgalanmalarına, mekanik strese, substrat içeriğine bağlı olarak değişim göstermektedir (Ilic ve diğ., 2007). İklim özelliklerinin OTA gelişimi üzerine etkisinin üzüm bağlarında incelendiği bir çalışmada, sıcaklığın yüksek olduğu yıllarda *Aspergillus niger* küfünün daha çok oluşum gösterdiği fakat OTA oluşumunun yıllar arasında gözle görülür bir farklılığı olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada *Aspergillus carbonarius* küfünün *Aspergillus niger* küfünden daha baskın OTA üretimi gösterdiği tespit edilmiştir (Bejaoui ve diğ., 2006). *Aspergillus section Nigri* üyelerinden *Aspergillus niger* düşük düzeyler olan %6 ila %10 aralığında OTA üretim kapasitesine sahipken okratoksijenik *Aspergillus carbonarius* izolatlarının üretim oranı %25 ila %100 arasında değişim göstermektedir (Abarca ve diğ., 2004; Samson ve diğ., 2004). Tüm bunların yanı sıra *Aspergillus carbonarius* ile *Aspergillus niger* suşlarının gelişim hızları karşılaştırıldığında, doğada daha az rastlanan ve yüksek üretim seviyesi olan *Aspergillus carbonarius* grubunun OTA

gelişim hızının daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Belli ve diğ., 2004; Esteban ve diğ., 2006; Valero ve diğ., 2005). *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinde yüksek oranlarda OTA üreticileri bulunmasının yanı sıra grup üyelerinden *Aspergillus foetidus* ve *Aspergillus japonicus* türlerinin OTA üretmedikleri tespit edilmiştir (Samson ve diğ., 2004). OTA birçok türevi olmasına karşın en yaygın rastlanan metabolittir (Duarte ve diğ., 2010). 1969 yılında ilk defa OTA kontaminasyonu mısırdaki tespit edilmiştir (Shotwell ve diğ., 1969).

*Aspergillus niger* suşlarının kuru incir, üzüm, kuru üzüm, kırmızı şarap, kahve, mısır, yer fıstığı, mısır bazlı hayvan yemleri, buğday, kahve çekirdekleri, hurma ve kuru erik gibi birçok gıdada OTA kontaminasyonlarına neden olması, küflerin birçok sustratta gelişme özelliği gösterdiğine işaret etmektedir. Buna ilaveten şaraplarda şeker oranının artışı OTA konsantrasyonunu artırmaktadır. Üzümlerin OTA kontaminasyonuna uğraması sonucunda, şarap kontamine hale dönüşebilmektedir. Sıcaklık, nem ve depolama koşulları gibi çevresel faktörlerden etkilenen OTA konsantrasyonu genel olarak soğuk iklimlerden sıcak iklimlere doğru artış göstermektedir (Anlı ve Alkış, 2010; Meerdink, 2002; Siegel ve Babauscio, 2011).

OTA bağışıklık sistemine ve böbreklere zarar veren, gebelikte meydana gelen biçim bozukluklarına neden olabilen, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'na göre kanserojenik olarak tanımlanan bir mikotoksindir (Aish ve diğ., 2004; Barkai-Golan, 2008; Hassab, 2010; Khoury, 2010). Toksik etkileri oluşan mikotoksin dozuna göre değişmekte olup, düşük seviyeleri bağışıklık sistemine zarar verirken yüksek dozları akut toksisiteye (bir kimyasal maddenin bir kez veya kısa zaman diliminde genellikle birkaç kez alınmasından sonra zehirlenmeye neden olma gücü) veya ölüme sebebiyet verebilmektedir. Uzun süre düşük doz alımları ise tümör oluşumu, kanser veya kronik hastalıklara neden olmaktadır (Meerdink, 2002; Siegel ve Babauscio, 2011). OTA vücuttaki proteini inhibe ederek kanın pıhtılaşmasını önler, böylece vücudun savunma mekanizmasını çökertmiş olur (Gümüş, 2002).

İnsan ve hayvan sağlığının güvenliği konusunda ise Okratoksin A ve Fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) mikotoksinleri problem oluşturan bileşenlerdendir (De Rossi ve diğ., 2012; Spadaro ve diğ., 2010). Bunların yanı sıra BEN (Balkan Endemik Nefropati) adı verilen hastalığa neden olabileceği analiz edilmiştir (Nielsen ve diğ., 2009). BEN hastalığı görülen bölgelerdeki insanlardan alınan kan örneklerinin ve gıda örneklerinin yüksek derecede OTA içerdiği tespit edilmiştir (Hult ve diğ., 1982;

Vrabcheva ve diğ., 2000). 2006 yılında Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) tarafından yapılan araştırmalara göre haftalık tolere edilebilir (TWI) OTA 7 miktarı 120 ng/kg olarak belirlenmiştir (EFSA, 2006). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre "Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Belirlenmesi Hakkında Tebliğ" nde OTA için belirtilen limitler Avrupa Birliği Komisyon Direktifleri ile eşdeğerdir. GRAS (güvenilir olarak kabul edilen) grubunda yer *Aspergillus niger* suşları biyoteknolojik çalışmalarda toksik olarak kabul edilmemektedir.

Meydana gelen OTA kontaminasyonlarını analiz etmek için ince tabaka kromatografisi (TLC), floresans dedektörlü yüksek sıvı kromatografisi (HPLC), immunokimyasal yöntem (ELISA) ve kütle spektroskopisi (MS) metotları kullanılmaktadır (Meulenberg, 2012).

### **2.2.2.2 Fumonisin B<sub>2</sub>**

Fumonisinler çoğunlukla mısır ve mısır ürünlerinde bulunan, insan ve hayvan sağlığına zararlı etkileri olan miktoksinlerdir. Önceki çalışmalara bakıldığında fumonisin B<sub>2</sub> nin *Fusarium* türleri, özellikle *Fusarium verticillioides* ve *Fusarium proliferatum*, tarafından üretildikleri ve genellikle mısır ve mısır ürünlerinde buldukları rapor edilmekteydi (Ferranti ve diğ., 2017; Smith, 2012). İlk kez Gelderblom ve diğ. (1988)yaptıkları araştırmada Güney Afrika bölgesinde tüketilmekte olan mısırlarda *Fusarium verticillioides* küfü kaynaklı fumonisin B<sub>2</sub> tespit etmişlerdir. Frisvad ve diğ. (2007)'nin yaptıkları çalışma ilk kez göstermektedir ki, fumonisin B<sub>2</sub> ve B<sub>4</sub> *Aspergillus niger*'in ekstra tip kültürleri tarafından üretilmektedir (Daskaya, 2011; Frisvad ve diğ., 2007). *Aspergillus niger*'in şarap, üzüm, şıra ve kahvede FB<sub>2</sub> kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. *Aspergillus niger* küflerinin OTA ve FB<sub>2</sub> mikotoksinlerini ortak olarak üretebilen suşlarının olduğu tespit edilmiştir (Frisvad ve diğ., 2007; Logrieco ve diğ., 2009; Mogensen ve diğ., 2010). Fumonisin gelişimini destekleyici bileşenlere örnek olarak sakkaroz (çay şekeri), NaCl (sofra tuzu) ve gliserol verilebilmektedir (Frisvad ve diğ., 2007). Fumonisin mitotoksininin optimum 0,98-0,99 aw değerlerinde gelişim gösterdiği tespit edilmiştir (Mogensen ve diğ., 2010).

Aflatoksinlerden daha az toksik olan fumonisinlerin atlarda ölümcül hastalıklara, domuzlarda akciğer ödemine, insanlarda ise yemek borusu kanserine yol açma riski söz konusudur (Ferranti ve diğ., 2017). OTA'nın yanı sıra Fumonisin mikotoksini de



Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından kanserojenik (2B) olarak değerlendirilmektedir (Siegel ve Babauscio, 2011).





### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Kf İzolatları

Çalışmada kullanılan *Aspergillus section Nigri* üyesi küfler kuru incirden izole edilmiş ve daha önceki çalışmalarda okratoksin ve fumonisin üreticisi olmadığı belirlenmiştir (Karbancıoğlu-Güler, 2008; Daşkaya, 2011). İzolatların makroskobik ve moleküler identifikasyonları gerçekleştirilmiştir (Karbancıoğlu-Güler, 2008; Taşçı ađan, 2016). Çalışmada kullanılan küfler izelge 3.1’de verilmiştir. İzolatlar, malt extract agar (MEA, Merck, 1.05398) besiyerinde çoğaltılmış ve çalışmalarda kullanılmıştır. Stok kültürler kullanılmak üzere 4°C’de saklanmıştır.

**Çizelge 3. 1:** Çalışmada kullanılan küfler.

Kod	Kf Kodu*	İsimler*
BA-1	1Y1	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-2	7D1	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-3	59D2	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-4	9D4	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-5	12D10	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-6	8D5	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-8	104D3	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-9	Z2XE	<i>Aspergillus</i> spp.
BA-11	27D3	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-12	65D6	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-13	Z3XL	<i>Aspergillus</i> spp.
BA-14	2904X2	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-15	62M1	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-16	65D9	<i>Aspergillus carbonarius</i>
BA-17	0404M3	<i>Aspergillus foetidus</i>
BA-18	704D1	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-19	65X2	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-21	36D5	<i>Aspergillus niger</i> agg.
BA-22	58D2	<i>Aspergillus niger</i> agg.

\*Kod’lar ve kf isimleri Taşçı ađan (2016) çalışmasından alınmıştır.

### **3.2 *Aspergillus Nigri* Üyelerinin Proteaz ve Amilaz Üretme Potansiyellerinin Katı Besiyerinde İncelenmesi**

#### **3.2.1 Amilaz üretme potansiyelinin katı besiyerinde incelenmesi**

Potansiyel amilaz üretiminin belirlenmesi için hazırlanan besiyeri (g/L); 1,5 g yeast extract, 0,5 g pepton, 1,5 g sodyum klorür (Merck, S9888), 10 g nişasta (Merck, 101253), 15 g agar tartılıp, saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Ardından, 121°C de, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanmıştır. Steril ortamda petrilere dökülen amilaz besiyerlerine izolatlar tek nokta olarak inoküle edilmiştir. Petrilere 15°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 mL Lugol's çözeltisi damlatılarak çap ölçümleri yapılmıştır. Analizler üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2 Proteaz üretme potansiyelinin katı besiyerinde incelenmesi**

Potansiyel proteaz üretiminin belirlenmesi için hazırlanan besiyeri (g/L); 1 g yeast extract, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,05 g CaCl<sub>2</sub>• H<sub>2</sub>O, 5 g sodyum klorür (S9888), 1 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 18 g agar tartılarak 600 mL saf su eklenmiştir, diğer yandan 10 g süt tozu 400 mL saf su ilave edilerek karışımlar ayrı ayrı 121°C de, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanıp ardından karıştırılmıştır. Karışım steril ortamda petrilere dökülmüştür. Proteaz besiyerlerine izolatlar tek nokta olarak inoküle edilmiştir. Petrilere 15°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Analizler üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.3 Amilolitik Aktivite Tayini**

Potansiyel enzim üretimi bulgularına göre test edilen küflerin daha yüksek miktarda amilaz üreticisi olmaları nedeniyle çalışmanın devamında seçilen küflerin amilaz enzimi üretimine sıcaklık, süre ve substratın etkisinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.1 Küf süspansiyonunun hazırlanması**

Tween 80 çözeltisi içeren peptonlu su (g/L); 1 g pepton, 8,5 g sodyum klorür ve 1 g Tween 80 (Sigma, P47809) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmışlardır. 10'ar mL'lik tüplere dağıtılan karışım 121°C de, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanmıştır. Spor süspansiyonları, Tween 80 içeren peptonlu su ile spor

yoğunluğu  $10^7$  koloni/mL olacak şekilde Thoma lamı ile mikroskopta sayım yapılarak hazırlanmıştır.

### 3.3.2 Ekim ve inkübasyon

Amilaz aktivitesinin belirlenmesinde standart besiyeri (Tryptic SoyBroth) ve buğday kepeği ile hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. Besiyerlerinin formülasyonları Çizelge 3.2 ve 3.3’de verilmiştir. Çizelge 3.3’de gösterilen buğday kepeği besiyeri formülasyonu Negi ve Banerjee (2010) çalışmasına göre hazırlanmıştır. Besiyerleri  $121^{\circ}\text{C}$  de, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanmıştır. İnkübasyon sıcaklığına soğutulan 100 mL besiyerine aseptik koşullarda 4 mL küf süspansiyonları ilave edilerek  $15^{\circ}\text{C}$ ’de 4, 6, 8 ve 10 gün, 180 rpm’de inkübe edilmiştir. Çalışma, sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla  $15^{\circ}\text{C}$ ’de daha yüksek aktivite tespit edilen buğday kepeği besiyerinde  $25^{\circ}\text{C}$  ve  $35^{\circ}\text{C}$ ’de aynı inkübasyon süreleri ve çalkalama hızında tekrarlanmıştır.

**Çizelge 3. 2:** Standart besiyeri (TSB).

Bileşen	Miktar (g/L)
Tripton	17
Soya peptonu	3
Sodyum klorür	5,0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,5
Dekstroz	2,5

**Çizelge 3. 3:** Buğday Kepeği besiyeri (Negi ve Banerjee, 2010).

Bileşen	Miktar (g/L)
Buğday Kepeği	50
$\text{NaNO}_3$	2,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,5

Buğday taneleri endosperm, kepek, ve germ (ruşeym) olmak üzere üç ana kısımdan oluşmaktadır. Kepek, tanenin yaklaşık %14,5’lik kısmını oluşturur. Çoğunlukla öğütme sırasında uzaklaştırılıp yem olarak kullanılan kepek, buğday ununun tamamında bulunur (Karakoç, 2006). Buğday kepeğinin kimyasal bileşimi %42

çözünmeyen lif, %28 karbonhidrat,%15 protein, %5 toplam kül, %4 yağ, %2 çözünen lif ve %2 nemden oluşmaktadır. Buğday kepeğindeki başlıca protein glutendir. Gluten buğdaydaki proteinlerin %78-85'ni oluşturur ve öz olarak adlandırılmaktadır. Diğer proteinlerden albumin %6-12, globulin %5-14 oranında bulunmaktadır (Kömürcü,2005). Buğday kepeği *Aspergillus* küf izolatlarının amilaz enzimi üretimlerinde kullanılan en iyi substratlardandır (Negi ve Banerjee, 2010).

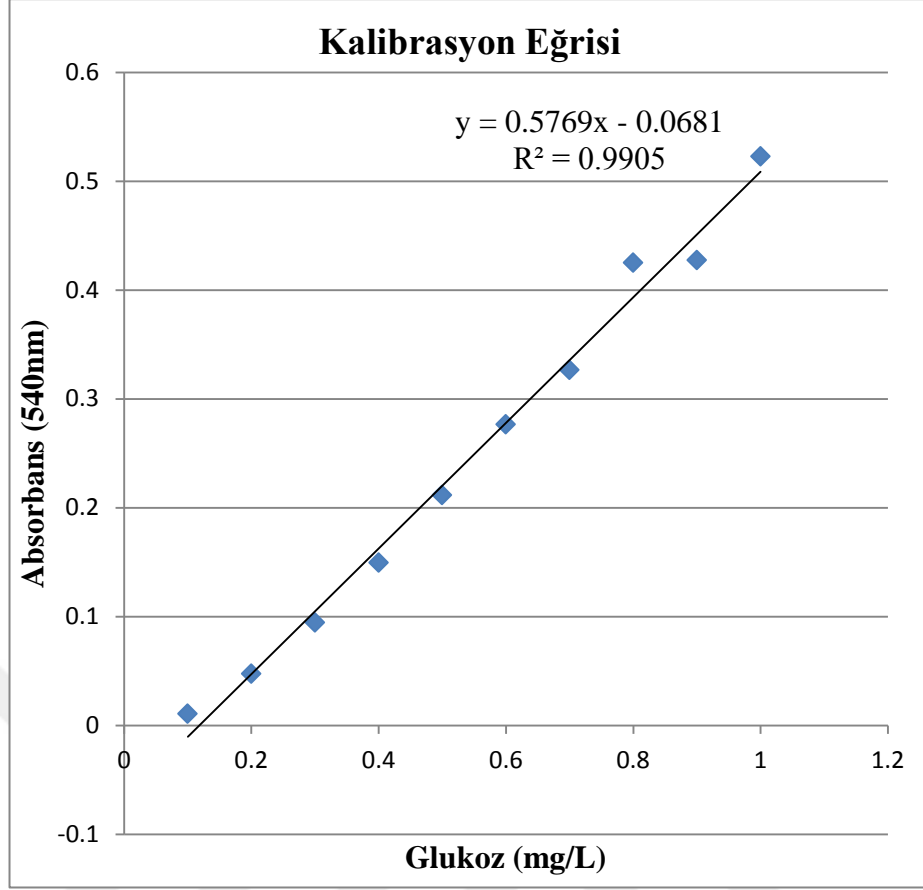
### 3.3.3 DNS metodu kullanılarak amilaz aktivitesinin belirlenmesi

Amilaz enzimi aktivitesi şekerin indirgenmesine dayalı yöntem olan DNS metodu ile tayin edilmiştir. Amilaz aktivitesi, amilaz enziminin dakikada ürettiği indirgen şekerin 1µmol glukoza eşdeğer kabul edilmesi ile hesaplanmıştır.

DNS çözeltisi 2,5 g dinitrosalisilik asit (Sigma, D0550) 50 mL 2N sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde (Merck, 106462) ve 75 g sodyum potasyum tartarat (Na-K-Tartrate) (Sigma, S2377) 125 mL saf suda ayrı ayrı çözülmüştür.İki çözelti karıştırılmış ve son hacim saf su ile 250 mL'ye ayarlanmıştır. Analizde, nişasta ve sitrat tamponu karışımı substrat olarak kullanılmıştır. 0,5 g çözünen nişasta 100 mL sitrat tamponu ile çözülmüştür. 50 mM sitrat tamponu, 0,7119 g sitrik asit ve 0,3807 g Na-sitrat•2H<sub>2</sub>O karışımının saf suda çözünmesi ile hazırlanmaktadır, ardından pH 3,5'e ayarlanır.

Kalibrasyon eğrisi (0-1 mg/mL) aralığında farklı konsantrasyonlara sahip (suda çözünen) glukoz solüsyonunun ölçülmesi ile elde edilmiştir. Farklı yoğunlukta olan glukoz çözeltilerinden 0,5 mL ve DNS reaktifinden 0,5 mL alınarak karışım 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Kaynamanın ardından hızlıca soğutulan karışımlara 4 mL saf su ilave edilmiştir. Ardından spektrofotometrik olarak mikro plak okuyucu (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) kullanılarak 540 nm dalgaboyunda absorbanları belirlenmiştir. Glukoz konsantrasyonu ve ölçülenabsorbanlar ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Eğri'nin eğimi hesaplanarak, elde edilen denklem hesaplamalar için kullanılmıştır.

Şekil 3.1. de kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir. Eğri denklemi; Absorbans= 0,5769Glucose-0,0681 şeklindedir.



Şekil 3. 1: Kalibrasyon eğrisi.

Örneklerde enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon sonunda erlen içeriği 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant enzim testlerinde kullanılmak üzere alınmıştır. Çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda substrat ve supernatant (enzim) alınmış, örnekler 10 dakika 15°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Örnekler reaksiyonu durdurmak için 0,5 mL DNS belirteci eklenerek, 15 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Soğutulan örneklere 4 mL saf su ilave edilmiştir. Ardından spektrofotometrik olarak mikro plak okuyucu (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) kullanılarak 540 nm dalgaboyunda absorbansları belirlenmiştir. Bir birim (U) enzim test edilen koşullarda substratı, 1 dakikada, 1  $\mu$ mol glukoza eşdeğer indirgen şekere dönüştüren enzim miktarıdır.

**Çizelge 3. 4:** Enzim aktivitesi için koşullar.

Reaksiyon	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tampon ( $\mu\text{L}$ )	Saf su ( $\mu\text{L}$ )
Kör değer	-	-	500	-
Enzim Substrat (ES)	50	250	-	200
Enzim Kör (EB)	50	-	250	200
Substrat Kör (SB)	-	250	250	-

### 3.3.4 İstatistiksel Analiz

Besiyerlerinin, inkübasyon sürelerinin ve sıcaklık değerlerinin amilaz enzim üretimine etkisi  $\alpha=0,05$  önem düzeyinde tek yollu ANOVA ile araştırılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır. İstatistiklerin oluşturulmasında SPSS (IBM SPSS STATICS 20) programı kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 *Aspergillus Section Nigri* Üyelerinin Proteaz ve Amilaz Üretme Potansiyellerinin Katı Besiyerinde İncelenmesi

#### 4.1.1 Amilaz üretme potansiyellerinin katı besiyerinde incelenmesi

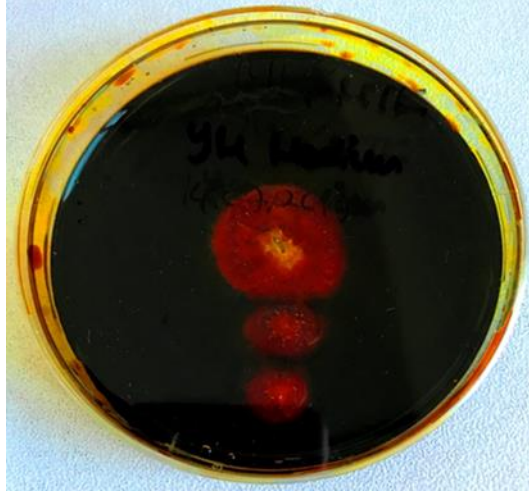
Nişasta besiyeri agar hazırlanarak küfler 15°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Gelişme sonucunda oluşturdukları zon çaplarına göre amilaz enzimi üretim potansiyelleri incelenmiştir. Çizelge 4.1’de küf izolatlarının amilaz enzimi hidroliz zonu ve koloni çapları gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 1:** Küf izolatlarının amilaz enzimi hidroliz zonu ve koloni çapları.

Kod	Koloni çapı, mm		Hidroliz çapı, mm		Fark, mm		*Dh/Dc	
	Ortalama	Std sapma	Ortalama	Std sapma	Ortalama	Std sapma	Ortalama	Std sapma
BA-1	9,00	1,00	23,00	1,00	14,00	0,00	2,55	0,50
BA-2	10,83	3,62	16,67	2,89	5,83	0,76	1,53	0,42
BA-3	10,17	3,06	16,33	3,40	6,17	1,61	1,60	2,22
BA-4	5,50	0,50	19,17	1,44	13,67	1,04	3,48	0,33
BA-5	8,00	1,80	14,17	1,04	6,17	0,76	1,77	1,48
BA-6	10,50	2,50	17,67	3,22	7,17	0,76	1,68	0,48
BA-8	8,67	2,17	18,83	2,71	10,17	1,04	2,17	0,70
BA-9	8,50	2,77	20,00	3,61	11,50	1,32	2,35	2,30
BA-11	8,83	2,88	20,33	2,37	11,50	0,50	2,30	2,21
BA-12	6,33	1,53	14,17	1,26	7,83	0,29	2,23	1,77
BA-13	6,00	2,29	11,17	2,02	5,17	0,29	1,86	1,66
BA-14	9,17	1,76	22,00	2,00	12,83	2,02	2,39	1,48
BA-15	5,67	2,75	15,83	2,75	10,17	1,04	2,79	1,52
BA-16	4,83	2,48	13,50	2,82	8,67	0,58	2,79	0,48
BA-17	8,83	2,36	22,33	2,31	13,50	0,50	2,52	0,77
BA-18	6,67	2,65	15,17	2,25	8,50	0,50	2,27	2,23
BA-19	10,83	3,56	23,33	2,02	12,50	0,50	2,15	2,26
BA-21	10,50	2,32	21,00	1,94	10,50	0,50	2,00	2,44
BA-22	12,50	1,32	23,33	1,57	10,83	1,53	1,86	1,63

\*Dh/Dc oranı, hidroliz çapı(mm) / koloni çapı(mm)’na eşdeğerdir.

Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te BA-1, BA-16 ve BA-17 küf izolatlarının katı besiyerinde potansiyel amilaz enzim üretimlerini gösteren hidroliz zonu oluşumları verilmiştir.



**Şekil 4. 1:** BA-1 küf izolatının amilaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.



**Şekil 4. 2:** BA-16 küf izolatının amilaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.



**Şekil 4. 3:** BA-17 küf izolatının amilaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.

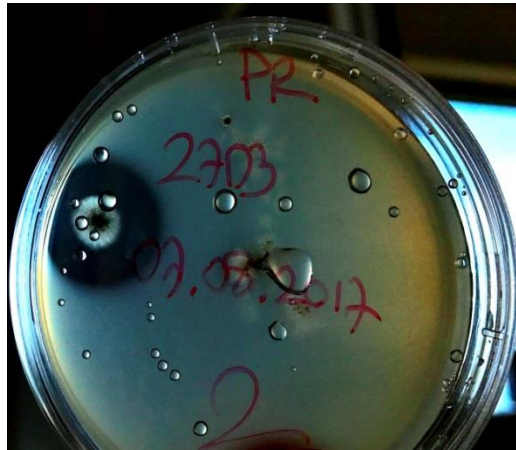
Potansiyel amilaz enzimi üretiminin incelenmesi sonucunda en fazla enzim üretimi gösteren 9 izolatın çap fark ortalamaları sırasıyla; BA-1 (14 mm), BA-4 (13,67 mm), BA-17 (13,50 mm), BA-14 (12,83 mm), BA-19 (12,50 mm), BA-9 (11,50 mm), BA-11 (11,50 mm), BA-22 (10,83 mm), BA-21 (10,50 mm) olduğu tespit edilmiştir. Topal ve diğerlerinin (2000) çalışmasında *Aspergillus* section *Nigri* izolatlarının 26°C’de 72 saat inkübe edildiklerinde oluşturdukları hidroliz zonu ile çap fark ortalamaları amilaz için 22 mm olarak tespit edilmiş olup gerçekleştirilen çalışmadan daha yüksek değerlerdir.

Dh / Dc oranı literatürdeki çalışmalarda küf izolatlarının katı besiyerinde enzim üretim potansiyellerini belirlemek amacıyla hesaplanmaktadır ve hidroliz çapı(mm) / koloni çapı(mm)’na eşdeğerdir. Küf izolatlarının amilaz enzimi üretim potansiyelleri incelendiğinde en yüksek oluşum gösteren küf izolatı BA-14, 3,48 değerinde Dh / Dc oranına sahiptir. Toscano ve diğerlerinin (2011) çalışmasında *Aspergillus niger* küf izolatının 30°C’de ürettiği en yüksek Dh / Dc oranı 3,7’dir ve bu değer çalışmadaki 3,48 değeri ile paraleldir.

#### 4.1.2 Proteaz üretme potansiyellerinin katı besiyerinde incelenmesi

Proteaz enzim üretiminin araştırılması için hazırlanan besiyeri kullanılarak küfler 15°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Gelişme sonucunda oluşturdukları zon çaplarına göre proteaz enzimi üretim potansiyelleri incelenmiştir. Çizelge 4.2’de küf izolatlarının proteaz enzimi hidroliz zonu ve koloni çapları gösterilmiştir.

Şekil 4.4 ve 4.5’te BA-11 ve BA-21 küf izolatlarının katı besiyerinde potansiyel proteaz enzim üretimlerini belirten hidroliz zon oluşumları gösterilmektedir.

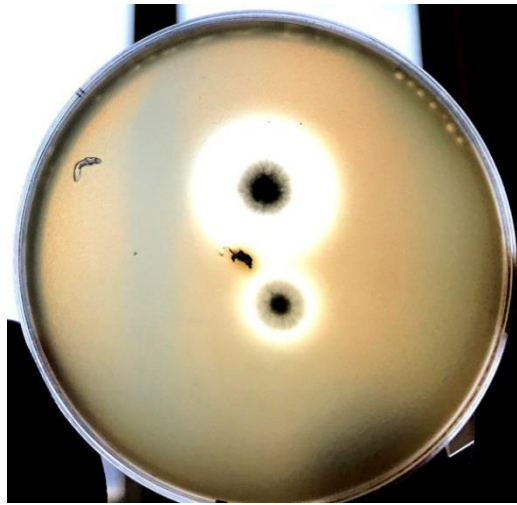


Şekil 4. 4: BA-11 küf izolatının proteaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.

**Çizelge 4. 2:** Küf izolatlarının proteaz enzimi hidroliz zonu ve koloni çapları.

Kod	Koloni Çapı, mm		Hidroliz Çapı, mm		Fark, mm		*Dh/Dc	
	Ortalama	Std sapma	Ortalama	Std sapma	Ortalama	Std sapma	Ortalama	Std sapma
BA-1	4,00	1,00	7,00	1,00	3,00	1,00	1,75	1,02
BA-2	6,17	1,26	9,00	1,50	2,83	1,53	1,45	1,40
BA-3	3,00	0,00	5,83	0,29	2,83	0,29	1,94	0,78
BA-4	---	---	---	---	---	---	---	---
BA-5	5,33	1,53	8,33	3,21	3,00	2,00	1,56	0,42
BA-6	7,00	1,00	11,33	1,15	4,33	2,08	1,61	0,98
BA-8	5,67	1,44	10,50	2,29	4,83	3,51	1,85	1,22
BA-9	---	---	---	---	---	---	---	---
BA-11	7,33	2,31	15,83	0,29	8,50	2,18	2,15	1,33
BA-12	10,50	2,29	17,67	2,08	7,17	1,26	1,68	2,58
BA-13	5,33	2,52	7,50	2,29	2,17	1,76	1,40	2,65
BA-14	3,67	1,79	12,00	2,36	8,33	3,51	3,26	1,47
BA-15	9,83	2,65	14,83	2,65	5,00	3,00	1,50	2,02
BA-16	5,50	1,80	7,83	1,76	2,33	1,53	1,42	1,77
BA-17	8,33	1,89	13,33	2,89	5,00	0,00	1,60	2,50
BA-18	6,33	0,58	12,33	0,58	6,00	1,00	1,94	2,11
BA-19	9,00	1,09	16,50	2,61	7,50	3,26	1,83	1,63
BA-21	10,67	2,80	21,50	2,00	10,83	2,78	2,01	1,88
BA-22	9,67	0,58	15,33	0,58	5,67	0,58	1,58	2,04

\*Dh/Dc oranı, hidroliz çapı(mm) / koloni çapı(mm)'na eşdeğerdir.



**Şekil 4. 5:** BA-21 küf izolatının proteaz enzimi üretme potansiyelini gösteren hidroliz zonu.

Potansiyel proteaz enzimi üretiminin incelenmesi sonucunda en fazla enzim üretimi gösteren 9 izolatin çap fark ortalamaları sırası ile; BA-21 (10,83 mm), BA-11 (8,50 mm), BA-14 (8,33 mm), BA-19 (7,50 mm), BA-12 (7,17 mm), BA-18 (6 mm), BA-22 (5,67 mm), BA-15 (5 mm) ve BA-17 (5 mm) olduğu tespit edilmiştir. Xu ve diğerlerinin (2011) çalışmasında *Aspergillus niger* küfünün proteaz üretme potansiyelinin incelenmiştir ve küfün ortalama enzim üretme potansiyeli 10 mm olarak tespit edilmiştir. Bu değerler çalışmadaki veriler ile paraleldir.

Küf izolatlarının proteaz oluşum potansiyellerini belirten Dh / Dc oranı en yüksek BA-14 küf izolatında tespit edilmiş olup 3,26'dır. Literatür araştırmasında proteaz ile ilgili Dh / Dc oranını veren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla beraber *Aspergillus section Nigri* küf izolatlarının pektinaz üretim potansiyellerinin incelendiği çalışmada en yüksek Dh / Dc oranı 3,5 olarak tespit edilmiş olup çalışmada elde edilen veriler ile eşdeğerdir (Taskin ve diğ., 2008).

Küf izolatlarının ortalama amilaz ve proteaz üretim potansiyelleri dikkate alınarak karşılaştırma yapıldığında BA-11, BA-14, BA-19 ve BA-21 izolatlarının diğerlerine oranlara daha yüksek enzim üretme potansiyeline sahip oldukları tespit edilmiştir. BA-11 izolatının amilaz enzimi üretme potansiyeli 11,50 mm iken proteaz enzimi üretme potansiyeli 8,50 mm'dir. BA-14 izolatının amilaz enzimi üretme potansiyeli 12,83 mm iken proteaz enzimi üretme potansiyeli 8,33 mm'dir. BA-19 izolatının amilaz enzimi üretme potansiyeli 12,50 mm iken proteaz enzimi üretme potansiyeli 7,50 mm'dir. BA-21 izolatının amilaz enzimi üretme potansiyeli 10,50 mm iken proteaz enzimi üretme potansiyeli 10,83 mm'dir. Proteaz ve amilaz enzim üretiminin katı besiyerinde gelişimi araştırıldığı diğer bir çalışmada, *Aspergillus section Nigri* izolatlarının 26°C'de 72 saat inkübe edildiklerinde oluşturdukları hidroliz zonu ile çap fark ortalamaları amilaz için 22 mm ve proteaz için 24 mm olarak tespit edilmiş olup gerçekleştirilen çalışmadan daha yüksek değerlerdir (Topal ve diğ., 2000). Bununla birlikte *Aspergillus niger* küfünün proteaz üretme potansiyelini gösteren hidroliz çapını gerçekleştirilen çalışma bulgularına benzer olduğu çalışmalar da mevcuttur (Xu ve diğ., 2011).

Karthic ve diğerlerinin (2014) *Aspergillus oryzae* küf izolatının proteaz üretme potansiyelini 35°C ve pH 6 inkübasyon şartlarında araştırdıkları çalışmada elde edilen en yüksek proteaz çap farkı 11,50 mm'dir. Çalışmada BA-21 küf izolatının 15°C inkübasyonu sonucunda proteaz enzimi üretme potansiyeli 10,83 mm olarak

elde edilmiştir ve bu çalışma verilerine paraleldir. Ayrıca yapılan çalışmada soğukta aktif enzim üretme potansiyelleri incelenmiştir. Literatürde *Aspergillus section Nigri*'ye benzer çalışmaya rastlanılmamıştır. Mayalarda veya bakterilerde soğukta aktif amilaz ve proteaz enzim üretim potansiyellerini inceleyen çalışmalara örnek olarak İslam ve diğerlerinin (2017) deri atıklarından elde edilen *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus subtilis* bakterilerinin amilaz üretim potansiyeli araştırmaları verilebilir. Çalışmada 37°C inkübasyon sonucunda incelenen bakterilerin ürettikleri ortalama amilaz hidroliz zonu 24,10 mm olarak tespit edilmiştir (İslam ve diğ., 2017). Elde edilen hidroliz zonu değeri, çalışma verilerine paraleldir. *Aspergillus section Nigri* izolatlarının incelendiği çalışmamızda elde edilen en yüksek amilaz enzim hidroliz zonu 23 mm olarak ölçülmüştür ve BA-1, BA-17, BA-19 ve BA-22 olmak üzere 4 farklı küf izolatında bu yüksek değer elde edilmiştir.

Küf izolatlarının amilaz ve proteaz enzimi üretme potansiyelleri incelendiğinde amilaz enzimi üretme potansiyellerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmada yüksek enzim üretme potansiyeline sahip BA-11, BA-14, BA-19, BA-21 4 küf izolatı seçilmiş olup, enzim üretme potansiyellerine besiyerinin etkisinin belirlenmesi amacı ile, 15°C'de farklı inkübasyon sürelerinde ve iki farklı besiyerinde amilaz enzim aktivitesi incelenmiştir.

#### 4.2 Amilolitik Aktivite Tayini

Amilaz ve proteaz üretme potansiyelleri karşılaştırılan küf izolatlarının içinden en yüksek potansiyellere sahip oldukları için seçilen 4 farklı küf izolatının (BA-11, BA-14, BA-19 ve BA-21) 15°C ve farklı inkübasyon sürelerinde, Buğday Kepeği (BK) besiyerinde oluşturdukları amilaz enzim aktivitesi değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmektedir.

**Çizelge 4. 3:** Küf izolatlarının 15°C ve farklı inkübasyon sürelerinde, BK besiyerinde ürettikleri amilaz enzim aktivite değerleri.

BK 15°C	6. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	8. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	10. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma
BA-11	0,354 <sup>c</sup>	0,006	1,332 <sup>a</sup>	0,020	0,408 <sup>b</sup>	0,000
BA-14	0,323 <sup>b</sup>	0,019	1,371 <sup>a</sup>	0,003	0,926 <sup>a</sup>	0,007
BA-19	0,367 <sup>b</sup>	0,000	0,854 <sup>a</sup>	0,011	0,370 <sup>b</sup>	0,056
BA-21	0,415 <sup>b</sup>	0,017	0,796 <sup>a</sup>	0,128	0,286 <sup>b</sup>	0,039

a,b,c : Her küf için aynı satırda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir (p>0,05).

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi Buğday Kepeği besiyerinde BA-11 (1,332 U/mL) ve BA-14 (1,371 U/mL) izolatlarının 8 gün inkübasyon sonucunda ürettikleri enzim aktiviteleri diğer günlere oranla artış göstermektedir.

4 farklı küf izolatının 15°C ve farklı günlerde, standart besiyerinde (TSB) geliştirdikleri enzim aktivite değerleri Çizelge 4.4’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4. 4:** Küf izolatlarının 15°C ve farklı inkübasyon sürelerinde, standart besiyerinde (TSB) ürettikleri amilaz enzim aktivite değerleri.

TSB 15°C	6. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	8. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	10. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma
BA-11	0,267 <sup>b</sup>	0,006	0,363 <sup>a</sup>	0,034	0,328 <sup>ab</sup>	0,048
BA-14	0,290 <sup>b</sup>	0,010	0,444 <sup>a</sup>	0,038	0,315 <sup>b</sup>	0,072
BA-19	0,318 <sup>b</sup>	0,000	0,351 <sup>b</sup>	0,028	0,434 <sup>a</sup>	0,058
BA-21	0,283 <sup>c</sup>	0,011	0,508 <sup>a</sup>	0,011	0,367 <sup>b</sup>	0,017

a,b,c : Her küf için aynı satırda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir (p>0,05).

Çizelge 4.4’de gösterildiği gibi standart besiyerinde BA-14 (0,444 U/mL) ve BA-21 (0,508 U/mL)’in 8 günlük inkübasyonları sonucundageliştirdikleri enzim aktiviteleri diğer günlere kıyasla yüksek ölçülmüştür.

Küf izolatlarının 15°C’de amilaz enzimi üretme analiz sonuçları incelendiğinde BK besiyerinde gelişen küflerin standart besiyerinde gelişen küflere kıyasla daha yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde tüm izolatlar için buğday kepeği ve standart besiyerinde amilaz aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05). 15°C’de Buğday Kepeği besiyerinde ölçülen en yüksek ortalama değer BA-14 (1,371 U/mL) iken, standart besiyerinde ölçülen en yüksek değer BA-21 (0,508 U/mL)’dir. Bu verilere dayanarak Buğday Kepeği besiyerinde enzim üretiminin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda 15°C sıcaklık düzeyinde 8 gün inkübasyon sonucunda analizi yapılan örneklerin 6. ve 10. günlere oranla daha yüksek aktivite değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Küf izolatlarının amilaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05). İzolatlar bazında inkübasyon süreleri arasındaki farklılıklar Çizelge 4.3 ve 4.4’de verilmiştir. Küf izolatları kendi içinde kıyaslanacak olursa, en

yüksek aktivite değerlerine sahip küflerin sırasıyla BA-14 (1,371 U/mL), BA-11 (1,332 U/mL), BA-19 (0,854 U/mL) ve son olarak BA-21 (0,796 U/mL) olduğu ve tüm izolatların en yüksek amilaz enzim aktivite değerlerini BK besiyerinde gösterdikleri tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde çalışmanın devamında 15°C’de en yüksek aktivite gösteren BA-14 ve BA-11 küf izolatlarına Buğday Kepeği besiyeri ve farklı inkübasyon sürelerinde, 25°C ve 35°C’lerde sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.5’de BA-11 küf izolatının BK besiyerinde, 15°C, 25°C ve 35°C’lerde 4,6, 8 ve 10 günlük inkübasyon sürelerinde amilaz aktivite değerleri gösterilmektedir.

**Çizelge 4. 5:** BA-11 küf izolatının BK besiyerinde, farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde amilaz aktivite değerleri.

BA-11	4. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	6. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	8. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	10. gün (U/mL) ortalama	Std. sapma
15°C	---	---	0,354	0,006	1,332	0,020	0,408	0,000
25°C	1,072	0,011	1,204	0,011	1,807	0,080	0,666	0,013
35°C	1,266	0,007	2,213	0,051	1,462	0,046	1,511	0,013

Sıcaklık ve inkübasyon süresinin BA-11 izolatının amilaz üretimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Küf izolatlarında 15°C ve 4 gün inkübasyonda enzim üretimi belirlenmediği için, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da değerlere yer verilmemiştir. BA-11 küf izolatının 25°C’de 4,6,8 ve 10 günlük inkübasyonları neticesinde amilaz enzim aktivite sonuçları incelendiğinde 8 günlük inkübasyonu sonunda ürettiği enzim aktivitesinin (1,807 U/mL) diğer günlere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. BA-11 küf izolatının 35°C’deki amilaz enzim aktivite değerleri incelendiğinde ise 6 gün sonunda analiz edilen örneklerin amilaz aktivite değerlerinin diğer günlere oranla (2,213 U/mL) daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6’da ise BA-14 küf izolatının BK besiyerinde, 15°C, 25°C ve 35°C’lerde 4,6,8 ve 10 günlük inkübasyon sürelerinde amilaz aktivite değerleri gösterilmektedir.



**Çizelge 4. 6:** BA-14 küf izolatının BK besiyerinde, farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde amilaz aktivite değerleri.

BA-14	4. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	6. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	8. Gün (U/mL) ortalama	Std. sapma	10. gün (U/mL) ortalama	Std. sapma
15°C	---	---	0,323	0,019	1,371	0,003	0,926	0,007
25°C	1,880	0,063	2,342	0,022	2,587	0,034	1,527	0,052
35°C	0,973	0,040	2,690	0,012	1,938	0,035	2,176	0,006

Sıcaklık ve inkübasyon süresinin BA-14 izolatının amilaz üretimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). BA-14 küf izolatının 25°C’de 4,6,8 ve 10. gün inkübasyonları neticesindeki amilaz enzim aktivite sonuçları incelendiğinde 8. gün gösterdiği aktivite değerinin (2,587 U/mL) diğer günlere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 35°C’deki değerler incelendiğinde ise 6.gün analiz edilen örneklerin amilaz aktivite değerlerinin (2,690 U/mL) en yüksek olduğu belirlenmiştir. 25°C ve 35°C’lerdeki tüm değerler incelendiğinde küf izolatlarının 25°C’de 8 gün inkübasyon sonunda yüksek enzim aktivitesi gösterdikleri, 35°C’de ise 6 gün inkübasyon sonunda yüksek enzim aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir.

Çalışmada ayrıca enzimatik reaksiyon sıcaklığının aktiviteye etkisi incelenmiştir. Gerçekleştirilen analizlerde enzimatik reaksiyonlar 15°C’de gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde amilaz aktivitesinin testi için yaygın olarak kullanılan 50°C’de 10 dakika enzimatik reaksiyon gerçekleştirilerek de amilaz aktivitesi ölçülmüştür. 25°C’de 4 gün inkübasyona bırakılan BA-11 küf izolatı süpernatantı ile 0,305 U/mL amilaz aktivitesi elde edilmiş olup, aynı süpernatant ile 15°C’de 10 dakika enzim reaksiyonu gerçekleştirilen örneklere (1,072 U/mL) kıyasla düşük aktivite değerindedir. Bnezer olarak 35°C’de 4 gün inkübe edilen BA-14 küf izolatı süpernatantı ile 50°C’de 10 dakika enzim reaksiyonu gerçekleştirilerek, amilaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu değer 0,548 U/mL elde edilmiş olup, 15°C’de 10 dakika enzim reaksiyonu gerçekleşen örneklere (0,973 U/mL) kıyasla düşük aktivite değerindedir.

Yapılan çalışmaların birçoğunda *Aspergillus section Nigri* izolatlarının amilaz ve proteaz üretme potansiyelleri 25°C ila 35°C sıcaklık aralıklarında incelenmiştir (Irfan

ve diğ., 2012; Gupta ve diğ., 2003). Çalışma sonuçlarına göre küf kaynaklarından amilaz enzimi üretiminde kullanılan mikroorganizmaların optimum enzim üretme sıcaklığı 28-32°C aralığının üzerindedir (Velioğlu ve Çelikyurt, 2016). Negi ve Banerjee (2010) *Aspergillus section Nigri* üyeleri üzerinde yaptıkları çalışmada optimum amilaz ve proteaz enzimi gelişme sıcaklığının 35-37°C olduğunu tespit etmişlerdir.

Literatür araştırmalarında gerçekleştirilen çalışmaya göre genellikle daha yüksek enzim aktivite değerleri elde edilmiş olup bu çalışmalar çoğunlukla mezofilik enzimler üzerinedir. Nithya ve diğerleri (2016) *Bacillus licheniformis* KSU-6 suşunun amilaz enzim üretme potansiyelini 37°C'de inkübasyonu neticesinde maksimum amilaz enzim üretimini 37,52 U/mL olarak tespit etmişlerdir. Velioğlu ve Çelikyurt'un (2016) çalışmalarında elde edilen sonuçlar incelendiğinde *Aspergillus section Nigri* izolatlarının en yüksek amilaz enzim aktivite değerine sıcaklık 33,27°C ve inkübasyon süresi 105 saat iken 11,81 U/mL değeri ile ulaşıldığı tespit edilmiştir. Singh ve diğerlerinin (2015) inceledikleri *Aspergillus niger* küfünün 50°C ve pH3 inkübasyon şartlarında amilaz üretimi 9,96 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Bununla birlikte literatür çalışmalarında bu çalışma bulgularına yakın değerler de rapor edilmiştir. Örneğin buğday kepeği besiyerinde amilaz enzim üretimini inceleyen Irfan ve diğerleri (2012) 30°C ve 96 saat süren inkübasyon sonucunda, optimum *Aspergillus niger* küfünün enzim üretim değerini 3,2 U/mL olarak belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada Acourene ve Ammouche (2012) *Aspergillus niger* küfünün 30°C'de 96 saat inkübasyonu sonucunda etanol, sitrik asit ve amilaz enzimi üretimi optimizasyonunu inceledikleri çalışmada, optimum amilaz üretimi 5 U/mL olarak belirlenmiştir. Ghazi-Birjandi ve diğerlerinin (2016) *Pedobacter* sp. BTR84 suşunun amilaz üretim özelliklerini inceledikleri çalışmada optimum enzim üretim değeri 2,2 U/mL olarak tespit edilmiştir. İslam ve diğerleri (2016) araştırmalarında *Bacillus amyloliquefaciens* suşunun amilaz enzim üretme potansiyelini incelemişlerdir ve 37°C'de inkübasyonu sonucunda optimum 2,13 U/mL değerini elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada da 35°C'de 6 gün inkübasyon sonucunda elde edilen maksimum değer 2,690 U/mL'dir. Bu değer Ghazi-Birjandi ve diğerleri (2016), Irfan ve diğerleri (2012), Acourene & Ammouche (2012) ve İslam ve diğerleri (2016) çalışmalarında belirlenen değerlere yakındır ve optimizasyon çalışmalarını daha yüksek enzim aktivitesi eldesi mümkün olabilir.

Bu çalışmada kullanılan *Aspergillus section Nigri* izolatlarının pektinaz aktivitelerinin incelendiği çalışmada kullanılan küf suşlarının pektinolitik aktivite değerleri 12°C inkübasyon sonucunda maksimum aktivite değeri 4,19 U/mL olarak ölçülmüştür (Taşçı Çağan, 2016).Çalışmada kullanılan *Aspergillus section Nigri* üyesi küflerin amilaz üretme potansiyellerinin pektinaz üretme potansiyellerine oranla daha düşük oldukları tespit edilmiştir.





## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada farklı bölgelerdeki kuru incirlerden izole edilmiş *Aspergillus* section *Nigri* üyesi küflerin soğuk ortamda amilaz ve proteaz enzim üretme potansiyelleri belirlenerek, soğuk ve mezofilik ortamda amilaz enzimi üretimleri incelenmiştir. Küf izolatlarının soğuk sıcaklıklarda enzim üretme potansiyelleri, oluşturdukları aydınlık alanın milimetrik ölçümü ile tespit edilmiştir. İzolatların 15°C'de 7 gün inkübasyonları sonucunda nişasta içeren besiyerinde amilaz enzimi, süt tozu içeren besiyerinde ise proteaz enzimi taraması yapılmıştır. Ortalama enzim üretme potansiyeli en yüksek olan 4 küf izolatı; BA-11, BA-14, BA-19 ve BA-21 çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Deneyin ikinci aşamasında küflerin soğukta aktif enzim üretme özelliklerini tespit etmek amacı ile standart besiyeri ve buğday kepeği besiyeri kullanılmış, küf izolatlarının 15°C'de 4,6, 8 ve 10 günlük inkübasyonları sonucundaki enzim aktiviteleri incelenmiştir. Amilaz aktivitesi, amilaz enziminin dakikada ürettiği indirgen şekerin 1µmol glukoza eşdeğer kabul edilmesi ile hesaplanmıştır. Küf izolatlarının amilaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). 15°C'de iki farklı besiyerinde enzim aktiviteleri incelenen küflerden BA-14 küf izolatı buğday kepeği besiyerinde, 8 gün inkübasyonu sonucunda 1,371 U/mL ile en yüksek aktiviteyi üretmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde tüm izolatlar için buğday kepeği ve standart besiyerinde amilaz aktiviteleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

15°C'de iki farklı besiyerlerinde inkübasyonları sonucundaki enzim üretimleri incelenen küf izolatlarının içerisinde en yüksek aktivite üreten BA-11 ve BA-14'tür. Son aşamada ise bu izolatların, buğday kepeği besiyerinde, 25°C ve 35°C'lerde, 4,6,8 ve 10 günlük inkübasyonları sonucundaki enzim aktivite değerleri araştırılmıştır. Sıcaklık ve inkübasyon süresinin BA-11 ve BA-14 izolatlarının amilaz üretimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Elde edilen veriler

doğrultusunda küf izolatlarının ürettiği en yüksek amilaz aktivite değeri, BA-14 izolatının 35°C’de 6 gün inkübasyonu sonucunda ölçülen 2,690 U/mL’dir.

Amilaz enzim üretiminin ilk aşaması olan çalışmanın amacı amilazın soğukta enzim aktivitesini incelemektir. Bu çalışma sonucunda *Aspergillus section Nigri* izolatlarının soğukta aktif amilaz enzim üretimi gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir.

İleriki çalışmalarda *Aspergillus section Nigri*’nin üretim ortamının optimizasyonunun (azot ve karbon kaynakları) yapılarak endüstriyel açıdan değerlendirilebilir ve ekonomik anlamda enzim pazarına katkı sağlanabilir. Elde edilen enzim özellikle soğukta aktif olması sebebi ile deterjan endüstrisinde kullanılabilir.

Ayrıca test edilen izolatların birden fazla enzim üretme potansiyeline sahip olması bu izolatların çoklu enzim üretimi ile atıkların parçalanması gibi işlemlerde de kullanımına imkan tanıyacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., & Cabañes, F. J.** (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli, *Antonie van Leeuwenhoek*, 86 (1), 33-49.
- Acourene, S., & Ammouche, A.** (2012). Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39 (5), 759-766.
- Ahamed, A., Singh, A., & Ward, O. P.** (2007). Chymostatin can combine with pepstatin to eliminate extracellular protease activity in cultures of *Aspergillus niger* NRRL-3, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34 (2), 165-169.
- Aish, J. L., Rippon, E. H., Barlow, T., & Hattersley, S. J.** (2004). Ochratoxin A. In N. Magan, M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in food: Detection and control* (pp.307–38). Boca Raton: CRC Press.
- Anlı E. & Alkış M. İ.** (2010). Ochratoxin A and brewing technology: A review, *Journal of The Institute of Brewing*, 116 (1), 27.
- Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., & Dalcero, A.** (2009). Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and OTA production by *Aspergillus niger* agg. strains on irradiated corn grains, *International Journal of Food Microbiology*, 129, 174-179.
- Barkai-Golan, R.,** (2008). *Aspergillus* Mycotoxins. In R. Barkai-Golan, N. Paster (Eds.), *Mycotoxins in fruits and vegetables* (pp.115-152). USA: Academic Press.
- Barredo, J. L.** (2005). *Microbial enzymes and Biotransformations*. Human Press: New York.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A.** (2006). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards, *International Journal of Food Microbiology*, 111, 46-52.
- Belli, N., Marin, S., Sanchis V. & Ramos, A. J.** (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes, *International Journal of Food Microbiology*, 96,19-27.
- Bhatti, H. N., Rashid, M. H., Nawaz, R., Asgher, M., Perveen, R., & Jabbar, A.** (2007). Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusarium solani*, *Food Chemistry*, 103, 338-343.
- Brandl, J., & Andersen, M. R.** (2015). Current state of genome-scale modeling in filamentous fungi, *Biotechnology Letters*, 37 (6), 1131-1139.

- Cabeza, M. S., Baca, F. L., Muñoz Puentes, E., Loto, F., Baigorí, M. D., & Morata, V. I.** (2011). Selection of psychrotolerant microorganisms producing cold-active pectinases for biotechnological processes at low temperature, *Food Technology and Biotechnology*, 49 (2), 187-195.
- Cherry, H. M., Hossain, T., & Anwar, M. N.** (2004). Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (11), 1988-1992.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Nester, M. A., Efraim, P. & Taniwaki, M. H.** (2013). Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture, *Food Chemistry*, 136,100-104.
- Daşkaya, C.** (2011). *Aspergillus section Nigri üyelerinin fumonisin oluşturma potansiyelleri ve pozitif suşların okratoksin A üretim özelliklerinin incelenmesi* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Değirmenci, C.** (2013). *Kırmızı şarapta okratoksin A ve fumonisin B<sub>2</sub> varlığının incelenmesi* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- De Rossi, P., Ricelli, A., Reverberi, M., Bello, C., Fabbri, A. A., Fanelli, C., ... & Nicoletti, I.** (2012). Grape variety related trans-resveratrol induction affects *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A biosynthesis, *International Journal of Food Microbiology*, 156 (2), 127-32.
- Dönmez, S.** (1986). Gıda sanayiinde kullanılan enzimler ve ülkemizdeki durumu, *Gıda*, 11, 4.
- Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M.** (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products, *Food Microbiology*, 27 (2), 187–198.
- Efsa,** (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin a in food, *The Efsa Journal*, 365, 1-56.
- Eksi, A.** (1998). Meyve suyu durultma tekniği, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 9, 127.
- Elgün, A., & Ertugay, Z.** (1995). *Tahıl İşleme Teknolojisi*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Eltem, R., Taşkın, E.** (2005). *Aspergillus section Nigri'nin Filogenetik Taksonomisi, Türkiye'de Mikotoksin Çalışmaları*. In Heperkan, D., Kaya, G. D., Güler, F. K. (Eds.), *II Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı*, 48-54.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. & Cabanes, F. J.** (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*, *Food Microbiology*, 23, 634–640.



- Ferranti, L. S., Correa, B., Fungaro, M. H. P., Iamanaka, B. T., Massi, F. P., Phippen, C. B., ... & Taniwaki, M. H.** (2017). Occurrence and fumonisin B<sub>2</sub> producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts, *Mycotoxin research*, 33 (1), 49-58.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., Thrane, U.** (2007) Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 55, 9727–9732.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. H. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggar, R. & Kriek, N. P. J.** (1988). Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1806-1811.
- Ghazi-Birjandi, R., Shahnava, B., & Mahjoubin-Tehran, M.** (2016). Optimization for high level expression of cold and pH tolerant amylase in a newly isolated *Pedobacter* sp. through response surface methodology, *Progress in Biological Sciences*, 6, 139-150.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., & Chauhan B.** (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616.
- Gümüş, T.** (2002). *Arpa, malt ve birada okratoksin A (OTA) varlığı ve bira üretimi sırasında OTA'nın maya tarafından parçalanması.* (Doktora tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., & Gharsallah, N.** (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1, *Process Biochemistry*, 42 (5), 791-797.
- Hassan, Z., Khan M., Khan A., & Javed, I.** (2010). Pathological responses of white leghorn breeder hens kept on ochratoxin A contaminated feed, *Pakistan Veterinary Journal*, 30(2), 118-123.
- Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty J. & Barthelmebs, L.** (2012). Recent advances in ochratoxin A producing fungi detection based on PCR methods and OTA analysis in food matrices, *Food Control*, 26, 401-415.
- Hult, K., Plestina, R., Habazin-Novak, V., Radic, B. & Ceovic, S.** (1982). Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy, *Archives of Toxicology*, 51, 313-321.
- Ilic, Z., Bui, T., Tran-Dinh, N., Dang, M. N. V., Kennedy, I., & Carter, D.** (2007). Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxigenic *Aspergilli*, *Mycopathologia*, 163, 177-182.
- Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q.** (2012). Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains, *Journal of Cell & Molecular Biology*, 10 (1).

- Islam, M. R., Mondol, O. K., Rahman, M. S., Billah, M. M., Rahman, M. S., & Zohora, U. S.** (2017). Screening of  $\alpha$ -amylase producing bacteria from tannery wastes of Hazaribag, Bangladesh, *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 5 (2), 1-10.
- Karakoç, D. S.** (2006). *Küflerden katı faz fermantasyon yöntemi ile lipaz üretimi*(Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Karbancıoğlu-Güler, F.** (2008). *İncirde okratoksin A ve fumonisin oluşumunun incelenmesi* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Karthic, J., Siddalingeshwara, K. G., SunilDutt, P. L. N. S. N., Pramod, T., & Vishwanatha, T.** (2014). An approach isolation, screening and production of protease from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4 (2), 86-89.
- Khoury, A. E., & Atoui, A.** (2010). Ochratoxin A : General overview and actual molecular status, *Toxins*, 2 (4), 461-493.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., & Dostbil, N.** (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜFen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12-19.
- Koç, Ö. &Metin, K.** (2010). Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by *Aspergillus flavus* HBF34, *African Journal of Biotechnology*, 9 (23), 3414-3424.
- Koç, Ö.** (2015). *Aspergillus fumigatus HBF125 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu*. (Doktora tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Kömürcü, İ.S.**(2005). *Farklı hububat kepeklerinin ekmek kalitesine etkileri* (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kurakake, M., Ueki, M., Hashimoto, S. & Komaki, T.** (1997). Adsorption of  $\alpha$ -amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin, *Carbohydrate Polymers*, 34, 55-59.
- Lara-Victoriano, F., Veana, F., Hernández-Castillo, F. D., Aguilar, C. N., Reyes-Valdés, M. H., & Rodríguez-Herrera, R.** (2017). Variability among strains of *Aspergillus* section *Nigri* with capacity to degrade tannic acid isolated from extreme environments, *Archives of microbiology*, 199 (1), 77-84.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., & Ritieni, A.** (2009). Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must, *Food Additives and Contaminants*, 26 (11), 1495-1500.
- Maciel, M., Ottoni, C., Santos, C., Lima, N., Moreira, K., & Souza-Motta, C.** (2013). Production of polygalacturonases by *Aspergillus* section *Nigri* strains in a fixed bed reactor, *Molecules*, 18 (2), 1660-1671.
- Meerdink, G. L.** (2002). Mycotoxins, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 1,89-93.

- Meulenberg, E. L.** (2012). Immunochemical methods for ochratoxin A detection: A review, *Toxins*, 4, 244-266.
- Mojsov, K.** (2012). Microbial  $\alpha$ -amylases and their industrial applications: A review, *International Journal of Management, IT and Engineering*, 2 (10), 583-609.
- Mogensen, M. F., Frisvad, J. C., Thrane, U., & Nielsen, K. F.** (2010). Production of fumonisin B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* on grapes and raisins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 954-958.
- Mukhtar, H.** (2009). Production of acid protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation, *Pakistan Journal of Zoology*, 41 (4).
- Mutlu-İngök, A., & Karbancıoğlu-Güler, H. F.** (2015). Sıcaklığın *Aspergillus* section *Nigri* üyelerinin okratoksin A oluşturma üzerine etkisinin incelenmesi, *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1).
- Naidu M. A., & Saranraj P.** (2013). Bacterial amylase: A review, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 4 (2), 274-287.
- Negi, S., & Banerjee, R.** (2010). Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation, *African Journal of Biochemistry Research*, 4 (3), 73-80.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M.** (2004). Enzymes, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 190-249.
- Nguyen Q. D., Rezessy-Szabó J. M., Claeysens M., Stals I., & Hoschke Á.** (2002). Purification and characterisation of amyolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 345-352.
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C.** (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1225-1242.
- Nielsen, J. E., & Borchert, T. V.** (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 253-274.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Dhanasekaran, D., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., & Thajuddin, N.** (2016). Production, optimization and partial characterization of thermostable and alkaline amylase from *Bacillus licheniformis* KSU-6, *International Journal of Agriculture & Biology*, 18 (6).
- Norouzzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M., & Young, M. M.** (2006). Fungal glucoamylases, *Biotechnology Advances*, 24, 80-85.
- Novic, S. J., Rozzel, J. D., & Barredo, J. L.** (2005). Methods in biotechnology, *Microbial Enzymes and Biotransformations*, 17, 256-257.
- Palencia, E. R., Hinton, D. M., & Bacon, C. W.** (2010) The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production, *Toxins*, 1, 399-416.

- Pandey, A., Nigman, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. & Mohan, R.** (2000). Advances in microbial amylases, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D.** (2009). *Fungi and Food Spoilage*. New York: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Radha, S., Nithya, V. J., Babu, R. H., Sridevi, A., Prasad, N. B. L., & Narasimha, G.** (2011). Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. *Archives of Applied Science Research*, 3 (2), 155-163.
- Rajagopalan, G., & Krishnan, C.** (2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate, *Bioresource Technology*, 99, 3044–3050.
- Ramya, L. N., & Pulicherla, K. K.** (2015). Molecular insights into cold active polygalacturonase enzyme for its potential application in food processing, *Journal of food science and technology*, 52 (9), 5484-5496.
- Reddy N. S., Nimmagadda A., & Sambasiva Rao K. R. S.** (2003). An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family, *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 645-648.
- Samson, R. A., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, M. & Frisvad, J. C.,** (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*, *Studies in Mycology*, 50, 45-61.
- Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., & Goulden, M. L.** (1969). Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample, *Applied Microbiology*, 17 (5), 765.
- Siegel, D. & Babuscio, T.** (2011). Mycotoxin management in the European cereal trading sector, *Food Control*, 22,1145-1153.
- Singh, S., Gupta, N., Kaur, J., & Gupta, A.** (2015). Valorization of sal deoiled cake as media for acidic amylase and invertase co-production by *Aspergillus niger* nj-1: Optimization by response surface methodology and application in oligosaccharide synthesis, *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (6), 2548-2561.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. & Pandey, A.** (2006).  $\alpha$ -amylases from microbial sources, *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 173-184.
- Smith, G.W.** (2012). Fumonisin, *Veterinary Toxicology*, 1206-1219.
- Spadaro, D., Patharajan, S., Lore, A., Gullino, M. L., & Garibaldi, A.** (2010) Effect of pH, water activity and temperature on the growth and accumulation of ochratoxin A produced by three strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Italian vineyards, *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 65–73.
- Sunna, A., Moracci, M., Rossi, M., & Antranikian, G.** (1997). Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles, *Extremophiles*, 1, 2-13.

- Sümengen, M., Dinçer, S., & Ünal, M. Ü.** (2016). *Bacillus subtilis* kullanılarak atık ekmeklerden alkali proteaz ve biyosülfektan üretimi, *Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 34 (6), 70-79.
- Tanrıseven, A., Uludağ, Y. B., & Doğan, S.** (2002). A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce from maltodextrin, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 406-409.
- Tanyildizi, M. S., Ozer, D., & Elibol, M.** (2005). Optimization of  $\alpha$ -amilaz production by *Bacillus* sp. using response surface methodology, *Process Biochemistry*, 40, 2291-2296.
- Taskin, E., Eltem, R., Da Silva, E. S., & De Souza, J. V. B.** (2008). Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production, *J Food Agric Environ*, 6, 5-7.
- Taşcı Çağan, T.** (2016). *Aspergillus section Nigri* üyelerinin pektinaz üretme potansiyellerinin incelenmesi ve moleküler karakterizasyonları (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., & Çeltik, Ö.** (2000). Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: Amilaz, proteaz, lipaz, *Turk J Biol*, 24, 79-93.
- Toscano, L., Gochev, V., Montero, G., & Stoytcheva, M.** (2011). Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 2243-2247.
- Uçar, A.** (2011). *Aspergillus* sp. tarafından üretilen amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Yüksek lisans tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Ünal, A.** (2009). Kuru üzüm ve ürünlerinde okratoksin A varlığının araştırılması. (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Valero, A., Marin, S., Ramos, A. J. & Sanchis, V.** (2005). Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors, *Letters in Applied Microbiology*, 41, 196-201.
- Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L.** (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Varga, J., Szigeti, G., Baranyi, N., Kocsubé, S., O'Gorman, C. M., & Dyer, P. S.** (2014). *Aspergillus*: sex and recombination, *Mycopathologia*, 178 (5-6), 349-362.
- Velioglu, H. M., & Çelikyurt, G.** (2016). Farklı tarım artığı ürünlerden fungal ve bakteriyel  $\alpha$ -amilaz enzimi üretiminin optimizasyonu, *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13 (1).

- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R. & Martlbauer, E.** (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (6), 2483-2488.
- Xu, D., Pan, L., Zhao, H., Zhao, M., Sun, J., & Liu, D.** (2011). Breeding and identification of novel koji molds with high activity of acid protease by genome recombination between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (9), 1255-1265.



## **EKLER**

**EK A:** Çizelgeler.



**EK A****Çizelge A. 1 :** BA11'in amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	1,815	2	0,908	6640	0,000
Hata	0,001	6	0,000		
Toplam	1,816	8			

**Çizelge A. 2 :** BA11'in amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,014	2	0,007	6,172	0,035
Hata	0,007	6	0,001		
Toplam	0,021	8			

**Çizelge A. 3 :** BA14'ün amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	2,020	2	1,010	27,498	0,001
Hata	0,220	6	0,037		
Toplam	2,240	8			

**Çizelge A. 4 :** BA14'ün amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,041	2	0,020	9,060	0,015
Hata	0,014	6	0,002		
Toplam	0,054	8			



**Çizelge A. 5 :** BA19'un amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,472	2	0,236	221,820	0,000
Hata	0,006	6	0,001		
Toplam	0,478	8			

**Çizelge A. 6 :** BA19'un amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,021	2	0,011	7,733	0,022
Hata	0,008	6	0,001		
Toplam	0,030	8			

**Çizelge A. 7 :** BA21'in amilaz üretimine BK besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,422	2	0,211	35,090	0,000
Hata	0,036	6	0,006		
Toplam	0,459	8			

**Çizelge A. 8 :** BA21'in amilaz üretimine TSB besiyerinde inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,077	2	0,039	211,566	0,000
Hata	0,001	6	0,000		
Toplam	0,078	8			

**Çizelge A. 9 : BA11'in amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi.**

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş Model	2,474 <sup>a</sup>	5	0,495	766,616	0,000
İşlemler arası (intercept)	4,658	1	4,658	7217	0,000
İnkübasyon süresi	1,045	2	0,522	809,406	0,000
Besiyeri	0,645	1	0,645	999,023	0,000
İnkübasyon süresi ve Besiyeri	0,784	2	0,392	607,621	0,000
Hata	0,008	12	0,001		
Toplam	7,140	18			
Düzeltilmiş toplam	2,482	17			

\*R<sup>2</sup> = 0 ,997 (Düzeltilmiş R<sup>2</sup>= 0,996)

**Çizelge A. 10 : BA14'ün amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi.**

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş model	3,909 <sup>a</sup>	5	0,782	40,115	0,000
İşlemler arası (intercept)	8,080	1	8,080	414,633	0,000
İnkübasyon süresi	1,228	2	0,614	31,507	0,000
Besiyeri	1,848	1	1,848	94,846	0,000
İnkübasyon süresi ve Besiyeri	0,832	2	0,416	21,357	0,000
Hata	0,234	12	0,019		
Toplam	12,223	18			
Düzeltilmiş toplam	2,482	17			

\*R<sup>2</sup> = 0 ,944 (Düzeltilmiş R<sup>2</sup>= 0,920)

**Çizelge A. 11** : BA19'un amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş modeli	0,613 <sup>a</sup>	5	0,123	99,982	0,000
İşlemler arası (intercept)	3,629	1	3,629	2960	0,000
İnkübasyon süresi	0,223	2	0,111	90,808	0,000
Besiyeri	0,119	1	0,119	97,379	0,000
İnkübasyon süresi ve Besiyeri	0,271	2	0,135	110,458	0,000
Hata	0,015	12	0,001		
Toplam	4,256	18			
Düzeltilmiş toplam	0,613 <sup>a</sup>	5	0,123	99,982	0,000

\*R<sup>2</sup>= 0,977 (Düzeltilmiş R<sup>2</sup>= 0,967)

**Çizelge A. 12** : BA21'in amilaz üretimine besiyeri ve inkübasyon süresinin etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş modeli	0,557 <sup>a</sup>	5	0,111	35,958	0,000
İşlemler arası (intercept)	3,526	1	3,526	1137	0,000
İnkübasyon süresi	0,397	2	0,198	63,973	0,000
Besiyeri	0,058	1	0,058	18,678	0,001
İnkübasyon süresi ve Besiyeri	0,103	2	0,051	16,584	0,000
Hata	0,037	12	0,003		
Toplam	4,121	18			
Düzeltilmiş toplam	0,595	17			

\*R<sup>2</sup>= 0,937 (Düzeltilmiş R<sup>2</sup>= 0,911)

**Çizelge A. 13** : BA-11'in amilaz üretimine sıcaklık ve sürenin etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş modeli	13,686 <sup>a</sup>	11	1,244	1219	0,000
İşlemler arası (intercept)	44,189	1	44,189	43290	0,000
Sıcaklık	7,230	2	3,615	3541	0,000
Süre	3,348	3	1,116	1093	0,000
Sıcaklık ve süre	3,108	6	0,518	507,447	0,000
Hata	0,025	24	0,001		
Toplam	57,900	36			
Düzeltilmiş toplam	13,711	35			

\*R<sup>2</sup>= 0,998 (Düzeltilmiş R<sup>2</sup>= 0,997)

**Çizelge A. 14** : BA-14'ün amilaz üretimine sıcaklık ve sürenin etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş modeli	23,938 <sup>a</sup>	11	2,176	214,932	0,000
İşlemler arası (intercept)	91,056	1	91,056	8993	0,000
Sıcaklık	13,040	2	6,520	643,984	0,000
Süre	5,323	3	1,774	175,261	0,000
Sıcaklık ve süre	5,574	6	0,929	91,751	0,000
Hata	0,243	24	0,010		
Toplam	115,237	36			
Düzeltilmiş toplam	24,181	35			

\*R<sup>2</sup>= 0,990 (Düzeltilmiş R<sup>2</sup>= 0,985)

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Meryem Tuğçe KARACA  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : Kırklareli / 25.10.1990  
**E-posta** : meryemtkaraca@gmail.com

## ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : 2014, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Lisans** :2016, İstanbul Üniversitesi, Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi, Sosyoloji

## MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER

- 2016 yılında yetkili gıda mühendisi olarak, Şahin Süt Ürünleri İnşaat San. ve Tic. Ltd. Şti. / Çanakkale Fabrikası denetimi  
Işık Gıda İhtiyaç Maddeleri Üretim ve Pazarlama Ltd. Şti. / Bursa Fabrikası denetimi  
Yardımcı Kardeşler Yumurta Gıda Dış Tic.San.Ltd.Şti. / Kocaeli Fabrikası denetimi
- 2015-halen Nazlı Börek Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti'de Kalite & Kontrol Mühendisi
- 2013 yılında Aksu Vital Doğal Ürünler A.Ş.'de staj
- 2012 yılında Ülker C.C.C A.Ş.'de staj

## KATILDIĞI TEKNİK GEZİLER

- Unilever San. ve Tic. A. Ş. / Çorlu Margarin ve Dondurma Fabrikaları
- İstanbul Halk Ekmek A. Ş. / İstanbul Fabrikası
- Tat Gıda San. A. Ş. / Bursa Salça Fabrikası
- Dr. Oetker Gıda San. ve Tic. A.Ş. / İzmir Fabrikası
- Kraft Foods / Kocaeli Fabrikası
- Trakya Birlik / Bursa Yağ Fabrikası

## KATILDIĞI ORGANİZASYONLAR

- 12. Uluslararası Ekmek, Pasta Makineleri, Dondurma, Çikolata ve Teknolojileri Fuarı / İstanbul Fuar Merkezi CNR / 2018
- 11. Uluslararası Ekmek, Pasta Makineleri, Dondurma, Çikolata ve Teknolojileri Fuarı / İstanbul Fuar Merkezi CNR / 2017
- 10. Uluslararası Ekmek, Pasta Makineleri, Dondurma, Çikolata ve Teknolojileri Fuarı / İstanbul Fuar Merkezi CNR / 2016

- Gıda Mühendisliği 4. Öğrenci Kongresi: ‘21. Yüzyılda Gıda’ konulu kongre / Sakarya / 2013
- Gıda Mühendisliği 3. Öğrenci Kongresi: ‘Gıdada Yeni Eğilimler’ konulu kongre / İstanbul / 2012

