

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF14'TEN ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP  
 $\alpha$ -AMİLAZIN SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Kimyager Şaban KESKİN**

**OCAK 2015  
TRABZON**

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF14'TEN ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP**  
 **$\alpha$ -AMİLAZIN SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE**  
**KARAKTERİZASYONU**

**Kimyager Şaban KESKİN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**"DOKTOR (KİMYA)"**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30.12.2014**

**Tezin Savunma Tarihi : 22.01.2015**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

**Trabzon 2015**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalında**

**Şaban KESKİN tarafından hazırlanan**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF14'TEN ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP  
α-AMİLAZIN SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 06/01/2015 gün ve 1584 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınav sonunda**

**DOKTORA TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan** : Prof. Dr. Ali KILINÇ .....

**Üye** : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK .....

**Üye** : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI .....

**Üye** : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI .....

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

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus sp.* TF14’ten Endüstriyel Öneme Sahip  $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamız KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (KTÜ-BAP) birimi tarafından 11549 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı KTÜ-BAP birimi çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde yardımını ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, kimya bilimini tanımamda ve bu alanda eğitim yapmamda büyük katkıları olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a, araştırmada kullandığımız mikroorganizmaların teminini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım esnasında yaşadığım aksilikleri laboratuvarını kullanmama izin vererek bertaraf eden değerli hocam Prof. Dr. Ersan KALAY hocama ve Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ hocama şükranlarımı sunarım. Bir dönem aynı odayı paylaştığım sevgili hocam Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarımın son bir yılında her an yanımda olan Yüksek Lisans öğrencileri Yakup ŞİRİN ve Emre DOKUZPARMAK’a teşekkürlerimi sunarım. Burada tek tek isimlerini zikredemediğim, Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuarındaki arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Kimya bölümünde birlikte mesai harcadığım isimlerini tek tek sayamadığım çok değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Varlık sebeplerim kıymetlilerim anneme ve babama, ve altı yıldır hayatımı paylaştığım, her daim destekçim biricik nişanlım Uzm.Kimyager Merve ÖZDEMİR’e ...

Şaban KESKİN  
Trabzon 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus sp.* TF14’ten Endüstriyel Öneme Sahip  $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri KTÜ Kimya Bölümü Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarlarında yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

22/01/2015

şaban KESKİN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Enzimler .....	2
1.3. Endüstriyel Enzimler.....	2
1.4. Enzim Kaynağı Olarak Bakteriler .....	5
1.5. Termofilik Mikroorganizmalar .....	5
1.6. Nişasta ve Uygulama Alanları .....	6
1.7. Amilolitik Enzimler .....	8
1.8. $\alpha$ -Amilazlar .....	10
1.8.1. $\alpha$ -Amilazların Aktif Merkezi ve Kristal Yapıları .....	12
1.8.2. $\alpha$ -Amilazların Kataliz Mekanizması .....	13
1.8.3. $\alpha$ -Amilazların Endüstriyel Uygulama Alanları .....	14
1.8.4. $\alpha$ -Amilaz Aktivite Tayin Metodları .....	16
1.8.4.1. Dinitro Salisilik Asit (DNS) Metodu .....	16
1.8.4.2. İyot Renk Şiddetinde Azalma Metodu.....	17
1.8.5. $\alpha$ -Amilaz Üreten Mikroorganizmalar .....	17
1.9. <i>Geobacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	18
1.10. Enzim Saflaştırmanın Önemi .....	19
1.11. Enzim İmmobilizasyonu .....	20
1.12. Çalışmanın Amacı.....	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	23

2.1.	Kullanılan Kimyasallar .....	23
2.1.1.	Kullanılan Cihazlar .....	23
2.1.2.	Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler .....	24
2.1.2.1.	Tampon Çözeltiler .....	24
2.1.2.2.	Sıvı ve Katı Besiyerleri .....	25
2.1.2.3.	Protein Tayin Çözeltileri .....	26
2.1.2.4.	Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	26
2.1.2.5.	Substrat ve Enzim Aktivitesi Tayin Çözeltileri .....	27
2.2.	Deneysel Çalışmalar .....	27
2.2.1.	Petri Testi .....	28
2.2.2.	Organizma ve Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi .....	28
2.2.3.	Ham Enzim Özütünün Eldesi.....	28
2.2.4.	Enzim Aktivitesi Tayini .....	29
2.2.5.	Glukoz Standardı.....	29
2.2.6.	Protein Tayini.....	30
2.2.7.	Enzimin Saflaştırılması .....	30
2.2.7.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	31
2.2.7.2.	İyon Değişim Kromatografisi .....	31
2.2.7.3.	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi .....	32
2.2.8.	Doğal ve SDS PAGE Elektrofrezisi .....	32
2.2.9.	Saf Enzimin Dowex ve Kitin Üzerine Ayrı Ayrı İmmobilizasyonu .....	33
2.2.10.	Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu .....	34
2.2.10.1.	Substrat Özgünlüğü.....	34
2.2.10.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi .....	34
2.2.10.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın etkisi.....	34
2.2.10.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi .....	35
2.2.10.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	35
2.2.10.6.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	35
2.2.10.7.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	36
2.2.10.8.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi .....	36
2.2.10.9.	İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi .....	37
2.2.10.10.	İnce Tabaka Kromatografisi .....	37
3.	BULGULAR.....	38

3.1.	Petri Testi .....	38
3.2.	Organizma ve Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi .....	39
3.3.	Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması .....	39
3.4.	Protein Tayini.....	40
3.5.	Enzimin Saflaştırılması .....	40
3.5.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	40
3.5.2.	İyon Değişim Kromatografisi .....	41
3.5.3.	Hidrofobik Etkileşim Kolonu .....	41
3.5.4.	Doğal ve SDS PAGE Elektroforezi .....	42
3.6.	Saf Enzimin Dowex ve Kitin Üzerine Ayır Ayır İmmobilizasyonu.....	43
3.7.	Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu.....	44
3.7.1.	Substrat Spesifitesi.....	44
3.7.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi .....	45
3.7.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	46
3.7.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi .....	47
3.7.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	48
3.7.6.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	50
3.7.7.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	52
3.7.8.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi .....	53
3.7.9.	İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi .....	55
3.7.10.	İnce Tabaka Kromatografisi.....	56
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	57
5.	ÖNERİLER.....	69
6.	KAYNAKLAR .....	71
ÖZGEÇMİŞ		



Doktora Tezi

ÖZET

TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF14'TEN ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP  $\alpha$ -AMİLAZIN SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Şaban KESKİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA

2015, 76 Sayfa

Bu çalışmada endüstriyel önemi olan  $\alpha$ -amilaz enzimi yeni tanımlanmış bir termofilik bakteri türü olan *Geobacillus sp.* TF14 suşundan amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi teknikleri ile 17,11 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE ile analiz edildiğinde 54 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir protein bandı tespit edildi. Doğal elektroforez sonucu yapılan aktivite boyamasında tek aktivite bandı belirlendi. Saflaştırılan enzim nişasta substratı varlığında 55 °C'de pH 5,00 ve pH 9,00 olan iki pH optimumuna sahip olduğu ve bu pH'larda 48 saat inkübasyon sonucu enzimin aktivitesini sırasıyla %64 ve %44 oranında koruduğu belirlendi. pH 9,00 da enzimin en yüksek aktiviteye 75 °C'de sahip olduğu ve bu sıcaklıkta 72 saat inkübasyon sonunda aktivitesini tamamen koruduğu belirlendi. Çözünür nişasta substratı için enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 5000 U/mg ve %0,35 olduğu hesaplandı.  $Ca^{2+}$  enzim aktivitesini %70 oranında artırırken,  $Mn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'nin enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği, EDTA'nın ise zayıf bir inhibisyona neden olduğu tespit edildi. SDS, Triton X100, Triton X114 ve Tween 20 deterjanlarının %1 (a/v)'lik çözeltilerinde enzimin sırasıyla %55, %52, %45 ve %48 oranlarında kalan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Saflaştırılan enzim Dowex 1\*8  $Cl^-$  iyon değiştirici katı desteğe %21 ve kitin yüzeyine %45 verimle immobilize edildi. Dowex'e ve kitine immobilize enzimin sırasıyla pH 4,00, pH 10,00 ve pH 5,00, pH 9,00 olan iki pH optimumuna sahip olduğu belirlendi. Dowex'e ve kitine immobilize enzimin en yüksek aktiviteye 95 °C'de sahip olduğu ve bu sıcaklıkta Dowex'e immobilize enzimin 72 saat sonunda %80 oranında, kitine immobilize enzimin ise %70 oranında aktivitesini koruduğu belirlendi. Dowex'e ve kitine immobilize enzim için  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 3333,33 U/mg, % 0,067 ve 2500 U/mg, % 0,5 olarak hesaplandı.  $Mn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  her iki katı desteğe immobilize edilen enzimi tamamen inhibe ederken,  $Hg^{2+}$  varlığında ise aktivitenin korunduğu belirlendi. Dowex'e immobilize enzimin deterjanlar varlığında aktivitesini büyük oranda koruduğu da belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:**  $\alpha$ -amilaz, saflaştırma, immobilizasyon, Dowex, kitin, *Geobacillus*

pHd Thesis

## SUMMARY

PURIFICATION, IMMOBILISATION AND CHARACTERIZATION OF INDUSTRIALLY IMPORTANT  $\alpha$ -AMYLASE FROM A THERMOPHILIC BACTERIA *Geobacillus sp.* TF14

Şaban KESKİN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA  
2015, 76 Pages

In this study,  $\alpha$ -amylase, an industrial enzyme, was purified by ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography from newly isolated *Geobacillus sp.* TF14 strain. The overall purification of 17,11 fold was achieved. Molecular weight of purified enzyme was estimated as 54 kDa by SDS-PAGE. Purified enzyme showed one activity band on native PAGE. Purified enzyme showed two pH optimum of pH 5.00 and pH 9.00. After incubation at these pH over a period of 48 h, 64% and 48% remaining activity was observed. Purified enzyme showed maximal activity at 75 °C and stability in this temperature over a period of 72 h. Kinetic constant of purified enzyme were calculated from the Lineweaver-Burk plots as 5000 U/mg for  $V_{max}$  and 0.35 % for  $K_m$ . It was observed that  $Ca^{2+}$  activated the enzyme at about 70%,  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  completely inhibited the enzyme activity at 5 mM final concentration and EDTA had little inhibition of 10%. In the presence of SDS, Triton X100, Triton X114 and Tween 20 at a final concentration of %1(w/v), 55%, 52%, 45% and 48% remaining activity was assayed respectively. Purified enzyme was immobilized on the surface of Dowex 1\*8 Cl<sup>-</sup> form and chitin and the overall immobilization yield of 21% and 45% was achieved respectively. While Dowex immobilized enzyme showed pH optimum of pH 4.00 and pH 10.00, whereas no change of pH optima was detected for the immobilized enzyme on chitin. Both of the immobilized enzyme had temperature optimum of 95 °C and stable at this temperature over a period of 72 h incubation.  $V_{max}$  and  $K_m$  values of immobilized enzyme were calculated as 3333,33 U/mg, % 0,067 for Dowex and 2500 U/mg, % 0,5 for chitin respectively.  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  completely inhibited both of the immobilized enzymes on the other hand in the presence of  $Hg^{2+}$  enzyme activity was conserved. It was observed that Dowex immobilized enzyme maintained most of its initial activity in the presence of SDS, Triton X100, Triton X114 and Tween 20 at a concentration of 1%.

**Key Words:**  $\alpha$ -amylase, purification, immobilization, Dowex, chitin, *Geobacillus*

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Nişasta granülü içinde bulunan amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> $\alpha$ -amilazı kristal yapısı .....	13
Şekil 3. Amilazlar için kataliz mekanizması.....	14
Şekil 4. Petri testi fotoğrafı .....	38
Şekil 5. İyon değiştirici kolon saflaştırma grafiği.....	41
Şekil 6. Elektroforez Jel görüntüleri .....	43
Şekil 7. Standart proteinler $\log(M_A)$ - $R_f$ grafiği.....	43
Şekil 8. TF14 $\alpha$ -Amilazı pH-%bağlı aktivite grafiği .....	45
Şekil 9. İmmobilize enzimlere ait pH-%bağlı aktivite grafiği .....	46
Şekil 10. TF14 $\alpha$ -Amilazı sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği.....	46
Şekil 11. İmmobilize enzimlere ait sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği.....	47
Şekil 12. TF14 Amilazı üzerine protein konsantrasyonunun etkisi .....	48
Şekil 13. TF14 Amilazı Lineweaver-Burk grafiği .....	49
Şekil 14. Dowex'e immobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 15. Kitine immobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 16. TF14 Amilazı ısıl kararlılık grafiği.....	50
Şekil 17. Dowex'e immobilize enzim ısıl kararlılık grafiği.....	51
Şekil 18. Kitin'e immobilize enzim ısıl kararlılık grafiği .....	51
Şekil 19. TF14 Amilazı pH kararlılık grafiği.....	52
Şekil 20. Dowex'e immobilize enzim pH kararlılığı grafiği.....	53
Şekil 21. Kitin'e immobilize enzim pH kararlılığı grafiği .....	53
Şekil 22. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği.....	56
Şekil 23. %1'lik nişastanın saf enzimle reaksiyonu sonucu oluşan parçalanma ürünleri ..	56

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Bazı enzimlerin endüstriyel uygulama alanları.....	3
Tablo 2. Nişastanın kullanıldığı endüstriyel alanlar .....	7
Tablo 3. Nişasta hidrolizleyen bazı enzimler .....	10
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	23
Tablo 5. Bradford protein tayini pipetleme tablosu .....	30
Tablo 6. Petri testi koloni ve zon çapı değerleri.....	38
Tablo 7. Organizmaların ürettikleri amilaz enzimlerinin spesifik aktivite değerleri ve protein miktarları .....	39
Tablo 8. Saflaştırma tablosu.....	42
Tablo 9. TF14 Amilazına ait substrat- % bağıl aktivite değerleri .....	45
Tablo 10. Bazı kimyasalların ve metal iyonlarının TF14 Amilazı üzerine etkisi .....	54
Tablo 11. İmmobilize enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi.....	55

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk önemli denemeler 1760–1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışmayı 1835 yılında İsveçli bir kimyager olan S.S. Berzelius gerçekteşirmiş, diastazın niştayı in vivo olarak sülfürik asitten daha yüksek verimle hidrolizlediğini göstermiştir. 1860 yılında L. Pasteur fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü deneylerle ispat etmiş, bu yüzden enzimler için ferment terimi kullanılmaya başlanmıştır. Fakat, Pasteur enzimlerin yalnız canlı hücre yapısı içinde görev yapabildiklerini zannetmiştir. Enzimoloji alanında şüphesiz en önemli gelişme, 1926 yılında, J.B Sumner'in üreaz enzimini Jack bean (*Canavalia ensiformis*) bitkisinden elde edip, kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasdır. Önceleri şüphe ile karşılanan bu sonuç, 1930–1936 yılları arasında J. Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya koymasıyla doğrulanmıştır [1].

Enzim endüstrisi, modern biyoteknolojik araçların da kullanımı ile birçok üretim işleminin geliştirilmesine önemli derecede katkı sağlamaktadır. Daha az miktarda enerji, su ve hammadde tüketimi ile daha az atık ve çevresel kirlilik bu teknolojinin hedeflenen yararları arasındadır. Enzim teknolojilerinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Enzimler kimyasal reaksiyonları oldukça yüksek bir seçicilikle katalizlerler ve yüksek verimlilikle ürün elde edilmesini sağlarlar. Bu kimyasal reaksiyonlar, bütün canlıların temel metabolik reaksiyonlarıdır. Enzimler endüstriye, daha hızlı, daha etkili ve daha ekonomik biyokatalitik dönüştürücüler sağlarlar [2].

## 1.2. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Diğer proteinler gibi bazı enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilirler. Bazı enzimler katalizlenme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabileceği gibi, koenzim denilen kompleks bir organik bileşik de olabilir.

Enzimlerin birçok uygulamadaki rolü oldukça uzun süreden beri bilinmektedir. Ortaya çıkışları, mikroorganizmalardaki enzimlerin ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde kullanılmasıyla yakından ilişkilidir. Isıl kararlı enzimler şimdiki kadar başlıca termofilik organizmalardan izole edilmiştir ve kendilerine has üstün kararlılıklarından dolayı birçok ticari uygulamada kullanılmışlardır [3].

## 1.3. Endüstriyel Enzimler

Enzimler canlı hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizlemeleri için üretilmelerine rağmen hücre dışında da kataliz fonksiyonlarını yerine getirebilirler. Çok spesifik bir şekilde reaksiyonları katalizlemeleri onları endüstriyel prosesler için kullanışlı kılmaktadır [4]. Enzimler çok eski zamanlardan beri peynir üretiminde maya ve bakteri kültürleri vasıtasıyla kullanılmaktadır. İzole enzimler ilk olarak 1914 yılında kullanılmaya başlandı, 1926'da protein yapısında oldukları kanıtlandı ve 1960'tan sonra ise ticari ölçekte mikrobiyal kaynaklardan enzimler üretilmeye başlandı. Günümüzde ticari enzim piyasası sürekli büyümekte ve gelişmektedir. Biyoteknolojik metotlarla enzimlerin katalitik etkinliğinin artırılması, kararlılıklarının artırılması ve gelişmiş üretim teknolojilerinin kullanılması bu piyasanın gelişmesine katkı sağlamaktadır. Günümüz ticari enzim piyasasında üretilen enzimlerin % 17'si deterjan katkısı, % 17'si gıda üretimi ve yem katkısı olarak, % 17'si deri ve kağıt endüstrisinde, % 8'i tekstil endüstrisinde ve % 41'i ilaç sanayisinde kullanılmaktadır [5]. Günümüzde 3000 civarında tanımlanmış enzim olmasına rağmen bunların sadece 150-170 civarında bir kısmı ticari olarak üretilip kullanılmaktadır. Günümüzde kimyasal ürünlerin sadece % 5'lik bir kısmı biyoteknolojik

metodlarla üretilmektedir. Enzimatik proseslerin, geleneksel kimyasal ve fizikokimyasal proseslerden ekonomik ve ekolojik yönden çok daha karlı olduğu tartışma götürmez bir gerçektir. Endüstride geleneksel olarak kullanılan bir çok kimyasal sentez prosesleri, yüksek enerjiye, yüksek basınca ve üretim tanklarını soğutmak için aşırı miktarda soğutma suyuna ihtiyaç duymaktadır. Yüksek sıcaklık, yüksek basınç, yüksek asitlik veya yüksek alkalilik gibi bir çok tehlikeli koşullara sahip geleneksel üretim prosesleri bu şartlara dayanıklı özel ekipmanlara ve kontrol sistemlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu proseslerde yüksek miktarda kullanılan kimyasallar, reaksiyonlarda oluşan zararlı yan ürünlerin çevre üzerine çok ciddi etkileri olduğuda bilinmektedir. Geleneksel üretim metodlarının bu gibi bir çok zararlı etkileri endüstride enzimlerin kullanımı ile azaltılabilir [6].

Endüstride enzimlerin kullanımı, yüksek verimlilikle ürün eldesi, geleneksel metotlara göre çok daha ılıman koşullarda reaksiyon şartları, yan ürün oluşmaması, düşük enerji maliyetli üretim prosesleri gibi birçok avantaj sunmaktadır. Ayrıca enzimatik reaksiyonların, reaksiyon ortamındaki enzim miktarı, sıcaklık ve zaman gibi basit parametrelerin değiştirilmesi ile kontrol edilebilir olması endüstride enzim kullanımının bir diğer avantajıdır. Tablo 1’de bazı enzimler ve onların endüstriyel uygulama alanları verilmiştir [5].

Tablo 1. Bazı enzimlerin endüstriyel uygulama alanları

Deterjan endüstrisi	Proteinaz	Protein artıklarının gideriminde
	Lipaz	Yağların hidrolizinde
	Amilaz	Nişasta kalıntılarının gideriminde
	Selülaz	Aşırı yıkamadan ötürü oluşan tüylerin giderimi
Nişasta Endüstrisi	Amilazlar Amiloglukozidazlar, Glukoamilazlar	Nişastadan şeker şurupları üretiminde
	Glukoz izomeraz	Yüksek fruktozlu şurup üretiminde
Tekstil Endüstrisi	Amilazlar	Dokuma kumaşlardan nişastanın uzaklaştırılması
Fırıncılık Endüstrisi	$\alpha$ -Amilaz	Ekmek yapımında
	$\beta$ -Ksilanaz	Hamurun kabarması ve ekmeğin kalitesini artırma
	Proteinaz	Undaki protein miktarını azaltmak amacıyla bisküvilik un yapımında
Kağıt Endüstrisi	$\beta$ -ksilanaz	Kağıt hamurunun ağartılmasında
	Lipaz	Kağıdın rulo yapılma prosesinde

Enzimler, üretim süreçlerinde, depolama ve endüstriyel proseslerde birçok denatürasyon reaksiyonlarına maruz kalırlar. Denatürasyon enzimin tersiyer yapısının bozularak, tersiyer yapıda enzimin aktif merkezini oluşturan veya katalitik fonksiyonu için gerekli olan amino asit etkileşimlerinin ortadan kalkmasıdır. Endüstride enzimlerin kullanımının, enzimlerin spesifiklikleri (moleküler veya kiral), rakipsiz katalitik etkinlikleri, yüksek turnover sayıları ve biyobozunur olmaları gibi birçok avantajı vardır. Ancak, enzimlerin endüstrideki uygulamaları, üretimlerinin ve saflaştırılmalarının yüksek maliyetli olmasından dolayı oldukça sınırlıdır [5].

Endüstride enzimlerin kullanımında karşılaşılan bir diğer problem kararlılıktır çünkü endüstriyel prosesler enzimlerin aktif ve kararlı olduğu doğal ortamlarından oldukça farklıdır. Birçok durumda enzimler substrat veya ürünün yüksek konsantrasyonundan dolayı inhibe olur veya enzimin sürekli proseslerde uzun süre ve tekrar tekrar kullanımı aktivitelerini kaybetmelerine sebep olur [6]. Termofilik mikroorganizmalar, 45 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda yaşamlarını devam ettirecek şekilde adapte olmuş canlılardır. Termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklarda aktif ve ısıl kararlı enzimler için iyi bir kaynaktırlar. Bu tür organizmalardan elde edilen enzimler, yüksek sıcaklıklarda aktif olma, ısıl kararlılık, ekstrem pH'larda aktif olma, deterjanlar, organik çözücüler gibi kimyasal denatüre edici ajanlara dirençlilik gibi kendilerine has emsalsiz özellikler sergilerler [7]. Nişasta veya nişasta kullanılan endüstrilerde hidrolitik enzimler arasında en önemlisi  $\alpha$ -amilazlardır.  $\alpha$ -Amilazlar, nişasta hidrolizi, kağıt endüstrisi, tekstil endüstrisi, deterjan sanayi, fırıncılık gibi bir çok endüstriyel uygulama alanı olan enzimlerdir. Her bir endüstriyel uygulama farklı fiziksel ve kimyasal şartlar altında gerçekleşmektedir. Dolayısıyla tek kaynaktan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi her bir endüstriyel uygulama için gerekli şartları taşıyamaz [8].

Ticari enzim piyasasının 2010 yılında dünya ölçeğinde 2 milyar \$ olduğu ve yıllık ortalama % 3,3 büyüme göstereceği tahmin edilmektedir.  $\alpha$ -Amilaz, birçok endüstriyel proste uygulama alanına sahip olduğundan ticari enzim piyasasının % 25'lik payına sahiptir. Amilazlar nişasta moleküllerini hidroliz ederek dekstrinler ve derece derece daha düşük glukoz polimerleri açığa çıkaran enzimlerdir. Bu enzimler günümüz biyoteknolojisinde, farklı endüstriyel uygulama alanlarına sahip olduklarından oldukça önemli bir yere sahiptirler. Gıda, fermentasyon, tekstil, kağıt endüstrisi amilazların uygulama alanlarından bir kaçıdır [6].



#### 1.4. Enzim Kaynağı Olarak Bakteriler

Endüstriyel kullanımı olan birçok enzim mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Bu enzimlerin çoğu “genellikle güvenli” olarak sınıflandırılan sınırlı sayıdaki mikroorganizma tarafından sentezlenirler. Bu mikroorganizmalar, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* gibi bakterileri içermektedir. “Genellikle güvenli” olarak sınıflandırılan mantarlar ise *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* ve *Rhizopus* türlerinin üyelerini içermektedir. Bu mikroorganizmalar, patojen ve toksik olmayan ve genellikle antibiyotik üretmeyen canlılardır. Mikroorganizmalar, kısa sürede oldukça fazla miktarlarda üretilebildikleri için enzim kaynağı açısından oldukça ilgi çekicidirler. Bu durum onları istenilen enzimi bol miktarda ve sürekli olarak üretebilen kaynak yapmaktadır. Mikrobiyal enzimler, genellikle bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilenlere oranla daha kararlıdır. Kendilerine has üstün kararlılıklarından ve yüksek katalitik aktivitelerinden dolayı termofilik mikroorganizmaların ürettikleri enzimler üzerine araştırmalar yoğunlaşmaktadır [9].

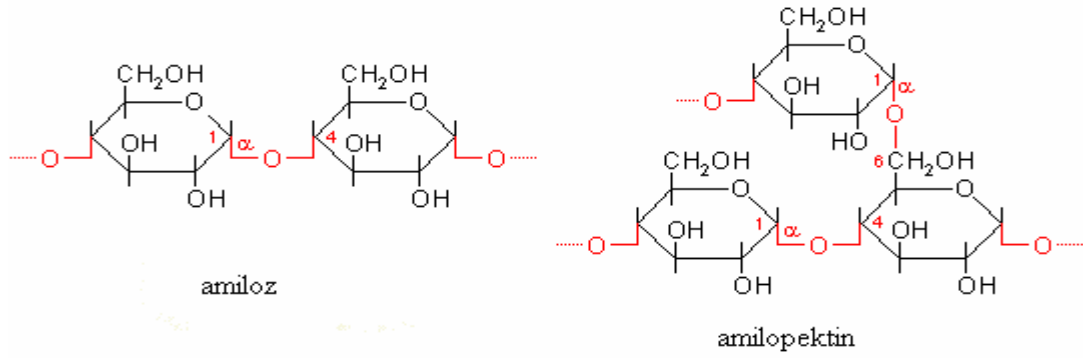
#### 1.5. Termofilik Mikroorganizmalar

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotlar olmak üzere üç grupta sınıflandığı görülmektedir [9]. Bakteriler, büyüyebildikleri sıcaklık aralıklarına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller, -10 °C’ye kadar olan sıcaklıklarda büyüebilirler fakat optimum büyüme sıcaklıkları 15 °C civarındadır. 20-45 °C arasında büyüebilme yeteneğine sahip mezofiller insan sağlığı açısından patojen olan bakterileri de ihtiva ederler. Termofiller ise genel olarak 45 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen canlılardır [10]. Termofil organizmalar, termotolerant veya termofil, hipertermofil ve ekstrem termofil olmak üzere üç grup içerisinde sınıflandırılmaktadırlar [11]. Hipertermofiller 80-110 °C arasında yaşayabilen canlılardır. Kara ve denizdeki sıcak ortamlardan izole edilen bu organizmalardan elde edilen enzimler (hipertermofilik enzimler) yüksek ısı kararlılığına sahiptirler ve 70 °C’nin üzerinde optimal aktivite gösterirler. Bu enzimlerden bazıları 110 °C’nin üzerinde de aktivitelerini koruyabilmektedirler [12]. Termofilik organizmaların en iyi büyüdüğü sıcaklık aralığı ise 50 °C ile 80 °C arasındadır. Bu organizmalardan elde edilen enzimler (termofilik enzimler)

hipertermofilik ve mezofilik enzimlerin arasında bir ısıl kararlılık özelliği gösterirler ve genellikle 60 °C ve 80 °C arasında optimum aktiviteye sahiptirler. Termofilik ve hipertermofilik enzimler yüksek sıcaklıklarda aktif olduklarından dolayı genellikle 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda aktivite göstermezler [12]. *Bacillus* cinsi bakteriler, toprakta, suda ve bitkisel ürünler üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile fermantasyon süresi kısa, genel olarak güvenli olması, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok sebepten dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. Çünkü gram negatif bakteriler, ürettikleri proteinleri protoplazmalarında ya da periplazmik boşluklarında biriktirirler. Bu da üretilen ürünün izolasyonunu güçleştirerek suştan birden fazla kez yararlanılmasını engeller. Ayrıca sentezlenen ürünlerin organizmaya karşı toksik etki oluşturması da söz konusudur [13]

### **1.6. Nişasta ve Endüstriyel Uygulamaları**

Bitkiler fotosentez ile yıllık 2850 milyon ton nişasta üretir. İnsanoğlu için nişastanın temel kaynağı tahıllar olmasına rağmen, kök ve yumru da önemlidir. Tahıllardan yıllık nişasta üretimi yaklaşık 2050 milyon ton, kök ve yumrulardan ise 679 milyon tondur. Nişasta suda çözünmeyen granüller halinde plastidlerde bulunur. Bu granüllerin büyüklüğü, şekli ve kompozisyonu bitkinin cinsine, bulunduğu organa veya bitkinin içinde bulunduğu büyüme evresine göre değişir [14]. Nişasta granülleri temel olarak glukoz polimeri olan amiloz ve amilopektinden meydana gelir, fakat yapısında az miktarda fosfat ve lipid de içerir. Amiloz genellikle 600-3000 sayıda 1→4 α-glikozil grubuna sahip lineer formda olup, her 1000 glikozilde bir 1→6 α-glikozil yan gruplarına yani dallara sahiptir. Amilopektin ise daha büyük bir molekül olup amiloza göre daha fazla dallanma gösterir. Yaklaşık 6000-60000 glikozil gruba sahip ve her 20-26 üniteye bir 1→6 α-glikozil yan grubu taşır. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı Şekil 1'de verildi..



Şekil 1. Nişasta granülü içinde bulunan amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı

Nişasta granülleri birbirini takip eden amorf bölge ve semi-kristal büyüme halkalarından oluşur. Amorf bölge amiloz ve kristal yapıda olmayan amilopektin içerir. Semi-kristal büyüme halkaları ise yine birbirini dönüşümlü olarak takip eden, yaklaşık 9-10 nm genişliğinde amorf ve kristal lamellerden meydana gelir. Amilopektin sarmalları çoğu tahıl nişastasında sıkı bir şekilde istiflenmişken (A-tipi nişasta), patates ve muz gibi bazı bitkilerde daha aralıklı istiflenirler (B-tipi nişasta). Nişasta başta yiyecek olmak üzere pek çok endüstriyel alanda yüzyıllardır kullanılmaktadır ( Tablo 2).

Tablo 2. Nişastanın kullanıldığı endüstriyel alanlar

Gıda Endüstrisi	Plastik Sanayi	Eczacılık ve Kozmetik	İnşaat Sanayi	Tekstil Sanayi	Kâğıt Endüstrisi
Mayonez	Parçalanabilir plastik ve filmler	Tabletler	Beton	Kumaş	Oluklu mukavva
Bebek maması		Toz pudra	Yanmaya dayanıklı duvar kağıdı	İplik	Karton
Ekmek					Kaplama
Alkolsüz İçecekler		Yüz kremi		Dokuma	Yapıştırıcı

Nişasta, yiyecek endüstrisinde donmuş yiyecekler, çorbalar, soslar, hamur işlerinde ya da diğer endüstriyel alanlarda bir kaplama materyali olarak kullanılabilir. Örneğin kağıt endüstrisinde nişasta kağıdın dayanıklılık ve baskı kalitesini arttırmada, eczacılıkta suda çabuk çözünebilen kapsül ve tablet halindeki ilaçların hazırlanmasında, inşaat sektöründe çimento katkı maddesi olarak ve boyalarda veya yanmaya dayanıklı duvar kağıdı yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde ise artan çevresel sorunlardan dolayı yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir hammaddelerin kullanımı üzerine ilgi

yoğunlaşmıştır. Plastik ve paketleme malzemelerinin yapımı için kullanılan petrol temelli maddelerin yerine, nişasta temelli hammaddelerin kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Mesela mısır nişastasından yapılan gevşek paketleme materyali polistirenin yerini almaktadır. Nişasta granüllerinin içeriği ve yapısı bitkiler arasında oldukça farklılık gösterir. Granül yapısı ve şekli, amiloz/amilopektin oranı, amiloz ve amilopektinin moleküler yapısı ve lipid, protein, fosfat miktarı gibi diğer faktörler nişastanın fonksiyonel özelliklerini dolayısıyla endüstriyel kullanım alanını belirler. Kimyasal ve genetik modifikasyonlar sonucu nişastanın yapısal özelliklerinin ve bununla bağlantılı olarak fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi, üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bir konudur. Kimyasal modifikasyonların gerek insan sağlığı gerekse çevre açısından potansiyel olumsuz yönleri göz önüne alındığında bitki biyoteknolojisindeki gelişmelerin yardımıyla gerçekleştirilen genetik modifikasyonlar ön plana çıkmaktadır. Nişasta günlük hayatımızda yiyecek, içecek, tarım, ecza, inşaat, tekstil ve kâğıt gibi pek çok endüstriyel alan için temel bir hammaddedir. Nişastanın farklı endüstriyel alanlarda kullanımını nişasta granüllerinin yapı-fonksiyon ilişkisi belirler. Bu sebeple bitkiler tarafından üretilen nişasta granüllerinin moleküler yapılarının değiştirilmesi bitki biyoteknolojisi için önemli bir konu olmuştur. Doğal nişasta genellikle fiziksel, enzimatik veya kimyasal olarak modifiye edilerek kullanılır [14].

### **1.7. Amilolitik Enzimler**

Amilolitik enzimlerin tarihi 1811 yılında Kirchoff tarafından ilk nişasta hidrolizleyen enzimin keşfedilmesi ile başlar. Bu keşfi bir çok sindirim amilazı ve malt amilazı hakkındaki çalışmalar takip etmiştir. Amilazlar  $\alpha$  veya  $\beta$  amilazlar olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma enzim hidrolizi sonucu oluşan ürünün anomerik konfigürasyonu ile ilişkilidir. [15]. Amilazlar Endo- ve ekzo- amilazlar olarak iki sınıfa ayrılırlar. Endo amilazlar nişasta moleküllerini iç kısımdan rastgele hidrolizlerler. Endo amilazlar zincir uzunlukları farklı düz zincirli ve dallanmış oligosakkaritlerin oluşumuna neden olurlar. Ekzo amilazlar ise indirgen olmayan uçlardan hidrolizleyerek daha küçük son ürün oluşmasına neden olurlar. Günümüzde nişasta molekülünü farklı ürünlere hidrolizleyebilen birçok enzim bilinmektedir ve nişastanın tam hidrolizi için farklı enzimlerin birlikte kullanılması gerekmektedir [8].

Nişasta endüstrisi, hidroliz ve modifikasyon amacıyla enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan biridir. Nişastanın tamamen hidroliz olması için enzim kombinasyonlarına ihtiyaç vardır. Bunlar  $\alpha$ -amilaz, glukoamilaz veya  $\beta$ -amilaz ve izoamilaz veya pullulanazı içerirler. Nişasta parçalayıcı enzimler temel olarak dört grup olarak sınıflandırılabilirler. Bu sınıflar; endo-amilazlar, ekzo-amilazlar, dallanmayı parçalayan enzimler ve transferazlar olarak sıralanabilirler.  $\alpha$ -Amilaz (EC 3.2.1.1) iyi bilinen bir endo-enzimdir. Amiloz ve amilopektin zincirindeki iç (endo-)  $\alpha,1\rightarrow4$  glikozidik bağlarını rastgele tarzda hidroliz ederek doğrusal ve dallanmış yapıda oligosakkaritler oluştururlar. Ekzo-enzimler, nişastayı indirgen olmayan ucundan başlayarak hidroliz ederler ve oligo ve/veya monosakkaritler oluştururlar. Ekzo-amilazlardan  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2) yalnızca  $\alpha,1\rightarrow4$  glikozidik bağlarını parçalarken, amiloglukozidaz veya glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ile  $\alpha$ -glukozidaz (EC 3.2.1.20),  $\alpha,1\rightarrow4$  ve  $\alpha,1\rightarrow6$  glikozid bağlarının her ikisini de hidrolizleyebilir. Ekzo-amilazlar, amilozun ve amilopektinin dış glukoz birimlerine karşı aktivite gösterdiklerinden yalnızca glukoz, maltoz ve  $\beta$ -dekstrinlerin oluşumunu sağlarlar. Ayrıca,  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz enzimleri, serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya çevirebilirler.

Nişasta hidrolizleyen enzimler arasındaki üçüncü grup, izoamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanaz tip I (EC 3.2.1.41) olarak adlandırılan dallanmayı parçalayan enzimlerdir ve yalnızca  $\alpha,1\rightarrow6$  glikozidik bağları hidrolizlerler. Pullulanaz, amilopektin ve pullulandaki  $\alpha,1\rightarrow6$  glikozidik bağları hidroliz edebiliyorken, izoamilaz yalnızca amilopektindeki  $\alpha,1\rightarrow6$  glikozidik bağlara etki edebilir. Nişasta hidrolizleyen enzimlerin dördüncü grubunu transferazlar oluşturmaktadır. Bu enzimler verici (donör) bir moleküldeki  $\alpha,1\rightarrow4$  glikozidik bağını parçalayarak bu molekülün bir kısmını bir alıcıya (akseptör) transfer ederler ve yeni bir glikozidik bağ oluştururlar. Amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19) bu enzim grubundandır. Nişasta hidrolizleyen bazı enzimler ve etki mekanizmaları Tablo 3'te verilmiştir [16].

Tablo 3. Nişasta hidrolizleyen bazı enzimler

Enzim	E.C. Numarası	Glikozidik Bağ Spesifikliği	Etki Mekanizması	Son Ürün
$\alpha$ -Amilaz	3.2.1.1	$\alpha$ -(1→4)	Endo	Doğrusal ve dallanmış oligo sakkaritler
$\beta$ -Amilaz	3.2.1.2	$\alpha$ -(1→4)	Ekzo	Maltoz ve limit dekstrin
Amiloglukozidaz Gluko amilaz	3.2.1.3	$\alpha$ -(1→4) $\alpha$ -(1→6)	Endo Ekzo	Glukoz
İzoamilaz	3.2.1.68	$\alpha$ -(1→6)	Endo	Doğrusal $\alpha$ -(1→4) glukon
Pullulanaz	3.2.1.41	$\alpha$ -(1→6)	Endo	Doğrusal $\alpha$ -(1→4) glukon

Günümüzde  $\alpha$ -amilazlar,  $\beta$ -amilazlar ve glukoamilazlar endüstriyel enzimler içerisinde biyoteknoloji alanında en önemli enzim grubundan bir tanesidir. Amilazlar nişasta endüstrisinde bir çok uygulama alanına sahip enzimlerdir. Bunlar nişastanın hidrolizi ile glukoz ve yüksek fruktoz içerikli şurupların hazırlanması, yüksek maltoz içerikli şurupların hazırlanması, nişastanın hidrolizi ile biyoetanol üretilmesi, meyve sularında bulanıklığın giderilmesi, bira üretiminde nişastanın çözünürleştirilmesi ve sakkarifikasyonu olarak sıralanabilir. Bununla birlikte amilazlar kağıt, tekstil ve deterjan sanayinde de geniş uygulama alanı olan enzimlerdir [6]. Amilazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi birçok kaynaktan elde edilebilmelerine karşılık, endüstriyel amilaz ihtiyacı mikrobiyal kaynaklardan karşılanır. Günümüzde birçok mikrobiyal amilaz ticari olarak elde edilebilmektedir ve nişastanın işlenmesi proseslerinde kimyasal hidrolizinin yerini bu enzimler almıştır [8].

### 1.8. $\alpha$ -Amilazlar

$\alpha$ -Amilaz, 1,4- $\alpha$ -D-Glukan-Glukan Hidrolaz, (E.C.3.2.1.1)  $\alpha$ -1→4 O-glukozidik bağları hidrolizleyen ve geniş bir filogenetik alanda yaygınlık gösteren bir enzimdir.  $\alpha$ -Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikrobiyal alemde evrensel olarak bulunur. Geçmiş birkaç on yılda farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler  $\alpha$ -amilazlar üzerine dikkate değer oranda araştırma yapılmıştır. Amilazların üretiminde mikroorganizmaları kullanmanın avantajı, onların ekonomik biyokütle oluşturma kapasiteleri ve mikroorganizmaların istenilen karakterde enzim elde edebilmek için kolay manipüle edilebilmeleridir. Endüstriyel ihtiyacı karşılamak için ısı kararlı bakteriyel amilazlar, daha çok *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir [8].  $\alpha$ -Amilaz en iyi bilinen endo-amilazdır ve

nişasta çözeltilisinin viskozitesini hızla azaltır. Bu enzimler substratı hidrolizlemelerine göre iki kategoriye ayrılırlar. Sıvılaştırıcı (liquifying) amilazlar nişastayı % 30-40 oranında hidrolizlerken, daha küçük zincir uzunluğunda ürünler oluşturan (saccharifying) amilazlar % 50-60 hidrolizi gerçekleştirirler. Bu sınıflandırma amilazların özelliklerini ortaya koymak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Dolayısıyla endo- amilazların reaksiyon ürünleri farklı zincir uzunluğuna sahip oligosakkaritlerdir [16].

Diğer enzimlerde de olduğu gibi amilazların substrat spesifikliğı enzimin elde edildiğı kaynağına göre değışkenlik arz etmekle birlikte,  $\alpha$ -amilazlar genel olarak çözüner nişasta substratı varlığında en yüksek aktivite gösterirler. Bununla birlikte amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz da amilazların substratlarıdır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, siklodekstrinaz, maltojenik amilaz ve neopullulanazın grup 13'e dahil olduğu ayrıca, siklodekstrin, pullulan ve nişastayı hızlı bir şekilde hidroliz ettikleri açığı çıkmıştır. Buna karşılık  $\alpha$ -amilazlar, yalnızca nişastayı hidroliz ederler.  $\alpha$ -Amilazların aksine siklodekstrin parçalayan enzimler için nişastanın zayıf bir substrat olduğu görülmüştür.

$\alpha$ -Amilazlar pH 2,0 ile 12,0 arasında değışen pH optimumuna sahip olabilirler. Birçok bakteriyel ve fungal amilazın asidik ile nötral pH aralığında pH optimumuna sahip olduğu bildirildi. *Alicyclobacillus acidocaldarius* amilazının optimum pH'sı 3,0 olduğu bildirildi. Alkalofilik *Bacillus sp.* amilazının ise pH 9,0'da en yüksek aktivite gösterdiği bildirildi. Amilazların optimum sıcaklık değıeri elde edildiğı organizmanın büyüme şartlarına bağılıdır. *F. oxysporum* amilazının 25-30 °C optimum sıcaklığına sahip olduğu, bu değıerin *Pyrococcus furiosus* ve *Pyrococcus woesei* amilazları için sırasıyla 100 °C ve 130 °C olduğu rapor edildi. Birçok çalışmada ısı kararlılık belirlenmeyen bir parametre iken, *Bacillus licheniformis* CUMC 305 amilazının 100 °C'de 4 saat kararlı olduğu bildirildi. Amilazların moleköl ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında değışmektedir. Mikrobiyal amilazların moleköl ağırlıkları 50 ile 60 kDa civarında olduğu, klonlanan amilaz genlerinin analizi ve belirlenen amino asit sıralarından direkt hesaplanarak ortaya koyulmuştur. Bazı amilazların glikoprotein yapısında olduğu da rapor edilmiştir. Birçok metal katyonunun, özellikle ağır metal katyonlarının, sülfidril grup reaktifleri, N-bromosüksinimit, iyodoasetat, BSA, EDTA ve EGTA gibi birçok kimyasalın  $\alpha$ -amilazları inhibe ettiği bildirildi [8].

$\alpha$ -Amilazların büyük çoğunluğu  $\text{Ca}^{2+}$  bağımlı metalo enzimlerdir ve her bir amilaz en az bir  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu ihtiva etmektedir.  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin amilazlara bağlanma afinitesi diğer metal

katyonlarından çok daha yüksektir.  $\alpha$ -Amilazlar bir ile on arasında değişen sayılarda bağlı  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu ihtiva edebilirler.  $\text{Ca}^{2+}$   $\alpha$ -amilazlardan EDTA'ya karşı diyalizlenerek veya elektrodializle uzaklaştırılabilir.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonları uzaklaştırılan enzim  $\text{Ca}^{2+}$  ilavesi ile tekrar aktif hale getirilebilir [17].

Enzim üretiminde kullanılan batık faz (submerged) fermantasyonunun yanında günümüzde katı faz (Solid state) fermantasyonu tekniği de kullanılmaya başlanmıştır. Her iki teknik kıyaslandığında katı faz fermantasyonu ile enzim üretiminin bir çok avantajı olduğu bildirilmektedir. Batık faz fermentasyonu ile kıyaslandığında katı faz fermantasyonunun özellikle yüksek miktarda enzim üretimi, düşük maliyetli oluşu, daha az enerji tüketmesi, suya çok az ihtiyaç duyulması gibi bir çok avantajı olduğu bildirilmektedir.

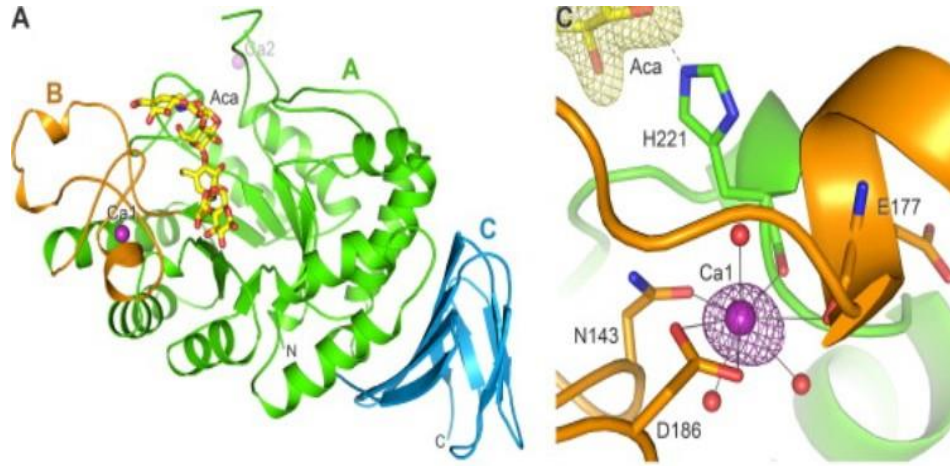
Enzim üretiminde üretim ortamının fiziko kimyasal parametreler açısından optimize edilmesinin önemli olduğu bildirilmektedir. Bu parametreler pH, sıcaklık, karbon ve azot kaynağı, metal iyonlarının varlığı, yüzey aktif maddelerin varlığı, fosfat miktarı ve indükleme olarak sıralanabilir. Çevre şartlarının optimize edilmesi elde edilen enzimin fizikokimyasal özelliklerini etkilediği ifade edilmektedir [17].

### **1.8.1. $\alpha$ -Amilazların Aktif Merkezi ve Kristal Yapıları**

$\alpha$ -Amilazlar glikozid hidrolaz ailesi içerisinde 13. grupta bulunan ve nişastanın hidrolizinde rol oynayan bir sınıfı teşkil eder. Bu ailenin üyeleri  $(\beta/\alpha)_8$  katlanmalı çoklu alt birimlerine sahiptir ve substrat özgülüğü için oldukça geniş bir yapısal esneklikleri vardır. Çok sayıda klonlama çalışması sonucunda elde edilen sıra analizlerinin kıyaslanması, bu enzimlerin özellikle substrat özgülüklerinin anlaşılmasını sağlamıştır. Grup 13'ün bir çok üyesinin primer yapıları kıyaslandığında, ilgili enzimlerin geniş bir sıra çeşitliliklerinin olduğu ve oldukça korunmuş 4 kısa  $(\beta/\alpha)_8$  katlanmalı katalitik bölgesine sahip oldukları belirtilmiştir [18].  $\alpha$ -Amilaz prototipinin iki boyutlu yapısının, A, B, C olarak adlandırılan üç domainden oluştuğu rapor edilmiştir. Domain A, N-ucundaki varil (barrel) yapısıdır, domain B, 3  $\beta$ -katlamalı tabaka ile 3  $\alpha$ - heliks arasında uzun bir spiralden oluşur. Domain C ise  $\beta$ -katlamalı tabakalardan oluşur ve domain A ya bağlanır.  $(\beta/\alpha)_8$  varil sekiz farklı  $\beta$ -katlamalı tabaka ve  $\alpha$ -helikslerden oluşur. TIM varil bütün  $\alpha$ -amilazların aktif merkeziyle alakalı oldukça korunmuş dört bölge içermektedir. Birinci bölge; C-ucunun sonundaki histidin içeren  $\beta$ -katlamalı tabaka 3 ki substrattaki glukoz birimleri ile etkileşime girer.



İkinci bölge, aspartik asit içeren  $\beta$ -katlamalı tabaka 4 ki kataliz esnasında nükleofil olarak etki eder. Üçüncü bölge, glutamik asit içeren  $\beta$ -katlamalı tabaka 5 ki kataliz esnasında proton alıcısı/vericisi olarak davranır. Dördüncü bölge ise histidin ve/veya asparagin içeren  $\beta$ -katlamalı tabaka 7 ki kataliz esnasında substrattaki glukoz birimleri ile hidrojen bağı yapabilir [18]. *Geobacillus thermoleovorans*  $\alpha$ -amilazının kristal yapısı Şekil 2'de verilmiştir.



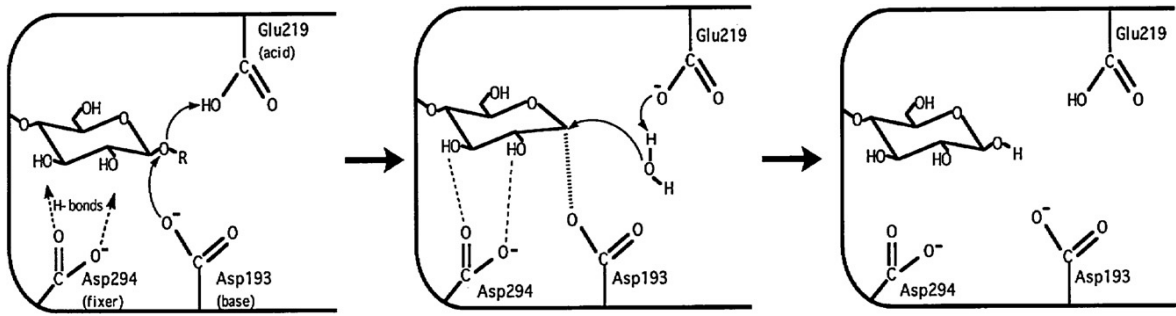
Şekil 2. *Geobacillus thermoleovorans*  $\alpha$ -amilazı kristal yapısı Domain A (yeşil renkli), Domain B (portakal renkli) ve Domain C ( Mavi Renkli)

*Geobacillus thermoleovorans*  $\alpha$ -amilazının 3 domainden oluştuğu şekilden görülmektedir. Kristal yapısı aydınlatılan enzimin iki adet  $\text{Ca}^{2+}$  bağlama bölgesi ihtiva ettiği,  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarından birinin enzime kuvvetli bağlandığı ve EDTA tarafından şelatlanmadığı bildirildi.  $\text{Ca}^{2+}$  ilave edilmesi enzim aktivitesi üzerine etki etmezken, ısı kararlılığı oldukça artırdığı bildirildi. 2 mM EDTA ile muamelenin enzim aktivitesini % 25 oranında inhibe ettiği, EDTA ortamdan uzaklaştırıldığında ise enzimin aktivitesini geri kazandığı bildirildi [19].

### 1.8.2. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Kataliz Mekanizması

$\alpha$ -Amilazların reaksiyon mekanizmaları incelendiğinde, bu enzimlerin katalitik aktivitelerini iki adımlı yer değiştirme mekanizmasına göre gerçekleştirdikleri önerilmektedir. Bu mekanizmaya göre, aktif bölgede bulunan iki karboksilik asit

grubundan biri nükleofil olarak davranır ve glikozidik bağın anomerik karbonuna saldırarak Enzim-Glikozil ara ürününü oluşturur. İkinci karboksilik asit grubu ise asit/baz katalisti olarak davranır ve birinci adımda glikozidik oksijenin protonlanmasını (genel asit katalizi) sağlarken ikinci adımda suyun deprotonizasyonunu (genel baz katalizi) sağlar.  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz enzimlerinin katalitik mekanizmaları için tek adımlı bir mekanizma önerilmiştir. Bu mekanizmaya göre enzimlerin aktif merkezlerindeki iki karboksilik asit uygun açıda ve mesafede yer alarak genel asit baz katalizi ile substratı hidrolizledikleri önerilmektedir. Karboksilik asitlerden biri genel baz katalizi ile suyun protonunu koparıırken diğeri genel asit katalisti olarak davranır ve glikozidik bağı koparır. Her iki mekanizmaya göre de reaksiyon okzokarbenyum ara ürünü üzerinden gerçekleşir. Amilazlar için önerilen kataliz mekanizması şematik olarak Şekil 5’te verilmiştir [16].



Şekil 3. Amilazlar için kataliz mekanizması

### 1.8.3. $\alpha$ -Amilazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Nişasta veya nişasta kullanılan endüstrilerde hidrolitik enzimler arasında en önemli  $\alpha$ -amilazlardır. Amilazlar ticari açıdan ilk olarak 1984 yılında metabolik bozuklukları tedavi edici olarak kullanılmıştır. Günümüz endüstriyel proseslerinde amilazlar, gıdadan tekstile, deterjanlardan kağıt endüstrisine ve hayvan yemlerinin iyileştirilmesi gibi çok farklı sahalarda kullanım alanına sahiptir. Bunlara ilaveten  $\alpha$ -amilazların ilaç sanayinde ve saf kimyasal üretimi endüstrisinde de uygulama olanaklarının olduğu rapor edilmiştir [8]. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi onların substrat spesifiteleri, optimum pH, ısıl kararlılık gibi özellikleri ile alakalıdır [20]. Literatür incelendiğinde, her bir endüstrinin ihtiyaç duyduğu  $\alpha$ -amilaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin farklılık gösterdiği görülür. Örneğin gıda endüstrisinde özellikle fırıncılık ve pastacılıkta 40-50 °C

sıcaklıklarda kararlı  $\alpha$ -amilazlar tercih edilmektedir.  $\alpha$ -Amilazların asıl ticari pazarı nişasta hidrolizatı üretiminde, özellikle nişastanın glukoz ve fruktoz şuruplarına dönüştürülmesi prosesleridir. Bu şuruplar yüksek oranda fruktoz içerirler ve alkolsüz içeceklerin tatlandırılmasında ve pastacılıkta kullanılırlar. Nişasta hidrolizinde oldukça ısı kararlı  $\alpha$ -amilazların gerekli olduğu rapor edilmiştir [8].

Tekstil endüstrisinde  $\alpha$ -amilazlar haşıl alma süreçlerinde kullanılmaktadır. Kağıt endüstrisinde ise, kağıdın mukavemetini artırmak için kağıt, üretilirken nişasta ile muamele edilir. Nişasta kağıda presleme esnasında katılır ve bu sayede kağıt iki pres rulo arasından geçerken nişasta ile muamele edilmiş olur. Bu proses için 45-60 °C arasında değişen sıcaklıklara ihtiyaç vardır. Bu proseste kullanılan doğal nişastanın viskozitesi, kağıdın kaplanması için oldukça yüksektir. Viskozite doğal nişastanın, sürekli proseslerde veya bir tank içerisinde  $\alpha$ -amilazlar ile muamele edilmesi ile düzenlenir.

Deterjan sanayisi enzimlerin büyük oranda kullanıldığı endüstriyel bir alandır. Deterjan formülasyonlarında enzim kullanımı, onları zor lekeleri kolayca temizlemelerini sağlamak ve onları çevre açısından güvenli kılmaktadır. Deterjan endüstrisinde  $\alpha$ -amilazlar şeker polimerlerinin hidrolizi amacıyla kullanılmaktadır. Amilazlar deterjan formülasyonlarında yoğunca kullanılan enzimlerdir ve sıvı deterjanların % 90'ına yakın bir miktarı amilaz ihtiva etmektedir. Enzim içeren deterjanlar içermeyenlere kıyasla daha ılıman koşullarda etkinlik gösterirler. Günümüzde sıvı deterjanların % 90'ı  $\alpha$ -amilaz içermektedir ve bulaşık makinesi deterjanları için bu enzime duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır [8]. Deterjan formülasyonunda kullanılacak  $\alpha$ -amilaz enziminin nispeten düşük sıcaklıklarda ve alkali pH'larda aktivite göstermesi, oksitleyicilere karşı dayanıklı olması istenilen özelliklerdir. Düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren, yüksek pH'larda aktif ve kararlı, okside edici ajanlar ve yüzey aktif maddeler varlığında etkin olabilen enzimler deterjan formülasyonlarında kullanım potansiyeli olabilen enzimlerdir [20].

Etanol en çok üretilen ve kullanılan bir bio yakıttır. Bio etanol üretiminde nişasta en fazla tercih edilen hammaddedir çünkü nişasta dünya genelinde her bölgede kolayca ve en ucuz elde edilebilen bir hammaddedir. Bu amaçla kullanılan nişasta iki adımlı enzimatik bir prosese tabi tutularak fermente edilebilir şekerlere dönüştürülür. Prosesin bu ilk aşamasında nişasta  $\alpha$ -amilazlarla muamele edilerek çözünürleştirilir ve amilolitik enzimlerle veya mikroorganizmalarla fermente edilebilir şekerlere dönüştürülür. Prosesin ikinci aşaması fermente edici mikroorganizmaların kullanılmasıyla şekerlerin alkole dönüştürülmesi sağlanır.

$\alpha$ -Amilazlar kağıt endüstrisinde de uygulama alanı olan enzimlerdir. Kağıt hamuru işleme esnasında mukavemeti artırmak amacıyla nişasta ile muamele edilir. Nişasta ile muamele edilmiş kağıt daha düzgün ve dayanıklı bir yüzeye sahip olurken yazma kalitesinde artmış olur. Bu amaçla kullanılacak düşük viskoziteli nişasta çözeltilerini elde etmek amacıyla  $\alpha$ -amilazlara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır [20].

Daha önce de ifade edildiği gibi farklı endüstriyel proseslerin ihtiyacı tek kaynaktan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi tarafından karşılanamaz. Bu sebeple farklı endüstriyel uygulamaların ihtiyaç duyduğu  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin, özellikle termofilik organizmalardan saflaştırılmasına ve protein mühendisliği uygulamaları ile özelliklerinin değiştirilmesine dönük çalışmalar sürdürülmektedir [3].

#### **1.8.4. $\alpha$ -Amilaz Aktivite Tayin Metotları**

$\alpha$ -amilaz aktivitesi genellikle çözünebilir nişasta veya modifiye nişasta substratı varlığında tayin edilir.  $\alpha$ -Amilazlar nişasta moleküllerindeki  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 glikozidik bağları hidrolizler ve glukoz, dekstrinler ve limit dekstrinlerin oluşumuna neden olurlar.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi, indirgen şeker miktarındaki artış veya iyotla muamele edilmiş substratın renk şiddetindeki azalış ölçülerek belirlenir. Bununla birlikte amilaz aktivitesi nişasta süspansiyonunun viskozitesindeki azalışın ölçülmesi ile de belirlenebilir [21].

##### **1.8.4.1. Dinitro Salisilik Asit (DNS) Metodu**

Bu metot nişastayla amilaz enziminin etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarındaki artışın belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu metodun prensibi fonksiyonel aldehit (glukoz) veya keton (fruktoz) gruplarının oksidasyonuna dayanır. Serbest aldehit veya keton grubuna sahip şekerler alkali koşullar altında 3,5 dinitro salisilik asidi, 3-amino-5-nitro salisilik aside indirgeyerek kırmızı, kahverengi renk oluşumuna neden olurlar. Renk şiddetindeki artış indirgen şeker miktarıyla orantılıdır [8,22].

#### 1.8.4.2. İyot Renk Şiddetinde Azalma Metodu

Nişasta  $I_2/KI$  reaktifi ile koyu mavi renkli bir kompleks oluşturur. Nişastanın amilaz enzimi ile kademeli hidrolizi sonucu koyu mavi renkli kompleksin rengi kırmızı, kahverengine dönüşür. Renk şiddetindeki azalışın 620 nm'de substrat körüne karşı ölçülmesi ile dekstrinleştirme aktivitesi belirlenir. Absorbanstaki % 1'lik azalış bir enzim ünitesi olarak tanımlanır. Besiyeri bileşiminde bulunan Luria broth, triptone ve pepton gibi birçok madde bu metoda girişim yapmaktadır.

Amilaz enzim aktivitesi, boyar maddelerle modifiye edilmiş substratların hidroliz ürünlerinin analiziyle, enzimle muamele edilen nişasta çözeltisinin viskozitesindeki azalışın ölçülmesi gibi farklı metotlarla da belirlenebilir [8].

#### 1.8.5. $\alpha$ -Amilaz Üreten Mikroorganizmalar

*Geobacillus stearothermophilus*'tan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığının 70 °C olduğu ve enzimin en yüksek aktiviteye pH 7,0'da sahip olduğu bildirildi. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE analizinde molekül ağırlığı 63 kDa olan tek bir protein bandının belirlendiği bildirildi. Saflaştırılan enzimin 50 ve 60 °C'de iki saat kararlı olduğu, pH 7,0'da 3 saat sonunda aktivitesini tamamen koruduğu rapor edildi.  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve Triton X-100'ün enzimi aktive ettiği  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonlarının ise enzim aktivitesini büyük oranda inhibe ettiği bildirildi. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0.051 mM ve 1.424  $\mu$ mol/dk olduğu bildirildi [23].

*Anoxybacillus flavithermus*'tan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 55 °C ve pH 7,0'da en iyi aktivite gösterdiği, SDS-PAGE analizinde enzimin monomerik ve 60 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu, saflaştırılan enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin sırasıyla 0,005 mM ve 3,5  $\mu$ mol/dk olduğu bildirildi [24].

*B. subtilis*'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 45 °C ve pH 6,0 olduğu, saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 56 kDa olduğu, enzimin pH 8,0'da 1 saat sonunda % 85 kalan aktiviteye sahip olduğu bildirildi.  $Cu^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları kuvvetli inhibisyona sebep olurken,  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  iyonlarının enzimi aktive ettiği bildirildi [25].

*Geobacillus sp.* NMS 2'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 50 °C ve pH 6,9 en yüksek aktiviteye sahip olduğu, saflaştırılan enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin ise sırasıyla

3,4 mg/mL ve 460 µmol/dk.mg olduğu bildirildi. Bir saat in kübasyon sonunda enzimin pH 6,9-9,0 aralığında kararlı olduğu, 50 °C ve 60 °C’de bir saat inkübasyon sonunda enzimin aktivitesini koruduğu bildirildi [26].

Toprak örneklerinden izole edilen ve termostabil alkalın  $\alpha$ -amilaz üreten *Bacillus sp.* ANT-6 suşunun 25-45 °C sıcaklık ve pH 7-11 aralığında çoğalabildiği ve 37 °C sıcaklıkta ve pH 9 da maksimum  $\alpha$ -amilaz üretme kapasitesine sahip olduğu bildirildi. bu suştan elde edilen ham enzim çözeltisi SDS-PAGE ile analiz edildiğinde, substrat boyama sonucu tek bir amilolitik aktivite bandının görüldüğü rapor edildi. kısmi saflaştırılan enzimin 94,5 kDa büyüklüğünde olduğu, en yüksek enzim aktivitesinin ise 80 °C sıcaklık ve pH 10,5’da olduğu bildirildi. 5 mM  $Ca^{2+}$ ’nin enzimi aktive ettiği, 10 mM EDTA, 8 M üre ve % 0,1 SDS konsatrasyonlarında enzimin sırasıyla %4,90, %86, %10,27 oranında inhibe olduğu bildirildi. enzimin alkali pH’larda 24 saat kararlı olduğu da rapor edildi [11].

Termofilik ve amilolitik aktivite gösteren yeni bir bakteri suşunun Larijan kaplıcasından (İran), izole edildiği ve 16S rDNA analizi sonucunda, *Geobacillus thermodenitrificans* suşunun 16S rDNA’sı ile %99 benzerlik gösterdiği bildirildi. *Geobacillus sp.* LH8 olarak tanımlanan bakteri suşunun ürettiği  $\alpha$ -amilaz enziminin iyon değişim kromatografisi ile 13,6 kat saflaştırıldığı ve saflaştırılan enzimin 52 kDa olduğu bildirildi. Saflaştırılan enzimin en yüksek aktiviteye 80 °C’de ve pH 5-7 aralığında sahip olduğu rapor edildi.  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Cr^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  iyonları enzimi aktive ederken,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve EDTA’nın enzimi inhibe ettiği de bildirildi.

### 1.9. *Geobacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Yeryüzü veya toprak basilleri anlamını ifade eden *Geobacillus* cinsi, günümüzde sistematiği yapılmış 16 türü içermektedir ve tip türü *Geobacillus stearothermophilus*’dur. Bu cinsin üyeleri Gram pozitif veya değişken, hücreleri çubuk şeklinde, hareketli, elips veya silindirik şeklinde terminal veya subterminal sporlara sahip, koloni morfolojisi ve büyüklüğü değişkendir. Başlıca kinonu, menakinon-7’dir ve nötrofilik özelliktedirler. Bu cinsin % G+C içeriği, % 48,2-58 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C15:0, iso-C16:0 ve iso-C17:0’dir. *Geobacillus* cinsinin kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği % 97’den daha fazla olduğu için, 16S rRNA gen dizi analizi *Geobacillus* cinsine ait türlerin ayrımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar [27].

### 1.10. Enzim Saflaştırmanın Önemi

Çalışılmakta olan enzim preparasyonları içerisinde, hedef olan enzimin %1'i kadar dahi başka bir enzimin bulunması, reaksiyon ortamında milyonlarca yabancı molekülün oluşmasına yol açabilmektedir. Genellikle bu tipteki kirleticiler, predominant olarak tek tipte değilse ve çalışılmakta olan bileşik ile oldukça yüksek olarak aktif değilse, herhangi bir problem oluşturmayabilir. Bütün bu nedenlerin yanı sıra, saf olarak elde edilmiş proteinlerin amino asit dizilimleri belirlendikten sonra, bu enzimlerin sentezinden sorumlu olan genlerin izolasyonu için gerekli olan problemler *in vitro* olarak sentezlenebilir. *In vitro* koşullarda sentezlenen problemler ise bu enzimlerin sentezinden sorumlu olan genlerin izolasyonunda kullanılabilir. Ayrıca, enzimlerin biyolojik aktivitelerinden sorumlu olan üç-boyutlu yapılarının araştırılmasında, saflaştırılarak amino asit dizilimleri belirlenmiş olan proteinlerden yararlanılabilir [28]. Endüstriyel enzimler üretilmeleri esnasında ham özüt olarak elde edilirler.  $\alpha$ -Amilazların ticari kullanımı saflaştırma işlemlerine gerek duymaz, ancak klinik, medikal amaçlı kullanılacak enzimlerin yüksek saflıkta olmaları gerekmektedir. Akademik çalışmalarda kullanılacak enzimlerin de yüksek saflıkta olmaları istenmektedir, özellikle enzimlerin kristal yapılarını aydınlatabilmek için oldukça saf enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Laboratuvar ölçeğinde enzim saflaştırmak amacıyla farklı stratejiler geliştirilmiş olmakla birlikte bu stratejiler genellikle bir kombinasyon halinde kullanılmalıdır. Günümüzde sıvı-sıvı ekstraksiyonu büyük miktarlarda saf enzim üretimi için başarı ile kullanıldığı bildirilmektedir [20].

İster akademik amaçlı çalışmalar için, isterse endüstriyel ve klinik uygulamalar için olsun, enzimlerin elde edildiği kaynaklar oldukça farklıdır. Enzim kaynaklarının başlıca gruplarını ise mikroorganizmalar, bitkiler, hayvan dokuları oluşturmaktadır. Enzim kaynakları bu kadar farklı ve çeşitli olmasına rağmen, bu kaynaklardan elde edilen enzimler ister doğal isterse rekombinant olsunlar, genellikle benzer saflaştırma protokolleri ve teknikleri ile saflaştırılırlar. İstenilen saflıktaki bir ürünün elde edilmesi için birden fazla saflaştırma basamağının uygulanması gerekmektedir. Başarılı ve randımanlı bir protein saflaştırma çalışmasının anahtarı ise en uygun tekniğin seçimine, seçilen tekniğin optimizasyonuna ve verimi artırmak ve saflaştırma protokolünün basamak sayısını minimuma indirmek için seçilen tekniklerin mantıklı bir şekilde kombinasyonuna bağlıdır [28]. Saflaştırma protokolü üzerine etkisi olan diğer önemli bir faktör ise saflaştırmanın amacıdır. Şayet hedef proteinin saflaştırılması, tamamı ile akademik bir amaçla

yapılıyorsa, bu durumda en önemli amaç, genellikle proteinin homojen olarak elde edilmesi olmaktadır. Bu durumda, homojen (saf) bir protein solüsyonunun elde edilmesi için gereken basamakların sayısı, prosedürün süresi, son-ürünün maliyeti ve verimliliği gibi konular ikinci planda kalmaktadır. Şayet hedef protein ticari bir uygulama amacı ile saflaştırılıyorsa, bu durumda saflaştırma prosedürünün maliyeti ve teknik faktörler çok daha önemli olmakta iken hedef proteinin saflık derecesi, gerekli olan minimum düzeyde olmaktadır. Saflaştırılmak istenen proteinin miktarı veya istenilen saflık derecesi de saflaştırma protokolünü etkileyecektir. Akademik amaçlı çalışmalarda, saflaştırılmış olan proteinin yapısal ve fonksiyonel çalışmalarının yapılabilmesi için genellikle birkaç yüz miligram ile 1 g arasında saf protein yeterli olmaktadır. Bunun aksine, ticari bir uygulama amacıyla saflaştırılmış olan proteinlere daha fazla miktarlarda gereksimin duyulmakta ve saflık düzeyleri ise uygulama amaçlarına göre değişmektedir [28].

### **1.11. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimlerin endüstride ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim adamlarını bu katalizörleri daha geniş ve daha kullanışlı hale getirme olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilişkin ortaya çıkan pekçok sorunu olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır [29]. Endüstride enzim kullanımının avantajlarından daha önce bahsedilmişti. Ancak sürekli prosesler olan endüstriyel uygulamalarda serbest enzimleri kullanmak, onların üretim maliyetlerinin yüksek oluşu, doğal olarak buldukları ortamdaki izole edildiklerinde aktivitelerini kaybetme eğiliminde oluşları, eser düzeydeki maddelerin dahi inhibisyona sebep olması gibi bir çok dezavantaj endüstride enzimlerin kullanımını sınırlamaktadır. Bu noktada enzimlerin inert katı bir desteğe immobilize edilmeleri, bu problemlerin çözümünde en etkili ve en çok başvurulan yöntemlerden birisidir [30]. Enzimler adsorbsiyon, çapraz bağlama, jelde hapsetme, mikro kapsülleme, kovalent bağlama gibi farklı yöntemlerle immobilize edilebilirler. Bu yöntemler ya da bu yöntemlerin kombinasyonu ile enzimler immobilize edilebilmelerine rağmen tek bir yöntem ve tek bir immobilizasyon yöntemi bütün enzimler ve onların uygulamaları için en iyisi değildir. Enzimleri immobilize etmenin çok daha önemli bir gereksinimi ise onların operasyonel kararlılıklarını artırmaktır. Serbest enzimlerle kıyaslandığında immobilize



enzimler ekstrem şartlarda çok daha kararlıdır [5]. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

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

Fiziksel ya da kimyasal olarak immobilize edilen enzimler, daha iyi bir kararlılık gösterir ve diğer maddelerle etkileşimi daha azdır. Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktivite edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon, çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir [5]. İmmobilize enzimlerin yukarıda ifade edilen üstünlüklerinin yanında, enzimlerin aktiviteleri üzerine bazı kötü etkileri de vardır. Serbest enzimlere kıyasla genellikle immobilize enzimlerin aktivitelerinde düşüş gözlenir ve bu durum immobilize enzimlerin  $K_m$  değerinin büyümesine sebep olur. Bunun sebebi enzim immobilizasyonunda kullanılan tekniğe göre enzimin yapısındaki değişiklikler olabilir. Ayrıca tutuklama hapsedme gibi metodlar kullanıldığında immobilize enzimlerin substratları ile etkileşimleri mikro bir çevrede gerçekleşmektedir ve bu durum enzimin hareketliliğini kısıtlamaktadır. İmmobilize enzimlerin  $K_m$  değerlerinin büyümesinin bir sebebi de immobilizasyon sonucu oluşan sterik engellemeler de olabilir [5, 30].

Ekstrem koşullarda enzimlerin kararlılığını artırması, immobilize enzimleri sadece endüstriyel değil aynı zamanda laboratuarda ölçeğinde organik sentezlerde, analitik ve medikal uygulamalarda da kullanılabilmesini ortaya koymaktadır. Enzimlerin sadece sulu ortamlarda değil organik çözücüler varlığında da reaksiyonları katalizlemeleri gelecekte immobilize enzimlerin organik sentezde kullanılabilmesini de göstermektedir. Günümüzde yüksek fruktoz içerikli mısır şurupları ve enantiyo saf *L-DOPA* üretimi immobilize enzimlerin kullanımına örnek gösterilebilir [5, 30].

### 1.12. Çalışmanın Amacı

Isıl kararlı enzimler oldukça yüksek özgünlüğe sahiptirler ve bu sebeple birçok endüstriyel uygulama için potansiyel oldukları düşünülmektedir. Bu tip enzimler yiyecek, kâğıt, deterjan, ilaç ve hayvan yemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür enzimleri termofilik mikroorganizmalardan elde edebilmek mümkündür. Bu tür kararlı enzimlere endüstride duyulan ihtiyaç, gelecekte bu enzimlerin geliştirilmesi ve uygulama alanlarının genişletilmesini oldukça önemli hale getirmektedir [8].

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu organizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik analoglarına göre daha kararlı olduğu keşfedilmiştir. Hücre içi enzimlerin aksine, hücre dışına salınan enzimlerin kararlılığı yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler [9]. Endüstriyel uygulamalarda genellikle ısıl kararlılığa sahip immobilize enzimler kullanılmaktadır. Isıl kararlı mikroorganizmalardan elde edilen termofilik amilazlar bu alanda oldukça önemli bir yere sahiptir [10]. Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonuna, saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna duyulan ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır.

Bu çalışmada KTÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN tarafından Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından izole edilen 7 farklı *Geobacillus* termofil bakteri türünün, (*Geobacillus sp.* TF1, TF12, TF14, TF16, TF17, DH20 ve *Geobacillus thermodenitrificans* TH2),  $\alpha$ -amilaz aktivitesi açısından incelenmesi, biyokimyasal özellikler açısından en iyi özellikli enzimi üreten organizmanın belirlenmesi, bu organizmanın ürettiği enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve farklı destek maddelerine immobilize edilerek, enzimin endüstride kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan çözüner nişasta, amiloz, amilopektin,  $\beta$ -siklo dekstrin, Dinitro salisilik asit (DNS), Tris (hidroksi metil amino metan) ve amonyum sülfat Sigma Aldrich (USA)'dan temin edildi. Kullanılan diğer bütün kimyasallar analitik saflıktadır.

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz İsmi	Marka	Model
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektrofzezi	Biorad	Mini PROTEAN-Tetra Sistem
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 100 XL
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Santrifüj	Hermle	Z 36 HK
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Hava Banyolu Çalkalayıcı	IKA	KS 4000
Su Banyosu	Memmert	WBU 45
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Vorteks	Thermolyne	Type 37600
Otoklav	Tomy	SX700E
Terazi	Ohaus	Pioneer
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Derin Dondurucu	Regal	RDD-1280
Peristaltik Pompa	TRIS	Teledyne
Kollektör	ISCO	Retriever 500
Dedektör	Isco	UA6 UV-Vis Dedector
Vakum Pompası	VacuBrand	PC101UT

### 2.1.2. Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler

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

#### 2.1.2.1. Tampon Çözeltiler

- 50 mM Glisin-HCl (pH 3,00): 0,3798 g Glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 3,00'a ayarlandı. Son hacim 100 mL ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat (pH 4,00): 0,6804 g NaAc.3H<sub>2</sub>O uygun Hacimde saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 4,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat (pH 5,00): 0,6804 g NaAc.3H<sub>2</sub>O uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 5,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat (pH 6,00): 0,6805 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 6.00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat (pH 7,00): 0,6805 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 7.00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Tris-HCl( pH 8,00): 0,6057 g Tris bazı uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 8,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Tris-HCl( pH 9,00): 0,6057 g Tris bazı uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH 9,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH (pH 9,00): 0,3799 g Glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 9,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH (pH 10,00): 0,3799 g Glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 10,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH (pH 11,00): 0,3799 g Glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 11,00'a ayarlandı. Hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidrat saf suda çözüldü. Hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,90 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O saf suda çözüldü. Hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 2,20): 98 mL A çözeltisi ile 2 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 22,4 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 3,00): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 20,8 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 4,00): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 18,1 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 5,00): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 16,6 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 6,00): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 15,3 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 7,00): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 13,8 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Mcilvaine Tamponu (pH 8,00): 2,8 mL A çözeltisi ile 97,2 mL B çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 12,69 mL alınıp saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

#### 2.1.2.2. Sıvı ve Katı Besiyerleri

Laura-Bertani (LB) Besiyeri: 5 g yeast ekstrak, 10 g Pepton, 5 g NaCl uygun hacimde saf suda çözüldü. pH 7,50'ye ayarlanarak hacmi 1L'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

LB Agar: Taze hazırlanmış LB besiyerine %1(w/v) olacak şekilde agar agar ilave edildi. Otoklavda steril edilerek petrilere döküldü.

% 1 Nişastalı LB: LB besiyerine konsantrasyonu %1 olacak şekilde çözüdür nişasta ilave edildi. pH 7,50'ye ayarlandı. Otoklavda steril edildi.

% 1 Nişastalı LB Agar: %1 Nişasta içeren LB besiyerine % 1(w/v) olacak şekilde agar agar ilave edildi. Otoklavda steril edilerek petrilere döküldü.

### 2.1.2.3. Protein Tayin Çözeltileri

Bovine Serum Albumin (250 µg/mL): 5 mg BSA uygun hacimde saf suda çözüldü hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve -30 °C'de saklandı. Konsantrasyonu 1mg/mL olan bu çözelti tayin esnasında ¼ oranında seyreltilerek kullanıldı.

Commassie Brillant Blue G-250: 100 mg Commassie Brillant Blue-G250 50 mL metanolde çözüldü. Whatman No 1 süzgeç kağıdından süzüldü. Üzerine 100 mL fosforik asit ilave edildi. Hacmi steril saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.2.4. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 9,085 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,80'e ayarlandı, hacmi 50 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 6,057 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,80'e ayarlandı, hacmi 50 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 5 g SDS saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10) : 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptotanol'ün karıştırılması ile hazırlandı, kısımlara ayrılarak -20°C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,30'a ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,80), 100µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C’de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,30’a ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL’ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250’nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Lugol: % 7 I<sub>2</sub> ve % 3 KI ihtiva etmektedir. Doğal jelde amilaz enzim aktivitesini ortaya koymak amacıyla 25 kat seyreltilerek kullanıldı.

#### 2.1.2.5. Substrat ve Enzim Aktivitesi Tayin Çözeltileri

- % 1 Nişasta Çözeltisi: 0,1 g çözüner Nişasta uygun hacimde kaynar suda çözüldü, oda sıcaklığına soğutuldu. Hacmi 10 mL’ye tamamlandı.
- Amiloz: 0,1 g amiloz saf suda çözüldü hacmi 10 mL’ye tamamlandı.
- β-Siklo Dekstrin: 0,1 g β-Siklo Dekstrin saf suda çözüldü hacmi 10 mL’ye tamamlandı.
- Glikojen: 0,1 g Glikojen saf suda çözüldü hacmi 10 mL’ye tamamlandı.
- CM-Selüloz: 0,1 g Karboksimetil Selüloz saf suda çözüldü hacmi 10 mL’ye tamamlandı.
- Çözelti A: 5 mL % 1 NaOH içerisinde % 10 (v/v) olacak şekilde Fenol çözüldü.
- Çözelti B: 0,345 g Sodyum bisüfit 3,45 mL A Çözeltisinde çözüldü.
- Çözelti C : 0,44 g DNS 44 mL saf suda çözüldü. Üzerine 15 mL % 4,5 NaOH ilave edildi. Bu çözeltiliye 11,25 g sodyum potasyum tartarat ilave edildi.
- Dinitro Salisilik Asit (DNS) : Çözelti B ve Çözelti C’nin karıştırılması ile hazırlandı.

## 2.2. Deneysel Çalışmalar

Bu çalışmada, 7 farklı *Geobacillus sp.* termofilik bakteri türü α-amilaz enzimi üretilip üretmedikleri açısından test edildi. Yüksek amilolitik aktivite gösteren suştan α-amilaz

enzimi saflaştırıldı, biyokimyasal karakterizasyonu yapıldı ve enzim farklı katı destek materyallerine immobilize edildi. Bu amaçla yapılan çalışmalar aşağıda adım adım izah edildi.

### 2.2.1. Petri Testi

Bu çalışmada, *Geobacillus sp.*TF1, *Geobacillus sp.* TF12, *Geobacillus sp.* TF14, *Geobacillus sp.* TF16, *Geobacillus sp.* TF17, *Geobacillus sp.* DF20, *Geobacillus sp.* TH2 olarak tanımlanan 7 farklı *Geobacillus* termofilik bakteri suşunun amilolitik enzim aktivitesi gösterip göstermediklerini ortaya koymak için petri testi yapıldı. %1 Nişastalı LB Agar steril edildikten sonra uygun büyüklükteki petriye döküldü. Agarlı besiyeri katılaştıktan sonra steril pipet ucu ile petride 7 kuyucuk açıldı. Bu kuyucuklara bakterilerin LB besiyerinde hazırlanmış gece kültürlerinden 10 µL aşılama yapıldı. Petri 55 °C de bir gece büyümeye bırakıldı. İlgili süre sonunda petri I<sub>2</sub> buharı ile muamele edilerek aktivite zonları ortaya çıkarıldı. Oluşan aktivite zon çapları kumpas ile ölçüldü [31].

### 2.2.2. Organizma ve Optimum indüklenme Süresinin Belirlenmesi

$\alpha$ -Amilaz enziminin elde edilip saflaştırılacağı bakteri suşunu ve optimum indüklenme süresini belirlemek amacıyla 7 farklı *Geobacillus sp.* termofilik bakteri türünün LB besiyerinde gece kültürleri hazırlandı.  $\alpha$ -Amilaz indüklemesi için gece kültürleri %1 nişastalı LB besi yeri ortamına aktarıldı ve 55 °C'de büyümeye bırakıldı. 55 °C'de büyüyen bakterilerden 18, 24 ve 48 saat sonunda örnekler alınarak ham enzim özütleri elde edildi. Aktivite tayin prosedürüne göre enzim aktiviteleri belirlendi. Spesifik aktivite değerleri hesaplanarak çalışmada kullanılacak bakteri suşu ve  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum indüklenme süresi tespit edildi.

### 2.2.3. Ham Enzim Özütünün Eldesi

Temin edilen 7 farklı *Geobacillus sp.* termofilik bakteri türünün LB besiyerinde gece kültürleri hazırlandı. Daha sonra gece kültürleri  $\alpha$ -amilaz indüklemesi için %1 nişastalı LB besiyeri ortamına aktarıldı ve 55 °C'de 24 saat büyümeye bırakıldı. İlgili süre sonunda



bakteri hücreleri 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek besiyeri ortamından ayrıldı. Süpernatant ham enzim çözeltisi olarak kullanıldı.

#### **2.2.4. Enzim Aktivitesi Tayini**

Bu çalışmada enzim aktivitesi, indirgen şeker miktarındaki artışın DNS metoduna göre ölçülmesiyle belirlendi. Bu metod, amilaz enzimiyle nişastanın etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarındaki artışın belirlenmesi esasına dayanmaktadır [8]. Enzim ünitesi optimum şartlarda dakikada 1 $\mu$ M glukoz eşdeğer indirgen şeker açığa çıkaran enzim miktarı olarak belirlendi. Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak belirlendi [32].

Serbest enzim aktivitesi tayin edilirken 300  $\mu$ L substrat üzerine eşit hacimde enzim çözeltisi ilave edildi. Uygun sıcaklıkta (tüm saflaştırma basamaklarında 55 °C, karakterizasyon çalışmalarında 75 °C) 30 dk. reaksiyon gerçekleştirildi. İlgili süre sonunda reaksiyon karışımı üzerine eşit hacimde DNS çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımları kaynar su banyosunda 5-10 dk. kaynatılarak renk oluşumu sağlandı. Buz banyosunda soğutulan tüpler oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 550 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü. Kör tüpü enzim çözeltisi yerine eşit hacimde tampon ihtiva etmektedir.

İmmobilize enzim aktiviteleri tayin edilirken enzimin immobilize edildiği katı destekten 0,5 g alınarak üzerine 350  $\mu$ L % 1 nişasta çözeltisi ve 350  $\mu$ L tampon çözelti ilave edildi. Optimum şartlarda 20 dk. reaksiyon gerçekleştirildi. İlgili süre sonunda reaksiyon tüpleri mini santrifüjle santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra reaksiyon karışımından 600  $\mu$ L alınıp üzerine eşit hacimde DNS reaktifi ilave edildi. 5-10 dk. kaynar su banyosunda bekletilen tüpler oda sıcaklığına soğutulup 550 nm'de absorbansları köre karşı kaydedildi. Kör tüpü immobilize enzim yerine boş Dowex veya Kitin katı destek materyali ihtiva etmektedir [33].

#### **2.2.5. Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması**

Enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla glukoz kalibrasyon grafiği oluşturuldu [34]. Bu amaçla 5 mM stok glukoz çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden bir seri seyreltme yapılarak 0,1-5 mM aralığında

farklı konsantrasyonlarda glukoz çözeltileri (600 µL) hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler üzerine eşit hacimde DNS reaktifi ilave edildi. Elde edilen karışım kaynar su banyosunda 5-10 dk. kaynatılarak renk oluşumu sağlandı. Buz banyosunda soğutulan tüpler oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 550 nm’de köre karşı absorbanları ölçüldü. Absorbanslara karşı konsantrasyon grafiği çizildi. Elde edilen doğrunun eğiminden yararlanarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

### 2.2.6. Protein Tayini

Bu çalışmada protein tayini için Bradford boya bağama metodu [35] ve standart olarak BSA (250 µg/mL) kullanıldı. Tablo 5’teki pipetlemeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri elde edildi. Bu çözeltiler üzerine 1/5 oranında seyreltilmiş Commassie Brilliant Blue G250 boyasından 1’er mL ilave edildi. 5 dk. karanlıkta bekletilen tüplerin absorbanları köre karşı 595 nm’de ölçüldü. Kör tüpü BSA yerine steril saf su içermektedir.

Tablo 5. Bradford protein tayini pipetleme tablosu

BSA(250 µg/mL)	4 µL	8 µL	16 µL	32 µL	48 µL	64 µL	80 µL
Saf Su (Steril) µL	196	192	184	168	152	136	120
C.B.Blue G 250 (mL)	1	1	1	1	1	1	1

Elde edilen absorbanlar BSA konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Örneklerin protein miktarı, örneklerin absorbanlarının standart grafiğinin eğimine oranlanması ile hesaplandı.

### 2.2.7. Enzimin Saflaştırılması

Ham özütteki α-amilaz enzimi kolon kromatografi teknikleri ile saflaştırıldı. Saflaştırma adımları sırasıyla aşağıda ayrıntılı olarak izah edildi.

### 2.2.7.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Ham özütteki  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılmasında ilk adım kademeli amonyum sülfat çöktürmesidir. Amonyum sülfat çöktürmesi buz banyosu içerisinde gerçekleştirildi. Bu amaçla ham özüt %10-90 aralığında amonyum sülfat doygunluğuna ulaştırıldı. İlgili amonyum sülfat doygunluğuna ulaşmak için gerekli amonyum sülfat miktarı, amonyum sülfat hesaplama programı kullanılarak belirlendi [36]. Tartılan katı amonyum sülfat ham özüte yavaş yavaş ilave edilerek ham özüt ilgili doygunluğa ulaştırıldı. İlgili doygunluğa ulaşmış ham özüt buz banyosunda bir saat daha karıştırıldı. İlgili doygunluğa ulaşmış ham özüt 20000 rpm'de 20 dk. santrifüjlendi. Her bir doygunlukta çöken proteinler pH 8,00 Tris-HCl tamponunda çözüldü. Aktivite ve protein tayinleri yapılarak enzimin en iyi çöktüğü amonyum sülfat doygunluğu belirlendi.

### 2.2.7.2. İyon Değişim Kromatografisi

Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılan enzim, Q sepharose fast flow anyon değiştirici kolon dolgu maddesi ile dengelenmiş iyon değiştirici kolona yüklendi. % 20 etanol içerisinde 4 °C'de saklanan kolon dolgu maddesi degaz edilerek 75 cm<sup>3</sup> yatak hacmine sahip olacak şekilde 2x30 cm ebatlarındaki kolonda dengelendi. Dengeleme işlemi 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponu ile gerçekleştirildi. Dengeleme işleminin ardından degaz edilmiş amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen enzim çözeltisi kolona yüklendi. Enzim çözeltisi kolona verildikten sonra tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kolon pH 8,00 Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Kolona tutunan proteinler 0–1,0 M aralığında artan konsantrasyonda sodyum klorür çözeltisi ile elue edildi. Elüsyon işlemi her bir tüpe 100 damla elüat olacak şekilde ve 3,5 mL/dk. akış hızında gerçekleştirildi. Elüsyon işleminin ardından kolon 2,0 M NaCl çözeltisi ile yıkandı. Kolon, bir sonraki kullanıma hazır tutulmak için % 20 lik etanol içerisinde saklandı.

Toplanan elüatların 280 nm'de absorpsiyonları ölçüldü. Absorpsiyon gösteren tüplerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi arandı.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesine sahip tüplerde protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Saflaştırma grafiği çizildi. Elektroforetik analizler için ard arda gelen ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen tüpler Amicon Ultracel Membran 10000 MWCO Milipore membran ile 4 °C'de 4000 rpm'de 4 dk.

santrifüj edilerek deriştirildi. Santrifüj işlemi birkaç kez tekrarlandı. Elektroforetik olarak da analiz edilen tüpler hidrofobik etkileşim kolonuna yüklendi.

### **2.2.7.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Q sepharose fast flow anyon değiştirici kolonu ile kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi hidrofobik etkileşim kolonuna yüklendi. Kolon dolgu malzemesi olarak Phenyl Sepharose Fast Flow kullanıldı. %20 alkol içerisinde bulunan kolon dolgu maddesi degaz edilerek 40 cm<sup>3</sup> yatak hacmine sahip olacak şekilde 1,5x25 cm ebatlarındaki kolona dengelendi. Dengeleme işlemi 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponu ile gerçekleştirildi. Kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi kolona yüklenmeden önce yeterli miktarda (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile doyuruldu ve degaz edildi. Tutunmayan proteinler dengeleme tamponu ile kolondan uzaklaştırıldı. Elüsyon, 0,3 - 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren pH 8,00 Tris-HCl tamponuyla hazırlanan gradient tuz köprüsü ile 2,5 mL/dk akış hızında gerçekleştirildi. Tuz köprüsünün ardından kolon pH 8,00 Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Her bir tüpe 100 damla olacak şekilde elüatlar toplandı. Bir sonraki kullanıma hazır tutmak üzere kolon %20 alkol çözeltisi ile yıkandı.

Toplanan elüatların 280 nm'de absorpsiyonları ölçüldü. Absorpsiyon gösteren tüplerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi arandı.  $\alpha$ -amilaz aktivitesine sahip tüplerde protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplanan spesifik aktivite değerleri kullanılarak saflaştırma tablosu oluşturuldu.

### **2.2.8. Doğal ve SDS PAGE Elektroforezi**

Saflaştırma işlemlerinin her bir adımı elektroforetik olarak analiz edildi. Doğal elektroforez için % 8'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli kullanıldı. Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler kuyucuklara doldurulduktan sonra yükleme jeli boyunca 25 mA ve ayırma jeli boyunca 30 mA akım sisteme verilerek jelde proteinlerin ayrılması sağlandı. Yürütme işlemi boyunca elektroforez tankı bir buz banyosu ile soğutuldu. Doğal elektroforez sonucu jele hem substrat boyaması hem de Comassie Brilliant Blue R 250 boyama işlemi uygulandı. Substrat boyaması yapılarak aktivite bandı ortaya koyuldu. Bu amaçla %8 lik ayırma jeli yürütme işlemi sonunda 55 °C'de 45 dk %1 nişasta çözeltisi ile

muamele edildi. Nişatanın aşırısını uzaklaştırmak amacıyla jel birkaç kez tamponla yıkandı ve 15 dk. pH 8,00 Tris-HCl tamponunda bekletildi. İlgili süre sonunda jel lügol çözeltisi ile muamele edildi. Comassie boyaması sonucu boyanın aşırısı, jeli birkaç kez destaining çözeltisi ile yıkayarak uzaklaştırıldı ve protein bantları ortaya çıkarıldı.

Saflaştırılan enzim SDS-PAGE ile de analiz edildi. Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler bir kuyucuğa ve saflaştırmanın her aşamasından bir örnek ayrı ayrı kuyucuklara yüklendi. Yürütmeye işlemi sonucu jel Comassie Brilliant Blue R 250 ile boyandı. Protein bantlarının jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek  $R_f$  değerleri hesaplandı. Standart proteinlerin  $M_A$  değerlerinin logaritması  $R_f$  değerlerine karşı grafiğe geçirildi. Saflaştırılan enzimin  $R_f$  değeri kullanılarak enzimin  $M_A$ 'sı hesaplandı.

### 2.2.9. Saf Enzimin Dowex ve Kitin Üzerine Ayrı Ayrı İmmobilizasyonu

*Geobacillus sp.*TF14 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi, Dowex (1x8 Chloride form 200-400 Mesh, strongly basic) anyon değiştirici matrikse iyonik etkileşimlerle ve kitine yüzey adsorbsiyon metoduyla immobilize edilmiştir. Saf enzimin Dowex iyon değiştiriciye immobilizasyonu için, 5 g Dowex 10 mL 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponunda süspansiyon edildi. İyon değiştiricinin dengeye gelmesi için Dowex 15 dk pH 8,00 tamponunda inkübe edildi. Daha sonra süspansiyona 0,521 mg saf enzim ilave edildi. Elde edilen karışım oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı. Karıştırma işlemine 4 saat devam edildi. İlgili süre sonunda katı destek filtre kağıdından süzüldü. Bağlanmayan enzimlerin yüzeyden uzaklaştırılması için katı destek ard arda ve her defasında 5 mL saf su ile yıkandı. Yıkama işlemine süzüntüde protein tespit edilmeyene kadar devam edildi. Yapılan protein tayini sonucunda, süzüntülerde bulunan toplam protein miktarı, başlangıçta immobilizasyon karışımına ilave edilen toplam protein miktarından çıkarılarak bağlanma %'si hesaplandı [37].

Saf enzim ayrıca kitin toz partiküllerine yüzey adsorbsiyonuyla immobilize edildi. Bu amaçla 5 g kitin 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponununun 10 mL'sinde süspansiyon edildi. Süspansiyona 0,805 mg saf enzim ilave edildi. Elde edilen karışım oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı. Karıştırma işlemine 6 saat devam edildi. İlgili süre sonunda toz partiküller filtre kağıdından süzüldü. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için toz partiküller ard arda ve her defasında 5 mL saf su ile yıkandı. Yıkama işlemine süzüntülerde protein tespit edilmeyene kadar devam edildi. Yapılan

protein tayini sonucunda, süzüntülerde bulunan toplam protein miktarı, başlangıçta immobilizasyon karışımına ilave edilen toplam protein miktarından çıkarılarak bağlanma %'si hesaplandı [37].

## **2.2.10. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu**

### **2.2.10.1. Substrat Özgünlüğü**

Serbest enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla nişasta, amiloz, glikojen,  $\beta$ -siklodekstrin ve karboksimetil selüloz substratlarının % 1'lik çözeltileri hazırlandı. 300  $\mu$ L substrat üzerine 300  $\mu$ L enzim çözeltisi ilave edildi. 30 dk. 55 °C'de reaksiyon gerçekleştirildi. İlgili süre sonunda tüplere 600  $\mu$ L DNS ilave edildi. Tüpler kaynar su banyosunda 5-10 dk. kaynatıldı. Köre karşı absorbansları 550 nm'de ölçüldü. Aktivite tayinleri 3 paralel gerçekleştirildi. Enzimin en iyi etkileştiği substrata ait aktivite değeri % 100 kabul edildi. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak hesaplandı.

### **2.2.10.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi**

Serbest ve immobilize enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek amacıyla pH 2,20-8,00 aralığında 50 mM Mcilvaine tamponları ve pH 9,00-11,00 aralığında ise 50 mM Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. % 1 Nişasta substratı varlığında farklı pH tamponları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite tayinleri 3 paralel gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama değerler alınarak hesaplandı [38].

### **2.2.10.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın etkisi**

Serbest enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 55-95 °C, immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 55-105 °C aralığında farklı sıcaklıklarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite tayinlerinde optimum pH tamponu kullanıldı. Aktivite tayinleri 3 paralel olarak gerçekleştirildi. Aktiviteler, ölçüm sonuçlarının aritmetik ortalaması alınarak hesaplandı. % Bağıl aktivite

sıcaklık grafiği çizilerek serbest ve immobilize enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi [38].

#### **2.2.10.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi**

Serbest enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum protein miktarını belirlemek için daha önce belirlenen optimum şartlarda ve sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarında (4,4-53,0 µg/mL) reaksiyon karışımları hazırlanarak aktivite tayinleri yapıldı. Aktivite tayinleri üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek enzimin doygunluğa eriştiği noktadaki protein miktarı bulundu.

#### **2.2.10.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Serbest enzim, dowex ve kitine immobilize enzim aktivitelerinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla sırası ile %0,025-%2,0 , %0,005-%2 ve % 0,02-%2 aralığında değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Aktivite tayinleri daha önce belirlenen optimum şartlarda ve üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest enzime ve immobilize enzimlere ait substrat doygunluk eğrileri elde edildi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerden kinetik parametreler olan  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.

#### **2.2.10.6. Isıl Kararlılığının İncelenmesi**

Isıl kararlılığı belirlemek amacıyla serbest enzim 4 °C'de, 55 °C'de, 75 °C'de ve 90 °C'de nihai olarak 72 saat bekletildi. 6., 24., 48. ve 72. saat sonunda aktivite tayinleri belirlenen optimum şartlarda ve üç paralel olarak gerçekleştirildi. % kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış serbest enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

İmmobilize enzimlerin ısıl kararlılıkları, 4 °C'de ve optimum sıcaklık değerlerinde zamana karşı incelendi. Bu amaçla immobilize enzimler 4 °C'de ve optimum sıcaklık

değerlerinde nihai olarak 72 saat bekletildi. 4, 8, 12, 24, 48 ve 72. saatler sonunda optimum şartlarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış immobilize enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

#### **2.2.10.7. pH Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, pH 5,0 Asetat, pH 9,0 Glisin-NaOH tamponları ile saf enzim uygun oranlarda karıştırıldı. Elde edilen saf enzim tampon karışımlarının bir kısmı ile enzim aktiviteleri optimum şartlarda belirlendi. Kalan karışımlar 4 °C'de bekletilerek belli aralıklarla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar kıyaslanarak enzimin kararlılığı % kalan aktivite olarak belirlendi.

İmmobilize enzimlerin pH kararlılıkları optimum pH değerlerinde zamana karşı incelendi. 0,5 g katı destek üzerine 0,5 mL optimum pH tamponu ilave edildi. Bu karışım 6 ayrı Eppendorf tüpünde hazırlandı ve elde edilen karışımlar oda sıcaklığında bekletildi. 4, 8, 12, 24 ve 48. saatler sonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış immobilize enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

#### **2.2.10.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi**

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelemek amacıyla;  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı zamanda SDS, Triton X100, Triton X114, Tween 20 gibi bazı deterjanların ve EDTA'nın da hem serbest hem de immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Bu deterjanların reaksiyon ortamında ki derişimleri %1, EDTA'nın derişimi ise 5 mM olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlanarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite sonuçları, herhangi bir kimyasal içermeyen reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak bu kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlendi.



### **2.2.10.9. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi**

Dowex ve kitine immobilize edilen enzimin kullanım sıklığını belirlemek amacıyla immobilize enzimlerle ard arda 15 kez aktivite tayini gerçekleştirildi. Bu amaçla bir Eppendorf tüpte 0,5 g immobilize enzim tartıldı üzerine 0,35 mL %1 nişasta ve 0,35 mL optimum pH tamponu ilave edildi. 30 dk reaksiyon gerçekleştirildikten sonra immobilize enzim mini santrifüjde 14800 rpm'de hızlı santrifüjleme ile ayrıldı. Reaksiyon karışımından 0,6 mL ayrı bir Eppendorf tüpe alınarak üzerine eşit hacimde DNS reaktifi ilave edildi. 5 dk kaynar su banyosunda kaynatılan tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra 550 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü. Kör tüpü immobilize enzim yerine boş katı destek maddesi ihtiva etmektedir. Her aktivite reaksiyonundan sonra katı destek yeteri kadar saf su ile yıkandı ve tekrar aktivite tayini gerçekleştirildi. İlk ölçüm sonucu % 100 kabul edilerek sonuçlar hesaplandı.

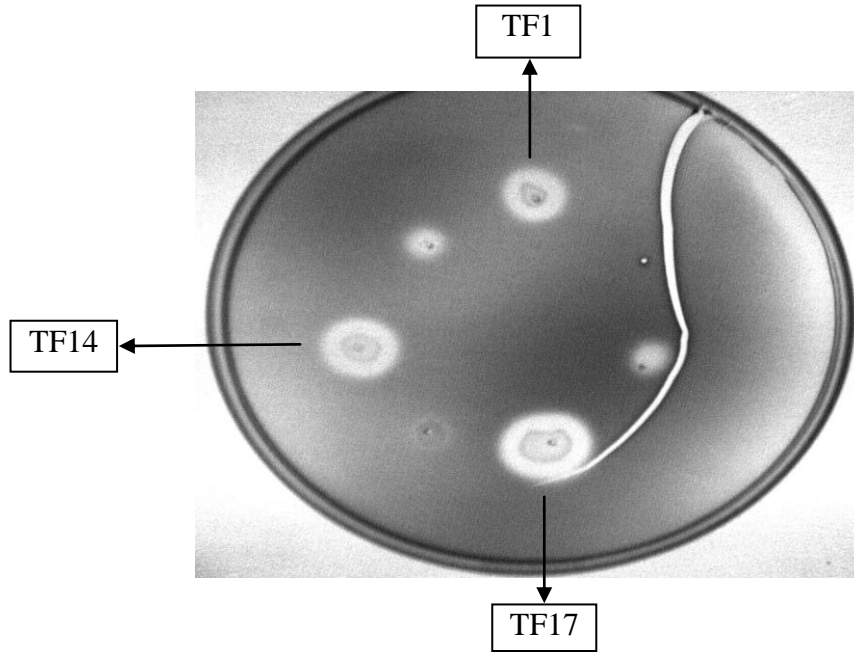
### **2.2.10.10. İnce Tabaka Kromatografisi**

İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile saf enzimin nişastayı parçalama ürünleri belirlendi. Bu amaçla 1 mL saf enzim çözeltisi 1 mL % 1'lik nişasta çözeltisi ile optimum şartlarda 2 saat reaksiyona bırakıldı. İlgili süre sonunda glukoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetroz standartları eşliğinde reaksiyon karışımı, önceden 110 °C'de 30 dk. aktifleştirilen TLC (Kieselgel-Silica gel/TLC-cards) plakaya ayrı ayrı spotlandı. Yürütme işlemi 3:1:1 (v/v/v) hacim oranlarında hazırlanan 2-propanol/etilasetat/su çözücü sisteminde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. TLC plaka kurutulduktan sonra metanol içerisinde hazırlanmış % 20'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi TLC plaka üzerine, plakayı kaplayacak şekilde ve taşırmadan püskürtüldü. 110 °C'de 10 dakika bekletildi ve oluşan görüntünün fotoğrafı çekildi. Standartların yürüdüğü mesafe ile örneğin yürüdüğü mesafe karşılaştırılarak enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan son ürün belirlendi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Petri Testi

Bu çalışmada kullanılan 7 farklı *Geobacillus sp.* termofilik bakteri türünün amilolitik aktivite gösterip göstermediklerinin kontrol edilmesi amacıyla petri testi yapıldı. Bakteriler 24 saat %1 Nişastalı LB-agar katı besiyerinde büyütüldü. İlgili süre sonunda petri I<sub>2</sub> buharı ile boyanarak aktivite zonları ortaya çıkarıldı. Petri testi fotoğrafı Şekil 4'te verildi.



Şekil 4. Petri testi fotoğrafı

Zon çapları kumpas ile ölçüldü. Koloni ve zon çapı değerleri Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. Petri testi koloni ve zon çapı değerleri

	TF1	TF12	TF14	TF16	TF17	TH2	DF20
K.Ç(cm)	0,7	0,7	<b>0,8</b>	-	<b>1,3</b>	-	0,9
Z.Ç(cm)	1,4	1,1	<b>1,7</b>	-	<b>2,0</b>	-	1,2

### 3.2. Organizma ve Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi

$\alpha$ -Amilaz indüklemesi için % 1 Nişasta içeren LB besiyeri kullanıldı. Daha önce LB besiyerinde hazırlanan gece kültürleri %1 Nişastalı LB besiyerine aşılansarak 55 °C’de büyümeye bırakıldı. Optimum indükleme zamanını tespit etmek amacıyla besiyeri ortamından 18, 24 ve 48. saat sonunda uygun miktarlarda örnekler alınarak  $\alpha$ -amilaz aktivite tayinleri ve protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 7’de verildi.

Tablo 7. Organizmaların ürettikleri amilaz enzimlerinin spesifik aktivite değerleri ve protein miktarları

Organizma	İndükleme Süresi (saat)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Protein Miktarı (mg/mL)
<i>Geobacillus sp.</i> TF1	18	15	16,0976
<i>Geobacillus sp.</i> TF12	18	47	4,9756
<i>Geobacillus sp.</i> TF14	18	54	5,9512
<i>Geobacillus sp.</i> TF16	18	41	5,9756
<i>Geobacillus sp.</i> TF17	18	54	5,6585
<i>Geobacillus sp.</i> TH2	18	39	6,000
<i>Geobacillus sp.</i> DF20	18	37	5,1463

Tablodaki spesifik aktivite değerleri, petri testi sonuçları ile birlikte değerlendirildi ve *Geobacillus sp.* TF14 suşunun ürettiği  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılmasına karar verildi. 18, 24 ve 48 saat büyütme sonucunda organizmaların ürettikleri protein miktarında ciddi bir değişiklik olmadığı ve spesifik aktivite değerlerinin değişmediği belirlendi. Bu aşamadan sonraki çalışmalarda indükleme süresi 18 saat olarak gerçekleştirildi.

### 3.3. Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla glukoz standart grafiği oluşturuldu [34]. Standartların konsantrasyonları, absorbanlarına karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen doğrunun eğiminden yararlanarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

### 3.4. Protein Tayini

Bu çalışmada protein tayini için Bradford boya bağlama metodu [35] ve protein standardı olarak BSA kullanıldı. Elde edilen absorbanlar BSA konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Örneklerin protein miktarı, örneklerin absorbanlarının standart grafiğinin eğimine oranlanması ile hesaplandı.

### 3.5. Enzimin Saflaştırılması

Ham özütteki  $\alpha$ -amilaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma adımlarına ait bulgular aşağıda ayrıntıları ile verildi.

#### 3.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

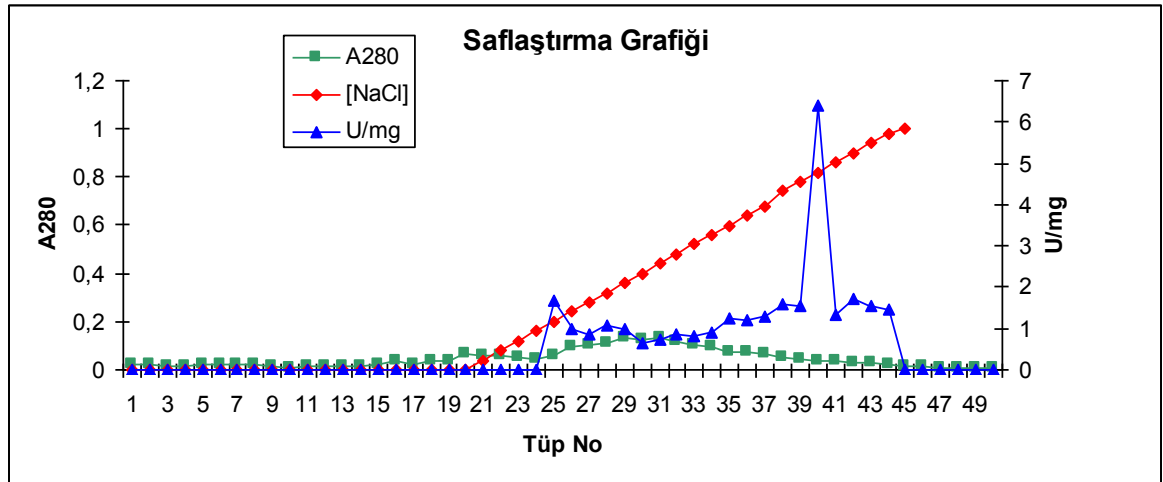
Amonyum sülfat ile proteinleri çöktürmek için ham enzim çözeltisi, %10-90 doyumluk aralığında 10'ar birim artış olacak şekilde katı amonyum sülfat ilavesi ile doyuruldu. İlave edilecek katı amonyum sülfat miktarı "ammonium sulphate calculator" programı kullanılarak hesaplandı [33].  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi ve protein tayinleri yapılarak enzimin en iyi çöktüğü amonyum sülfat doyumluğu belirlendi.

Aktivite tayinleri paralel 3 tekrarlı yapıldı. Ortalama değerler alınarak sonuçlar hesaplandı. Yapılan aktivite tayinleri neticesinde TF14 suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin en iyi %50 doyumlukta amonyum sülfat çözeltisinde çöktüğü belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu %50 doyumlukta çöken enzimlerin spesifik aktivite değerinin ham özüte göre yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu belirlendi. Bu aşamadan sonraki çalışmalarda ham enzim %40 doyumlukta amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çökelek atılarak süpernatant %50 doyumluğa getirildi. Bir gece 4 °C'de bekletildi. Elde edilen protein çökeleği uygun hacimde 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponunda çözüldü. Elde edilen protein çözeltisi amonyum sülfatı uzaklaştırmak ve kısmen deriştirmek amacı ile Amicon Ultracel Membran 10000 MWCO Milipore ile 4 °C'de 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işlemi birkaç kez tekrarlandı.

### 3.5.2. İyon Değişim Kromatografisi

Amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılan enzim, Q sepharose fast flow anyon değiştirici kolon dolgu maddesi ile dengelenmiş iyon değiştirici kolona yüklendi. Tampon ile dengeleme işleminin ardından protein konsantrasyonu 1,3444 mg/mL olan 5 mL enzim çözeltisi kolona yüklendi. Enzim çözeltisi kolona verildikten sonra tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kolon pH 8,00 Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Kolona tutunan proteinler 0-1 M aralığında artan konsantrasyonda sodyum klorür çözeltisi ile elue edildi. Elüsyon işlemi her bir tüpe 100 damla elüat olacak şekilde ve 3,5 mL/dk akış hızında gerçekleştirildi. Elüsyon işleminin ardından kolon 2,0 M NaCl çözeltisi ile yıkandı.

Toplanan elüatların 280 nm’de absorpsiyonları ölçüldü. Absorpsiyon gösteren tüplerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi arandı.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesine sahip tüplerde protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Saflaştırma grafiği çizildi. Grafik Şekil 5’te verilmiştir.



Şekil 5. İyon değiştirici kolon saflaştırma grafiği

### 3.5.3. Hidrofobik Etkileşim Kolonu

Q sepharose fast flow anyon değiştirici kolonu ile kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi hidrofobik etkileşim kolonuna yüklendi. Kolon dolgu malzemesi olarak Phenyl Sepharose Fast Flow kullanıldı. Dengeleme tamponu olarak 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponunda hazırlanmış 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kullanıldı. Konsantrasyonu 0,5577 mg/mL olan 3 mL enzim

çözeltisi kolona yüklenmeden önce yeterli miktarda  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile doyuruldu ve degaz edildi. Tutunmayan proteinler dengeleme tamponu ile kolondan uzaklaştırıldı. Elüsyon 0,3-0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponuyla hazırlanan gradient tuz köprüsü ile gerçekleştirildi. Tuz köprüsünün ardından kolon 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Her bir tüpe 100 damla olacak şekilde elüatlar toplandı.

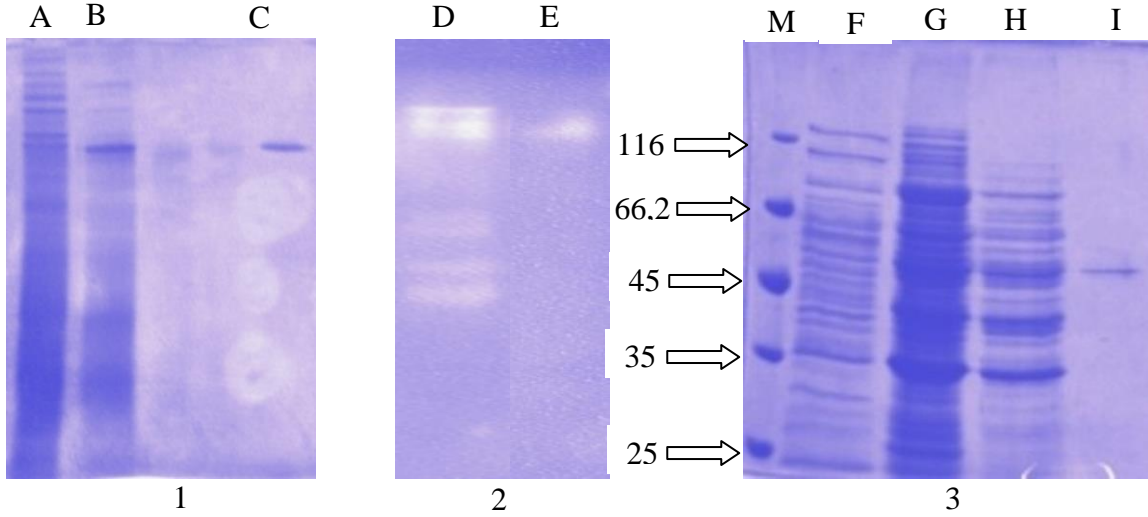
Toplanan elüatların 280 nm’de absorpsiyonları ölçüldü. Absorpsiyon gösteren tüplerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi arandı.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesine sahip tüplerde protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplanan spesifik aktivite değerleri kullanılarak saflaştırma tablosu oluşturuldu. Sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite ( $\mu\text{M}/\text{dk}$ )	Toplam Aktivite (U)	Sps. Akt (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Özüt	300	1401	125,39	37617	26,85	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürme	15	19,182	120,84	1812,6	94,49	4,8	3,52
Q Sepharose Kolonu	3	1,6731	170,22	510,66	305,23	1,35	11,37
Phenyl Sepharose Kolonu	1	0,2596	119,25	119,25	459,36	0,32	17,11

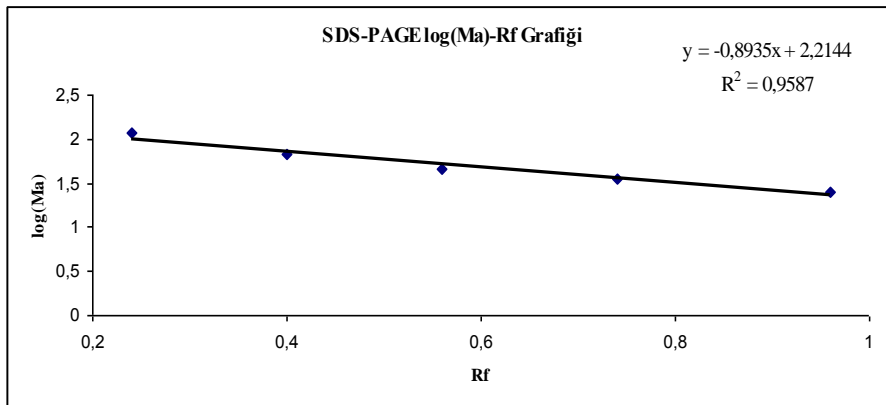
### 3.5.4 Doğal ve SDS PAGE Elektrofrez

Saflaştırma basamaklarının her bir adımında bir miktar örnek elektrofretik analiz için +4 °C’de saklandı. % 8’lik Poliakrilamid Jel kullanılarak Doğal elektrofrez işlemi gerçekleştirildi. Elektrofrez işleminden sonra Jel Commassie Brilliant Blue R 250 ile boyandı. Boyama sonucu oluşan protein bantları incelendi. Ayrıca doğal elektrofrez sonucu jelde aktivite boyaması gerçekleştirildi. % 1 Nişasta ile muamele edilen jel lugol çözeltisi ile boyandı maviye boyanan jelde boyanmadan kalan bölge aktivite bandıdır. Doğal ve SDS-PAGE elektrofrez jel görüntüleri Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 6. Elektroferez Jel Görüntüleri 1) Coomassie Brilliant Blue R 250 Boyama; A: %50 amonyum sülfat çöktürmesi, B: İyon değişim kolonu elüatı, C: Saf Enzim 2) Substrat boyama D: % 50 Amonyum Sülfat Çöktürmesi E: Saf Enzim 3) SDS-PAGE Coomassie boyama, F: Ham enzim ekstraktı, G: % 50 Amonyum Sülfat Çöktürmesi, H: Q sepharose kolonu elüatı, I: Saf enzim, M: Protein standardı (116 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa)

SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı belirlendi. Standart proteinlerin  $R_f$  değerleri  $M_A$ 'larının logaritma değerine karşı grafiğe geçirildi. Grafik Şekil 7'de verildi. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı grafikten 54 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 7. Standart proteinler  $\log(M_A)$ - $R_f$  grafiği

### 3.6. Saf Enzimin Dowex ve Kitin Üzerine Ayrı Ayrı İmmobilizasyonu

*Geobacillus sp.*TF14 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi, Dowex (1x8 Chloride form 200-400 Mesh, strongly basic) anyon değiştirici matrikse iyonik etkileşimlerle ve Kitine yüzey adsorbsiyon metoduyla immobilize edilmiştir.

Saf enzimin Dowex iyon değiştiriciye immobilizasyonu için, 5 g Dowex 10 mL 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponunda süspanse edildi. İyon değiştiricinin dengeye gelmesi için Dowex 15 dk. aynı tamponunda inkübe edildi. Daha sonra süspansiyona 0,521 mg saf enzim ilave edildi. Elde edilen karışım oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı. Karıştırma işlemine 4 saat devam edildi. İlgili süre sonunda katı destek filtre kağıdından süzöldü. Bağlanmayan enzimlerin yüzeyden uzaklaştırılması için katı destek ard arda ve her defasında 5 mL saf su ile yıkandı. Yıkama işlemine süzöntüde protein tespit edilmeyene kadar devam edildi. Yapılan protein tayini sonucunda, süzöntülerde toplam protein miktarı 0,413 mg olarak belirlendi. % Bağlanma verimi ise % 21 olarak hesaplandı.

Saf enzim ayrıca Kitin toz partiköllerine yüzey adsorbsiyonuyla immobilize edildi. Bu amaçla 3 g Kitin 50 mM pH 8,00 Tris-HCl tamponunun 10 mL'sinde süspanse edildi. Süspansiyona 0,805 mg saf enzim ilave edildi. Elde edilen karışım oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı. Karıştırma işlemine 6 saat devam edildi. İlgili süre sonunda toz partiköller filtre kağıdından süzöldü. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için toz partiköller ard arda ve her defasında 5 mL saf su ile yıkandı. Yıkama işlemine süzöntülerde protein tespit edilmeyene kadar devam edildi. Yapılan protein tayini sonucunda, süzöntülerde toplam protein miktarı 0,44 mg olarak belirlendi. % Bağlanma verimi ise % 45 olarak hesaplandı.

### 3.7. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

#### 3.7.1. Substrat Spesifitesi

Saf enzimin substrat özünülüğünü belirlemek amacı ile çözüner nişasta, amiloz,  $\beta$ -siklodekstrin, glukojen ve CM-selöloz substratları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekteştirildi. Sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

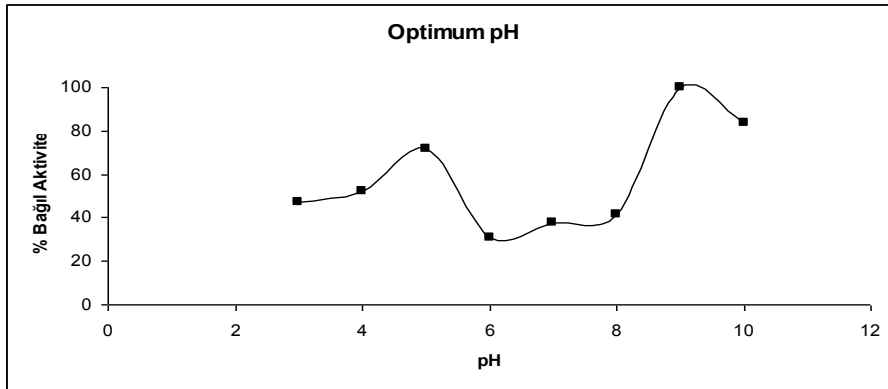


Tablo 9. TF14 Amilazına ait substrat- % bağıl aktivite değerleri

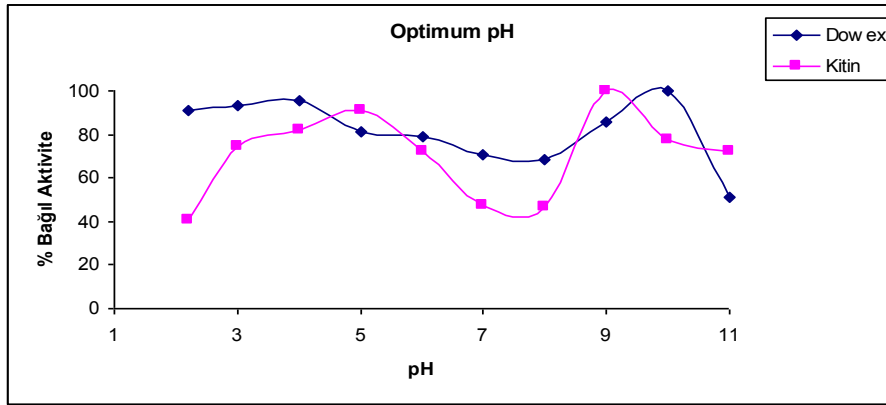
Substrat	% Bağıl Aktivite
Niğasta	100
Amiloz	12
$\beta$ -Siklo Dekstrin	4
Glikojen	3
CMC	0

### 3.7.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek amacıyla pH 2,20-8,00 aralığında 50 mM Mcilvaine tamponları ve pH 9,00-11,00 aralığında ise 50 mM Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Aktivite tayinleri 3 paralel olacak şekilde yapıldı. Sonuçlar hesaplanarak grafiğe geçirildi. TF14 Amilazına ait pH- % bağıl aktivite grafiği Şekil 8'de, immobilize enzimlere ait pH - % Bağıl Aktivite grafiği Şekil 9'da verildi.

Şekil 8. TF14  $\alpha$ -Amilazı pH-%bağıl aktivite grafiği

Şekil 8'den de görüldüğü gibi serbest enzim en yüksek aktiviteyi pH 9,00'da göstermiştir. pH 5,00'da ekstra bir tepe noktası görülmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda optimum pH 9,00 olarak kullanılmıştır.

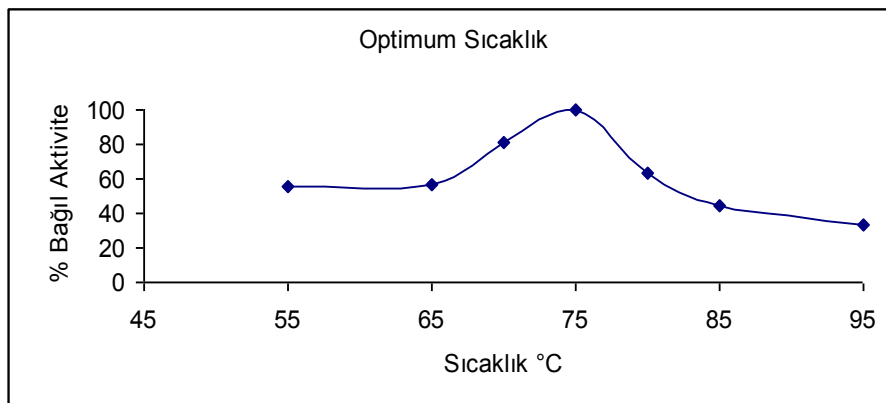


Şekil 9. İmmobilize enzimlere ait pH-%bağlı aktivite grafiği

Şekil 9'dan da görüldüğü üzere Dowex iyon değiştiriciye immobilize edilen enzim en yüksek aktiviteyi pH 10,00'da göstermiştir. Kitin yüzeyine immobilize edilen enzim ise en yüksek aktiviteyi pH 9,00'da göstermiştir.

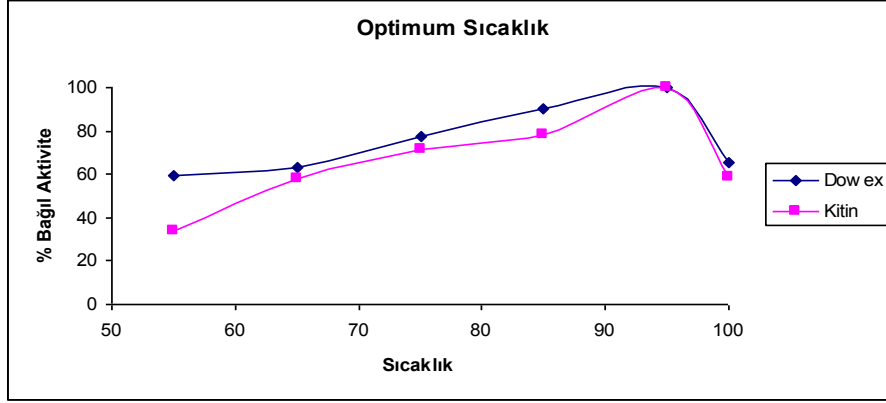
### 3.7.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 55-95 °C, immobilize enzimlerin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 55-100 °C aralığında farklı sıcaklıklarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve aktiviteler hesaplandı. % Bağlı aktivite sıcaklık grafiği çizilerek serbest ve immobilize enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi. TF14 amilazına ait Sıcaklık- % Bağlı Aktivite grafiği Şekil 10'da, immobilize enzimlere ait Sıcaklık % Bağlı aktivite grafiği Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 10. TF14 α-Amilazı sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği

Yapılan aktivite tayinleri neticesinde enzimin en yüksek aktiviteyi 75 °C'de gösterdiği belirlendi.

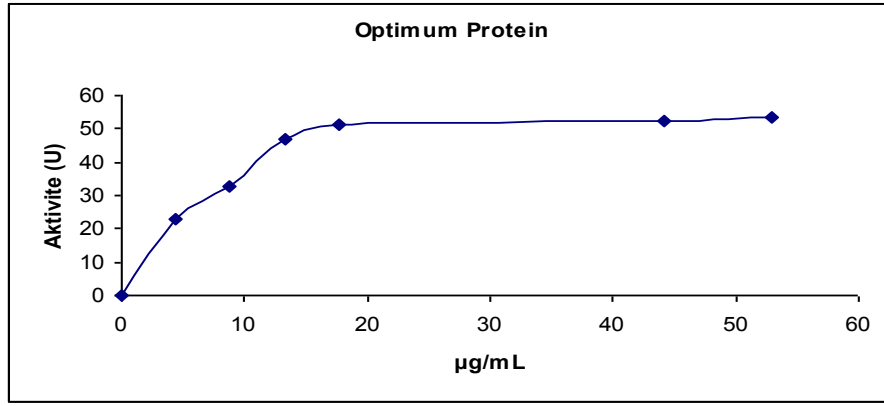


Şekil 11. İmmobilize enzimlere ait sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği

Hem Dowex iyon değiştirici katı desteğe hem de kitin yüzeyine immobilize enzimin optimum sıcaklığı 95 °C olarak belirlendi.

#### 3.7.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

Serbest enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum protein miktarını belirlemek için daha önce belirlenen optimum şartlarda ve sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarında (4,4-53 µg/mL) reaksiyon karışımları hazırlanarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite tayinleri üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek enzimin doygunluğa eriştiği noktadaki protein miktarı bulundu. Grafik Şekil 12'de verilmiştir.

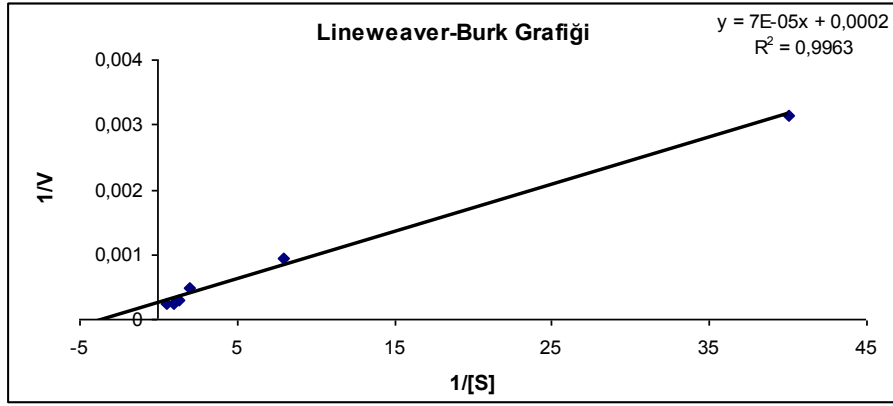


Şekil 12. TF14 Amilazı üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

Grafikten enzimin en etkin aktivite gösterdiği protein konsantrasyonu yaklaşık 18 µg/mL olarak belirlendi. Bundan Sonraki aşamalarda reaksiyon ortamına 18 µg/mL olacak şekilde enzim çözeltisi ilave edildi.

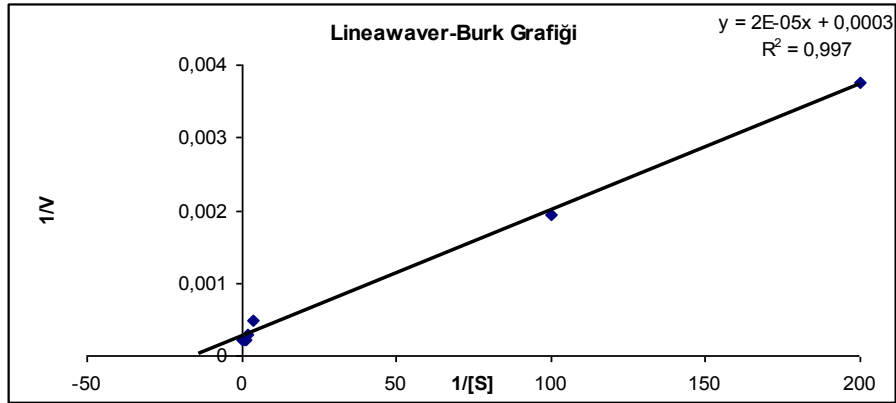
### 3.7.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest enzim, Dowex ve kitine immobilize enzim aktivitelerinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla sırası ile %0,025-%2,0 , %0,005-%2,0 ve %0,02-%2,0 aralığında değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Aktivite tayinleri daha önce belirlenen optimum şartlarda ve üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest enzime ve immobilize enzimlere ait substrat doygunluk eğrileri elde edildi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerden kinetik parametreler olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplandı. Serbest enzim ve immobilize enzimler için Lineawaver Burk Grafikleri sırası ile Şekil 13-15'te verilmiştir.

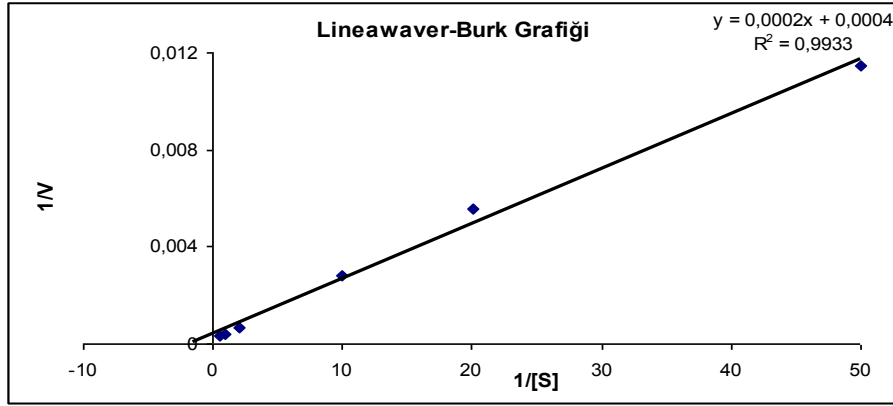


Şekil 13. TF14 Amilazı Lineweaver-Burk grafiği

Serbest enzim Michaelis-Menten kinetiğine uyum göstermektedir. Enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri, çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden sırası ile 5000 U/mg protein ve % 0,35 olarak belirlenmiştir.



Şekil 14. Dowex'e immobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği

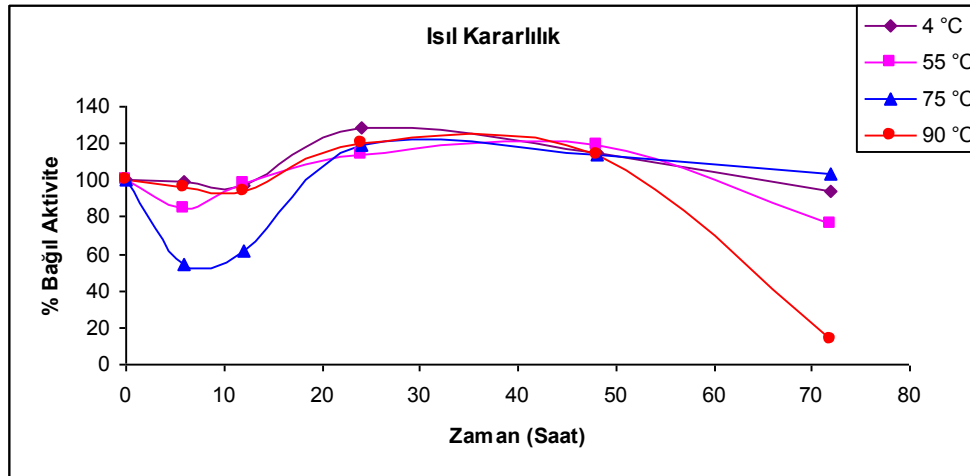


Şekil 15. Kitine immobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği

Çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden, Dowex iyon değiştirici katı desteğe ve kitin yüzeyine immobilize enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırası ile 3333,33 U/mg , % 0,067 ve 2500 U/mg , % 0,5 olarak belirlendi.

### 3.7.6. Isıl Kararlılığının İncelenmesi

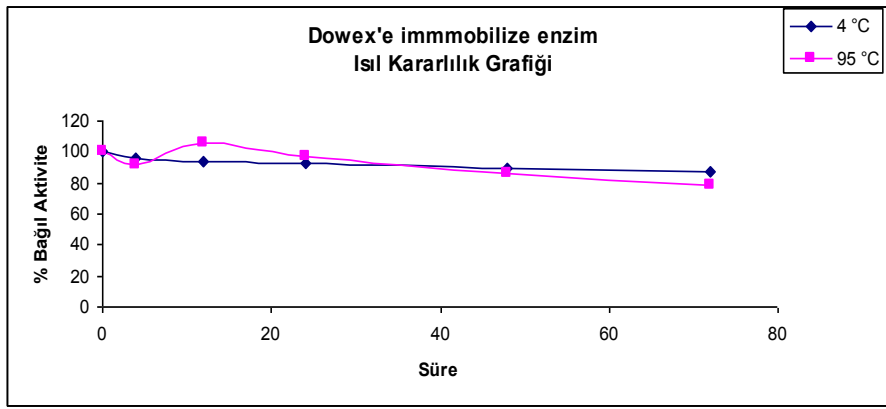
Isıl kararlılığı belirlemek amacıyla serbest enzim 4 °C'de, 55 °C'de, 75 °C'de ve 90 °C'de nihai olarak 72 saat bekletildi. 6., 24., 48. ve 72. saat sonunda aktivite tayinleri belirlenen optimum şartlarda üç paralel olarak gerçekleştirildi. % Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış saf enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar Şekil 26'da verilmiştir.



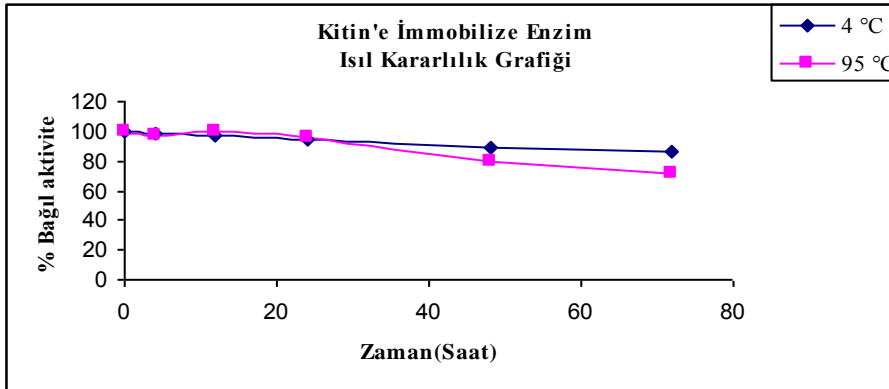
Şekil 16. TF14 Amilazı ısıl kararlılık grafiği

Grafikten görüldüğü üzere 4 °C, 55 °C ve 75 °C’de nihai olarak 72 saat bekletilen serbest enzim bu sıcaklıklarda aktivitesini büyük oranda korumuştur.

İmmobilize enzimlerin ısıl kararlılıkları, 4 °C’de ve optimum sıcaklık değerlerinde zamana karşı incelendi. Bu amaçla immobilize enzimler 4 °C’de ve optimum sıcaklık değerlerinde nihai olarak 72 saat bekletildi. 4, 12, 24, 48 ve 72. saatler sonunda optimum şartlarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış immobilize enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar Şekil 17 ve Şekil 18’de verildi.



Şekil 17. Dowex’e immobilize enzim ısıl kararlılık grafiği

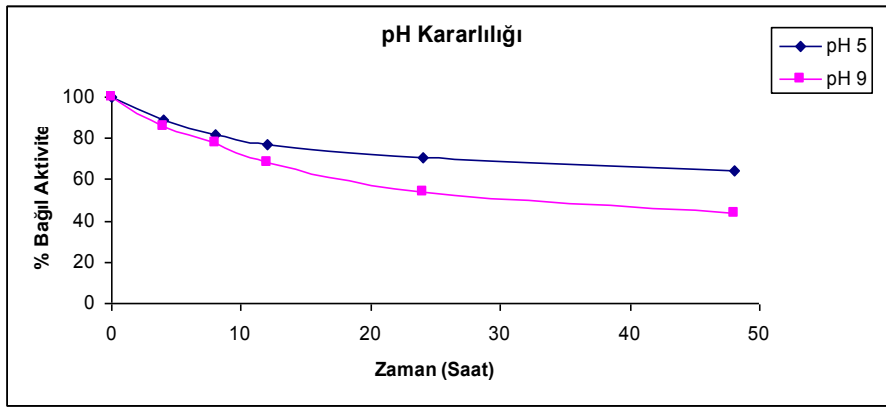


Şekil 18. Kitin’e immobilize enzim ısıl kararlılık grafiği

Her iki katı desteğe de immobilize edilen enzimin, hem depolama sıcaklığı olan 4 °C’de hem de optimum sıcaklık değeri olan 95 °C’de 72 saat inkübasyon sonucu aktivitesini büyük oranda koruduğu görülmektedir.

### 3.7.7. pH Kararlılığının İncelenmesi

Serbest enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, optimum pH tamponları ile serbest enzim uygun oranlarda karıştırıldı. Elde edilen enzim tampon karışımlarının bir kısmı ile enzim aktiviteleri optimum şartlarda belirlendi. Kalan karışımlar 4 °C'de bekletilerek belli aralıklarla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar kıyaslanarak enzimin kararlılığı % Kalan aktivite olarak belirlendi. Sonuçlar Şekil 19'da verilmiştir.

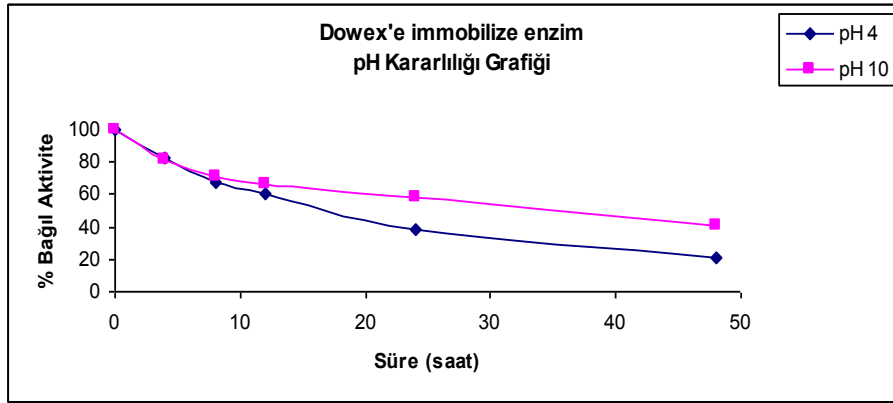


Şekil 19. TF14 Amilazı pH kararlılık grafiği

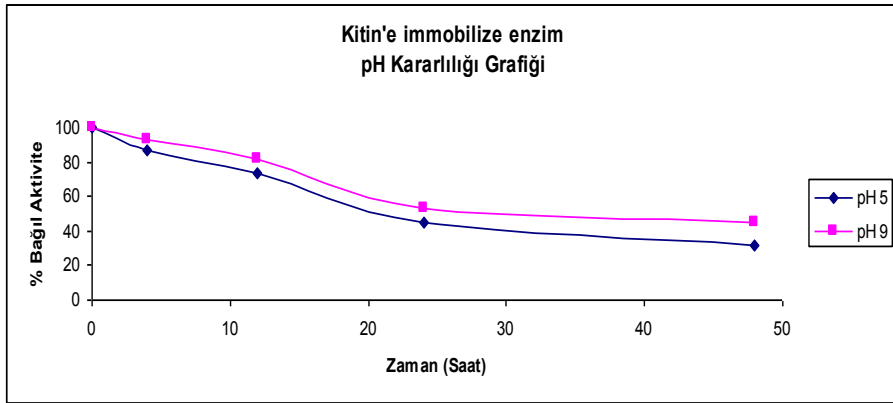
Şekilden de görüldüğü üzere serbest enzim pH 5,00'da 48 saat sonunda aktivitesini %65 oranında koruduğu, pH 9,00'da ise 48 saat sonunda %50 civarında kalan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

İmmobilize enzimlerin pH kararlılıkları optimum pH değerlerinde zamana karşı incelendi. 4, 8, 12, 24 ve 48. saatler sonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış immobilize enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı ve grafiğe geçirildi. Grafikler Şekil 20 ve Şekil 21'de verildi.





Şekil 20. Dowex'e immobilize enzim pH kararlılığı grafiği



Şekil 21. Kitin'e immobilize enzim pH kararlılığı grafiği

Dowex iyon değiştiriciye immobilize edilen enzim optimum pH değerinde 48 saat sonunda aktivitesini %50 oranında koruduğu şekilden görülmektedir. Kitin'e immobilize enzim optimum pH değerinde 48 saat sonunda aktivitesini %50 civarında koruduğu şekilden görülmektedir.

### 3.7.8. Enzim Aktivitesi zerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Serbest enzimin aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelenmek amacıyla;  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonları reaksiyon karışımında 5mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Aynı zamanda SDS, Triton X100, Triton X114, Tween 20 ve EDTA gibi

bazı kimyasalların da enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirildi ve ortalama değer alınarak hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. Serbest enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi

Metal İyonu	U/mg	% Bağlı Aktivite
Kontrol	171±0,061	100
Ca <sup>2+</sup>	295±0,012	173
Co <sup>2+</sup>	80±0,040	47
Cu <sup>2+</sup>	7±0,007	4
Fe <sup>2+</sup>	99±0,025	58
Hg <sup>2+</sup>	84±0,019	49
Mg <sup>2+</sup>	63±0,020	37
Mn <sup>2+</sup>	3±0,006	2
Ni <sup>2+</sup>	111±0,014	65
Zn <sup>2+</sup>	90±0,006	52
EDTA	155±0,033	91
Triton X100	89±0,006	52
Triton X114	77±0,015	45
Tween 20	82±0,014	48
SDS	94±0,020	55

Tablo 10'dan da görüldüğü üzere Ca<sup>2+</sup> enzimi aktive ederken diğer metal iyonları enzimi inhibe etmişlerdir. Özellikle Mn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> enzim aktivitesini neredeyse tamamen durdurmuştur.

İmmobilize enzimlerin aktivitesi üzerine metal iyonları ve bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla; Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonları reaksiyon karışımında 5 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Aynı zamanda SDS, Triton X100, Triton X114, Tween 20 ve EDTA gibi bazı kimyasalların da enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirildi ve ortalama değer alınarak hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar Tablo 11'de verildi.

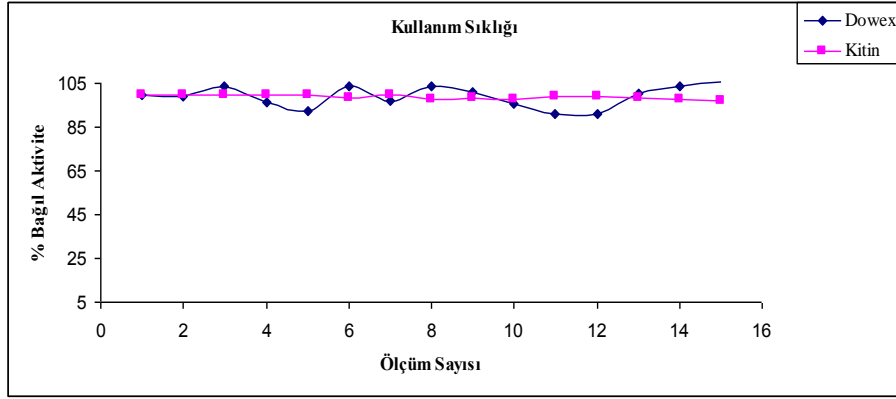
Tablo 11. İmmobilize enzimlerin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi

Dowex'e immobilize enzim			Kitine immobilize enzim	
Metal İyonu	U/mg	% Bağıl Aktivite	U/mg	% Bağıl Aktivite
Kontrol	5123±0,025	100	2593±0,012	100
Ca <sup>2+</sup>	5271±0,014	103	2270±0,031	88
Co <sup>2+</sup>	5467±0,021	107	1463±0,014	56
Cu <sup>2+</sup>	258±0,013	5	1221±0,032	47
Mg <sup>2+</sup>	5467±0,026	107	1159±0,021	45
Ni <sup>2+</sup>	5236±0,024	102	1903±0,031	73
Fe <sup>2+</sup>	5716±0,032	112	1567±0,044	60
Mn <sup>2+</sup>	53±0,003	1	18±0,005	1
Zn <sup>2+</sup>	5458±0,028	107	1447±0,016	56
Hg <sup>2+</sup>	5440±0,023	106	2849±0,070	110
EDTA	3627±0,016	71	1531±0,065	59
TritonX100	4916±0,040	96	956±0,020	37
TritonX114	4249±0,017	83	354±0,018	14
Tween20	3120±0,036	61	317±0,009	12
SDS	5743±0,026	112	633±0,030	24

Mn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> iyonlarının Dowex iyon değiştiriciye immobilize edilen enzimi neredeyse tamamen inhibe ettiği, Cu<sup>2+</sup>'nin kitine immobilize enzimin aktivitesini yarı yarıya azalttığı tablodan görülmektedir.

### 3.7.9. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ardı ardına 15 ölçüm alınarak belirlendi. İlk ölçüm değeri % 100 kabul edilerek sonuçlar değerlendirildi. Bulgular Şekil 22'de verildi.



Şekil 22. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize enzimlerin optimum şartlarda 15 ölçüm sonunda aktivitelerinde ciddi bir değişiklik olmadığı belirlendi.

### 3.7.10. İnce Tabaka Kromatografisi

*Geobacillus sp.* TF14'ten saflaştırılan enzimin % 1 nişasta ile 2 saat reaksiyona sokulması sonucu açığa çıkan parçalanma ürünlerini tespit etmek amacıyla TLC yapıldı. Elde edilen görüntü Şekil 23'de verildi.



Şekil 23. %1'lik nişastanın saf enzimle reaksiyonu sonucu oluşan parçalanma ürünleri, 1: Glukoz, 2: Maltoz, 3: Maltotrioz, 4: Maltotetroz 5: 6 saat hidroliz ürünleri, 6: 12 saat hidroliz ürünleri

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

$\alpha$ -Amilazlar, nişasta moleküllerindeki  $\alpha$ -(1→4) glikozidik bağları içten ve rastgele hidrolizleyerek, dekstrinler, oligosakkaritler, maltoz ve glukoz açığa çıkaran enzimlerdir. Dünya ölçeğinde, ticari enzim piyasasında  $\alpha$ -amilazlar % 25 payla piyasanın dörtte birlik kısmına sahiptir. Amilazlar klinik, medikal, analitik kimyanın yanı sıra nişastanın sakkarifikasyonunda, tekstil ve gıda endüstrisi, deterjan sanayi ve fırıncılık gibi geniş bir endüstriyel yelpazede uygulama alanına sahiptirler [39]. Birçok endüstriyel uygulama için ısı kararlı ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren  $\alpha$ -amilazlara ihtiyaç vardır. Günümüz ticari piyasasında ısı kararlı  $\alpha$ -amilazlar *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir [40]. Çeşitli alanlarda kullanılmak üzere piyasada ticari olarak farklı organizmalardan elde edilen farklı enzimler mevcut olmakla birlikte, bunlar arasında en çok tercih edilenler, pratikteki eldelerinin kolaylığı, yüksek aktiviteleri ve ekstrem şartlardaki kararlılıklarından dolayı mikrobiyal ve termofilik orijinli olanlardır. Endüstriyel olarak özellikle ısıya dayanıklı enzimlerin eldesi oldukça önemli olduğundan termofilik organizmalardan enzim izolasyonu, karakterizasyonu ve immobilizasyonu üzerine ilgi gittikçe artmaktadır.

Bu çalışmada ticari potansiyelli ve endüstriyel bir enzim olan  $\alpha$ -amilaz enzimi, yeni izole edilmiş termofilik bir bakteri olan *Geobacillus sp.*TF14 suşundan saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak, enzim farklı destek maddelerine immobilize edildi. İmmobilize enzimlerin de biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak sonuçlar hem serbest enzimle hem de literatür verileri ile kıyaslandı.

*Geobacillus sp.*TF14 suşunun ürettiği  $\alpha$ -amilaz enzimi kolon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırıldı. Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından uygulanan iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucu enzim 17,11 kat saflaştırıldı (Tablo 8). Yeni izole edilen bir fungus olan *Aspergillus oryzae strain S2*'den  $\alpha$ -amilaz enziminin, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi teknikleri ile 16,1 kat saflaştırıldığı rapor edildi [41]. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus methylotrophicus P11-2* suşundan  $\alpha$ -amilaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri ile 13,1 kat saflaştırıldığı bildirildi [42]. *Bacillus licheniformis AS08E* suşundan  $\alpha$ -amilaz enziminin hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri ile 14,5 kat saflaştırıldığı rapor edildi [39].  $\alpha$ -amilaz enziminin, *Bacillus licheniformis NH1*'den 3,08

kat[40], *Bacillus clausii* BT-21'den 18,5 kat, *Chryseobacterium taeanense* TKU001'den 5 kat, *Marinobacter sp.* EMB8'den 76 kat [43] saflaştırıldığı rapor edildi.

Saflaştırılan enzim elektroforetik olarak analiz edildiğinde, doğal elektroforez sonucu yapılan aktivite boyamasında tek bir aktivite bandı ve Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanan jelde ise tek bir protein bandı görüldü (Şekil 6). Bu durum enzimin saflaştırıldığını desteklemektedir. Denatüre şartlarda gerçekleştirilen SDS-PAGE sonucu 54 kDa moleköl ağırlığında tek bir bandın varlığı gözlendi (Şekil 6). Literatürde  $\alpha$ -amilazların moleköl ağırlıklarının 12,5 ile 160 kDa arasında değiştii bildirilmektedir [44]. *Bacillus licheniformis* AS08E'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 55 kDa [39], *Bacillus licheniformis* NH1'den klonlanarak saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 59 kDa [40], *Aspergillus Oryzae* S2'den saflaştırılan iki amilaz izoformunun 42 kDa ve 50 kDa [41], *Bacillus methylotrophicus* P11-2'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 44 kDa [42] büyüklüğünde olduğu bildirildi.

Endüstride enzimlerin kullanımında en büyük problem, onların üretimleri, depolanmaları ve endüstriyel proseslerde maruz kaldıkları denatüre edici şartlardır. Bu şartlar enzimlerin kararlılıklarını olumsuz etkilemektedir. Enzimlerin inert katı destek materyallerin yüzeyine immobilizasyonu onların operasyonel kararlılıklarını artırma amacıyla en çok başvurulan yoldur. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere oranla reaksiyon ürünleri tarafından daha az denatüre edilmeleri, doğal olmayan substratlara olan seçicilikleri ve daha iyi operasyonel şartlara sahip olmaları immobilizasyonu, enzimlerin kararlılıklarını artırmak için en çok tercih edilen metod yapmıştır [45]. Saflaştırılan enzim Dowex iyon değiştiriciye % 21 ve kitin yüzeyine % 45 verimle immobilize edildi. Divinil benzen-stiren polimer türevi olan Dowex'in, yüksek iyon değişim kapasitesine sahip olması, kimyasal olarak kararlı olması, mekanik dirençliliği ve toksik olmaması gibi birçok avantajı onu enzim immobilizasyonu için uygun bir taşıyıcı yapmaktadır. 60 yıldan fazla bir zaman diliminde endüstride yoğun kullanımı olan Dowex'e ksilanaz,  $\beta$ -ksilozidaz, dekstranaz, proteaz,  $\alpha$ -amilaz, pektinaz ve lipaz gibi çeşitli enzimlerin immobilize edildiği bildirildi [46]. Ayrıca kitin ve onun deasetil türevi olan kitosan, kolay ve ucuz elde edilmeleri, biyo bozunur olmaları, toksik olmamaları, ağır metalleri şelatlayıcı özelliğe sahip olmaları, inert ve suda çözünmez olmaları ve enzim immobilizasyonu için uygun yüzeye sahip olmaları gibi birçok avantajlarından dolayı immobilizasyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilen katı destek materyalleridir [30]. Gupta ve arkadaşları tarafından,  $\alpha$ -amilaz enziminin Dowex MAC-3 iyon değiştiriciye % 88 verimle immobilize edildiği

bildirildi [47]. *Bacillus subtilis* I'den aseton çöktürmesi ile kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin kitin yüzeyine % 15,4 ve Dowex 1X4 Cl<sup>-</sup> formuna % 5,3 verimle immobilize edildiği bildirildi [48]. Fluka(Germany)'den temin edilen ticari  $\alpha$ -amilaz enziminin biyosensör dizaynı için kitin yüzeyine % 62,9 verimle immobilize edildiği rapor edildi [49].

*Geobacillus sp.*TF14'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi en yüksek aktiviteyi çözünür nişasta substratı varlığında göstermiştir (Tablo 9). CM-selüloz varlığında enzim aktivite göstermemiştir. Amilazlar nişasta, amiloz, amilopektin, glikojen,  $\alpha$  ve  $\beta$  siklodekstrinler ve pullulan gibi bir çok substrata etki edebilirler. Genel olarak amilaz enzimleri için en iyi substratın nişasta olduğu rapor edildi [8].

Serbest enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde enzimin en yüksek aktiviteye pH 9,00 olan Glisin-NaOH tamponun'da sahip olduğu görüldü (Şekil 8). Grafik incelendiğinde, pH 5,00'da enzim aktivitesinin ikinci bir tepe noktasına sahip olduğu ve enzimin nötral pH civarındaki aktivitesinin ise oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu durum enzimin iki farklı pH optimumuna sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde amilazların katalitik merkezinde histidin, asparagin, glutamik asit gibi polar ve iyonlaşabilir amino asitlerin olduğu bildirilmektedir. Bu amino asitlerin hem enzimin katalitik merkezinin oluşumuna katıldığı hem de enzimin substrata bu amino asitler üzerinden bağlandığı bildirilmektedir [17]. Enzimlerin substratlarına bağlanmaları hidrojen bağı, iyonik etkileşimler gibi zayıf etkileşimlerle gerçekleşmektedir ve bu etkileşimler ortam pH'sına oldukça bağımlıdır. Enzimin iki farklı pH da yüksek aktivite göstermesi enzimin aktif merkezinin bu pH'larda substratla daha iyi etkileşebileceği veya katalitik sürece katılabilir formda olabileceği ile açıklanabilir. Park ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, yeni izole edilen *Paenibacillus sp.* HPL-001 suşundan, 996 baz çifti ihtiva eden bir gen klonlandı ve *E.coli*'de ekspres edildi. Gen ürününün bir ksilanaz enzimi olduğu, enzimin pH 5,0-11,0 aralığında aktif ve pH 5,5 ve pH 9,5 gibi iki pH optimumuna sahip olduğu rapor edildi [50]. Pandey ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *A.niger*'den fitaz enzimi kodlayan bir genin klonlanarak *Kluyveromyces lactis*'te ekspres edildiği bildirildi. Ekspresyon sonrası saflaştırılan enzimin optimum pH'sı 2,5 ve 5,5 olarak rapor edildi [51]. Achbergerova' ve Naha'lka tarafından yapılan bir çalışmada ise SPO0224 geninin *Ruegeria pomeroyi*'den klonlanarak *E.coli*'de ekspres edildiği ve gen ürünü olan polifosfat kinaz 2 homolog proteininin pH 8,0 ve pH 10,0 olan iki pH optimumuna sahip olduğu bildirildi [52]. *Geobacillus sp.* LH8'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz

enziminin optimum pH değerinin pH 5,0 ve pH 7,0 olduğu bildirildi [53]. Amilazlar pH 2,0 ile pH 12,0 arasında geniş bir skalada aktivite gösterebilirler. *Bacillus* suşlarından elde edilen bir çok amilaz için optimum pH değerinin pH 5,0 civarında olduğu bildirildi [44]. Bununla birlikte alkali pH da yüksek aktiviteye sahip bir çok amilaz enzimi de literatürde bildirilmektedir [39, 48, 49]. *Geobacillus sp.* TF14'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin hem asidik hem de bazik pH'larda yüksek aktivite gösteriyor olması, bu enzimin nişasta hidrolizi, deterjan katkısı, kağıt ve tekstil gibi birçok endüstriyel proses için uygun bir enzim olabileceğini göstermektedir.

Dowex iyon değiştiriciye immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde, immobilize enzimin en yüksek aktiviteyi pH 10,00'da gösterdiği ve pH 4,00'da ikinci bir pH optimumuna sahip olduğu görülmektedir (Şekil 9). Serbest enzim nötral pH civarında nispeten düşük bir bağıl aktiviteye sahipken, immobilizasyon sonucu nötral pH civarında enzimin bağıl aktivitesinde bir artış olduğu da görülmektedir. Kitin yüzeyine immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde ise serbest enzimle kitine immobilize enzimin benzer pH-Aktivite profiline sahip olduğu görülmektedir (Şekil 9). Kitin yüzeyine immobilizasyon enzimin optimum pH değerinde bir değişikliğe sebep olmamakla birlikte denenen bütün pH değerlerinde enzim aktivitesinin serbest enzime kıyasla arttığı da görülmektedir. Sureshkumar ve Lee tarafından yapılan bir çalışmada, Sigma-Aldrich firmasından temin edilen *Bacillus sp.* ticari  $\alpha$ -amilazı magnetik kitin partiküllerine immobilize edildiği bildirildi. Magnetik kitin partiküllerine immobilize enzimin optimum pH değerinin serbest enzime kıyasla çok değişmediği rapor edildi [54]. El-Benna ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis*'ten kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin Dowex ve kitin partiküllerine immobilize edildiği bildirildi. Dowex'e immobilize enzimin optimum pH değeri pH 7,0'dan pH 6,0'a değiştiği kitin partiküllerine immobilize enzimin optimum pH değerinin ise değişmediği rapor edildi [55]. *Bacillus subtilis*'ten kısmi saflaştırılarak kitine immobilize edilen enzimin optimum pH değerinin pH 6,0'dan pH 5,25'e değiştiği bildirildi [48]. İmmobilizasyon sonucu enzim pH 4,0 ve pH 10,0 gibi ekstrem pH'larda yüksek aktivite göstermektedir. Bu sonuç, immobilize enzimin serbest enzime göre daha ekstrem şartlarda dahi aktif olabildiğini göstermektedir.

Serbest enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde enzimin en yüksek aktiviteye 75 °C'de sahip olduğu görülmektedir (Şekil 10). İleri sıcaklıklarda dahi enzimin %50'ye yakın bir bağıl aktiviteye sahip olduğu da şekilden görülmektedir. Termofilik



organizmalardan elde edilen amilaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerlerinin 55 – 85 °C arasında değiştiği bildirilmektedir [8]. *Bacillus sp.*ANT-6 suşundan kısmen saflaştırılan amilaz enziminin en yüksek aktiviteyi 80 °C’de gösterdiği bildirildi [11]. Arıkan tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus sp.* A3-15 suşundan kısmen saflaştırılan amilaz enziminin en yüksek aktiviteyi 70 °C’de gösterdiği bildirildi [56]. *Bacillus subtilis* JS-2004’den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığının 70 °C olduğu bildirildi [56]. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerinin, *Bacillus* suşlarından saflaştırılan birçok enzimden daha yüksek ve literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Nişasta hidrolizi ile glukoz şuruplarının üretiminde jelatinleştirme (gelatinization) 100-110 °C ve sıvılaştırma (liquefaction) prosesleri 80-90 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir ve nişasta bu işlemlerden sonra enzimatik hidrolize tabi tutulmaktadır. Dolayısı ile bu sıcaklıklarda aktif ve kararlı amilazlara ihtiyaç duyulmaktadır [57].

Dowex iyon değiştiriciye ve kitin yüzeyine immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde immobilize enzimlerin en yüksek aktiviteyi 95 °C’de gösterdiği görülmektedir (Şekil 11). Immobilize enzimlerin 100 °C’de dahi % 50 den fazla bağlı aktiviteye sahip olduğu da şekilden görülmektedir. Immobilizasyon sonucu enzimlerin optimum sıcaklık değerlerinde artış olduğu literatürde bir çok çalışmada rapor edilmiştir. Kahraman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ticari domuz pankreas amilazı cam boncuklara kovalent olarak immobilize edildiği bildirildi. Cam boncuklara kovalent olarak immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 30 °C’den 50 °C’ye değiştiği bildirildi [58]. El-Banna ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *B. Subtilis*’ten kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin, dowex, Ca-alginat, kitin ve sephadex yüzeyine immobilize edildiği bildirilmiştir. Dowex ve Ca-alginata immobilizasyon sonucu enzimin optimum sıcaklık değerinin 50 °C’den 70 °C’ye değiştiği rapor edildi [55]. *Bacillus subtilis*’ten kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi kitin yüzeyine immobilize edildiğinde optimum sıcaklık değerinin 45 °C’den 65 °C’ye değiştiği bildirildi [48]. Daha önce de ifade edildiği gibi, immobilizasyon enzimlerin operasyonel şartlarda kararlılıklarını artırmaktadır. Immobilizasyon sonucu enzimin optimum sıcaklık değeri 75 °C’den 95 °C’ye değişmiştir. Bu sonuç immobilize enzimin nişasta hidrolizi, kağıt ve tekstil endüstrisi için uygun bir aday olabileceğini göstermektedir.

Saflaştırılan enzimin kinetik parametreleri olan  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri Lineawaver-Burk grafiğinden sırasıyla % 0,35 ve 5000 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 13).  $K_m$  değeri

enzimin substratına ilgisinin bir göstergesidir. Enzimler substratlarını ürüne dönüştürürken reaksiyon bir enzim-substrat ara kompleksi üzerinden gerçekleşir.  $K_m$  değeri oluşan bu ara kompleksin kararlılığının bir göstergesidir. Düşük  $K_m$  değeri güçlü bir bağlanmayı ifade eder [1]. Saflaştırılan enzim çözümlerinde nişasta substratı varlığında nispeten düşük bir  $K_m$  değerine sahiptir. Mehta ve Satyanarayana tarafından yapılan bir çalışmada *Geobacillus thermoleovorans*'tan  $\alpha$ -amilaz enzimi kodlayan bir gen klonlanarak ekspres edildi ve enzim nikel afinite kromatografisi tekniğiyle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin çözümlerinde nişasta substratı için sırasıyla 0,315 mg/mL ve 2778 U/mg olduğu bildirildi [59]. *Geobacillus sp.*LH8 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin çözümlerinde nişasta substratı varlığında  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin sırasıyla 3 mg/mL ve 6  $\mu$ mol/dk olduğu rapor edildi [53]. *Anoxybacillus flavithermus*'tan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin sırasıyla 0,005 mM ve 3,5  $\mu$ mol/dk olduğu bildirildi [24]. *Bacillus subtilis*'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 8,3 mg/mL, 10  $\mu$ mol/dk.mL olduğu bildirildi [55]. Literatürle kıyaslandığında *Geobacillus sp.*TF14 suşundan saflaştırılan enzimin, bu güne kadar rapor edilen bir çok  $\alpha$ -amilaz enziminin daha küçük bir  $K_m$  değerine sahip olduğu görülmektedir.

İmmobilizasyon sonucunda enzimlerin  $V_{maks}$  değerleri serbest enzimlere kıyasla azalır. Dowex ve kitin'e immobilize edilen enzimlerin  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 3333,33 U/mg , % 0,067 ve 2500 U/mg , % 0,5 olarak belirlendi (Şekil 14 ve Şekil 15). *Bacillus licheniformis* 44MB82-A'dan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi Dowex iyon değiştiriciye immobilize edildiğinde enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 0,46 mM/s.g, 6,7 mg/mL olarak belirlendiği rapor edildi [60]. NOVO (Bagsvaerd, Denmark) firmasından temin edilen *Bacillus licheniformis* ticari  $\alpha$ -amilazının Dowex MAC 3 iyon değiştiriciye immobilize edildiği ve immobilize enzimin kinetik parametreleri  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 4373 U/mg ve % 0,14 olduğu bildirildi [48]. *Bacillus subtilis*'ten kısmi olarak saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin serbest enzim, Dowex ve kitin'e ayrı ayrı immobilize edilen enzimler için sırasıyla 10 U/mg ve 8,3 mg/mL, 25 U/mg, 16,66 mg/mL ve 11,11 U/mg ve 9,09 mg/mL olduğu bildirildi [55]. *Vigna radiata*'dan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 1,63 U/mg, 1,66 mg/mL , Amberlite MB 150 ve kitosan boncuklara immobilize edilen enzimin  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin ise sırasıyla 0,76 U/mg, 2,77 mg/mL ve 0,83 U/mg, 5,0 mg/mL olduğu bildirildi [73].

Saflaştırılan enzimin ısı kararlılığı incelendiğinde, enzimin depolama sıcaklığı olan 4 °C’de 72 saat sonunda aktivitesini hemen hemen tamamen koruduğu, enzimin üretilme sıcaklığı olan 55 °C’de 72 saat sonunda aktivitesini yarı yarıya kaybettiği, optimum sıcaklığı olan 75 °C’de ise 72 saat sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu belirlendi (Şekil 16). Ayrıca enzimin endüstride kullanım sıcaklığı olan 90 °C’deki kararlılığı incelendi ve bu sıcaklıkta enzimin 48 saat kararlı olduğu, 72. saatte ise aktivitesini büyük oranda kaybettiği de şekilden görülmektedir. *Bacillus laterosporus*’dan saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığının 60 °C olduğu enzimin bu sıcaklıkta kararlı olduğu daha ileri sıcaklıklarda ise kademeli olarak aktivitesini tamamen kaybettiği rapor edildi [61]. *Bacillus subtilis* JS-2004’den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 70 °C ve 80 °C’de 1 saat inkübasyon sonucu aktivitesini tamamen koruduğu, aynı sıcaklıklarda 24 saat inkübasyon sonucu enzimin aktivitesini % 50 civarında kaybettiği, 90 °C’de 1 saat sonunda aktivitesini % 70 civarında koruduğu, 24 saat sonunda enzimin % 40 civarında kalan aktiviteye sahip olduğu bildirildi [56]. *Anoxybacillus flavithermus*’dan saflaştırılan enzimin 40 ve 45 °C’de iki saat kararlı olduğu, 55 °C’de 2 saat sonunda aktivitesini % 50 oranında kaybettiği bildirildi [62]. *Bacillus subtilis* ZJ-1’den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin, 70 °C’de bir saat inkübasyon sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği, 5 mM Ca<sup>2+</sup> varlığında ise aynı şartlarda aktivitesini % 75 oranında koruduğu bildirildi [62]. *Marinobacter sp.* EMB8’den saflaştırılan enzimin 80 °C’de yarılanma ömrünün 80 dk. olduğu bildirildi [40]. *Geobacillus thermoleovorans*’tan klonlanarak saflaştırılan rekombinant  $\alpha$ -amilaz enziminin, 70 °C ve 80 °C’de beş saat inkübasyon sonucunda % 50 kalan aktiviteye sahip olduğu, 90 °C’de ise beş saat inkübasyon sonunda enzimin büyük oranda aktivitesini kaybettiği bildirildi [58]. Literatürle kıyaslandığında *Geobacillus sp.* TF14 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin, termofilik *Bacillus* suşlarından saflaştırılan  $\alpha$ -amilazların birçoğundan daha kararlı olduğu görülmektedir. 75 °C ve 90 °C gibi yüksek sıcaklıklarda enzimin uzun süre kararlı olması, saflaştırılan enzimin ısı kararlı bir enzim olduğunu göstermektedir ve bu sonuç enzimin yüksek sıcaklık gerektiren birçok endüstriyel proses için uygun bir enzim olabileceğini ortaya koymaktadır.

İmmobilize enzimlerin ısı kararlılıkları depolama ve optimum sıcaklık değerlerinde zamana karşı incelendi. Dowex’e immobilize edilen enzimin, depolama sıcaklığı olan 4 °C’de ve optimum sıcaklığı olan 95 °C’de 72 saat bekletildiğinde aktivitesini büyük oranda koruduğu belirlendi (Şekil 17). Kitin’e immobilize enzimin ısı kararlılığı incelendiğinde, hem 4°C’de hem de 95 °C’de 72 saat nihai bekletme sonucu enzimin aktivitesini büyük

oranda koruduğu belirlendi (Şekil 18). *Bacillus subtilis*'ten kısmi saflaştırılarak Dowex ve kitine ayrı ayrı immobilize edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin 60 °C'de bir saat inkübasyon sonucu aktivitesinin % 50'den fazlasını kaybettiği bildirildi [55]. Ticari olarak temin edilip çapraz bağlı selüloz boncuklar (CELBEADS)'a immobilize edilen *B. Licheniformis*  $\alpha$ -amilazının 55 °C'de 24 saat inkübasyonu sonucu serbest enzimin aktivitesini %75 oranında koruduğu, immobilize enzimin aktivitesinin değişmediği bildirildi [63]. *Bacillus subtilis* I'den aseton çöktürmesi ile kısmi saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin DEAE-selüloz ve kitine immobilize edildiği, immobilize enzimlerin 60 °C'de bir saat sonunda aktivitelerini büyük oranda koruduğu, 70 °C'de bir saat sonunda ise sırasıyla % 15 ve % 85 kalan aktiviteye sahip oldukları bildirildi [48]. Sigma (St Louis, MO, USA) firmasından temin edilen ticari *Bacillus sp.* $\alpha$ -amilazının, N-izopropilakrilamit (NIPAAm) polimer matrikse immobilize edildiği, serbest ve immobilize enzimin 70 °C'de 35 dk inkübasyon sonuncu sırasıyla %33 ve % 46 kalan aktiviteye sahip olduğu bildirildi [64]. *Aspergillus sclerotiorum*'dan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin Ca-alginat boncuklara immobilize edildiği, immobilize enzimin 60 °C'de yarılanma ömrünün 164 dk olduğu rapor edildi [65]. S. D. Fine-Chem Ltd.(Mumbai, India) firmasından temin edilen *Aspergillus oryzae* ticari  $\alpha$ -amilaz enziminin Ca-agar mikrokapsüllere immobilize edildiği, immobilize enzimin 75 °C'de yarılanma ömrünün 17 dk olduğu bildirildi [66]. Literatürle kıyaslandığında *Geobacillus sp.*TF14 suşundan saflaştırılarak Dowex ve kitin'e immobilize edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin bir çok immobilize enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir. Daha önce de ifade edildiği gibi immobilizasyon enzimlerin ekstrem şartlarda ki kararlılıklarını artırmada en çok tercih edilen bir yoldur. Her iki immobilizasyon sonucu enzimin ısı kararlılığının serbest enzime kıyasla (90 °C'de 24 saatten 95 °C'de 72 saate değişim) daha yüksek olması bu gerçeğe örtüşmektedir.

Saflaştırılan enzimin pH kararlılığı optimum pH değerlerinde zamana karşı incelendiğinde, pH 5,0 ve pH 9,0'da 12 saat sonunda enzimin % 80 aktivitesini koruduğu, 48 saat sonunda ise pH 5,0'da enzim aktivitesini % 70 oranında korurken bu değer pH 9,0 için % 50 civarında olduğu belirlendi (Şekil 19). *Geobacillus thermoleovorans*'tan klonlanarak saflaştırılan rekombinant  $\alpha$ -amilaz enziminin, pH 5,0'da 20 saat inkübasyon sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu, 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinde % 50'ye yakın bir azalma olduğu ve daha ileri inkübasyon sürelerinde aktivitesini büyük oranda kaybettiği bildirildi [58]. *Bacillus subtilis* JS-2004'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin pH 5,0 ile pH 10,0 aralığında farklı tamponlarda 24 saat inkübasyonu sonucu

enzimin bu pH'larda aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirildi [56]. *Anoxybacillus flavithermus*'tan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin pH 6,0, pH 7,0 ve pH 8,0 tamponlarında bir saat inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğu, üç saat nihai inkübasyon sonunda pH 6,0'da % 80, pH 7,0 ve pH 8,0'de ise % 60 civarında kalan aktiviteye sahip olduğu rapor edildi [24]. *Bacillus subtilis* ZJ-1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi pH 3,0 ile pH 9,0 arasında farklı tamponlarda 40 °C'de bir saat bekletildiğinde, pH 3,0 ve pH 4,0'da aktivitesini büyük oranda kaybettiği, pH 5,0'da aktivitesini % 80 oranında koruduğu, diğer pH'larda ise aktivitesinde ciddi bir değişiklik olmadığı bildirildi [62]. *Bacillus sp.* YX-1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin, pH 4,5 ile pH 11,0 arasında farklı tamponlarda 40 °C'de bir saat bekletildiğinde pH 5,0'da % 80 ve diğer pH'larda farklı oranlarda aktivitesini koruduğu rapor edildi [67]. *Geobacillus sp.* TF14'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi pH 5,0 ve pH 9,0'da hem yüksek aktiviteye sahip hemde bu pH'larda uzun süre kararlılığını korumuştur. Bu sonuç literatürle kıyaslandığında saflaştırılan enzimin *Bacillus* suşlarından saflaştırılan bir çok enzimden daha kararlı olduğunu ortaya koymaktadır.

İmmobilize enzimlerin pH kararlılıkları da optimum pH değerlerinde zamana karşı incelendi. Dowex'e immobilize enzim pH 4,0 ve pH 10,0 tamponlarında 12 saat bekletildiğinde immobilize enzim %70 civarında aktivitesini koruduğu, 48 saat sonunda ise her iki pH'da da enziminin aktivitesini % 40 civarında koruduğu belirlendi (Şekil 20). Kitine immobilize enzimin, 12 saat sonunda pH 5,0 ve pH 9,0'da aktivitesini büyük oranda koruduğu, 24 saat sonunda her iki pH'da yarı aktiviteye sahip olduğu ve 48 saat sonunda immobilize enzimin her iki pH'da da yaklaşık % 40 oranında aktivitesini koruduğu görüldü (Şekil 21). Sigma (USA) firmasından temin edilen ticari *Bacillus sp.*  $\alpha$ -amilazının akrilik katı destek materyallerine immobilize edildiği ve immobilize enzimin pH 3,5-8,0 aralığında bir saat süreyle kararlı olduğu bildirildi [68]. Domuz pankreas amilazının cam boncuklara kovalent olarak immobilize edildiği, immobilize enzimin pH 6,9 da 4 °C'de 5 gün kararlı olduğu bildirildi [57]. İmmobilize enzimlerin pH kararlılıkları 12 saat inkübasyon sonunda serbest enzimden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Amilazların çoğu metalo enzimlerdir. Aktiviteleri, yapısal uyumları ve kararlılıkları için metal iyonuna ihtiyaç duyabilirler. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, özellikle  $Mn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonlarının enzim aktivitesini tamamen durdurduğu,  $Ca^{2+}$ 'nın enzim aktivitesini yaklaşık iki kat artırdığı ve EDTA'nın ise enzim aktivitesini azalttığı görülmektedir (Tablo 10).  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonlarının ise enzim aktivitesini yarı yarıya azalttığı da tablodan görülmektedir. Triton X100 ve Tween 20 gibi

deterjanların varlığında dahi serbest enzimin aktivitesini yarı yarıya koruduğu belirlendi. *Bacillus laterosporus*'dan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $Mg^{2+}$  tarafından % 50 oranında inhibe edildiği bildirildi [24]. *Bacillus subtilis* JS-2004'den saflaştırılan enzimin,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  iyonları tarafından farklı oranlarda inhibe edildiği bildirildi. Ayrıca  $Ca^{2+}$ 'nın enzim aktivitesini artırdığı da rapor edildi [56]. *Bacillus sp.* KSM-1378'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları tarafından sırasıyla % 88, %91, %100 ve %100 oranlarında inhibe edildiği bildirildi [69]. *Geobacillus sp.* LH8'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve EDTA tarafından farklı oranlarda inhibe edildiği, 10 mM konsantrasyonda  $Ca^{2+}$ 'nın ise enzim aktivitesini yaklaşık iki kat artırdığı bildirildi [55]. *Geobacillus thermoleovorans*'tan klonlanarak ekspres edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin 5 mM nihai konsantrasyonda  $Fe^{3+}$  varlığında % 80 aktivitesini koruduğu,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  iyonları varlığında ise enzimin tamamen inhibe olduğu bildirildi [58]. *Marinobacter sp.* EMB8'den saflaştırılan enzimin, % 0.1 (w/v) konsantrasyonda SDS, Tween 80 ve Triton X-100 deterjanları ile bir saat muamele edilmesi sonucunda % 75 oranında aktivitesini koruduğu bildirildi [40]. *Bacillus subtilis* ZJ-1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin,  $Cu^{2+}$  iyonu tarafından inhibe edildiği,  $Ca^{2+}$ 'nın enzim aktivitesini artırdığı, EDTA'nın enzim aktivitesini azalttığı ve  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  iyonlarının ise enzim aktivitesi üzerine ciddi bir etkisi olmadığı bildirildi [62]. *Bacillus sp.* A3-15'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin, 5 mM  $Ca^{2+}$  tarafından % 30 oranında aktive edildiği, 5 mM EDTA'nın enzim aktivitesini % 5 azalttığı, % 1 SDS varlığında enzimin % 82 oranında aktivitesini koruduğu bildirildi [7]. Divalent metal iyonları ile alfa-amilaz molekülleri arasındaki ilgi enzim kaynağına göre değişmekle beraber *Geobacillus sp.* TF14'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $Ca^{2+}$  iyonu tarafından artırıldığı, bunun dışındaki iyonlar tarafından ise farklı oranlarda inhibe edildiği görülmüştür.  $Ca^{2+}$  iyonunun saflaştırılan enzimin güçlü bir aktivatörü olduğu söylenebilir. Farklı kaynaklardan elde edilen  $\alpha$ -amilazların deterjanlar ve organik çözücüler içerisinde farklı aktiviteler gösterdiği bildirilmektedir. Kullanılan deterjanların *Geobacillus sp.* TF14'ten saflaştırılan enzimin aktivitesini yarı yarıya düşürdüğü tespit edilmiştir.

İmmobilize enzimlerin aktivitesi üzerine aynı metal iyonlarının etkisi incelendiğinde,  $Mn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'nın immobilize enzimlerin aktivitelerini de tamamen durdurduğu görülmektedir (Tablo 11). Dowex iyon değiştiriciye immobilizasyonun,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonlarının inhibisyon,  $Ca^{2+}$ 'nın ise aktivasyon etkisini ortadan kaldırdığı da tablodan görülmektedir. Dowex'e immobilizasyon sonucu deterjanların varlığında enzim

aktivitesinde serbest enzime oranla ciddi bir artış olmuştur. Dowex'e immobilize enzimin, SDS, Triton X100, Triton X114 ve Tween 20 varlığında sırasıyla % 112, %96, % 83 ve % 61 kalan aktiviteye sahip olduğu görüldü. Kitinin ağır metalleri şelatlama özelliği olduğu daha önce ifade edilmişti. Kitin'e immobilize enzim  $Hg^{2+}$  varlığında aktivitesini tamamen koruduğu belirlendi (Tablo 11). Denenen diğer bütün metal iyonlarının kitin'e immobilize enzimi farklı oranlarda inhibe ettiği de tablodan görülmektedir. Ayrıca SDS ve Triton X100 varlığında immobilize enzimin, bağlı aktivitesini yaklaşık % 30 civarında koruduğu belirlendi. *Bacilli* izolatlarından elde edilen ve poliglisidil metakrilat boncuklara immobilize edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin, %5 konsantrasyonda SDS ve Triton X100 varlığında aktivitesinde 6 kat artış olduğu, ayrıca  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonlarının immobilize enzimi farklı oranlarda inhibe ettiği bildirildi [70]. *Aspergillus niger*'den elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin glutaraldehit modifiye polianiline immobilize edildiği ve immobilize enzimin  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonları tarafından farklı oranlarda inhibe edildiği bildirildi [71]. Dowex'e immobilize edilen enzimin deterjanlar mevcudiyetindeki aktivitesinin serbest enzime nazaran yüksek olması enzimin bu destek maddesi ile etkileşimi sonucu deterjanlara karşı kararlılığının arttığını göstermektedir. Hem serbest enzim hem de literatür verileriyle kıyaslandığında, Dowex'e immobilize enzimin SDS, Triton X100, Triton X114 ve Tween 20 gibi deterjanlar varlığında yüksek aktivite göstermesi Dowex immobilize enzimin deterjan endüstrisi için potansiyel olabileceğini göstermektedir.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde hem Dowex'e hem de kitine immobilize enzimin ard arda alınan 15 ölçüm sonucu aktivitesinde değişim olmadığı belirlendi (Şekil 22). Ticari olarak temin edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin polianilin-polivinil alkol filme immobilize edildiği ve immobilize enzimin 30 ölçüm sonunda % 60 Aktivitesini koruduğu rapor edildi [72]. N-izopropilakrilamit (NIPAAm) polimere immobilize edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin peş peşe 12 ölçüm sonucunda % 54 oranında aktivitesini koruduğu bildirildi [64]. Ca-agar mikrokapsüllere immobilize edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin 6 ölçüm sonucu aktivitesini % 22 oranında kaybettiği bildirildi [66]. Her iki katı desteğe immobilize edilen enzimin tekrar kullanılabilirliği literatürde bildirilen birçok immobilize enzimden daha iyi olduğu görülmektedir. Bu sonuç immobilize enzimin sürekli proseslerde kullanıma uygun olabileceğini ortaya koymaktadır.

Saflaştırılan enzimin substratı ile etkileşimi sonucu ana ürün olarak maltotetroz olduğu belirlendi (Şekil 23). Maltotetroz dışında daha uzun zincirli oligosakkaritlerin

varlığı da TLC plakada görülmektedir.  $\beta$ -amilazların nişasta moleküllerini esas olarak maltoz birimlerine hidrolizlediği, Glukoamilazların esas olarak Glukoz açığa çıkardığı, Pullulanaz enzimlerinin ise dallanma bölgelerini hidrolizlediği göz önüne alındığında, elde edilen sonuç saflaştırılan enzimin endo aktivite gösteren bir enzim olduğunu desteklemektedir. Literatürde farklı zincir uzunluğuna sahip oligo sakkarit açığa çıkaran bir çok  $\alpha$ -amilaz rapor edilmiştir [39,40].



## 5. ÖNERİLER

Enzim endüstrisi, modern biyoteknolojik araçların da kullanımı ile birçok üretim işleminin geliştirilmesine önemli derecede katkı sağlamaktadır. Daha az miktarda enerji, su ve hammadde tüketimi ile daha az atık ve çevresel kirlilik bu teknolojinin hedeflenen yararları arasındadır. Enzim teknolojilerinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir [N.S]. Enzimlerin ilaç, tekstil, kozmetik, temizlik, gıda ve ziraat gibi temel alanlarda kullanımı günümüzde rutin uygulamalar haline gelmekle beraber, ülkemiz enzim kullanımında Avrupa ve Amerika'ya nazaran daha geridedir. Avrupa'da ve Amerika'da farklı firmaların ürettiği ticari enzimlerin piyasalarda olmasına rağmen, yeni ve farklı özelliklere sahip enzimlerin keşfi hala sıcak bir araştırma alanıdır.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı araştırmacılarının yapmış oldukları çalışmalarla, Türkiye'deki bazı kaplıcalardan, bazı termofilik bakteriler izole edilmiş ve biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizleri ile bu bakterilerin *Geobacillus* türlerine ait yeni suşlar olduğu ortaya konulmuştur.

Yapılan bu çalışmada, yeni izole edilen bu bakterilerin 7 tanesi  $\alpha$ -amilaz üretme kapasiteleri açısından incelendi ve *Geobacillus sp.* TF14 suşundan bu enzim saflaştırılarak karakterize edildi. Ülkemiz kaplıcalarından izole edilen ve yeni suşlar olan termofilik organizmalardan endüstriyel öneme sahip ısı kararlı enzimlerin elde edilmesi, kendi kaynaklarımızı kullanmak açısından oldukça önemlidir.

Klasik kromatografik metotlarla enzim saflaştırmaları, saflaştırma verimi açısından düşük etkinliğe sahiptir. Özellikle mikroorganizmaların enzimleri az miktarda ekspres ettiği de göz önüne alındığında birkaç adımlık saflaştırma prosesi sonucu mikrogram düzeyinde saf enzim elde edilebilmektedir. Saflaştırılan enzimin N-ucundan ve C-ucundan aminoasit sırası belirlenerek enzimi kodlayan gen için primerler tasarlanabilir ve bu primerler kullanılarak enzimi kodlayan gen rekombinant DNA tekniği ile klonlanabilir.

Böylece orijinal kaynağında düşük seviyede ekspres edilen bu enzim daha düşük sıcaklıklarda ve bol miktarda üretilebilir hale getirilebilir.

Serbest enzimler sürekli proseslerde kullanıma uygun değildir ve immobilizasyon bu noktada etkili bir çözümdür. Enzimi kodlayan gen klonlanırken, enzimin uç bölgesinde immobilizasyon için kullanılacak katı desteğe afinitesi olan bir grup takılabilir. Örneğin enzimin yüzeyinde histidin rezidüleri olacak şekilde klonlandığında, yüzeyinde tiyol grubu bulunan inert bir katı desteğe kovalent olarak immobilize edilebilir.

Saf enzimin farklı kaynaklardan elde edilen işlenmemiş nişastaları hidrolizleme etkinliği incelenebilir. Böylece enzimin endüstriyel proseslerde kullanılabilme potansiyeli ortaya çıkarılabilir.

Saflaştırılan enzimin tekstil endüstrisinde kullanılabilirliğini ortaya koymak açısından, nişasta ile muamele edilmiş pamuklu dokumalardan enzimin nişasta giderme etkinliği incelenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya 2. Baskı, Aktif Yayınevi, 638 Sayfa 2000.
2. Beilen, J.B. ve Li, Z., Enzyme technology: an overview, Current Opinion in Biotechnology, 13 (2002) 338–344.
3. Haki, G.D. ve Rakshit, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, Bioresource Technology, 89 (2003) 17–34.
4. Hernandez, K. ve Fernandez-Lafuente, R., Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance, Enzyme and Microbial Technology, 48 (2011) 107–122.
5. Iyer, P. V. ve Ananthanarayan, L., Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment, Process Biochemistry, 43 (2008) 1019–1032.
6. Naidu, M. A. ve Saranraj, P., Bacterial Amylase: A Review, Int. J. of Pharmaceutical & Biological Archives, 4, 2 (2013) 274 – 287.
7. Arıkan B., Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15, Bioresource Technology, 99 (2008) 3071–3076.
8. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. ve Chauhan, B., Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochem., 38 (2003) 1599–1616.
9. Woese, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains *Archea*, *Bacteria* and *Eucarya*, Proc. Natl. Acad. Science, 97 (1990) 4576-4579.
10. Li, W.F., Zhou, X.X. ve Lu, P., Structural features of thermozymes, Biotechnol. Advance, 23 (2005) 271–281.
11. Burhan, A., Ünalđı, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A. ve Gülnaz, O., Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* İsolate ANT-6, Process Biochemistry, 38 (2003) 1397-1403.
12. Vieille, C. ve Zeikus, J.G., Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiol Mol Biol R, 65 (2001) 1-43.
13. Schallmeyer, M., Singh, A. ve Ward, O.P., Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production, Canadian Journal of Microbiology, 50 (2004) 1-17.

14. Ölçer, H. ve Akın B., Nişasta: Biyosentezi, Granül Yapısı ve Genetik Modifikasyonlar, D.P.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 16. Sayı, 2008.
15. Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. ve Balasubramanian, T., Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus cereus*, Indian Journal of Microbiology, 51, 4 (2011) 424–429.
16. Horváthová, V., Janeček, S. ve Sturdík, E., Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties, Biologia Bratislava, 55,6 (2000) 605-615.
17. Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K.M., Soccol C.R. ve Pandey A.,  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources An Overview on Recent Developments, Food Technology and Biotechnology, 44, 2 (2006) 173–184.
18. Peng H., Zheng Y., Chen M., Wang Y., Xiao Y. ve Gao Y., A starch-binding domain identified in  $\alpha$ -amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch, FEBS Letters, 588 (2014) 1161–1167.
19. Mok, S. C., Teh, A.H., Saito, J. A., Najimudin, N. ve Alam, M., Crystal structure of a compact  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus thermoleovorans*, Enzyme and Microbial Technology, 53 (2013) 46– 54.
20. Souza, P. M., Magalhães, P. O., Application of microbial  $\alpha$ -Amylase in industry a review, Brazilian Journal of Microbiology, 41 (2010) 850-861.
21. Priest, F. G., Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*, Bacteriology Reviews, 41 (1977) 711-753.
22. Bernfeld, P., Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ , Methods in Enzymology, 1 (1955) 149-158.
23. Fincan, S., A. ve Enez, B., Production, purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*, Starch/Stärke, 66 (2014) 182–189.
24. Fincan, S. A., Enez B., Özdemir, S. ve Bekler, F. M., Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*, Carbohydrate Polymers, 102 (2014) 144-150.
25. Demirhan E., Production, purification, and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives, Turkish Journal of Biology, 35 (2011) 705-712.
26. Mathew, C. D. ve Rathnayake, S., Isolation and characterization of alpha amylase isolated from a hot water spring in Sri Lanka, International Research Journal of Microbiology, 5, 4 (2014) 50-61.
27. İnan, K., İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıçalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu, Doktora Tezi, 2011.

28. Tuncer, M., Protein Saflaştırma 1 Kromatografik Metodlar, Mersin Üniversitesi Yayınları, Yayın No:14, 265 sayfa, 2008.
29. Telefoncu, A., İmmobilize enzimler, Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası-AYDIN (1997) 193-247.
30. Krajewska, B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, Enzyme and Microbial Technology, 35 (2004) 126–139.
31. Aygan, A., Haloalkalofil *Bacillus sp.* İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, 2008.
32. Keskin, S., Ertunga, N.S., Colak, A., Yildirim, M. A., Özel, A. ve Kolcuoglu, Y., Characterization of a Polyphenol Oxidase Having Monophenolase and Diphenolase Activities, Asian Journal of Chemistry, 24 (2012) 1203-1209.
33. Nivedita, J., Prakash, O., Talat, M., Hasan, S.H. ve Pandey, R.K.,  $\alpha$ -Amylase immobilization on gelatin: Optimization of process variables, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 10 (2012) 161–167.
34. Kikani, B.A.,ve Singh, S.P., Single step purification and charecterization of a thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat(india), International Journal of Biological Macromolecules, 48 (2011) 676-681.
35. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72 (1976) 248-254.
36. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>
37. Sedaghat, M.E., Ghiaci, M., Aghaei, H. ve Soleimanian-Zad, S., Enzyme immobilization. Part 3 Immobilization of  $\alpha$ -amylase on Na-bentonite and modified bentonite, Applied Clay Science, 46 (2009) 125–130.
38. Kolcuoglu, Y., Colak, A., Faiz, O. ve Belduz A.O., Cloning, expression and characterization of highly thermo- and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4, Process Biochemistry, 45 (2010) 821–828.
39. Jetendra, K.R. ve Ashis, K. M., Applications of a high maltose forming, thermo-stable  $\alpha$ -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries, Biochem. Engineering Journal, 77 (2013) 220– 230.
40. Hmidet, N., Bayouhd, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N. ve Nasri, M., Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*, Process Biochemistry, 43 (2008) 499–510.

41. Sahnoun, M., Bejar, S., Sayari, A., Triki, M.A., Kriaa, M. ve Kammoun, R., Production, purification and characterization of two  $\alpha$ -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2, Process Biochemistry, 47 (2012) 18–25.
42. Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F. ve Chen, G., Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2, Process Biochemistry, 49 (2014) 47–53.
43. Kumar, S. ve Khare, S.K., Purification and characterization of malto oligosaccharide-forming  $\alpha$ -amylase from moderately halophilic *Marinobacter sp.* EMB8, Bioresource Technology, 116 (2012) 247–251.
44. Sharma, A. ve Satyanarayana, T., Microbial acid stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications, Process Biochemistry, 48 (2013) 201–211.
45. Padma, V.I., Laxmi, A., Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment, Process Biochemistry, 43 (2008) 1019–1032.
46. Tomotani, E.J., Vitolo, M., Method for immobilizing invertase by adsorption on Dowex® anionic exchange resin, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 42 (2006) 245–249.
47. Gupta, K., Jana, A.K., Kumar, S. ve Maiti, M., Immobilization of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase onto ion-exchange resin beads and hydrolysis of natural starch at high concentration, Bioprocess Biosyst. Eng., 36 (2013) 1715–1724.
48. Abdel-Naby, M. A., Hashem, A. M., Esawy, M. A. ve Abdel-Fattah, A. F., Immobilization of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase and characterization of its enzymatic properties, Microbiol. Res., 153 (1998) 319-325.
49. Reiss, M., Heibges, A., Metzger, J. ve Hartmeier, W., Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor, Biosensors & Bioelectronics, 13 (1998) 1083-1090.
50. Hwang, I. T., Lim, H. K., Song, H. Y., Cho, S. J., Chang, J. ve Park, N., Cloning and characterization of a xylanase, KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus sp.* HPL-001, Biotechnology Advances, 28 (2010) 594–601.
51. Ushasree, M. V., Vidya, J. ve Pandey, A., Extracellular expression of a thermostable phytase (phyA) in *Kluyveromyces lactis*, Process Biochemistry, 49 (2014) 1440–1447.
52. Achbergerova, L. ve Naha'lka, J., Degradation of polyphosphates by polyphosphate kinases from *Ruegeria pomeroyi*, Biotechnol Letters, 36 (2014) 2029–2035.
53. Mollania, N., Khajeh, K., Hosseinkhani, S. ve Dabirmanesh, B., Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus sp.* LH8, International Journal of Biological Macromolecules, 46 (2010) 27–36.

54. Sureshkumar, M. ve Lee, C-K., Polydopamine coated magnetic-chitin particles as a new matrix for enzyme immobilization, Carbohydrate Polymers, 84 (2011) 775–780.
55. El-Banna, T. E., Abd-Aziz, A. A., Abou-Dobara, M. I. ve Ibrahim, R. I., Production and immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*, Pakistan Journal of Biological Sciences, 10,12 (2007) 2039-2047.
56. Arikan, B., Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* A3-15, Bioresource Technology, 99 (2008) 3071-3076.
57. Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U. ve Legge, R.L., A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing, Journal of Food Engineering, 79 (2007) 950–955.
58. Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman, A.N. ve Güngör, A.,  $\alpha$ -amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment, Food Chemistry, 104 (2007) 1385–1392.
59. Mehta, D. ve Satyanarayana, T., Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 86 (2013) 229– 238.
60. Ivanova, V., Dobрева, E. ve Legoy, M.D., Characteristics of Immobilized Thermostable Amylases from Two *Bacillus licheniformis* Strains, Acta Biotechnology, 18 (1998) 339-351.
61. Kumar, N. M., Karthikeyan, S. ve Jayaraman, G., Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2 (2013) 38-44.
62. Liu, J., Xia, W., Abdullahi, A. Y., Wu, F., Feng, Q. A. D. ve Zuo, J., Purification and Partial Characterization of an Acidic  $\alpha$ -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* ZJ-1 that may be Applied to Feed Enzyme, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 45,3 (2014) 259-267.
63. Shewale, S. D. ve Pandit, A. B., Hydrolysis of soluble starch using *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase immobilized on superporous CELBEADS, Carbohydrate Research, 342 (2007) 997-1008.
64. Chen, J-P., Chu, D-H. ve Sun, Y-M., Immobilization of  $\alpha$ -Amylase to Temperature-Responsive Polymers by Single or Multiple Point Attachments, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 69 (1997) 421-428.
65. Yagar, H., Ertan, F. ve Balkan, B., Comparison of Some Properties of Free and Immobilized  $\alpha$ -Amylase by *Aspergillus sclerotiorum* in Calcium Alginate Gel Beads, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 38 (2008) 13–23.

66. Sharma, M., Sharma, V. ve Majumdar, K. D., Entrapment of  $\alpha$ -Amylase in Agar Beads for Biocatalysis of Macromolecular Substrate, International Scholarly Research Notices, vol. 2014, Article ID 936129, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/936129.
67. Liu, X. D. ve Xu, Y. A., Novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization, Bioresource Technology, 99 (2008) 4315–4320
68. Bryjak, J., Glucoamylase,  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase immobilisation on acrylic carriers, Biochemical Engineering Journal, 16 (2003) 347–355.
69. Igarashi K., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M. ve Uemura T., Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and aminoacid sequences, Applied and Environmental Microbiology, 64 (1988) 3282-3289.
70. Akkaya, B., Yenidunya, A. F. ve Akkaya, R., Production and immobilization of a novel thermo alkalophilic extracellular amylase from *Bacilli* isolate, International Journal of Biological Macromolecules, 50 (2012) 991– 995.
71. Pascoala, A. M., Mitidieri, S. ve Fernandes, K. F., Immobilisation of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* onto polyaniline, Food and Bioproducts Proces., 89 (2011) 300-306.
72. Singh, S., Prasad, S. J. ve Buragohain, A. K., A novel reusable PANi-PVA-Amylase film: Activity and analysis, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 106 (2013) 46–50.
73. Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P. ve Kayastha, A. M., Immobilization of  $\alpha$ -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49 (2007) 69–74.



## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Maçka'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Maçka'da tamamladı. 1998–2002 yılları arasında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2003 yılı temmuz ayında vatani görevini tamamlayarak terhis oldu. 2005 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi. “*Russula delica (Russulaceae)*'dan Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu” adlı Yüksek Lisans tezini 2009 yılında tamamlamıştır. İyi derecede İngilizce bilmektedir (UDS 82.5).