

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Anoxybacillus gonensis* Z4 SUŞUNDAN EKSTRASELÜLER  $\alpha$ -AMİLAZ**  
**ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Nimet BALTAŞ**

**MAYIS 2012**  
**TRABZON**

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Anoxybacillus gonensis* Z4 SUŞUNDAN EKSTRASELÜLER  $\alpha$ -AMİLAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**Kimyager Nimet BALTAŞ**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07/05/2012**  
**Tezin Savunma Tarihi : 25/05/2012**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI**  
**İkinci Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER**

**Trabzon 2012**

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Nimet BALTAŞ tarafından hazırlanan

*Anoxybacillus gonensis* Z4 SUŞUNDAN EKSTRASELÜLER · -AMİLAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 08/05/2012 gün ve 1455 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri


Başkan : Prof. Dr. E. Edip KEHA

Üye : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Üye : Doç. Dr. Ahmet ALVER



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi amacıyla yapılan bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalında "Doktora Tezi" olarak hazırlandı.

Tez danışmanlığımı üstlenen ve tez konusunu belirleyen, değerli bilgilerinden yararlandığım, maddi ve manevi her türlü desteği, imkânı sağlayan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya ve ikinci danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında kullandığımız *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunu temin eden Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, enzimin HPLC cihazında son ürün analizini yapmamda kolaylık sağlayan Trabzon Tarım İl Kontrol Laboratuvarında çalışan Yüksek Kimyager Sevda ÇAVRAR'a teşekkür ederim. Kimya bölümündeki değerli hocalarıma ve çalışmam sırasında her türlü desteğini gördüğüm Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU'ya teşekkür ederim. Biyokimya laboratuvarında beraber çalıştığımız, çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, Arş. Gör. Arife Pınar EKİNCİ'ye, yüksek lisans öğrencisi Feyzan AVCI'ya, Murat DURMAZ'a ve Arş. Gör. Gülay CANDAN'a teşekkür ederim. Ayrıca tez yazımında yardımını gördüğüm Fizik Bölümü Arş. Gör. Erkan KIRIŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan sevgili aileme ve amcama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, her türlü desteğini esirgemedi sunan sevgili eşim Doç. Dr. Hasan BALTAŞ'a ve canım oğlum Ege Ahmet'ime teşekkür ederim. İyi ki varsınız...

Nimet BALTAŞ

Trabzon 2012

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI ve ikinci danışmanım Yrd. Doç. Dr. Barbaros Dinçer’ in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda 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. 07/05/2012

Nimet BALTAŞ

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	3
1.3. Amilolitik Enzimler .....	4
1.3.1. $\alpha$ -Amilazın Yapısı, Aktif Bölgesi ve Kataliz Mekanizması.....	8
1.4. $\alpha$ -Amilaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar .....	15
1.5. Nişasta.....	23
1.6. Termofilik Mikroorganizmalar .....	25
1.6.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklıklara ve Denaturasyona Karşı Dayanıklılıkları .....	27
1.6.2. Termofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı .....	27
1.7. Isıl Kararlı Enzimler .....	29
1.8. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	31
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	35
2.1. Kullanılan Cihazlar .....	35
2.2. Kullanılan Kimyasallar .....	35
2.3. Kullanılan Çözeltiler .....	36
2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları .....	36
2.3.2. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler.....	37
2.3.3. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	38

2.3.4.	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler .....	38
2.4.	Sıvı ve Katı Besiyerleri .....	39
2.5.	Deneysel Çalışmalar .....	40
2.5.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Termofilik Suşunun Ekstraselüler $\alpha$ -Amilaz Üretiminde Petri Testi .....	40
2.5.2.	Ekstraselüler Ham Enzim Kaynağının Üretilmesi .....	40
2.5.3.	Termofilik $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması .....	40
2.5.3.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	40
2.5.3.2.	Çöktürülen Proteinlerin Amicon Ultracel Membran 30.000MWCO Milipore ile Konsantre Edilmesi .....	41
2.5.3.3.	Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	41
2.5.4.	Protein Tayini.....	42
2.5.5.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE).....	42
2.5.6.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez .....	43
2.5.7.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	44
2.5.8.	Saflaştırılan Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi .....	44
2.5.9.	$\alpha$ -Amilaz Enziminin HPLC Yöntemiyle Son Ürün Tayini .....	45
2.5.10.	Glukoz Standart Grafiğinin Hazırlanması.....	45
2.6.	Bazı Parametrelerin Saflaştırılan <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -Amilazının Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	45
2.6.1.	pH'ın Etkisi .....	45
2.6.2.	Sıcaklığın Etkisi .....	46
2.6.3.	Enzim Konsantrasyonunun Etkisi.....	46
2.6.4.	Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	46
2.6.5.	Isıl Kararlılığın İncelenmesi.....	46
2.6.6.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	46
2.6.7.	Bazı Kimyasal, Deterjan, Anyonların ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	47
3.	BULGULAR.....	48
3.1.	$\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması.....	48
3.1.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Termofilik Suşunun Ekstraselüler $\alpha$ -Amilaz Üretiminde Petri Testi .....	48
3.1.2.	Enzimin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	49
3.1.3.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE).....	50

3.1.4.	SDS Poliakilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE).....	51
3.1.5.	Saflaştırılan Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	53
3.1.5.1.	$\alpha$ -Amilaz Katalizli Reaksiyon Karışımında HPLC Yöntemiyle Son Ürün Tayini.....	53
3.1.5.2.	Glukoz Standart Grafiğinin Hazırlanması.....	53
3.1.5.3.	Saflaştırılan Enzimin Substrat Özgünlüğü ve Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	54
3.1.5.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi .....	55
3.1.5.5.	Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	56
3.1.5.6.	Protein Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	57
3.1.5.7.	Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	58
3.1.5.8.	Saflaştırılan Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	60
3.1.5.9.	Saflaştırılan Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	65
3.1.5.10.	Metal İyonlarının, Anyonların, Bazı Kimyasal ve Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	66
4.	TARTIŞMA .....	71
5.	SONUÇLAR .....	79
6.	ÖNERİLER.....	82
7.	KAYNAKLAR .....	83
8.	EKLER.....	92
ÖZGEÇMİŞ		



## Doktora Tezi

### ÖZET

#### *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI  
2012, 91 Sayfa, 6 Sayfa Ek

Bu çalışmada, yeni bir termofilik bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saf enzim, doğal ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezlerinde tek bir bant halinde belirlendi. Optimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, pH'ın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, çözümlü patates nişastası substratı kullanılarak belirlendi. Enzimin optimum pH'sı, çözümlü patates nişastası varlığında, 5,5-10,5 arasında bulundu. Enzimin optimum sıcaklığı ise, 70 °C olarak belirlendi. Saf enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde 10 gün sonunda, +4 °C de aktivitesinin tamamını koruduğu, 70 °C' de % 65' ini koruduğu ve 90 °C' de aktivitesinin %43' ünü koruduğu gözlemlendi. Patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için, *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının  $K_m$  değerleri, Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla, sırasıyla, 0,9 mg/mL, 1,3 mg/mL ve 0,5 mg/mL olarak bulundu.  $V_{maks}$  değerleri ise sırasıyla 833,3 U/mg protein, 1000 U/mg protein ve 769 U/mg protein olarak belirlendi. EDTA,  $Hg^{2+}$ ,  $B_4O_7^{-2}$ ,  $OH^-$ ,  $CN^-$  ve üre için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 16,5 mM, 15,2 mM, 8,2 mM ve 10,9 mM olarak bulundu. Bu sonuçlar, elde edilen *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazı, ısıl ve pH kararlılığı ve diğer özellikleri açısından endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Anoxybacillus gonensis* Z4, Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz, Saflaştırma, Karakterizasyon

PhD. Thesis

SUMMARY

Purification and Characterization of Extracellular  $\alpha$ -Amylase  
from *Anoxybacillus gonensis* Z4 Strain

Nimet BALTAŞ

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Sevgi KOLAYLI  
2012, 91 Pages, 6 Pages Appendix

In this study,  $\alpha$ -amylase, was isolated from a new thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* Z4 using gel filtration chromatography. The purified enzyme was migrated as a single band on native and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum  $\alpha$ -amylase activity as a function of pH and temperature was determined using soluble potato starch as substrate. The optimum pH of the enzyme was found between 5,5 to 10,5 in the presence of soluble potato starch. The optimum temperature was determined at 70°C. When the thermal stability profile of the purified enzyme was investigated, at the end of ten days, it was observed that the purified enzyme was extremely stable +4 °C, the enzyme retained over 65 % of its original  $\alpha$ -amylase activity at 70°C, the enzyme retained over 43 % of its original  $\alpha$ -amylase activity at 90 °C. The  $K_m$  values of *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amylase for soluble starch, amylopectin and amylose substrates were determined 0,9 mg/mL, 1,3 mg/mL and 0,5 mg/mL by Lineweaver-Burk curve, respectively. The  $V_{max}$  values of *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amylase for the same substrates, were determined 833,3 U/mg protein, 1000 U/mg protein and 769 U/mg protein by Lineweaver-Burk curve, respectively.  $IC_{50}$  values of *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amylase for EDTA,  $Hg^{2+}$ ,  $B_4O_7^{-2}$ ,  $OH^-$ ,  $CN^-$  and urea inhibitors were determined as 8 mM, 5,75 mM, 16,5 mM, 15,2 mM, 8,2 mM ve 10,9 mM respectively. It is clear from the present results that the pH- and thermo- stabilities and other biochemical features of the extracellular enzyme make it potential for industrial applications.

**Key Words:** *Anoxybacillus gonensis* Z4, Extracellular  $\alpha$ -amylase, Purification, Characterization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

Şekil 1.	Nişasta hidrolizine katılan amilolitik enzimler ve oluşan ürünler. ....	7
Şekil 2.	<i>Bacillus licheniformis</i> $\alpha$ -Amilazının üç boyutlu yapısı.....	9
Şekil 3.	<i>Aspergillus oryzae</i> Taka Amilazın yapısı ve katalitik amino asitler.....	10
Şekil 4.	<i>Aspergillus oryzae</i> Taka Amilazın aktif bölge yapısı .....	11
Şekil 5.	(A) <i>Bacillus licheniformis</i> $\alpha$ -Amilaz (B) <i>Bacillus licheniformis</i> $\alpha$ -Amilazın aktif bölgesine bağlı maltopentoz substratı.....	12
Şekil 6.	<i>Aspergillus oryzae</i> suşundan elde edilen $\alpha$ -amilazın reaksiyon mekanizması .....	14
Şekil 7.	Amilozun yapısı .....	23
Şekil 8.	Amilopektinin yapısı.....	24
Şekil 9.	Nişastanın endüstriyel işlemlerden geçerek siklodekstrin, maltodekstrin, glukoz ve fruktoz şrubu ve kristal şekere dönüşümü.....	33
Şekil 10.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 suşunun amilolitik petri testi.....	48
Şekil 11.	Jel Filtrasyon kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve amilolitik aktivite değerleri.....	49
Şekil 12.	Doğal PAGE elektroforezi.....	51
Şekil 13.	SDS-PAGE elektroforezi.....	52
Şekil 14.	Standart proteinlerin Rf değerlerine karşı molekül ağırlıklarının logaritması grafiği.....	53
Şekil 15.	Glukoz standart grafiği .....	54
Şekil 16.	Enzim aktivitesi üzerine pH' ın etkisi.....	56
Şekil 17.	Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....	57
Şekil 18.	Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	58

Şekil 19.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazı için çözünür patates nişastası substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	59
Şekil 20.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazı için amilopektin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi .....	59
Şekil 21.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazı için amiloz substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi .....	60
Şekil 22.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 4 °C'deki pH kararlılık grafiği ...	61
Şekil 23.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 4 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.....	62
Şekil 24.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 55 °C'deki pH kararlılık grafiği .	62
Şekil 25.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 55 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.....	63
Şekil 26.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 70 °C'deki pH kararlılık grafiği .	63
Şekil 27.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 70 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.....	64
Şekil 28.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 90 °C'deki pH kararlılık grafiği .	64
Şekil 29.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının 90 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.....	65
Şekil 30.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi .....	66
Ek Şekil 1.	Glukoz, Fruktoz ve Sakkaroz standartlarının HPLC Kromotogramları .....	92
Ek Şekil 2.	Enzim ile substratın 10 dakika inkübasyon sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı.....	93
Ek Şekil 3.	Enzim ile substratın 20 dakika inkübasyon sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı.....	94
Ek Şekil 4.	Enzim ile substratın 30 dakika inkübasyonu sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı.....	95
Ek Şekil 5.	Enzim ile substratın 45 dakika inkübasyonu sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı.....	96

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No:

Tablo 1.	Amilolitik enzimlerin enzim kod numaraları (EC numaraları) ve başlıca substratları .....	5
Tablo 2.	Bazı mikroorganizmalardan $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzimin biyokimyasal özellikleri .....	17
Tablo 3.	Termofilik organizmalarından elde edilen bazı enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar (Aguilar, 1996).....	29
Tablo 4.	Isıl kararlı enzimlerin biyoçevrim reaksiyonları ve uygulamaları .....	30
Tablo 5.	Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları .....	35
Tablo 6.	Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları .....	36
Tablo 7.	Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları .....	43
Tablo 8.	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları.....	44
Tablo 9.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4' ten izole edilen ekstraselüler $\alpha$ -Amilaza ait saflaştırma tablosu.....	50
Tablo 10.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 ekstraselüler $\alpha$ -amilazının farklı substratlar varlığında elde edilen aktivite değerleri .....	55
Tablo 11.	Bazı Metal İyonlarının <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine etkisi .....	67
Tablo 12.	Bazı Anyonların <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine etkisi .....	68
Tablo 13.	Bazı deterjanların <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine etkisi .....	70
Ek Tablo 1.	Proteinleri çöktürmek için katı amonyum sülfat doyurma tablosu .....	97

## SEMBOLLER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Bovin serum albümin
DNS	: 3,5-Dinitrosalisilik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
kDa	: Kilodalton
$K_m$	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria-Bertani
LB-A	: Luria-Bertani Agar
MOPS	: 3-(N-morfolino)propan sülfonik asit
PMSF	: Fenilmetilsülfonoflorid
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
$V_{maks}$	: Maksimum hız

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

$\alpha$ -Amilaz (EC 3.2.1.1, 1-4- $\alpha$ -glukan glukanohidrolaz) hidrolaz sınıfından bir enzim olup, nişasta, glikojen gibi polisakkaritleri genelde  $\alpha$ -1-4-glikozidik bağlarından hidroliz ederek çeşitli uzunluklarda oligosakkaritler oluşturur. Bu nedenle de polisakkaritleri kullanan çeşitli hayvan, bitki, bakteri ve mantarlarda yaygın olarak bulunurlar.  $\alpha$ -amilazlar, glikozit hidrolazlar olup 13 farklı ailede sınıflandırılırlar.  $\alpha$ -amilazlar önemli endüstriyel enzimlerden olup gıda, meyve suyu, deterjan üretimi, eczacılık ve tekstil endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pazarlıoğlu, 1999; Telefoncu, 1999; Najafi vd., 2005).

Amilaz enziminin buğday nişastasası üzerinde parçalayıcı bir etkisi olduğu 1811 yılında Kirchoff tarafından belirlenmiş ancak parçalama etkeni amilaz tanımlanamamıştır. Daha sonra benzer etkiyi insan tükürüğünün gösterebileceği 1831 yılında Leuch tarafından tespit edilmiştir. 1833' de Payen ve Persoz'un ise malttan nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını vermişler. 1951'de Berzelius tükürüğün bu özelliğinin pityalin tarafından meydana geldiğini söylemiştir. Günümüzde tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak bilinmektedir (Sarıkaya, 1995).

Enzimler, canlı hücrelerde üretilen ve organizmadaki tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesini sağlayan, bunları düzenleyen protein yapısındaki biyo katalizörlerdir (Pekin, 1983; Sarıkaya, 1995). İnsanoğlu enzimlerden önceleri bilinçsiz olarak ekmek, peynir, sirke, bira, şarap gibi bazı gıda maddelerinin yapımında yararlanmaktaydı, ancak günümüzde pek çok sayıda enzim çeşitli orgazimalardan saflaştırılmakta ve karakterize edildikten sonra biyoteknolojiden, klinik biyokimyaya, gıda sanayiinden tekstil kimyasına kadar pek çok alanda fiili olarak kullanılmaktadırlar (Sarıkaya, 1995).

Günümüz endüstrisinde klasik kimyasal yöntemlerin yerini biyoteknolojik uygulamalar almaktadır. Biyoteknolojinin de katkısıyla enzimler, birçok endüstriyel işlemleri hem daha ılımlı şartlarda gerçekleştirilmekte, hem de oluşan yan ürünlerin çevreye verdikleri zararları en aza indirmektedirler. Endüstriyel enzimler, bir kaç istisna hariç, pH 3-10 ve 25-90 °C (çoğu 45-55 °C)' de normal atmosfer basıncında aktivite

gösterirler.

Endüstriyel enzimlerin kullanıldığı proseslerin pek çok avantajları olmakla birlikte en büyük avantaj düşük maliyet sağlamalarıdır. Enzimler normalde substrat ağırlığının % 0.1-1.0'ı kadar kullandıklarından işlem akışında katıldıkları miktar ihmal edilebilir. Ayrıca reaksiyonlar spesifik olduğundan istenmeyen ürünler azaltılır veya tamamen yok edilir. Oysa enzimatik olmayan kimyasal teknikte, birçok reaksiyon yüksek basınç, yüksek sıcaklık gibi ekstrem şartlar gerektirdiğinden maliyet yükselmekte ve yan ürünler oluşabilmektedir. Enzimler, pek çok avantajlara sahip olmalarına rağmen yakın zamana kadar bazı önemli endüstri dalları haricinde kullanımları çok yaygın değildi. Ancak son yıllarda; enzim üretim, saflaştırma, türevlendirme teknolojilerindeki ve biyoteknolojideki gelişmelere bağlı olarak hızla uygulama alanı bulmuşlardır ve bu giderek artmaktadır. Enzimlerin sınırlı uygulama alanları bulmasında en önemli etken, enzimlerin saflaştırılma işlemlerinin zahmetli ve pahalı olmasıdır (Sarıkaya, 1995).

$\alpha$ -Amilaz enziminin endüstriyel üretimine ilk kez Japonya' da 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak başlanmıştır. 1970' lerde ise *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır (Sarıkaya, 1995). Bugün  $\alpha$ -amilaz enzim üretiminde kullanılan diğer mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas*, *Saccharophila*, bazı *Clostridium* ve *Bacillus* türleri ve alt türleri sayılabilir. Fungal  $\alpha$ -amilazlar sıcaklığa bakteriyel  $\alpha$ -amilazlara göre daha çok duyarlı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerinin genişliği, besin isteklerinin daha az olması ve Dünya' da bu alanda giderek artan gelişmeler bakterilere karşı ilgiyi iyice artırmıştır.

Endüstride kullanılan en önemli ham materyallerden biri nişastadır. Nişasta bitkilerde depo polisakkarit formunda bol miktarda bulunmaktadır ve yiyecek endüstrisinde geniş çapta kullanılan glukoz, fruktoz veya maltoz içeren şurupların üretimi için oldukça ucuz bir kaynaktır. Nişasta granüllerinde moleküller iç ve ara moleküler bağlar ile polikristalin fazda yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Bu yüzden soğuk suda çözünmezler. Sıklıkla kimyasallara ve enzimlere karşı dirençlidir. Nişasta endüstrisinde kullanılan bütün bu işlemler yüksek enerjiye ihtiyaç duyar. Bu yüzden nişastayı temel alan ürünlerin üretim fiyatları artar. Jelatinizasyon işleminde bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar, sakkarifikasyonda ise fungal  $\alpha$ -amilazlar kullanılmaktadır. Her iki enzim grubunun aktivite gösterdiği pH değeri değişiktir.



Bakteriyal  $\alpha$ -amilazlar bazik, fungal  $\alpha$ -amilazlar ise asidik pH' da maksimum aktivite göstermektedirler. Jelatinizasyon işleminden sakkarifikasyon işlemine geçilirken ortamın pH'sı da değiştirilmek zorundadır. Bu işlemde sonuç olarak maliyeti arttırmaktadır (Goyal vd., 2005).

Tek basamakta ham nişastayı hidrolizleyen amilaz ile nişastadan elde edilen glukoz, fruktoz veya maltoz şuruplarının üretim fiyatları oldukça düşük olacaktır. Son yıllarda, jelatinizasyon işlemi olmaksızın ham nişastanın enzimatik sakkarifikasyonu artan bir öneme sahiptir. Kullanılan enerji miktarının azalması ve nişastanın daha etkili kullanılması nişasta endüstrisinde fiyatları düşürmektedir. Bu durum tek basamakta ham nişastayı direk hidrolizliyeabilen ve jelatinizasyona ihtiyaç duymayan amilazların arayışının kapısını açmıştır (Goyal vd., 2005).

Bu tür verilerden yola çıkarak ülke ekonomisine katkıda bulunmak ve Dünya' daki gelişmelere ayak uydurmak amacıyla bu çalışmada, Yeni Termofilik Bir Bakteri Olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşunun ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz üretme kapasitesi ve saflaştırma koşullarının belirlenmesi üzerinde durulacaktır. Ayrıca, endüstride daha geniş bir kullanım alanı bulabilmesi için, termofilik  $\alpha$ -amilazın pH ile termal kararlılığı belirlenecek, bununla birlikte deterjanlar, çeşitli iyonlar ve kimyasallar varlığında  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin değişimi incelenecektir.

## 1.2. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Isıl kararlı enzimler oldukça yüksek özgünlüğe sahiptirler ve bu sebeple birçok endüstriyel uygulama için potansiyel oldukları düşünülmektedir. Bu tip enzimler yiyecek, ekmekçilik, kâğıt, deterjan, ilaç, zehirli atıkların uzaklaştırılması ve yağ sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür enzimler termofilik mikroorganizmalardan elde edilebildiği gibi çabuk büyüeyebilen mezofil canlılara, rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla klonlanarak da elde edilmesi mümkündür. Bu tür özgün ısıl kararlı enzimlere endüstride duyulan ihtiyaç, gelecekte bu enzimlerin geliştirilmesi ve uygulama alanlarının genişletilmesini oldukça önemli hale getirmektedir (Haki ve Raksit, 2003).

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu organizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik analoglarına göre daha kararlı olduğu keşfedilmiştir. Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonuna, karakterizasyonuna ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır.

Bu çalışmada, çalışma materyali olarak kullanılan ve yeni bir termofilik bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşu Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından Erzurum Ilıca İlçe'si kaplıcalarından izole edilmiştir. Çalışma amacı olarak, “*Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” ile tekstil, deterjan, kağıt, ekmekçilik ve özellikle nişasta sanayi için büyük önem taşıyan sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enziminin bol ve ucuz bir şekilde üretilmesine olanak sağlamak amacıyla, saflaştırılması ve biyokimyasal olarak karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Saflaştırılacak olan yeni  $\alpha$ -amilaz'ın özellikleri göz önüne alındığında ise endüstride kolaylıkla kullanım alanı bulabileceği düşünülmektedir.

### 1.3. Amilolitik Enzimler

Nişasta endüstrisi, hidroliz ve modifikasyon amacıyla enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan biridir. Nişasta polimerinin, diğer benzer polimerler gibi tamamının hidroliz olması için enzim kombinasyonlarına ihtiyaç vardır. Bunlar  $\alpha$ -amilaz, glukozamilaz, veya  $\beta$ -amilaz ve izoamilaz veya pullulanazı içerirler (Poonam ve Dalel, 1995). Endüstride nişasta hidrolizinde kullanılan 5 grup enzim vardır;

1. Endo-amilazlar (iç etkili)
2. Ekzo-amilazlar (dış etkili)
3. Dallanmayı kırıcı enzimler
4. İzomerazlar
5. Transferazlar

Amilolitik enzimlerin enzim kod numaraları (EC numaraları) ve başlıca substratları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Amilolitik enzimlerin enzim kod numaraları (EC numaraları) ve başlıca substratları

Enzim	EC Numarası	Domain	Başlıca substratı
Amilosükraz	2.4.1.4	-	Sükroz
Sükroz fosforilaz	2.4.1.7	-	Sükroz
Glukon dallanma enzimi	2.4.1.18	A,B,F	Nişasta, glikojen
Siklodekstrin glikozil transferaz	2.4.1.19	A,B,C,D,E	Nişasta
Amilomaltaz	2.4.1.25	A,B1,B2	Nişasta,glikojen
Amilopentoz oluşturan amilaz	3.2.1.-	A,B,I	Nişasta
$\alpha$ -Amilaz	3.2.1.1	A,B,C	Nişasta
Oligo (1-6)glukozidaz	3.2.1.10	A,B	Amilopektin
$\alpha$ -Glukozidaz	3.2.1.20	-	Nişasta
Amilopullulanaz	3.2.1.41	A,B,H,G,I	Pullulan
Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	A,B	Siklodekstrinler
Izopullulanaz	3.2.1.57	-	Pullulan
Izoamilaz	3.2.1.68	A,B,F,7	Amilopektin
Maltotetroz oluşturan amilaz	3.2.1.60	A,B,C,E	Nişasta
Siklodekstranaz	3.2.1.70	-	Nişasta
Teraloz 6-fosfat hidrolaz	3.2.1.93	-	Teraloz
Maltoheksoz oluşturan amilaz	3.2.1.98	-	Nişasta
Maltojenik amilaz	3.2.1.133	A,B,C,D,E	Siklodekstrinler,nişasta
Neopullulanaz	3.2.1.135	A,B,G	Pullulan
Malto-oligozil teralaz hidrolaz	3.2.1.141	-	Teraloz
Malto-oligozil teralaz sentaz	5.4.99.15	-	Maltoz

$\alpha$ -amilaz ailesi (glikozil hidrolaz Family 13), nişastanın hidrolizinde rol oynayan bir sınıfı teşkil eder. Bu ailenin birçok üyesi ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> katlanmalı çoklu alt birimlerine sahiptir ve substrat özgünlüğü için oldukça geniş bir yapısal esneklikleri vardır (Svensson, 1994; Henrissat, 1991). Birçok Family 13 üyesinin primer yapıları kıyaslandığında, ilgili enzimlerin geniş bir sıra çeşitliliklerinin olduğu ve oldukça korunmuş 4 kısa ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> katlanmalı katalitik bölgesine sahip oldukları belirtilmiştir (Henrissat, 1991).

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, siklodekstrinaz (CDaz), maltojenik amilaz ve neopullulanazın Family 13'e dahil olduğu ayrıca, siklodekstrin, pullulan ve nişastayı hızlı bir şekilde hidroliz ettikleri açığa çıkmıştır. Buna karşılık  $\alpha$ -amilazlar, yalnızca nişastayı hidroliz ederler (Bender, 1993).

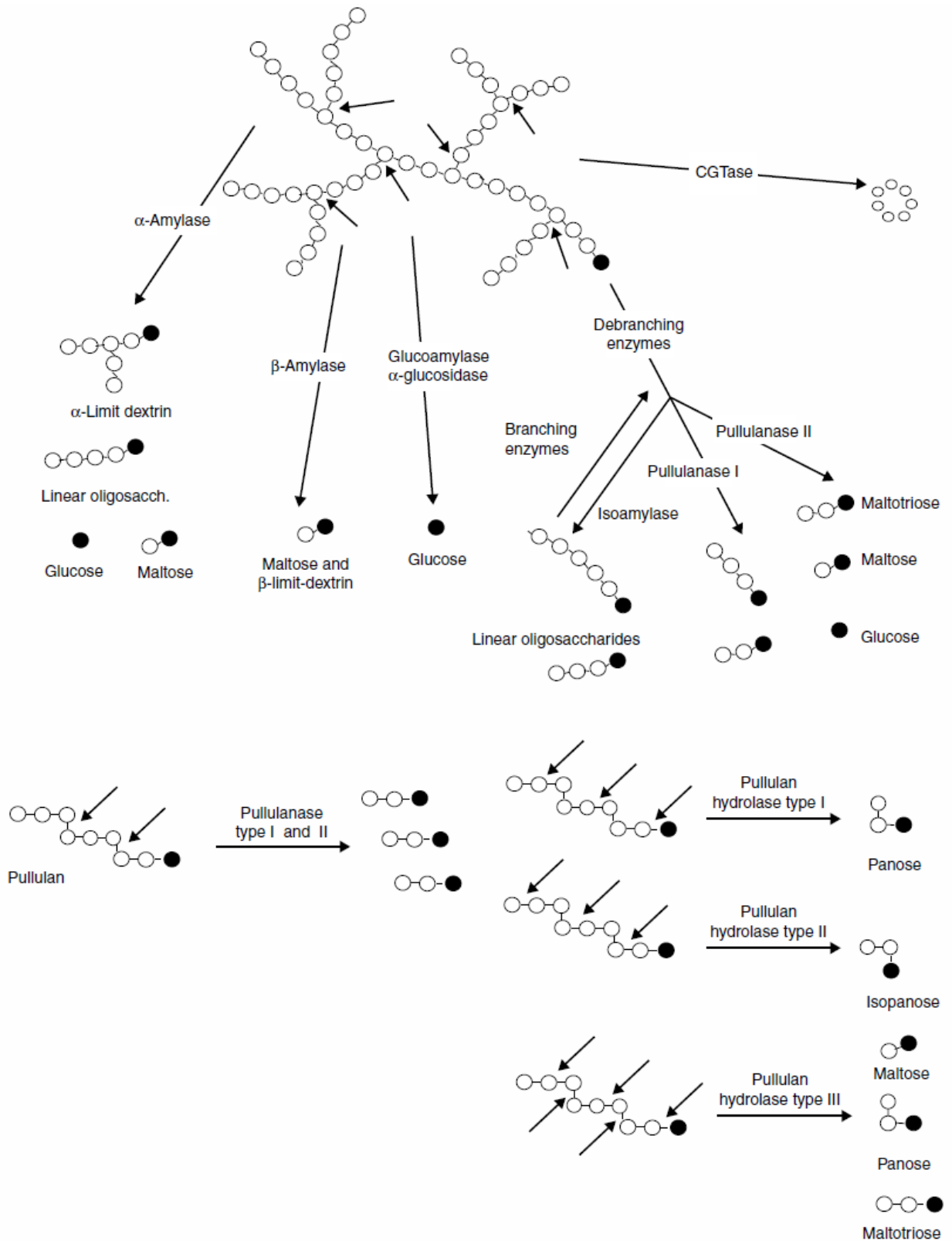
İç etkili amilazlar,  $\alpha$ -amilaz (1,4- $\alpha$ -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) olup; amiloz, amilopektin ve ilgili polisakkaritlerdeki  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağları hidroliz eder fakat amilopektindeki  $\alpha$ -1,6 bağlarını kıramaz. Hidroliz ürünleri çeşitli zincir uzunluğundaki oligosakkaritlerdir (Şekil 2). Endo-amilazlara ek olarak, transglikozilasyon aktivitesine sahip, siklodekstrin glikoztransferaz (CGTaz) (EC 2.4.1.19); maltojenik amilaz (EC 3.2.1.133) ve maltooligosakkarit oluşturan amilazlar (maltotetroz ve maltohegzoz oluşturan amilazlar) bulunmaktadır (Van der Maarel vd., 2002).

Ekzo-amilazlar, substratın indirgen olmayan ucundan hidroliz gerçekleştirirler ve oligo ve/veya monosakkaritler oluştururlar. Ekzo-amilazlardan  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2) yalnızca  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını parçalarken, amiloglukozidaz veya glukamilaz (EC 3.2.1.3) ile  $\alpha$ -glukozidaz (EC 3.2.1.20),  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 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 glukamilaz enzimleri, serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya çevirebilirler (Pandey vd, 2000).

Dallanmayı parçalayıcı enzimler iki tanedir; Pullulanaz (EC 3.2.1.41) ve izoamilaz (EC 3.2.1.68). Pullulanaz, pullulandaki  $\alpha$ -1,6 zincirleri üzerine spesifik etkiye sahiptir. Endüstride glukamilaz  $\alpha$ - veya  $\beta$ -amilaz ile kombine edilerek kullanılır. İzoamilaz amilopektinde yer alan  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını hidrolizler, endüstride glukamilaz ile kombine edilerek kullanılır.

Nişasta hidrolizleyen enzimlerin beşinci grubunu transferazlar oluşturmaktadır. Bu enzimler verici (donör) bir moleküldeki  $\alpha$ -1,4 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 (Van der Maarel vd., 2002). Siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19) nişastadan hidroliz ürünü olarak siklodekstrinleri üretir. Siklodekstrinler altı, yedi veya sekiz D-glikopiranozil gruplarını içeren indirgen olmayan siklomaltooligosakkaritlerdir (Maldonado ve Lopez, 1995).

İki iyi bilinen amilolitik enzim olan Termamyl ve Fungamyl ticari olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler farklı seviyelerde dekstroz içeren şurupların ve glukoz şurubunun üretilmesinde kullanılmaktadırlar (Chitradon vd., 2000).



Şekil 1. Nişasta hidrolizine katılan amilolitik enzimler ve oluşan ürünler (Bertoldo ve Antranikian, 2002).

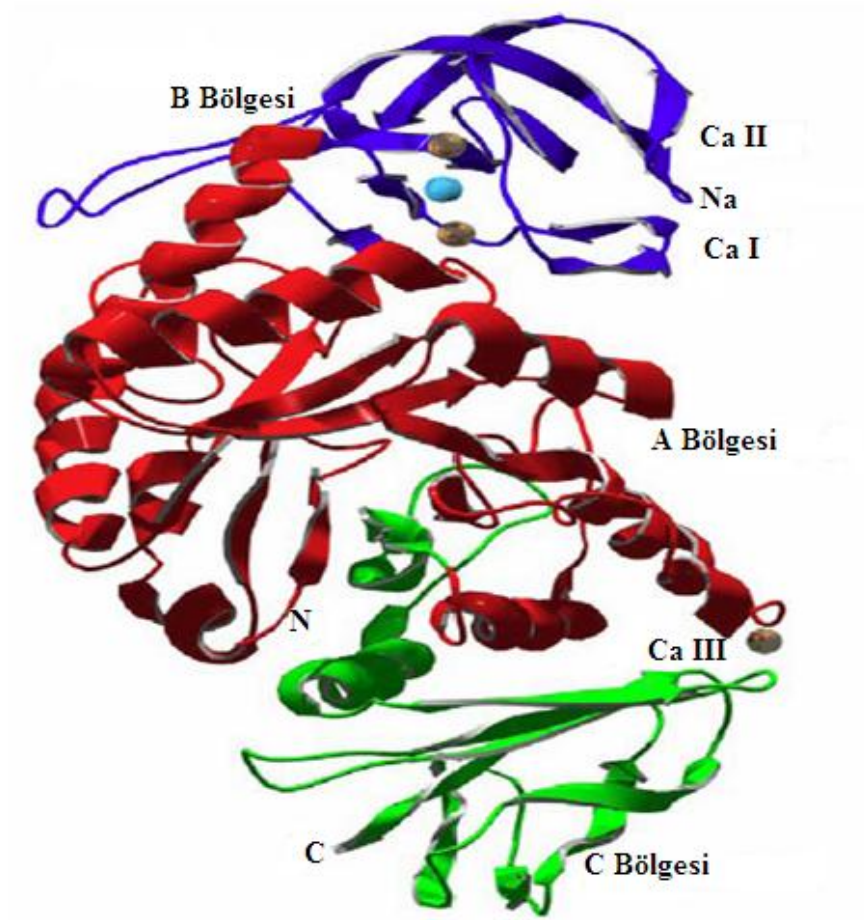
### 1.3.1. $\alpha$ -Amilazın Yapısı, Aktif Bölgesi ve Kataliz Mekanizması

$\alpha$ -amilaz (1,4- $\alpha$ -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) nişastadaki  $\alpha$ -1,4 bağlarını hidrolizler.  $\alpha$ -Amilaz (EC 3.2.1.1) enziminin nişastayı hidrolizi ile serbest bırakılan hemiasetal grupları  $\alpha$ -optik konformasyona sahip olduklarından bu enzimlere yaygın olarak  $\alpha$ -amilaz denilmektedir (Windish ve Mhatre, 1965).

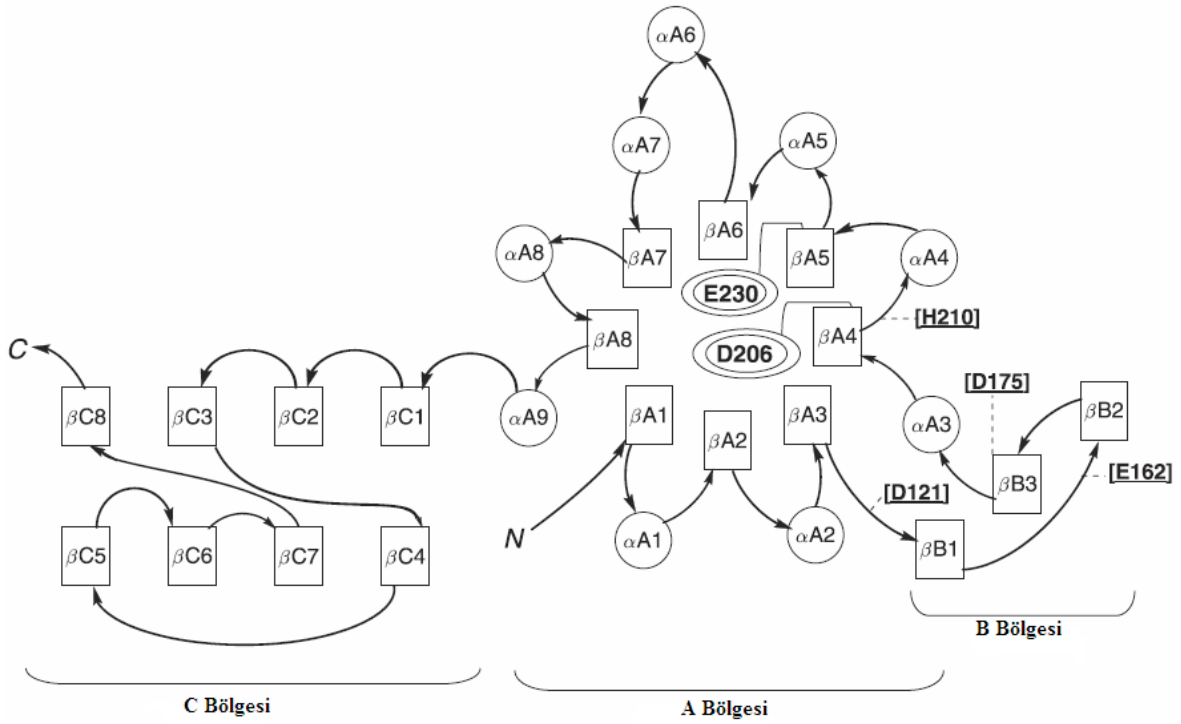
$\alpha$ -Amilazlar molekül ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında değişen proteinlerdir ve genelde tek polipeptid zincirinden oluşur (Janecek, 1997). Molekül ağırlığı 10 kDa ve tek alt birim olan  $\alpha$ -amilaz *Bacillus caldolyticus* suşundan (Grooteoged vd, 1973), 210 kDa  $\alpha$ -amilaz enzimi ise *Chloroflexus ourantiacus* suşundan (Ratanakhanokchai vd, 1992) saflaştırılmıştır.

Enzim, aktivite gösterebilmek için kalsiyum ( $\text{Ca}^{+2}$ ) iyonlarına gereksinim duyduğundan metalloprotein yapısına sahiptir (Manning ve Campbell, 1961). Enzimin yapısında bulunan kalsiyum, ekstrem pH ve sıcaklıklarda pepsin, tripsin, papain gibi proteazlara karşı enzimin dayanıklılığını ve aktivite sırasında enzimin katalitik bölgenin yapısının kararlılığını korumasını sağlamaktadır.

$\alpha$ -Amilaz 3 farklı bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2- 3). A bölgesi ailenin diğer üyelerinde de olduğu gibi  $(\beta/\alpha)_8$  tabaka yapısından oluşmuştur. Bütün  $\alpha$ -amilazlar da B bölgesi, A bölgesinin üçüncü  $\beta$ -kırmalı tabakası ile üçüncü  $\alpha$ -heliksine disülfid bağlarıyla tutunmuştur. Genel olarak B bölgesinin uzunluğu 44 ile 133 aminoasit arasında değişir. B bölgesi substrat ve kalsiyum iyonu bağlamada rol alır. C bölgesi A bölgesine basit bir polipeptid zinciriyle bağlanmıştır ve  $\beta$  kırmalı tabakadan oluşmaktadır.  $\alpha$ -amilazlar  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu içerirler ve bu iyon A ile B bölgesinin arasında yer alır, hem allosterik aktivatör olarak iş görür hem de katalitik bölgenin yapısının korunmasında görevlidir (Muralikrishna ve Nirmala, 2005).



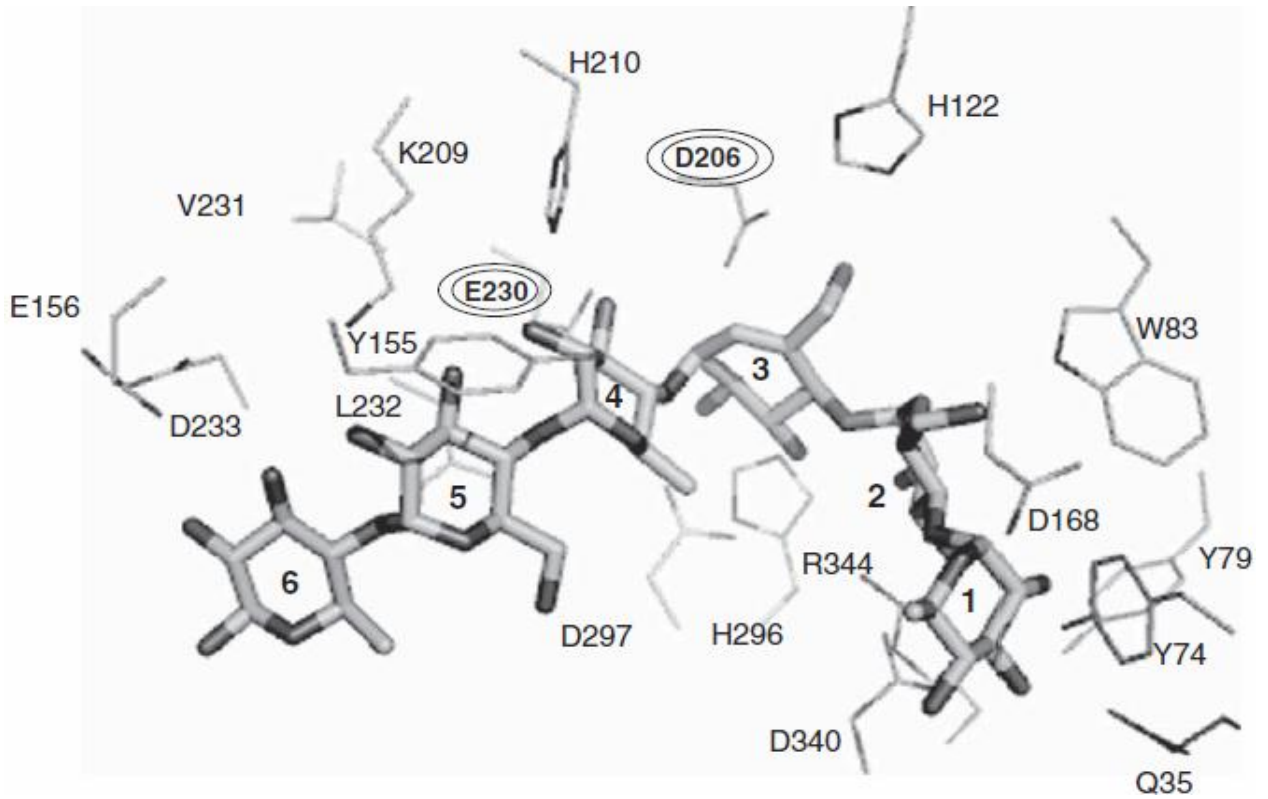
Şekil 2. *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -Amilazının üç boyutlu yapısı  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$  kırmalı tabakadan oluşan A bölgesi kırmızı renkte, B bölgesi mavi renkte, C bölgesi yeşil renkte, sodyum iyonlar açık mavi ve kalsiyum iyonları altın renginde gösterilmiştir (Nazmi vd., 2006)



Şekil 3. *Aspergillus oryzae* Taka Amilazın yapısı ve katalitik amino asitler, daireler  $\alpha$ -heliks yapıları, kareler ise  $\beta$  kırmalı yapılanmaları göstermektedir (Taniguchi ve Honnda, 2009)

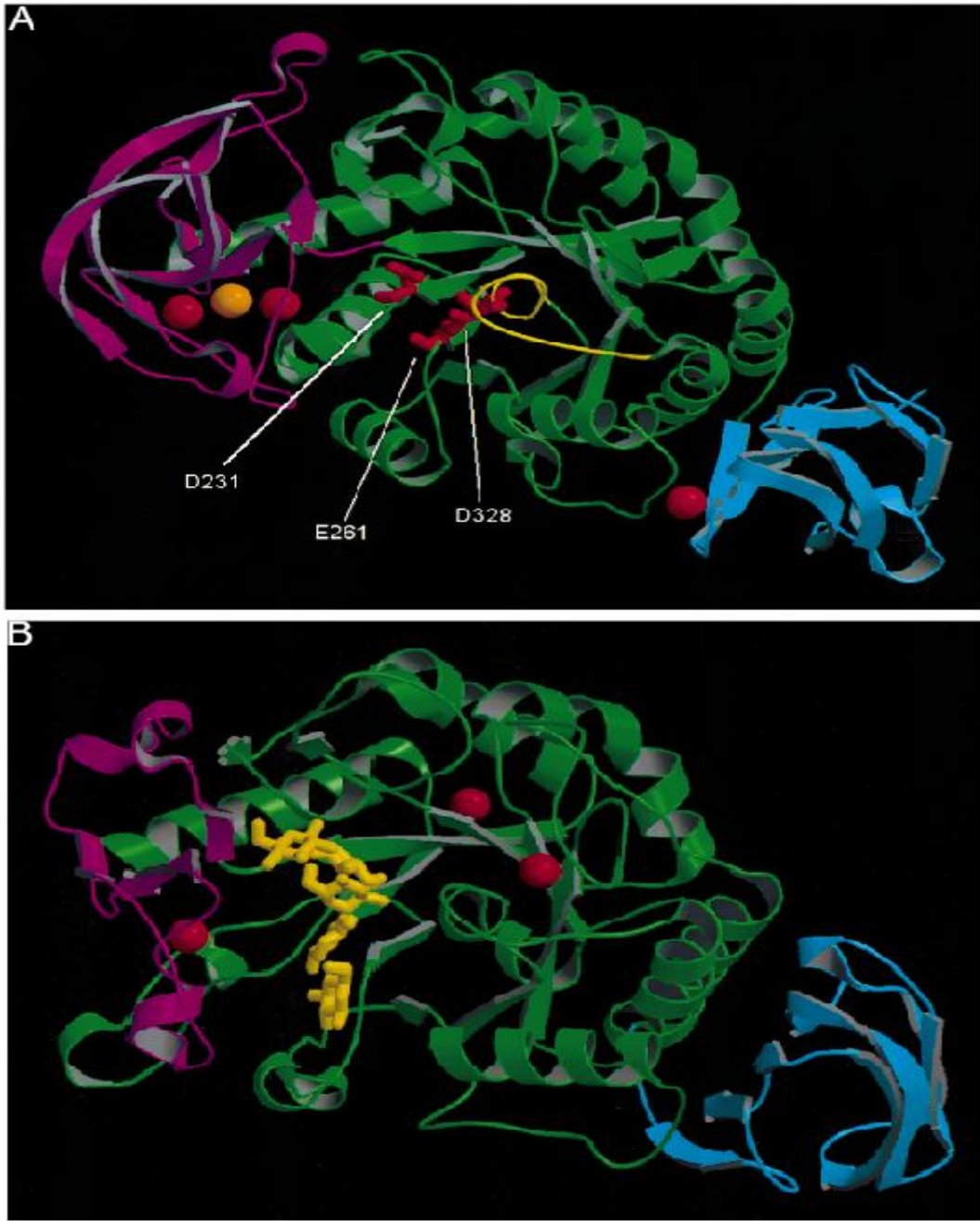
*Aspergillus oryzae*'dan saflaştırılan Taka amilazı 478 amina asitten ve tek polipeptid zincirinden ibarettir. A bölgesi 1 ile 376 aminoasitler arasında, B bölgesi 128 ile 201 nolu aminoasitler arasında ve C domaini ise 385 ile 478 aminoasitler arasında yer almaktadır. A bölgesi diğer GH 13 ailesi üyeleri gibi birbirine benzer şekilde, sekiz birbirine benzer alfa sarmal ve beta kırmalı çifti ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> yapısı içeren katalitik domainidir. Katalitik bölge A ve B domainin arasında yer alan bir cep şeklindedir. Bölge B ise  $\beta$  kırmalı tabakadan oluşmaktadır ve A bölgesi üçüncü  $\beta$  kırmalı tabaka ile üçüncü  $\alpha$  heliksine disülfid bağlarıyla tutunmuştur. Bölge C ise sekiz antiparalel  $\beta$  kırmalı tabaka içermektedir.





Şekil 4. *Aspergillus oryzae* Taka Amilazın aktif bölge yapısı, substrat olarak bağlanan akarboz indirgen olamayan uçtan başlayarak numaralandırılmış ve Asp 206, Glu230 çift daire içinde gösterilmiştir (Taniguchi ve Honnda, 2009)

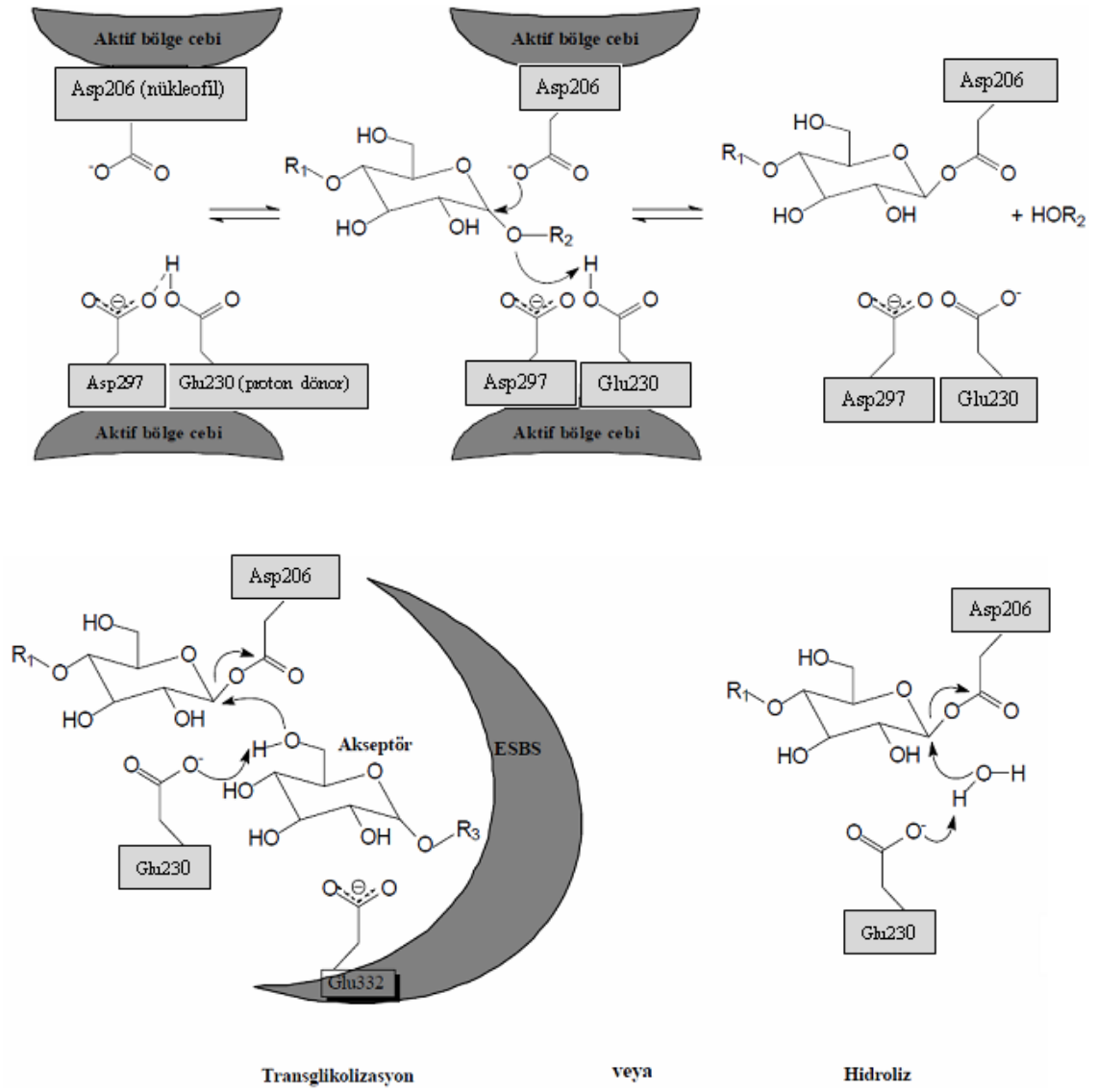
Şekil 4'te te görüldüğü gibi yaklaşık yirmi tane amino asit katalitik cep etrafında dizilmiştir. Katalitik bölgede bulunan amino asitlerin çoğu A bölgesinde ki  $(\beta/\alpha)_8$  katlanma bölgesinde yer alırken, bazıları B bölgesinde bulunur. Katalitik amino asitlerin iki tanesi; Asp206 dördüncü  $\beta$ -kırmalı yapı üzerinde, Glu230 ise beşinci  $\beta$ -kırmalı yapı üzerinde bulunmaktadır. Bu aminoasitler ayrıca substratın üçüncü glikozidik bağına yakın yerleşmiştir. Aktif bölge cebinde bulunan diğer amino asitler ise glukoz birimlerinin hidroksil gruplarıyla hidrojen bağı oluştururlar. Bütün bu etkileşimler substratın parçalanmasına ve katalitik aminoasitlerin hidroliz reaksiyonuna yardımcı olmaktadır.



Şekil 5. A bölgesi yeşil renkte, B bölgesi mor renkte ve C bölgesi mavi renkte gösterilmiştir. Kalsiyum iyonları kırmızı yuvarlak şeklinde ve klor iyonu turuncu renkte gösterilmiştir. (A) *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -Amilaz (PDB code 1BLI). Aktif bölgedeki aminoasitler Asp231, Glu261 and Asp328 kırmızı renkte ve L7 yi K7 ye bağlayan pileptid zinciri sarı renkte gösterilmiştir. (B) *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -Amilazın (PDB code 1BAG) aktif bölgesine bağlı maltopentoz substratı sarı renkte gösterilmiştir (Nielsen ve Borchert, 2000)

Şekil 5A' da görüldüğü gibi *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amilazının aktif bölgesinde katalizden sorumlu aminoasitler Asp231, Glu261 ve Asp328' dir. *Aspergillus oryzae* Taka Amilaz'ında bu aminoasitlere denk gelen aktif bölge aminoasitleri Asp-297, Glu-230 ve Asp-206' dır. Kataliz sırasında Asp-206 nükleofil olarak (baz gibi), Glu-230 proton donör (asit gibi) olarak davranır. Kataliz sırasında katalitik bölgede Glu-230'un yanında bir su molekülü bulunmaktadır. Katalitik bölge cebinin içinde bulunan  $Ca^{+2}$  iyonu katalitik aminoasitlerle etkileşim içindedir ve reaksiyon sırasında katalitik bölgenin yapısının kararlı olmasını sağlar (Taniguchi ve Honnda, 2009).

Siklodekstrin ve pullulan parçalayan enzimlerin hidroliz ve transglikozilasyon mekanizması,  $\alpha$ -amilaz, CGTaz ve dallanmayı parçalayan enzim reaksiyon mekanizmasıyla benzer olduğu ve çift yer değiştirme reaksiyonunu takip ettiği düşünülmektedir (Tao vd., 1989; Kim vd., 1999; Uitdehaag vd., 1999). Üç karboksilli asit biriminin kataliz mekanizmasındaki rolü daha önceden bilinmektedir (McCarter ve Withers, 1996; Matsuura vd., 1984). Taka-amilaz A'nın (TAA) benzerliği kullanılarak, TAA'nın Asp-328'nin, Glu-230'nun ve Asp-297'sinin *B. stearothermophilus* neopullulanazında Asp-206'ya, Glu-357'ye ve Asp-424 karşılık geldiği ve katalitik birimler olduğu ifade edilmiştir (Kuriki vd, 1991). Bu sebeple, Asp-328 (Asp-206, TAA) nükleofilik kataliz ve Glu-357'nin (Glu-230, TAA) ise asit/baz katalizi fonksiyonunu yerine getirmektedir. Asp-424'ün (Asp-297 TAA) asit/baz katalizi için uygun protonlayıcı olabileceği ve glukoz halkasının bükülmesine sebep olabileceği veya sudan faydalanarak C-1 karbonuna nükleofilik saldırıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (Şekil 7). Yakın zamanlarda bu teori, parçalanmamış substrat veya ara reaksiyonlardaki kovalent bağlanmış türevleri içeren CGTaz komplekslerinin X-ray yapıları incelenerek güçlü bir şekilde desteklenmiştir (Uitdehaag vd., 1999). *Bacillus licheniformis* suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilazın aktif bölgesinin alt kısmında yani alt birimin N-terminal bölgesiyle sınırlı ve diğer alt birimin ( $\beta/\alpha$ )8-katlanmasının olduğu bölgede ekstra bir boşluk olduğu gözlenmiştir (Kim vd., 1999). Bu boşluk (ekstra şeker-bağlanma bölgesi olarak tanımlanır), mono- veya disakkaritlerin yerleşmesi için uygun bir bölgedir ve alıcı birim olarak suyla yarışarak substrata saldırır.



Şekil 6. *Aspergillus oryzae* suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilazın reaksiyon mekanizması (Park vd., 2000). R1: substrat molekülündeki donör kısım; R2: şekerden ayrılan kısım; R3: alıcı moleküldeki (akseptör) şeker kısmı veya -H; ESBS: ekstra şeker bağlanma boşluğu

Şekil 6' daki reaksiyonda da görüldüğü gibi birinci basamakta nükleofil substratın anomerik karbonuna saldırıyor ve nükleofil oksijeni ile anomerik karbon kovalent bağlanıyor ve  $\beta$  konfigürasyonda geçiş ürünü oluşuyor. Protonunu kaybeden proton donör ikinci basamakta su molekülünün protonuna saldırırken, aktifleşen su molekülü anomerik karbona saldırmakta ve  $\alpha$ -glukoz monosakkariti oluşmaktadır.

Amilaz enzimlerinin reaksiyonları sulu ortamda gerçekleştiği için dönüşümsüz olduğu düşünülmektedir. Retaining reaksiyon mekanizmasını katalizleyen enzimler transglükolizasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler. Şekil 6'daki reaksiyonda su molekülü yerine şekerlerin ve alkollerin hidroksil grupları yer alabilir ve böylece transglükolizasyon reaksiyonu gerçekleşir (Taniguchi ve Honnda, 2009).

$\beta$ -Amilaz ve Glukoamilaz ise  $\alpha$  (1-4) glikozidik bağı hidrolyz reaksiyonunu kataliz ederken reaksiyonda aktifleşen su molekülü substrata kovalent bağlandığı için bu enzimler transglükolizasyon reaksiyonu katalizleyemezler (Taniguchi ve Honnda, 2009) .

#### 1.4. $\alpha$ -Amilaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen, ham nişastayı direk hidrolizedebilen  $\alpha$ -amilazların pH, sıcaklık, molekül ağırlığı, termostabilitesi ve diğer fizikokimyasal parametreleri farklılık ve benzerlik göstermektedir. Bazı mikroorganizmalardan saflaştırılan hücre içi veya hücre dışı  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

*B.licheniformis* (Meer, 1972) ve *B.stearahermophilus* tarafından üretilen termostabil enzimler yüksek sıcaklığa dayanıklıdır. Nişastayı işlemede kullanılan jeletinizasyon ve sıvılaştırma basamakları olmaksızın ham nişastayı hidroliz eden  $\alpha$ -amilazlar farklı fungal (Michelena ve Castillo, 1984; Okolo vd., 2000), ve bakteriyal (Lin vd., 1998; Demirkan vd., 2005) türlerden elde edilmiştir.

*Bacillus licheniformis* CUMC305 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı 212 kat ve % 42 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim 90 °C' de ve pH 9 da en yüksek aktivitesini göstermiştir. Ayrıca enzim aktivitesini 100 °C' de 1 gün sonunda %91 oranında korumuştur. Enzimin aktivasyon enerjisi  $5,1 \cdot 10^{x5}$  J/mol olarak hesaplanmış ve molekül ağırlığı 28 kDa olarak bulunmuştur.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , ve  $\text{Mg}^+$  iyonlarının enzim aktivitesini arttırdığı,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  iyonları inhibitör etkisi göstermiştir. Sistein, indirgenmiş glutatyon, tiyöüre,  $\beta$ -merkaptotanolamin ve sodyum

gliserol fosfat ilavesinde enzim aynı aktiviteyi korurken, p-kloromerkuribenzoik asit ve sodyum iyodo asetat enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. Amilaz 30 °C’ de EDTA ile muamele edildiğinde oldukça aktivitesini koruduğu fakat 90 °C’ de EDTA ile ısıtıldığı vakit enzim bütün aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Saf enzimin çözünür nişasta, amiloz, amilopektin ve glikojen substratlarını bağıl hidroliz oranları sırasıyla 1,27, 1,8, 1,94 ve 2,28 mg/mL olarak bulunmuştur. Bu substratların hidrolizinin  $V_{max}$  değerleri ise 0,738, 1,08, 0,8 ve 0,5 mg maltoz/dak olarak hesaplanmıştır (Krishnan ve Chandra., 1983, Tablo 2).

*Lactobacillus plantarum* A6 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı, % (50-70) amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından dietil amino etil iyon değişim kolonu kullanılarak 35,6 verimle 19,5 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 50 kDa, optimum pH’ sı 5,5 ve optimum sıcaklığı 55 °C bulunmuştur (Giraud, vd., 1993, Tablo 2).

*Streptococcus bovis* JB1 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı, % 70 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılarak % 50 verimle 6,9 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 77 kDa optimum pH’ sı 6,0, optimum sıcaklığı 50 °C, izoelektrik pH’ sı 4,5 ve  $K_m$  değeri 0,88 mg/mL olarak bulunmuştur (Freer, S.N., 1993, Tablo 2)

*Thermococcus profundus* DT5432 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı % 80  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesinin ardından, DEAE-Toyopearl 650 ve Superdex 200 HR yöntemleri kullanılarak %26 verimle 816 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 42 kDa optimum pH’ sı 5,5, optimum sıcaklığı 90 °C ve  $K_m$  değeri 2,3 mg/mL olarak bulunmuştur (Chung vd., 1995, Tablo 2).

*Bacillus mojavensis* A21 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografik yöntemleri kullanılarak %11 verimle 15,3 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 58 kDa optimum pH’ sı 6,5 ve optimum sıcaklığı 80 °C olarak bulunmuştur (Hmidet, vd., 2010, Tablo 2).

*Bacillus subtilis* KIBGE HAS ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon kromatografik yöntemi kullanılarak %96,3 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 56 kDa, optimum pH’ sı 7,5 ve optimum sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur.  $K_m$  değeri 2,68 mg/mL  $V_{max}$  değeri ise 1773 U/mL olarak bulunmuştur (Bano, vd., 2011, Tablo 2).

Tablo 2. Bazı mikroorganizmalardan  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzimin biyokimyasal özellikleri

Mikroorganizma	Saflaştırma Yöntemi	Saflaştırma Katsayısı/ Verim	Mr (kDa)	Optimum pH/sıcaklık (°C)	Km (mg/mL)/ Vmax	Inhibitör	pI	Referans
<i>Bacillus subtilis</i> AX20	% 70 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Sefadex G-50, Nişasta Afinite Kromotografisi, Sephacryl S-400	37,5 /24,2	149/ 79	6 / 60	3,3 /-	Hg, Ag,Cu	-	Najafi vd., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	% (20-80) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Nişasta Afinite Kromotografisi	230 /51	58	6,8 / 60	-	-	-	Rao vd., 2005
* <i>B. licheniformis</i> CUMC 305	% 65 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CM-Selüloz (pH 6,4)	212 /42	28	7-9/90	1,274/0,738 mgglukoz/m ldk	Hg <sup>2+</sup> ,Cu <sup>2+</sup> ,EDT A, NaIAc,Co+2, Al <sup>3+</sup>	-	Krishnan ve Chandra., 1983
<i>B. licheniformis</i> NH 1	% (40-60) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Sephadex G-100 Jel Filt., Sepharose mono Q Anyon değişim	3,08 /15,09	58	5-10 /90	-	B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup> , EDTA, PMSF	-	Hmidet vd., 2008
<i>Bacillus sp. ferdowsicus</i>	%(20-80) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , iyon değişim kromotografisi	23/15,3	53	4,5 /70	-	Hg <sup>2+</sup> ,Zn <sup>2+</sup> ,EDT A,	-	Asoodeh vd., 2010
<i>Bacillus sp. KR-8104</i>	Yon değişim ve hidrofobik etkileşim kromotografisi	34 /12,8	59	3,5 /75	-	-	-	Sajedi vd., 2005
* <i>Lactobacillus plantarum</i> A6	% (50-70) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , DEAE kolon kromotografisi	19,5 /35,6	50	5,5/65	2,38 /-	iyot, asetik asit	-	Giraud vd., 1993
<i>Bacillus flavothermus</i>	% 80 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Q Sefaroz iyon değişim kromotografisi	2,22/15,4	-	5,5 /60	2,2 /	-	-	Bolton vd., 1997
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	% 80 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Q Sepharose fast flow( iyon değişim)	3,87/ 16,7	52	6 /55	- /351 U/mg	-	-	Demirkan vd.,2005
<i>Bacillus sp. A3-15</i>	Etanolla çöktürme, Nişasta afinite kolonu	-	80/60,5	11 /70	-	EDTA, PMSF, Zn <sup>2+</sup> ,SDS	-	Arikan, B., 2008
<i>Bacillus sp. I-3</i>	Kısmi saflaştırma	-	-	7/70	-/642 U/mL	EDTA	-	Goyal vd., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	% (20-80) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Nişasta afinite kolonu	230/-	58					Rao, vd., 2005
<i>Bacillus sp. IMD435</i>	$\alpha$ -siklodekstrin sefaroz 6-B	744/65	63.0	6/60	-	-	5.6	Hamilton vd., 1999
<i>Bacillus sp. IMD434</i>	Asetonla çöktürme, fenil-sefaroz CL-4B	266/-	69.2	6/65		N-bromosüksinimid,	5.9	Hamilton vd., 1999

Tablo 2'nin devamı

<i>Bacillus</i> sp. HUTBS62	% 60 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , jel fitrasyon sefadeks G-100, DEAE iyon değişim	22.7/ 11.6	54.2	4,4/90	-	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>		Al-Quadran vd., 2012
<i>Bacillus</i> sp. WN 11	% 60 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , DEAE Sefaroz,Sefadeks G-75	AmyI 65/13 AmyII 40,7/9,5		5,5/80		Fe <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>		Mamo vd., 2001
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	DEAE selüloz DE52	33/66	62-65	7-10/70				Morgan vd.,1981
<i>B. subtilis</i>	% 60 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Sefaril-S200 HR (pH 8.0),	9/17	48.0	7/50	3.845/585.1	Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Al <sup>3+</sup>		Marco vd.,1996
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , içerisinde çözünür nişasta adsorbsiyonu, DEAE selüloz, ultrafiltrasyon	-	59	6/80	14/-	Cd <sup>2+</sup> ,Cu <sup>2+</sup> Hg <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ,6 M üre, Na <sup>2+</sup> , B.S.A.	8,8	Vihinen vd.,1990
<i>B. subtilis</i> 65	Sefaril S-300, CM Sefadeks C-50	30.85/24.8	-	6-9/60	-	Cu <sup>2+</sup> ,Fe <sup>3+</sup> ,Mn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> ,Zn <sup>2+</sup> ,Pb <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Ag <sup>2+</sup> , EDTA		Hayashida vd.,1988
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Liyofilizatörle konsantre, % 25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , % 70acetone	1.036/_/	12,5	8/47	-	-	-	Robty vd., 1971
* <i>Streptococcus bovis</i> JB1	% 70 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Sefadeks G-25 (pH 7.5), Mono Q iyon değişim kromotografisi	6.9/50	77	6/50	0,88/-	Hg <sup>2+</sup> , p- kloromerküribenz oik asit	4,5	Freer, S. N., 1993.
<i>Thermomonospora curvata</i> NCIMB 10081	% 85 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , jel fitrasyon (pH 6.0), DEAE-Sephacel (pH 8.0)	300/_/	69	6/65	-	-	6,2	Collins vd., 1993
<i>Streptomyces</i> sp. IMD 2679	-	-	47,8	5,5/65	8,2mM/-	-	8,7	Mcmahon vd., 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> and IECC on DEAE-selüloz kolon	432/32	64	7/50		Divalent metal iyonları		Chakraborty vd., 2000
* <i>T. profundus</i> DT5432	%80 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , DEAE-Toyoparl 650 M (pH 7.5), Superdeks 200 HR (pH 7.5)	816/26	42.0	5,5/90	2,3/-	İyodoasetik asit, N-bromosüksinik asit, SDS	-	Chung vd., 1995
<i>Bacillus thermooleovorans</i> NP54	%80 asetonla çöktürme	6.2/ 43.7		8/100	0.83/250 µmol/ mg protein min	-	-	Malhotra vd.,2000



Tablo 2'nin devamı

<i>Bacillus circulans</i> GRS 313	-	-	-	4,9/48	11,66/-	-	-	Dey vd., 2002
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	58	6-6,5/90	-	-	-	Ivanova vd., 1993
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	57,70	6,5/50	3,85/-	-	-	Marco vd., 1996
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	42	9/70		2,7/-	-	Lin vd., 1998
<i>Thermococcus profundus</i>	-	-	43	5,5/80	-	N-bromosüksinimid		Kwak vd.,1998
<i>Geobacillus</i> sp. IIPTN (MTCC 5319)	İyon değişim kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi	82/31	97	60°C and 6.5	36 / 222 µmol mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup>	Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , ve EDTA	-	Dhearan vd., 2010
<i>Geobacillus</i> sp. LH8	İyon değişim komotografisi	13,6/10	52	5,0-7,0/80	3/ 6.5 µmol/ min	Mg <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , EDTA	-	Mollania vd., 2010
<i>Bacillus</i> sp. GRE1	Jel filtrasyon kromatografisi	33.6/ 46.5%	55	6/ 70	4.98 mg ml <sup>-1</sup> /42 mgmin <sup>-1</sup>	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> .	-	Haki vd., 2008
<i>Bacillus</i> Strain HUTBS71	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi	24/12.5	58.8	5.2-10.0/ 100	-	Cu <sup>2+</sup>	-	Al-Quadran vd., 2009
* <i>Thermus filiformis</i> Ork A2	iyon değişim kromatografisi	-	60	6/95	5.0/-	EDTA	-	Egas, vd., 1998
* <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	iyon değişim kromatografisi (mono Q) ve jel filtrasyon kromatografisi	-	84	5.6/45	3.6 /-	EDTA	4,7	Paguet vd., 1991
<i>Bacillus mojavensis</i> A21	Sephadex G-75 jel filtrasyon ve sefaroz iyon değişim kromatografisi	15,3/11	58	6,5/80	-	-	-	Hmidet, vd., 2010
* <i>Aspergillus fumigatus</i>	İyon değişim (DEAE-cellulose) ve α-siklodekstrin sefaroz affinite kromatografisi		65	5,5/40	3,4/-	-	3,7	Planchot, ve colonna,1995
* <i>Lactobacillus manihotivorans</i>	-	-	135	5,5/55	3,4/-	Al <sup>3+</sup> Fe <sup>3+</sup> , ve Hg <sup>2+</sup>	3,8	Aguilar, vd., 2000
* <i>Aspergillus flavus</i> F2Mbb	% 60 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> and Sephadex G-200 jel filtrasyon		56	6,4/30	-	-	-	Sidkey vd.,2011

Tablo 2'nin devamı

* <i>Bacillus cereus</i> Ms6	DEAE-selüloz anyon değişim ve sefaroz jel filtrasyon kromatografisi	-	27	7/45	-	-	-	AbduAlZaZae, vd.,2011
* <i>Bacillus subtilis</i> KIBGE HAS	Amonyum sülfatla çöktürme ve jel filtrasyon kromatografisi	96.3/-	56	7,5/50	2.68/1773 U/ml	-	-	Bano, vd., 2011
* <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	Amonyum sülfatla çöktürme, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi	148/-	67		2,5/192,3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ dak.-1	-	-	Yandri, vd., 2010
* <i>Saccharopolyspora</i> sp. A9	Jel filtrasyon, sefaril S-100	39,01/25,27	66	11/55	-	-	-	Chakraborty vd., 2011
* <i>Vibrio</i> sp.	Niştasta affinite kromatografisi	163,5/ 78	58,48	6,5 /60	-	-	-	Najafi vd., 2005
<i>Paecilomyces variotii</i>	DEAE-Selüloz, Sefadex G-100 Jel filtrasyon	8,9 /63,1	75	-	6,2 /-	-	-	Michelin vd., 2010

\* Ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz çalışılan mikroorganizmalar

Termofilik *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amilazı, %20-80 amonyum sülfatla çöktürme yaptıktan sonra nişasta affinite kolonu ile 230 kat saflaştırılmıştır. Kolona tutunan enzimi maltoz, çözünür nişasta ve tuz çözeltisiyle elüe edilememiş fakat %2'lik dextrin çözeltisi ile elüe edilmiştir. SDS-PAGE yapılarak saf enzimin molekül ağırlığı 58 kDa olarak belirlenmiştir (Rao vd., 2005, Tablo 2)

*Bacillus subtilis* AX20 suşunun modifiye edilmiş besiyerinde ekstraselüler amilaz üretimi sağlandıktan sonra, %70' lik amonyum sülfatla çöktürme yapılmış ve arkasından sephadex G-50 kolon kromatografisi, DEAE-Selüloz iyon değişim kolonu yapılmıştır. Amilaz aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar çözünmeyen mısır nişasta kolonuna yüklenmiştir. Saflaştırılan enzimin 78 kDa'luk iki alt birimden oluştuğu ve molekül ağırlığının 149 kDa olduğu bulunmuştur. Optimum çalışma pH'sı 6 ve optimum sıcaklık 55 °C olarak bulunmuştur. Hg<sup>+2</sup>, Ag<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> iyonları enzimi inhibe ederken EDTA ve EGTA'nın inhibe etmediği gözlenmiştir (Najafi vd., 2005, Tablo 2).

*Bacillus Flavothermus*  $\alpha$ -amilazını saflaştırırken amonyum sülfatla çöktürme yapıldıktan sonra iyon değişim kolonu ve peşinden jel filtrasyon uygulanmıştır. Saflaştırılan enzimin izoelektrik pI'sı 8,4, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 °C, optimum pH değeri 5,5-6,0 ve Km değeri 2,2 mg glukoz/mL bulunmuştur (Bolton vd., 1997, Tablo 2)

*Bacillus licheniformis* suşunda  $\alpha$ -amilaz proteinini eksprese eden amyN geni *Escherichia coli* bakterisine klonlanmıştır. Klonlanan enzim jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografik yöntemiyle saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 58 kDa olarak bulunmuştur (Hmidet vd., 2008, Tablo 2).

*Bacillus* sp. KR-8104 suşundan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 59 kDa bulunmuştur. Ortamda Ca<sup>+2</sup> iyonu ve EDTA'nın varlığında ve yokluğunda enzimin aktivitesi ve ısıl karalılığı değişmemiştir. Enzim Ca<sup>+2</sup> iyonuna bağımlı olmayan yeni bir amilaz enzimi olduğu belirtilmiştir (Sajedi vd., 2004, Tablo 2).

Termofilik *Bacillus* sp. *Ferdowsicous* suşundan asidofilik  $\alpha$ -amilaz enzimi iyon değişim kromatografisi (Q-sepharose fast flow) yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin aktivite gösterdiği optimum pH 4,5, optimum sıcaklık 70 °C ve molekül ağırlığı ise 53 kDa olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi Zn<sup>+2</sup> ve EDTA ilavesiyle azalırken, Hg<sup>+2</sup> iyonu inhibe etmektedir.

Bunun yanında  $Ba^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ , Triton X-100 ve  $\beta$ -merkaptotanolamin enzim aktivitesini %15 arttırdığı bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin N-terminal dizi analizi yapıldığında diğer  $\alpha$ -amilaz enzimlerine benzemediği ve yeni bir amilaz enzimi olduğu söylenmiştir. Amiloz substrat olarak kullanıldığında enzim aktivitesi amilopektin substratına göre 1.80 kat daha fazla bulunmuştur (Asoodeh vd., 2010).

*Paecilomyces variotii* mantar  $\alpha$ -amilaz enzimi DEAE kolon kromatografi ve jel filtrasyon kromatografi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 75 kDa ve izoelektrik pH'sı 4,5 olarak bulunmuştur. Enzimin çalıştığı optimum sıcaklık 60 °C ve optimum pH değeri ise 4,0 olarak bulunmuştur. Enzimin hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi ile analiz edildiğinde maltoz ve maltotrioz olduğu görülmüştür. Saflaştırılan enzimin amino asit dizisi kısmen *Bacillus* sp. amilazı ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca  $Co^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir (Michelin vd., 2010, Tablo 2).

Yalancı safran (*Carthamus tinctorius L.*) 'ın çimlenmekte olan çekirdeklerinden  $\alpha$ -amilaz enzimi affinite kromatografi ( $\beta$ -siklodekstrin sepharoz 6B) yöntemiyle saflaştırılmıştır. 131 kat saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 35 kDa, optimum aktivite sıcaklığı 55 °C ve optimum pH değeri ise 6,0 olarak bulunmuştur. Enzimi  $Ca^{+2}$  iyonları aktive ederken,  $Fe^{+2}$  iyonları inhibe etmektedir (Elarbi vd., 2009)

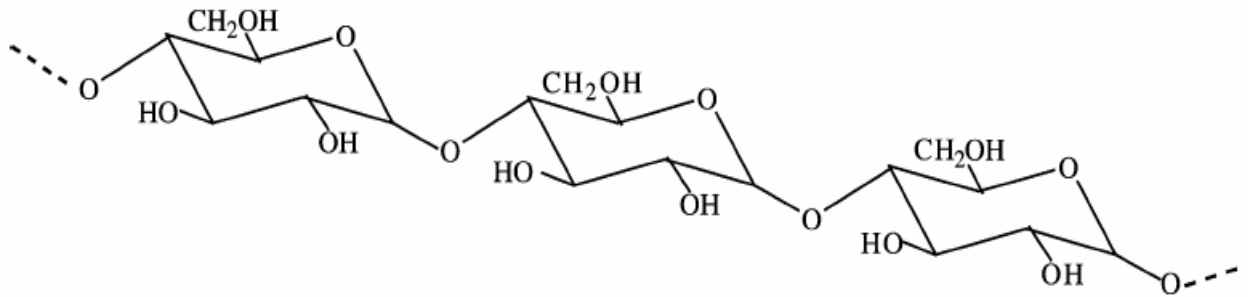
Kozalak çekirdeklerinden  $\alpha$ -amilaz enzimi; amonyum sülfatla çöktürme, DEAE anyon değişim kromatografisi ve nişasta affinite kromatografi yöntemleri kullanılarak 1286,1 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 46,7 kDa, aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 65 °C ve optimum pH ise 4.5 bulunmuştur. Saflaştırılan enzim 50 °C'de 48 saat inkübe edildiğinde aktivitesini tamamen korumakta, 96 saat inkübe edildiğinde ise aktivitesini % 80 korumaktadır. Enzimin  $K_m$  değeri 0.84 mg/mL ve  $V_{max}$  değeri ise 3.71  $\mu$ mol glukoz/dak olarak bulunmuştur (Azad vd., 2009).

## 1.5. Nişasta

Nişasta bitkiler tarafından fotosentez yoluyla elde edilen temel karbohidrattır. Soğuk suda çözünmeyen nişasta granülleri bütün tahıl tanelerinin başlıca ögesidir. Yüksek bitkilerde tümüyle  $\alpha$ -D-glukozdan oluşan depo maddesidir ve pek çok organizma için özellikle de insanlar için zorunlu enerji kaynağını oluşturur. Besinsel olarak nişasta bütün insan popülasyonlarında beslenmenin başlıca ögesidir (Maldonado ve Lopez, 1995).

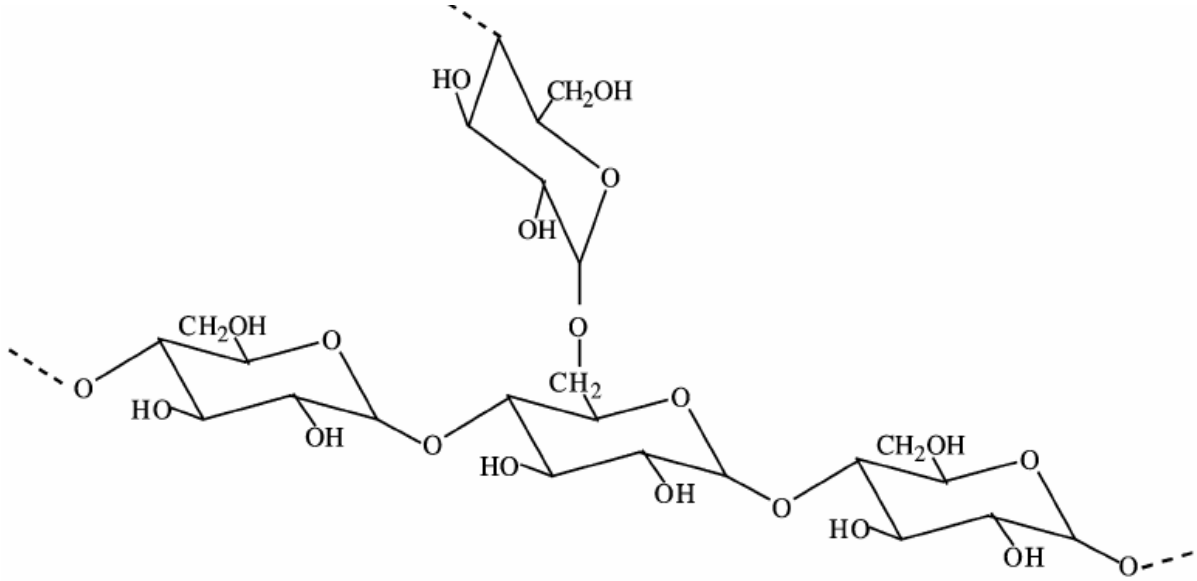
Nişasta  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağları ile birleşen  $\alpha$ -glukoz birimlerinden oluşmuştur. İki yüksek molekül ağırlıklı bileşik içerir; amiloz (%15-25) ve amilopektin (% 75-85). Amiloz glukopiranoz birimlerinin  $\alpha$ -1,4 bağlanması ile oluşan doğrusal polimer (Şekil 7), amilopektin ise dallanma noktasında  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını içeren dallanmış polimerdir (Antranikian, 1992; Rüdiger vd., 1994, Şekil 8).

Amiloz sıcak suda çözünür ve iyod ile mavi bir renk verir. İndirgen olmayan bir karbohidrattır (Menevşe ve Menevşe, 1982), 100-700 glukoz birimi içerir. Glukoz birimlerinin oluşturduğu zincir helezon şeklinde kıvrılmış olup her kıvrım 4-6 glukoz birimi içerir (Bailey ve Ollis, 1977).



Şekil 7. Amilozun yapısı (Muralikrishna ve Nirmala, 2005)

Amilopektin, her 24 ya da 30 glukoz ünitesinde bir dallanma gösterir (Lehninger, 1982). Zincir ve bundan çıkan yan zincirleri de amilozdaki gibi helezonlaşmıştır (Yenson, 1981). Amilopektin 500-2000 ya da daha fazla glukoz üniteleri içerir. Dallı yapılar 15 glukoz ünitesinden yapılmıştır. Bu molekül suda basınç altında ısıtıldığı zaman çözünür. Amilopektin oda sıcaklığında bırakıldığında kararlı bir eriyik meydana getirir (Çağatay, 1976). Amilopektin sıcak suda çözünmez ve iyod ile kırmızı renk verir.



Şekil 8. Amilopektinin yapısı (Muralikrishna ve Nirmala, 2005)

Amilozdaki mavi renk, glukoz birimlerinden oluşan helezon kıvrımları boşluklarına iyotun yerleşmesi ile meydana gelir ve spektrofotometrede şiddetli ışık absorpsiyonuna neden olur (Yenson, 1981). Amiloz nişasta tanesinin iç kısmında bulunur ve nişasta türünün % 15-20' sini, amilopektin ise nişasta tanesinin dış kısmında bulunur ve nişasta türünün % 75-80' ini oluşturur (Swinkels, 1985).

Bütün nişasta ürünlerinin yarısından daha fazlası ya prejelatinize veya kimyasal modifiye form şeklinde yiyecek üretimi ve besin ürünlerinde yer alır. Bununla birlikte modifiye nişastalar; kağıt, tekstil, sabun, çamaşır, kozmetik ve farmakoloji endüstrisinde ateşten etkilenmeyen malzeme yapımında, patlayıcı ve yakıt bağlayıcı ajan olarak ve inşaat endüstrisinde kullanılır. Bu endüstriler özellikle kağıt ve tahta endüstrisi modifiye nişasta gibi işlenmemiş nişastanın çok yüksek miktarını tüketir (Maldonado ve Lopez, 1995).

Mısır, patates, buğday ve pirinç nişastanın elde edildiği genel kaynaklardır. Mısır nişastası granülleri orta büyüklüktedir, yuvarlak veya poligonal şekillidir. Yıllık dünya mısırının sadece %5' i mısır nişastası üretimi için kullanılmaktadır. Üretilen mısır nişastasının %70' i mısır şurubu, yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu ve dekstroz haline dönüştürülür. Patates nişastası granülleri hilumda asentrik olarak yer alan istiridye kabuğu çizgilerine benzer olarak oval şekillidir. Patates nişastası, herhangi bir ticari nişasta granülünden daha büyük granüle sahiptir ve bu patates nişastasının ürünleri yiyecek, kağıt, tekstil ve yapıştırıcı endüstrisinde kullanılır.

Pirinç nişastası bütün ticari nişastaların en küçük granüllerine sahip olan çeşididir. Granüller küresel kümeler şeklinde amiloplast içinde agregat yaparlar ve her bir amiloplast 20 ila 60 küçük polihedral granül içerir. Pirinç nişastası kozmetik pudra tozu, puding ve dondurma yoğunlaştırıcısı olarak kullanılır (Maldonado ve Lopez, 1995).

### 1.6. Termofilik Mikroorganizmalar

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğerlerinin büyüemediği veya çok az büyüme gösterdikleri şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduklarından, çevre etkenleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyel oluştururlar.

Dünya nüfus artışına, sanayi ve endüstri gelişimine bağlı olarak, çevre giderek kirlenmekte ve dünyadaki doğal şartlar ekstrem şartlara doğru kaymaktadır. Dolayısıyla insanlık, son yıllarda ekstrem durumlardaki hayat şartlarının araştırılması yolunda yoğun çalışmalara girmektedir (Goyal vd., 2005).

Termofilik bakterilerin ilk izole edilmesinden bu yana yaklaşık olarak 100 seneden fazla bir zaman geçmiştir (Miquel, 1888). O yıllardan beri çok sayıda spor oluşturabilen *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait termofilik bakteri türleri ortaya çıkarılmış ve özellikleri belirlenmiştir. Üzerinde en çok çalışma yapılan termofilik bakteri türü *Bacillus steorothermophilus* olup, bu türün çok sayıda farklı suşu izole edilmiş ve bu suşların birçok özelliği belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu bakterilerin hepsinin genellikle optimum olarak yaşayabildikleri sıcaklık 60 °C'dir. Bununla birlikte çalışılan çok az sayıda termofilik bakteri türünün 75 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinmektedir (Guagliardi vd., 1996).

Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonlu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamışlardır. Bu organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerde etkin olarak kullanılan aşırı şartlarda bile görev yapabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir (Guagliardi vd., 1996).

Bu enzimler son zamanlarda endüstride kullanılan ve kirlenmeye neden olan bazı kimyasalların yerine kullanılabilirler. Bu endüstrilerin en göze çarpanları kağıt ve kağıt hamuru endüstrileridir. Ayrıca termofilik enzimlerin yoğun bir şekilde kullanılmaya başlandığı diğer bir alan ise besin endüstrisidir (Aguilar, 1996).

Endüstride çoğu enzimatik ve mikrobiyolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda yapılması önemli faydalar sağlamaktadır. Böylece yüksek sıcaklıkta işlemin kararlı olmayan bileşikler tarafından engellenmesi önlenmiş olur. Yüksek sıcaklığın başlıca avantajları, daha yüksek reaksiyon hızı, çoğu kimyasalın daha yüksek oranda çözünbilmesi, akıcılığın ve difüzyon hızlarının yüksek olmasıdır (Kristjansson, 1989).

Bakteriler yaşayabildikleri sıcaklık aralığına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller -10 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak bunların optimum olarak büyüyebildikleri sıcaklıklar 15 °C civarındadır. Mezofiller normal ortam sıcaklığında (20-45 °C) büyüyebilirler ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu gruba girerler. Termofiller ise 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilirler (Brock, 1985).

Dünya üzerinde yaşayan bütün bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmektedir (Madigan vd., 2000). Bu görüşün dayandığı nokta şu anda dünya üzerinde yaşayan termofilik bakterilerin mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmesidir. Bu görüşlerde göz önüne alınarak termofiller temelde ikiye ayrılırlar. Atasal termofiller (örneğin, *Thermotoga*, *Aquifex*), var oldukları günden bugüne kadar devamlı olarak termofilik olarak yaşamaktadırlar ve hiçbir şekilde mezofilik ortamlara adapte olamazlar. Sonradan termofilik olanlar (örneğin, *Bacillus* ve *Clostridium*), mezofiller ile devamlı ilişki halindedir ve bu grupta bulunan mezofilik türler değişerek tekrar termofilik özellik kazanabilirler. Bu türlerde termofilik ortamlara tekrar adaptasyon söz konusu olduğundan bunlar üzerinde, termofilliğin moleküler temelleri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Termofilik bakteri suşlarının optimum büyüyebilme sıcaklıklarının 55 °C'den 105 °C'nin üstüne kadar olan sıcaklıklara kadar değiştiği bilinmektedir. Bu şekilde çok yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik mikroorganizmalar aşırı termofiller veya çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadır ve bu organizmaların optimum büyüme sıcaklıkları 80 °C'nin üzerinde olduğu bilinmektedir. Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde vb. yerlerde bulunurlar (Kristjansson ve Stetter, 1992).

45 °C'nin üstüne çıkıldığında mikrobiyal türlerin sayısı önemli bir şekilde düşüş gösterir, fakat bütün organizmaların yaşayabildikleri üst sıcaklık limitleri halen tam anlamıyla bilinmemektedir. Son zamanlarda birkaç tane mikroorganizmanın, sıcaklığı çok



yüksek olan kaplıca sularında ve deniz diplerindeki sıcaklığı 100 °C'nin üzerinde olan alanlarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson ve Stetter, 1992).

Denizlerin alt kısımlarında sıcak su alanlarının olduğu fakat bu alanların mikrobiyolojisi hakkında fazla bilginin olmadığı bilinmektedir. 115 °C'ye kadar yaşayabilen kültüre alınmış bakteriler bulunmaktadır. Ancak hidrotermal çevrelerde 135°C'ye kadar yaşayabilen organizmaların olduğunu gösteren deliller bulunmaktadır. Bu sıcaklık sınırı hayatın olabileceği üst sıcaklık limitini göstermektedir. Çünkü bu sıcaklıkta amino asitler büyük oranda *L* formundan *D* formuna dönerler. 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan tür sayısı az olmasına rağmen, filogenetik olarak farklı çok sayıda kategorideki prokaryotların bu sıcaklıklarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson ve Stetter, 1992).

### **1.6.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklıklara ve Denaturasyona Karşı Dayanıklılıkları**

Mikroorganizmalar, yaşayan tüm canlılar gibi canlılıklarını sürdürebilmek için yaşadıkları ortama adapte olmak zorundadırlar. Termofillerin içerdikleri proteinlerin yüksek sıcaklığa, denaturasyona ve proteolize karşı dayanıklı oldukları bilinmektedir (Kumar ve Nussinov, 2001). Şaperonlar olarak bilinen özelleşmiş proteinler, bu organizmalar tarafından bolca üretilir ve bunlar denaturasyondan sonra proteinlerin tekrar doğal formlarında katlanmasına ve fonksiyonlarını tekrar kazanmalarına yardımcı olurlar (Everly ve Alberto, 2000). Termofillerin hücre membranları doymuş yağ asitlerinden oluşmuştur. Doymuş yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve bu durum yüksek sıcaklıklarda hücrenin yaşama şansını artırır (Herbert ve Sharp, 1992). Termofiller derevers DNA giraz yardımıyla oluşturulan süper sarmal DNA yapısı mevcuttur (Lopez,1999). Bu, DNA'nın çift sarmal yapısının bozulma noktasını en azından organizmanın çoğalma sıcaklığına kadar yükseltir. Ayrıca termofiller, ısı dayanıklılığı olmayan organizmalarla elektrostatik, disülfür köprüleri ve hidrofobik etkileşimlerini arttırarak yüksek sıcaklığa dayanıklı hale gelebilirler (Kumar ve Nussinov, 2001).

### **1.6.2. Termofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı**

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından büyük faydalar sağlamaktadır (Brock,1986). Termofillerin biyoteknolojide kullanıldığı bazı alanlar Tablo 3'te verilmektedir. Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin

mümkün olması, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi ve termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmasıdır. Biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardakinden çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdır ve bu yüzden bunlardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlüdürler (Brock, 1986).

Termofilik organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olarak kullanılan ekstrem şartlarda fonksiyonel olabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, ekstrasellüler-polimer-parçalayan enzimler (amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikozil transferazlar, selülozlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar), gıda, kimya, farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler aynı zamanda çok sayıdaki farklı deterjan ve çözücülere karşı da dirençlidir (Aguilar, 1996).

Termofilik enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan birisi de karbohidratların türevlendirilmesidir. Bununla birlikte halen bu modifikasyon işlemini daha spesifik ve daha etkili bir şekilde katalizleyebilecek enzimler üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Son zamanlarda, karbohidratlara bağımlı olan endüstri kollarında ilave özelliklere sahip olan enzimlere, özellikle de termofilik enzimlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Karbohidratları modifiye edebilen enzimler, kâğıt endüstrisinde olduğu kadar besin endüstrisinde de hidroliz olaylarının meydana getirilmesinde kullanılmaktadır (Priest, 1984). Ayrıca bu enzimler karbohidratlara bağımlı olan bazı bileşiklerin türevlendirilmesinde ve sentezlerinde de aktif olarak yer almaktadır (Aguilar, 1996).

Bu enzimlere amilazlar, pullulanazlar,  $\alpha$ -glukozidazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoz izomerazlar, ksilanazlar ve lipazlar örnek olarak verilebilir (Aguilar, 1996).

Tablo 3. Termofilik organizmalarından elde edilen bazı enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar (Aguilar, 1996).

Enzimler ve biyoteknolojide kullanılan hücre içi bileşikler	Uygulamaları ve ürettikleri son ürünler
Amilazlar	Tatlandırıcılarda kullanılan glukoz, fruktoz
Ksilanazlar	Kağıt ağartılması
Proteazlar	Keratinden amino asitlerin üretimi, besin işlenmesi, fırıncılık, mayalanma ve deterjan endüstrilerinde
DNA Polimerazlar	Genetik mühendisliği
Katalaz	Deri, tekstil, kağıt, gıda, ilaç endüstrilerinde

### 1.7. Isıl Kararlı Enzimler

Termozimler olarak da adlandırılan termofilik ve hipertermofilik enzimler, ekstremofillerden elde edilen ve ekstremozimler olarak adlandırılan diğer bir enzim sınıfının üyesidirler (Vieille vd., 1996). Termozimler, mezofilik enzimlerin veya kimyasalların yerini alarak, birçok endüstriyel uygulamada kullanılabilirler. Bu durum, proseslerin optimize edilmesinde yeni avantajlar sağlamaktadır (Bruins vd., 2000). Ekstremozimler yüksek tuz içeren ortamlarda (halozimler), yüksek alkali ortamlarda (alkalozimler) ve diğer uç şartlarda (basınç ve asitlik vb.) fonksiyon gösterebilirler (Adams vd., 1995; Lowe vd., 1993). Isıl kararlı enzimler (termofilik ve hipertermofilik enzimler) zorlu endüstriyel uygulamalara en iyi uyumu sağladıklarından ve sahip oldukları özelliklerden dolayı (yüksek sıcaklıklarda kararlı ve aktif olmaları), mezofilik veya sakrofilik enzimlere oranla çok daha büyük biyoteknolojik avantajlara sahiptirler (Li vd., 2005; Leushner ve Antranikan, 1995; Fredrich ve Antrakian, 1996; Vieille ve Zeikus, 2001). Bu avantajlar şu şekilde ifade edilebilir;

-Mezofilik konakçılarda ekspres edildiklerinde ısı muamelesi ile saflaştırılmaları çok kolaydır.

- Denatüre edici kimyasallara (bir çözücü veya guanidinyum hidroklorür gibi) karşı dirençli olmaları, ısıl kararlılıkları ile ilişkilendirilir.

-Enzimatik reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ile yüksek konsantrasyonda substrat kullanımı, daha düşük viskozite, daha az mikrobiyal

kontaminasyon riski ve genellikle daha yüksek reaksiyon hızları elde edilir (Vieille ve Zeikus, 2001).

-Reaksiyonun yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesiyle viskozitenin azalması substrat difüzyonunun artmasıyla birlikte ürün oluşumu da artar. Bu gibi enzimler ayrıca protein mühendisliği için önemli olan ısıl kararlılığın ve aktivitenin anlaşılmasında model olarak kullanılabilirler (Mozahev, 1993; Krahe vd., 1996).

Biyokatalitik çevrimlerde ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan ısıl kararlı enzimlerin bazıları Tablo 4' te gösterilmiştir.

Tablo 4. Isıl kararlı enzimlerin biyoçevrim reaksiyonları ve uygulamaları

Enzim	Sıcaklık aralığı (°C)	Biyoçevrim	Uygulama
$\alpha$ -Amilaz (Bakteriyal)	90-100	Nişasta→Deksroz Şurup	Nişasta hidrolizi, fırıncılık, deterjan
$\alpha$ -Amilaz (Mantar)	50-60	Nişasta→Deksroz Şurup	Maltoz üretimi
Pullulanaz	50-60	Nişasta→Deksroz Şurup	Glukoz şurubu üretimi
Kitinaz	65-75	Kitin→Kitibioz	Gıda, kozmetik, eczacılık
Selulaz	45-55	Seluloz→Glukoz	Seluloz hidrolizi, deterjanlarda polimer parçalanması
Lipaz	30-70	Yağ uzaklaştırılması, hidrolizi, interesterifikasyon	Eczacılık, kozmetik, deri endüstrisi

Filogenetik çeşitliliklerin dışında, hipertermofilik ve mezofilik enzimleri ayıran tek şey kararlı ve aktif oldukları sıcaklık aralıklarıdır. Diğer bir deyişle, hipertermofilik ve mezofilik enzimler birbirlerine oldukça benzerlik gösterirler. Şöyle ki;

-Hipertermofilik ve mezofilik proteinlerin aminoasit sıraları tipik olarak %40-85 oranında benzerlik gösterirler.

-Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları birbiri üzerine çakışabilmektedir.

### 1.8. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları

$\alpha$ -amilazın uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glukoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermentasyonunda kullanılmaktadırlar. Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan, *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo  $\beta$ -glukanazlardır

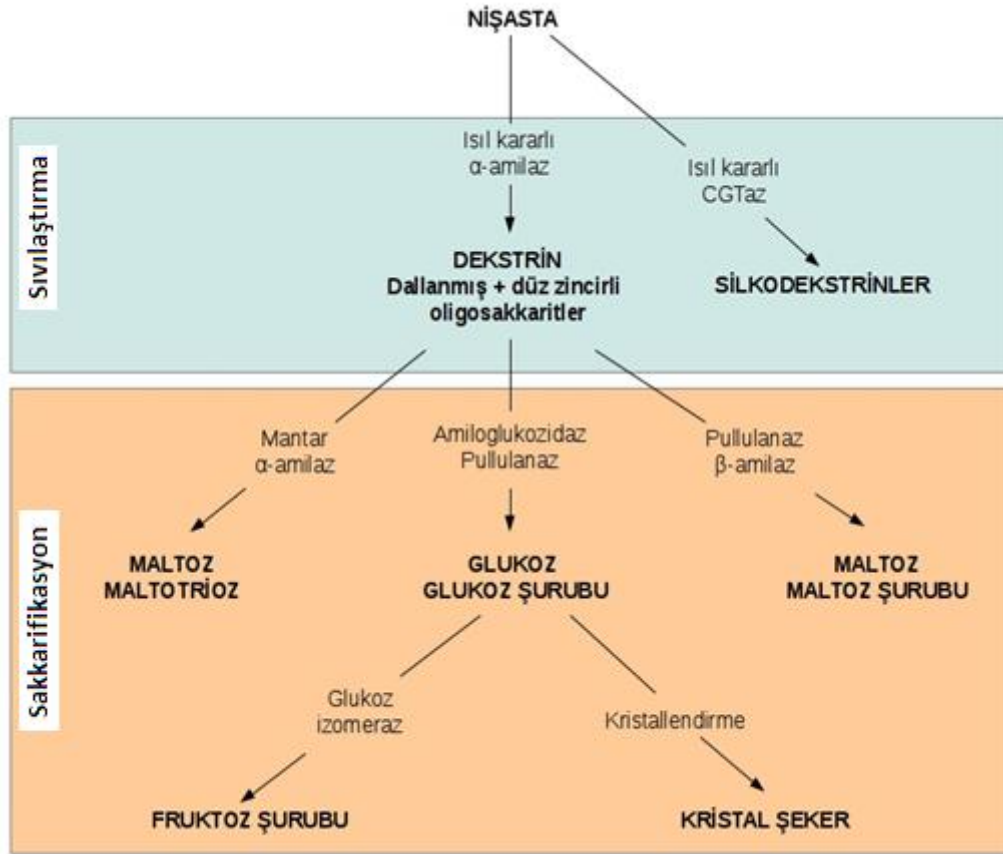
$\alpha$ -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Radley, 1976). 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde kullanılan  $\alpha$ -amilaz enzimi *Aspergillus oryzae* kültüründen üretilmiştir.  $\alpha$ -amilaz enziminin endüstriyel boyutlardaki üretimine 1939 yılında ilk kez Japonya'da başlanmış ve *Bacillus Subtilis* kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda  $\alpha$ -amilaz enzimi nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılmıştır. 1959'da  $\alpha$ -amilaz ve amiloglikozidaz enzimleri kullanılarak, nişastadan toz ve kristal dekstroz'un üretimine başlanmıştır (Anonymous, 1988).

Nişasta dekstrinlere kadar parçalandıktan sonra, glikoamilazın ortama ilavesi ile glukozu kadar ayrılmaktadır. Açığa çıkan glukoz, ya şurup halinde, ya da kristal toz şeklinde elde edilmektedir. Glukoz şurubuna glukoz izomeraz enzimi ilave edilerek fruktozlu şurup üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu ürün yüksek Gıda endüstrisinde, nişastanın  $\alpha$ -amilaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkan ürünler, yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmasından önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür.

Dekstrinler çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite artırıcı, yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Nişastadan glukoz üretiminde kullanılan asit-hidroliz yönteminde nişastanın ısıtılmasına bağlı olarak hidroksimetilfurfural açığa çıkmakta ve bu maddenin insan sağlığı için zararlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca yine asit-hidroliz yönteminde ısıtma işlemine bağlı olarak (140-150°C) üründe renk bozulmaları ve küllü kontaminasyonu da meydana gelmektedir. Gerek asit-hidroliz yöntemindeki bu olumsuzluklar, gerekse enzim üretimindeki gelişmeler sebebiyle günümüzde nişastadan glukoz üretiminde asit-hidroliz yönteminin yerini enzim-enzim yöntemi almıştır. Nişasta granülleri 60 °C'nin üzerinde ki bir sıcaklıkta ısıtıldığı zaman (çoğunlukla 105-110 °C) nişasta şişmeye ve daha sonrada parçalanmaya başlar. Bu işleme jelatinleşme denir. Bu işlem nişastanın enzim hidrolizine maruz kalması için gereklidir. Daha sonra nişastanın sıvılaştırılması aşaması gelir ve

sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılarak nişasta önce 90-105 °C'de ve pH 6-6,5' te 1-1,5 saat süreyle muhafaza edilir. Bu işlemi 140 °C'de kısa süreli ısıtma ve hemen arkasından da 85 °C'ye hızlı bir şekilde soğutma takip eder. Bu işlem nişastanın sıvılaştırılması tamamlanana kadar sürer. Sıvılaştırmadan sonra nişasta hala suda çözünemez durumdadır ve şeker dekstrine yıkılmamıştır. Bu işlemden sonra sakarifikasyon işlemi uygulanarak nişasta glukozu yıkılır. Sakarifikasyonda ortam sıcaklığı 60 °C'ye, pH ise 4,1'e ayarlanarak sıvılaştırılmış nişastaya amiloglukosidaz enzimi ve diğer dallanma kırıcı enzimler uygulanır. Reaksiyon süresi ise 60 saattir. Son olarak sırasıyla filtrasyon, deminerilizasyon ve evaporasyon işlemleri uygulanarak glukoz kullanıma hazır hale getirilir (Anonymous, 1988).

Nişastanın maltoza kadar hidrolizi, nişasta molekülünün öncelikle  $\alpha$ -amilaz enzimi tarafından sıvılaştırılıp, daha sonra da ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin ilavesi ile sağlanmaktadır. Açığa çıkan yüksek saflıktaki maltoz, reçel, şekerleme, ekmek ve bira üretiminde kullanıldığı gibi, gıdalarda tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır (Şekil 9). Nişastanın hidrolizi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan maltotetroz ise nem tutucu olarak kullanılmaktadır (Anonymous, 1988).



Şekil 9. Nişastanın endüstriyel işlemlerden geçerek siklodekstrin, maltodekstrin, glukoz ve fruktoz şrubu ve kristal şekere dönüşümü (Van der Maarel vd., 2002)

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşılama denilmektedir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın giderilmesi gerekmektedir. Bu işleme haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakçioğlu, 1979).

$\alpha$ -Amilaz enzimi alkol üretiminde de kullanılmaktadır. Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller,  $\alpha$ -amilaz ve amilolitikosidaz enzimleri ile muamele edilmektedir. Nişasta yeterince parçalandıktan sonra ortama maya aşıl原因arak fermentasyon işlemine geçilmektedir (Wiseman, 1987).

$\alpha$ -amilaz enzimi meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulmuştur. Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir. Bu

sorun, ortama  $\alpha$ -amilaz ilave edilerek giderilmektedir (Ekşi, 1988).

Kâğıt endüstrisinde kâğıt kaplaması için gerekli olan düşük viskozite ve yüksek molekül kütleli nişastanın üretimi için  $\alpha$ -amilazlar kullanılır. Doğal nişastanın viskozitesi kâğıda kaplamak için çok yüksektir. Bu sorun  $\alpha$ -amilazlar kullanılarak çözülür. Kağıdın kaplanması, proses boyunca meydana gelebilecek mekanik zararları önlemek amacıyla yapılır (Upadek ve Kottwitz,1997).

$\alpha$ -Amilaz enzimi ekmeçilikte, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekmek unundaki nişasta amilazlar tarafından daha küçük parçalar olan dekstrinlere parçalanır. Bu dekstrinler mayalar tarafından fermente edilerek ekmeğin kalitesinin artması, bayatlamının gecikmesi gibi özellikler sağlar. Ekmek üretiminde genellikle fungal amilazlar (*Aspergillus* sp.) kullanılır.

Son yıllarda özellikle kuru temizleme gibi yeni alanlarda da giderek artan şekilde kullanım alanı bulmuştur. Nötrofilik özelliğe sahip amilaz enzimleri genel olarak pH 5-7,5 aralığında aktivite gösterirken, özellikle deterjan sanayisinde kullanılan amilaz enzimleri pH 8-11 aralığında aktivite göstermekte olup, alkalifilik *Bacillus* türlerinden izole edilmektedirler (Igarashi vd., 1998; Uhling, 1998).

$\alpha$ -Amilaz enzimi otomatik çamaşır ve bulaşık makinası deterjanlarının üretiminde de kullanılmaktadır (Igarashi vd., 1998).

*Bacillus* türleri, endüstriyel önemi büyük olan ekstraselüler amilaz ve proteaz enzimlerini üretirler. Termotabil  $\alpha$ -amilaz, mezofil ortamda üreyen *B.licheniformis* türünün ürünü olup, geniş bir pH aralığında aktivite gösterir (Morgan ve Priest, 1977).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, üretici firmalar ve modelleriyle birlikte markaları Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601UV-Visible Spektrofotometer
Protein Elektroforezi	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
Santrifüj	ThermoFisher Scientific	Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge
Saf Su Cihazı	SartoriusStedim Biotech	Arium 61316 ProUV
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	JEIO TECH	SI-600
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
pH Metre	Thermo Scientific	ORION 3 Star pH Benchtop
Otoklav	Tomy	SS-325
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/ Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Terazi	Precisa	XB 220A
Steril Kabin	Tezsan	—
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL
HPLC	Shimadzu	Prominence

### 2.2. Kullanılan Kimyasallar

“*Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” konulu çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları

Firma Adı	Kimyasal Adı
Sigma /Aldrich Chem.Co(St.Louis.MO.USA)	CH <sub>3</sub> COOH, Glisin, NaOH, Çözünür patates nişastası, Amilopektin, Amiloz, Çözünmeyen patates nişastası, Folin Reaktifi, PMSF, 3,5 Dinitrosalisilikasit,
Merck A.G(Darmstadt,Germany)	CH <sub>3</sub> COONa, MOPS, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Na-K Tartarat, NaHSO <sub>3</sub> , Pepton, Akrilamid, Tris, Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, APS, TEMED, EDTA, KI, I <sub>2</sub> , Üre, 2-Merkaptoetanol, β-siklodekstrin, MgCl <sub>2</sub> , BaCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , NaCl, FeCl <sub>2</sub> , CuCl <sub>2</sub> , NaOH, NaClO <sub>4</sub> , Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , NaN <sub>3</sub> , NaCN, NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaAc, Na <sub>2</sub> CO <sub>4</sub> , NaNO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , NaC <sub>8</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , NaHSO <sub>4</sub> , Bromofenol mavisi, SDS, Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Pharmacia	Sefadeks G-100 kolon dolgu maddesi
Conda Pronodisa	Pepton
Ambresco	BSA
Fermentas	Protein markırı
Himedie	Agar

## 2.3. Kullanılan Çözeltiler

### 2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 4,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,5): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 4,5'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 5,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,5): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 5,5'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 6,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,5): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 6,5'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

MOPS Tamponu (50 mM, pH 7,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

MOPS Tamponu (50 mM, pH 7,5): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,5): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,5'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,5): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,5'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,0): 1,87 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 10'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,5): 1,87 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 10'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11,0): 1,87 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 11'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11,5): 1,87 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 11,5'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12,0): 1,87 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 12'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

### **2.3.2. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler**

%2'lik nişasta çözeltisi: 2 gram çözüdür patates nişastası 100 mL aktivite tamponunda çözümlenerek hazırlandı ve her tayin sırasında taze hazırlanıp kullanıldı.

3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Çözeltisi (Çözelti A): 22 mL %10'luk NaOH çözeltisi üzerine az miktarda suda çözülmüş 10 g fenol ilave edilip 100 mL'ye seyreltildi.

Çözelti B: 6,9 g sodyum bisülfid 69 mL çözelti A'da çözüldü.

Çözelti C: 300 mL % 4,5 NaOH, 225 g Na-K tartarat ve 880 mL % 1'lik 3,5-dinitrosalisilik asit karıştırıldı. Çözelti B ve C karıştırılarak DNS çözeltisi hazır hale getirildi.

### 2.3.3. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 0,4 g NaOH ve 2,0 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Lowry B Çözeltisi (%1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi): 1,0 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K Tartarat Çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Lowry D Çözeltisi: 1 kısım lowry B ve lowry C karıştırılarak hazırlandı.

Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.

Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

0,1 N NaOH içinde % 0,1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

### 2.3.4. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 5,4225 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 8,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 0,2850 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 6,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C'de saklandı.

N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (% 30): 29,20 g akrilamid ve 0,80 g N,N'-metilenbisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Bromofenol Mavisi (0,1):10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

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-merkaptolanol'ün karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,20 g Tris ve 1,50 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.

Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,20 g Tris ve 1,50 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

%10'luk Nişasta Çözeltisi: 10 g çözümlü nişasta tartılıp saf suda çözüldü.

Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesiyle hazırlandı.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Substrat Boyama Çözeltisi: 0,30 g iyot, 0,60 g KI ve 1 g NaHCO<sub>3</sub> 100 mL saf suda çözüldü ve 1:100 oranında seyreltilerek kullanıldı.

## 2.4. Sıvı ve Katı Besiyerleri

Luria-Bertani Besiyerinin (LB) Hazırlanması: 10,0 g tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 980 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1,1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd., 1989).

Luria-Bertani Agar Besiyerinin (LB Agar) Hazırlanması: 10,0 g tripton, 5,0 g maya

ekstrağı ve 5,0 g NaCl ve 15,0 g agar yaklaşık 980 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltilinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1,1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd., 1989).

İndüklenmiş Besiyerinin Hazırlanması: 10 g çözünmeyen nişasta, 10 g NaCl, 5 g tripton, 50 mM CaCl<sub>2</sub> ve 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren karışım yaklaşık 950 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltilinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C' de ve 1,1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi.

## **2.5. Deneysel Çalışmalar**

### **2.5.1. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşunun Ekstraselüler $\alpha$ -Amilaz Üretimi İçin Petri Testi**

Z<sub>4</sub> suşu 55 °C'de LB ortamında 4 saat ön büyütmeden sonra %1 tripton, %0,5 NaCl, %0,5 maya ekstrağı, %1,5 g agar ve %1 çözümlü patates nişastası içeren besiyerine ekildi. 24 saat boyunca 55 °C'de büyümeye bırakıldı ve petri içeriğı iyot çözeltilisiyle boyandı.

### **2.5.2. Ekstraselüler Ham Enzim Kaynağının Üretilmesi**

Ekstraselüler ham enzim özütü için *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşu %1 çözünmeyen nişasta, % 0,5 tripton, % 1 NaCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub> ve 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren besiyerine ekim yapıldı. 55 °C'de 48 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda büyümeye bırakıldı. Elde edilen karışım 13000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek berrak ekstraselüler ham enzim kaynağı elde edildi.

### **2.5.3. Termofilik $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması**

#### **2.5.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Elde edilen ham enzim özütündeki proteinleri çöktürmek amacıyla katı amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Ham enzim özütünün hacmi mezürle ölçüldükten sonra, bir beher içerisinde buz banyosunun içerisinde magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi ve tuz ilavesi boyunca en düşük ayarda, köpürme olmayacak şekilde karıştırıldı. Amonyum sülfat doygunluğu %40 olacak şekilde yeterli miktarda amonyum sülfat tartıldı (Segel, 1976, Ek Tablo 1). Beherin dibinde amonyum sülfat birikmeyecek şekilde, spatülle yavaş yavaş

amonyum sülfat ilave edildi. Amonyum sülfat doygunluğu %40 olan enzim özütü, buzdolabında +4 °C’de bir gece bekletildi. Ertesi gün çöken proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 10000 rpm’ de 30 dakika santrifüj edildi. Protein pelletleri bir falkon içerisinde, süpernatant ise temiz bir beher içerisinde toplandı. Amonyum sülfat doygunluğu %40 olan bu enzim özütünün tuz doygunluğunun % 80 olması için yeterli miktarda amonyum sülfat tartıldı. % 40 tuz doygunluğundaki enzim özütünü içeren beher, buz banyosunun içerisinde magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi ve tuz ilavesi boyunca en düşük ayarda, köpürme olmayacak şekilde karıştırıldı. Beherin dibinde amonyum sülfat birikmeyecek şekilde, spatülle yavaş yavaş amonyum sülfat ilave edildi. Amonyum sülfat doygunluğu % 80 olan enzim özütü buzdolabında +4 °C’de bir gece bekletildi. Ertesi gün çöken proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 10000 rpm’ de 30 dakika santrifüj edildi. Çöken proteinler daha sonraki aşamalarda kullanmak amacıyla -20 °C’de saklandı.

### **2.5.3.2. Çöktürülen Proteinlerin Amicon Ultracel Membran 30.000MWCO Milipore ile Konsantre Edilmesi**

Amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen protein pelleti 50 mM pH’sı 7,0 olan 50 mL MOPS tamponunda çözüldü. Karışımda var olan amonyum sülfat tuzunu uzaklaştırmak ve proteinleri deriştirmek amacıyla Amicon Ultracel Membran (30.000MWCO Milipore) filtre kullanıldı. Yeterli miktarda protein karışımı filtre içine konuldu ve 4500 g’de +4 °C’de santrifüj yapıldı. Filtrenin üstünde kalan protein pelleti üç kez aynı tamponla yıkandı ve 50 mM pH’sı 7,0 olan 50 mL MOPS tamponunda çözüldü. Toplam 16 mL protein karışımının 1 mL’si aktivite ve protein tayini deneyleri için ayrıldı. Geriye kalan 15 mL saflaştırma aşamaları için kullanıldı.

### **2.5.3.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Jel filtrasyon kromatografisi için 60 cm x 3 cm ebatlarında bir kolon ve kolon dolgu maddesi olarak Sefadex G-100 kullanıldı. Kolon dolgu maddesi 0,1 M ve pH=10,0 olan NaHCO<sub>3</sub> tamponunda şişirildikten sonra 50 mM ve pH’ sı 7,0 olan MOPS tamponu içine alındı. Dolgu malzemesi ve kullanılan tüm çözeltilerin gazı bir vakum pompası yardımıyla alındıktan sonra Sefadex G-100 dolgu malzemesi pastör pipeti yardımıyla dikkatlice kolona paketlenildi. Paketleme işleminin ardından kolon 1000 mL 50 mM ve pH’ sı 7,0 olan MOPS tamponunun (2 mM CaCl<sub>2</sub> içerecek şekilde hazırlanmış) geçirilmesiyle dengeye

getirildi. Sonra kolonun akış hızı 0,5 mL/dak olacak şekilde ayarlanıp 15 mL ham enzim özütü kolona yüklendi. Poteinleri elüe edebilmek için kolondan protein çıkışı sona erece kadar denge tamponu geçirildi. Kolondan çıkan elüatlar 4'er mL'lik fraksiyonlar halinde ayrı ayrı tüplerde toplandı. Toplanan elüatlarda 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Protein gözlenen tüplerde aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite gözlenen elüatlarda protein miktarını belirlemek amacıyla protein tayini yapıldı. Amilaz aktivitesinin yüksek olduğu ve protein içeriği olarakta benzerlik gösteren elüatlarda protein elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonrası tek protein bantının gözlendiği elüatlar birleştirildi. Elde edilen enzim elüatları, Amicon Ultracel Membran 10.000 MWCO Milipore kullanılarak deriştirildi.

#### **2.5.4. Protein Tayini**

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanıldı.

Kalibrasyon grafiği çizilemek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1,0 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu. Bu şekilde tüplerde BSA' nın nihai konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µL olması sağlandı.

Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, amonyum sülfatla çöktürülen ve amikon filtreden geçirilen protein karışımından ve saf proteinden ayrı bir deney tüpüne 5 µL ilave edildi. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL tamamlayacak şekilde 0,1N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.

Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (%2 sodyum-potasyum tartarat, %1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ve 0,1N NaOH içerisinde %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. 650 nm'de absorbanslar okundu.

Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

#### **2.5.5. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE)**

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yığıma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 7).



Tablo 7. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları

	%5'lik Yığma Jeli Bileşenleri (mL)	%10' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
% 10 Nişasta	---	1,0
Saf su	2,7	3,1
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Jel SDS-PAGE'de olduğu gibi ancak SDS içermeyecek şekilde hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuk yaklaşık 40 µg protein içerecek şekilde doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırıldı ve Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya yığma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve yavaş bir şekilde 10 dakika sallanarak bekletildi. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantları görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

Substrat boyaması için, doğal-PAGE jeline %10'luk nişasta çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra 55 °C'de yaklaşık olarak 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel üzerine boyama çözeltisi ilave edilerek protein bantı görünür hale getirildi.

### 2.5.6. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre %5'lik yığma jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 8).

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuk yaklaşık 40 µg protein içerecek şekilde doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Bu sayede üç boyutlu yapısı bozulan proteinler Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi.

Tablo 8. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları

	%5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	%12' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	4,0
%30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
%10 SDS	0,04	0,1
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, proteinler, yığıma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve 3 saat boyunca boyamaya bırakıldı. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

### 2.5.7. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi için, dakikada 1  $\mu$ M glukoz açığa çıkaran enzim miktarı bir ünite olarak tanımlandı. Enzim aktivitesi tayini indirgen şeker tayini yöntemi olan 3,5-dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı (Miller, 1959). 150  $\mu$ L aktivite tamponu (50 mM, pH=7,0 ve 2 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren MOPS tamponu) üzerine %2'lik nişasta çözeltisinden 300  $\mu$ L eklenerek 70 °C'de 5 dakika ön ısıtma yapıldı. Daha sonra saf enzim önceden ısıtılmış olan bu karışım üzerine ilave edildi ve 70 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak ve renklendirmek amacıyla, reaksiyon karışımı üzerine 600  $\mu$ L DNS çözeltisi ilave edilerek su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Reaksiyon karışımının absorbansı spektrofotometrede 540 nm'de okundu.

### 2.5.8. Saflaştırılan Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Saflaştırılan amilaz enziminin substrat özgünlüğünün belirlenmesi enzimin  $\alpha$ -amilaz olduğunu teyid etmek açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla, amilopektin, amiloz, patates nişastası, mısır nişastası, buğday nişastası, selüloz, glikojen ve  $\beta$ -siklodoktrin substratlarının %2'lik çözeltileri kullanılarak nihai substrat konsantrasyonu %1 olacak şekilde amilaz aktivitesi bakıldı ve aktiviteler hesaplandı.

### **2.5.9. $\alpha$ -Amilaz Katalizli Reaksiyon Karışımında HPLC Yöntemiyle Son Ürün Tayini**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak enzimin son ürünü belirlendi. Standart olarak glukoz, fruktoz ve sakkaroz kullanıldı. Tampon, enzim ve substrat karışımlarının 70 °C' de 10, 20, 30 ve 45 dakika inkübe edildi. Elde edilen karışımlar filtreden geçirilerek viallere yüklendi ve tayine hazır hale getirildi. Hareketli faz olarak %80'lik asetonitril varlığında örnekler cihaza verildi ve 16 dakikalık bir koşturma sonrası kromotogramlar alındı ve son ürün belirlendi.

### **2.5.10. Glukoz Standart Grafiğinin Hazırlanması**

0,625 mg/mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden belirli seyreltmelerle dokuz farklı konsantrasyonda glukoz çözeltisi hazırlandı. Her bir konsantrasyon üç paralel çalışıldı. Kör olarak saf su kullanıldı. Deney tüplerine 600  $\mu$ L standart çözeltilerden pipetlendi ve 70 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak ve renklendirmek amacıyla, reaksiyon karışımı üzerine 600  $\mu$ L DNS çözeltisi ilave edilerek su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra reaksiyon karışımının absorbansı 540 nm'de okundu.

## **2.6. Bazı Parametrelerin Saflaştırılan *Anoxybacillus gonensis* Z4 $\alpha$ -Amilazının Aktivitesi Üzerine Etkileri**

### **2.6.1. pH'ın Etkisi**

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilaz'ının aktivitesi, pH'ın bir fonksiyonu olarak farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak çözüdür patates nişastası kullanılarak belirlendi. Bunun için, 50 mM konsantrasyonda hazırlanan pH 4,0-5,5 arasında Asetat tamponu, pH 6,0-7,5 arasında MOPS tamponu, pH 8,0-9,5 arasında Tris-HCl tamponu ve pH 10,0-12,0 arasında Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Tespit edilen optimum pH değerinden faydalanılarak substrat konsantrasyonu, protein miktarının ve diğer parametrelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

### 2.6.2. Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10°C'lik artışlarla 20-90°C aralığında sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında 20 dakika inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe aktarıldı. Grafikte gözlenen tek pik optimum sıcaklık değeri olarak alındı.

### 2.6.3. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilaz'ının konsantrasyonunun değiştirilmesiyle enzim aktivitesinin değişimini incelemek ve aktivenin en yüksek olduğu optimum protein miktarını belirlemek amacıyla, önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta ve sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarına karşılık (0,01 – 0,8 mg/mL) aktivite değişimi grafiğe geçirildi.

### 2.6.4. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, daha önceden ifade edilen optimum şartlarda enzim aktivitesi değişen substrat miktarlarına (0,1-12 mg/mL) karşı belirlendi. Diğer parametrelerin belirlenmesinde ölçülen en yüksek hız değerindeki substrat konsantrasyonu kullanıldı.

### 2.6.5. Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim, +4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C sıcaklıklarda 1, 3, 5, 7, 9 ve 10 gün boyunca inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. Kalan yüzde *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilaz'ının aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

### 2.6.6. pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4,5 ve 5,5 asetat tamponu, pH 6,5 ve 7,5 MOPS tamponu, pH 8,5 ve 9,5 tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C'de toplam 10 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildikten sonra optimum şartlar

altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanan ancak inkübasyona bırakılmamış enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bulunarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

### 2.6.7. Bazı Kimyasal, Deterjan, Anyonların ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilaz'ının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 1mM, 5 mM, 10mM ve 20 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi de aynı konsantrasyonlarda çalışıldı.

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilaz'ının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla  $OH^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $PO_4^{-3}$ ,  $N_3^-$ ,  $CN^-$ ,  $Cl^-$ ,  $HPO_4^{-2}$ ,  $B_4O_7^{-2}$ ,  $CO_3^{-2}$ ,  $Ac^-$ ,  $CO_4^{-2}$ ,  $NO_3^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $SO_4^{-2}$ ,  $SO_3^-$ ,  $C_8H_{11}N_2O_3^-$ ,  $WO_4^{2-}$  ve  $HSO_3^-$  anyonlarının sodyum tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Anyonların reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 1mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Üre' nin de aynı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilaz'ının aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini incelemek amacıyla Triton X-114, Triton X-100, Tween 80, Tween 20, bulaşık makinası sıvı deterjanı, bulaşık sıvı el deterjanı, Katı çamaşır makinası deterjanı, sıvı çamaşır makinası deterjanı ve leke çıkarıcı kullanıldı. Bu deterjanların % 10' luk stok çözeltileri hazırlandı. Deterjanların reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları % 0,5, % 1 ve % 2 olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı.

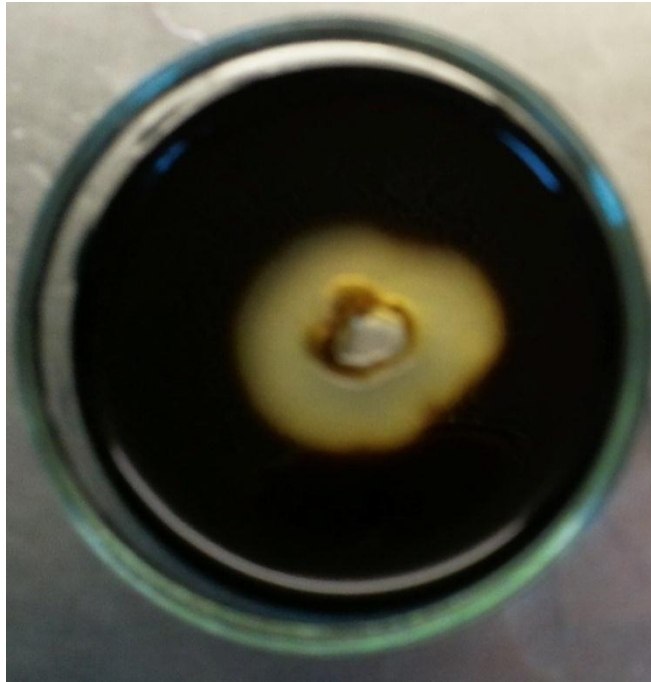
Ayrıca fenilmetilsülfanoflorid (PMSF) ve 2-merkaptoetanol (2-ME) nihai konsantrasyonları sırasıyla %1, 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu, anyon, deterjan ve kimyasal içermeyen karışımın aktivitesi elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması

##### 3.1.1. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Termofilik Suşunun Ekstraselüler $\alpha$ -Amilaz Üretiminde Petri Testi

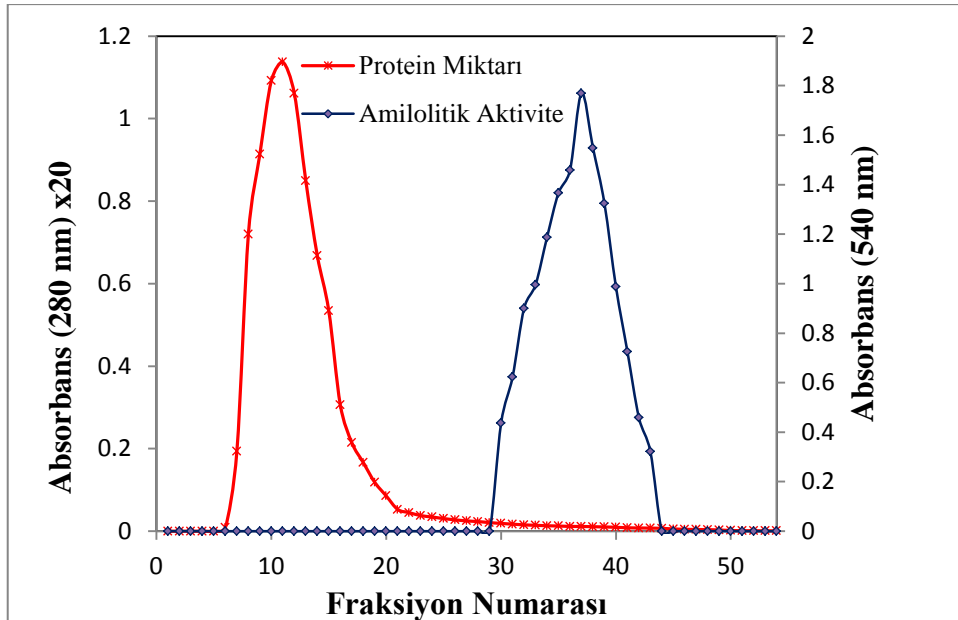
Z<sub>4</sub> suşu 55 °C'de LB ortamında 4 saat ön büyütmeden sonra %1 tripton, %0,5 NaCl, %0,5 maya ekstreği, %1,5 g agar ve %1 çözünür patates nişastası içeren besiyerine ekildi. 24 saat boyunca 55 °C'de büyümeye bırakıldı ve iyot çözeltisiyle boyandı. Oluşan beyaz alandan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun ekstraselüler amilolitik enzim ürettiği tespit edildi (Şekil 10).



Şekil 10. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun amilolitik petri testi

### 3.1.2. Enzimin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Amonyum sülfat ile çöktürme sonrası elde edilen protein pelleti 50 mM pH'sı 7,0 olan 50 mL MOPS tamponunda çözüldü. Amonyum sülfat tuzunu uzaklaştırmak ve proteinleri deriştirmek amacıyla Amicon Ultracel Membran (30.000MWCO Milipore) filtre kullanıldı. Filtrenin üstünde kalan protein pelleti üç kez aynı tamponla yıkandı ve 16 mL 50 mM pH'sı 7,0 olan MOPS tamponunda çözüldü. 50 mM ve pH' sı 7,0 olan MOPS tamponunun (10 mM CaCl<sub>2</sub> içerecek şekilde hazırlanmış) geçirilmesiyle dengeye getirilen kolona 15 mL ham enzim özütü yüklendi ve akış hızı 0,5 mL/dak olacak şekilde ayarlandı. Poteinleri elüe edebilmek için kolondan protein çıkışı sona erene kadar denge tamponundan geçirildi. Kolondan çıkan elüatlar 4'er mL halinde tüplerde toplandı. Toplanan elüatlarda kalitatif olarak protein varlığını belirleyebilmek için 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Protein varlığı gözlenen tüplerde amilolitik aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra amilolitik aktivite gözlenen tüplerde, protein miktarı Lowry metodu kullanılarak, kantitatif olarak belirlendi. Fraksiyonların 280 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri ile amilolitik aktivite değerlerinin excell programı yardımıyla grafikleri çizildi (Şekil 11).



Şekil 11. Jel Filtrasyon kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve amilolitik aktivite değerleri

6 numaralı fraksiyondan itibaren kolondan protein gelmeye başladığı ve 54 numaralı fraksiyonda ise protein gelişinin sona erdiği tespit edildi. 30 ile 42 numaralı fraksiyonlar da dahil olmak üzere toplam 13 fraksiyonda amilolitik aktivite gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre benzer amilolitik aktivite gösteren ve protein içeriği de yakın olan fraksiyonlar birleştirildi. Saf enzim elüatında Lowry yöntemiyle protein tayini yapıp özgül aktivite değeri hesaplandı (Tablo 9).

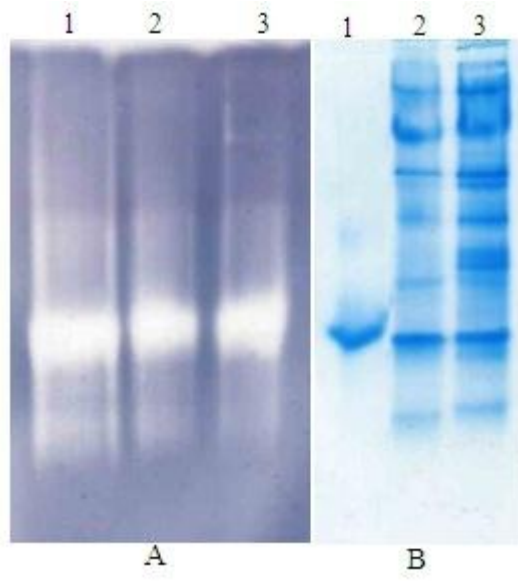
Tablo 9. *Anoxybacillus gonensis* Z4' ten izole edilen ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaza ait saflaştırma tablosu

	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Özgül Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham Enzim Kaynağı	9900	0,054	538,6	2,2	21780	40,4	1	100
% (40-80) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Amicon filtre ile deriştirme	15	6,2	92,3	1091,6	16375	177,5	4,4	75,2
Jel Filtrasyon Kromatografisi	15	0,9	13,5	1083,3	16250	1203,7	29,8	74,6

### 3.1.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)

Doğal PAGE'de saf enzimin yürütülüp Comassie Brilliant Blue R250 ile boyanması sonucunda (Şekil 12B) tek bir bandın gözlenmesi enzimin başarılı bir şekilde saflaştırılabildiği sonucunu desteklemektedir. Ancak bu yöntemle, saf proteinin molekül ağırlığı belirlenemediğinden enzimin alt birimlerinin sayısı tespit edilememiştir. Enzim aktivite boyaması için (Şekil 12A), %10'luk doğal poliakrilamid jeline %1 son konsantrasyonda olacak şekilde çözünür patates nişastası ilave edilerek elektroforez yapıldı. Jelde açığa çıkan beyaz bölge amilazın varlığını ve nişasta üzerindeki aktivitesini göstermektedir.

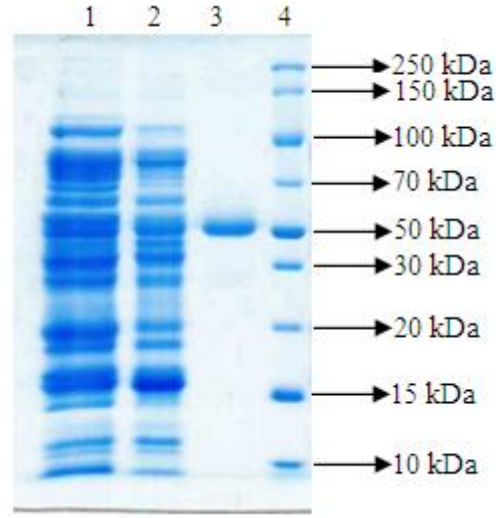




Şekil 12. Doğal PAGE elektroforezi. A1: Saf enzim, A2: % (40-80) Amonyum sülfat çöktürmesi, A3: Ham enzim kaynağı, B1: Saf enzim, B2: % (40-80) Amonyum sülfat çöktürmesi, B3: Ham enzim kaynağı

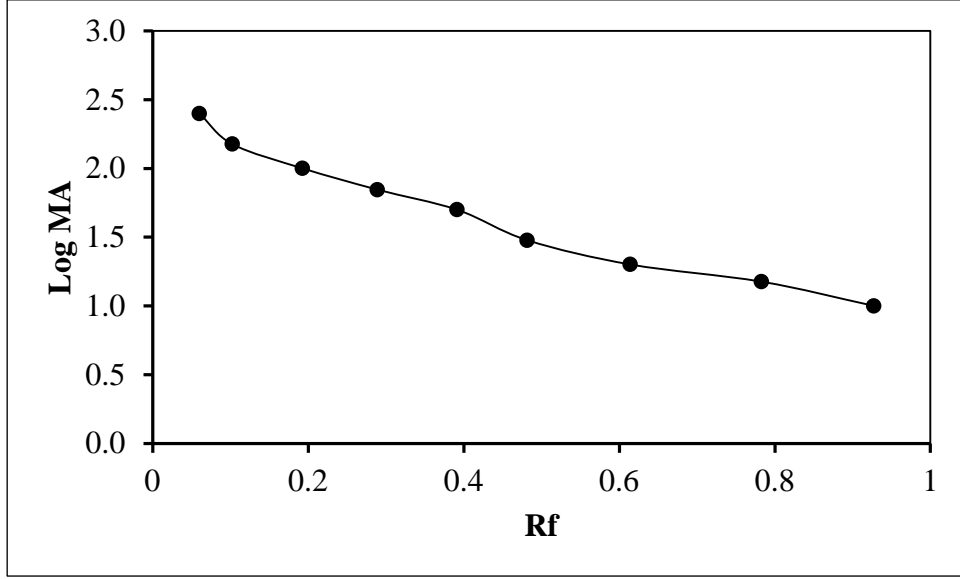
### 3.1.4. SDS Poliakilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE)

SDS-PAGE %12'lik jele yaklaşık 40 µg protein yüklenerek yapıldı. Elektroforez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda *Anoxybacillus gonensis* Z4 α-amilazının jel filtrasyon kromatografisiyle etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 13).



Şekil 13. SDS-PAGE elektroforezi. 1: Ham enzim kaynağı, 2: % (40-80) Amonyum sülfatla çöktürme sonrası, 3: Saf enzim, 4: Standart protein karışımı

Saf proteinin kromatogramda tek bant halinde olması, enzimin farklı molekül ağırlıklı alt birimlerden oluşmadığını veya alt birim içermediğini göstermektedir. Standart proteinlerin Rf değerleri, bu proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı grafiğe geçirilerildi (Şekil 14). Saf proteinin Rf değeri 0,39 olarak bulundu ve grafikten faydalanarak *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının molekül kütlesi tespit edildi. Yapılan bu hesaplamayla *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazın tek alt birim molekül kütlesi yaklaşık 50 kDa olarak belirlendi.



Şekil 14. Standart proteinlerin Rf değerlerine karşı molekül ağırlıklarının logaritması grafiği

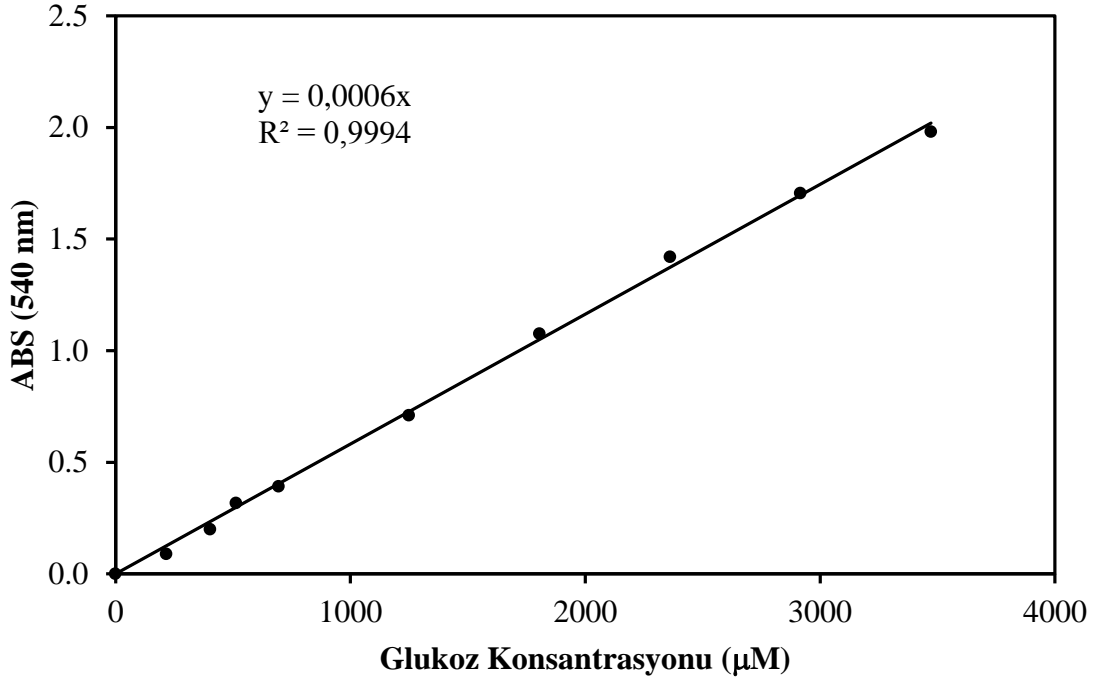
### 3.1.5. Saflaştırılan Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.1.5.1. $\alpha$ -Amilaz Katalizli Reaksiyon Karışımında HPLC Yöntemiyle Son Ürün Tayini

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak enzimi katalizli reaksiyonun son ürünü belirlendi. 10, 20, 30 ve 45 dakikalık inkübasyon sonrası reaksiyon ortamında oluşan son ürünün glukoz olduğu ve başka ürün pikinin oluşmadığı gözlemlendi (Ek Şekil 1, Ek Şekil 2, Ek Şekil 3, Ek Şekil 4 ve Ek Şekil 5).

#### 3.1.5.2. Glukoz Standart Grafiğinin Hazırlanması

0,625 mg/mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi hazırlandı ve bu çözümden belirli seyreltmelerle dokuz farklı konsantrasyonda glukoz çözeltisi kullanılarak elde edilen sonuçlarla glukoz standart grafiği çizildi (Şekil 15).



Şekil 15. Glukoz standart grafiği

### 3.1.5.3. Safılaştırılan Enzimin Substrat Özgünlüğü ve Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Karakterizasyon çalışmalarının gerçekteştirilebilmesi amacıyla *Anoxybacillus gonensis* Z4 termofilik suşundan elde edilen saf enzim için amilopektin, amiloz, patates nişastası, mısır nişastası, buğday nişastası, selüloz ve  $\beta$ -siklodektrin substratları varlığında  $\alpha$ -amilaz aktivitesi incelendi ve aktiviter ünite (U) cinsinden hesaplandı (Tablo 10). Dakikada 1  $\mu$ M glukoz oluşturan enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı.

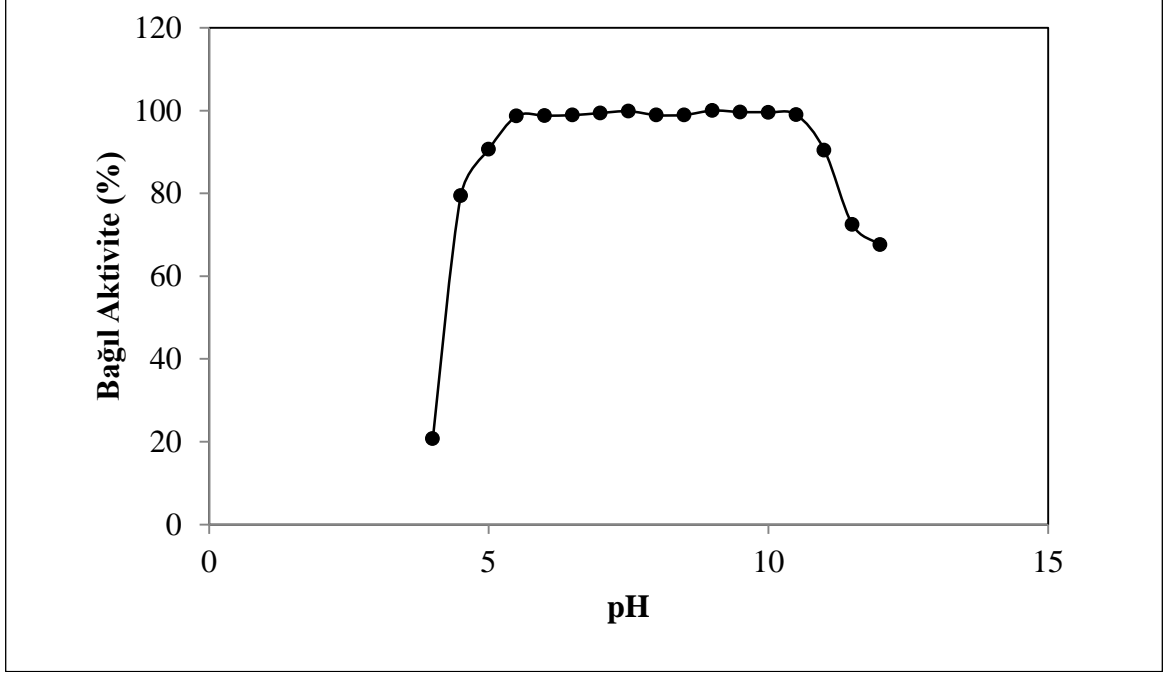
Tablo 10. *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının farklı substratlar varlığında elde edilen aktivite değerleri

Substrat	Aktivite (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
Amilopektin	772	82
Amiloz	938,7	100
Patates nişastası	832,7	89
Mısır nişastası	724	77
Buğday nişastası	738,7	79
$\beta$ -Siklodekstrin	133,3	14
Glikojen	417,3	44
Selüloz	-	-

Elde edilen sonuçlar neticesinde, *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının patates nişastası varlığında diğer nişasta çeşitlerine göre daha yüksek aktivite göstermesinden dolayı patates nişastası karakterizasyon çalışmalarında substrat olarak kullanıldı.

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

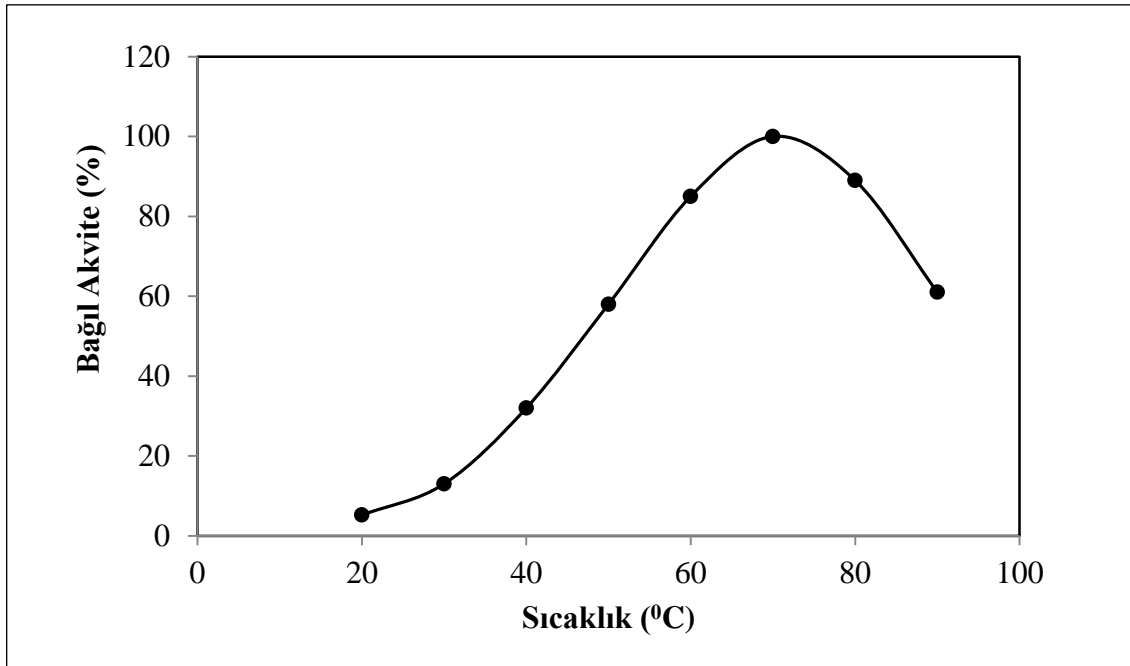
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerindeki (4,0-12,0) tamponların kullanılmasıyla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak pH-% Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 16). Enzim, pH 5,5-10,5 arasındaki pH değerlerinde maksimum aktivitesini korumaktadır. pH 5,5'tan 10,5'e kadar meydana gelen pH artışlarından enzim aktivitesi etkilenmediği tespit edildi.



Şekil 16. Enzim aktivitesi üzerine pH' ın etkisi

### 3.1.5.5. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

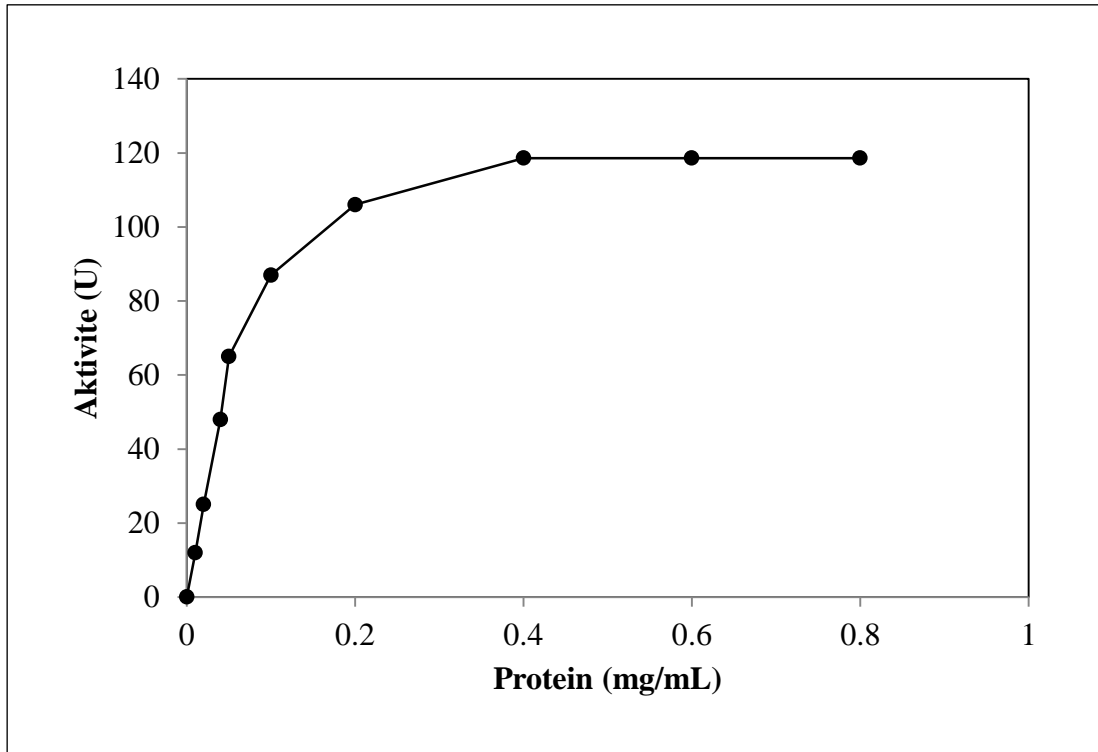
Sıcaklığın  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla 20-90  $^{\circ}\text{C}$  aralığındaki sıcaklıklarda 10  $^{\circ}\text{C}$ 'lik artışlarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen şekil 16' deki Sıcaklık-% Bağıl Aktivite grafiğine göre  $\alpha$ -amilaz için optimum sıcaklık 70  $^{\circ}\text{C}$  olarak belirlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

### 3.1.5.6. Protein Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazı aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla önceden belirlenen substratın sabit konsantrasyonunda reaksiyon karışımındaki protein miktarına bağlı olarak aktivitelerin değişimi incelendi. Reaksiyon karışımında 0,01-0,8 mg/mL değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen hiperbolik eğriden 8 mg/mL substrat konsantrasyonunda optimum enzim konsantrasyonu 0,4 mg/mL olarak belirlendi (Şekil 18).

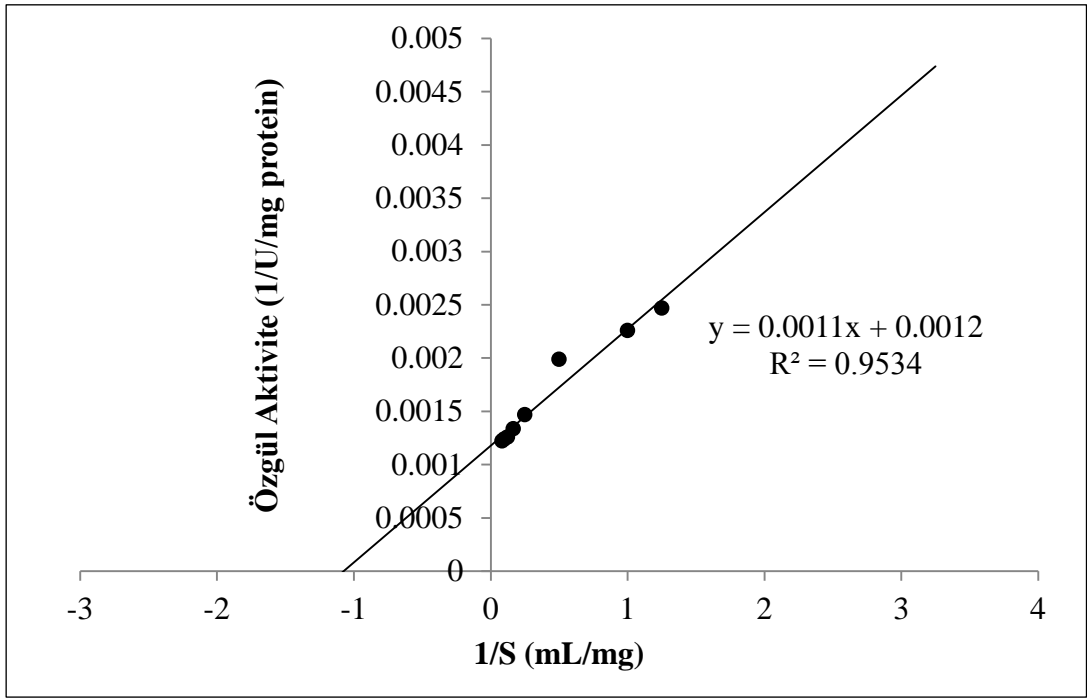


Şekil 18. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

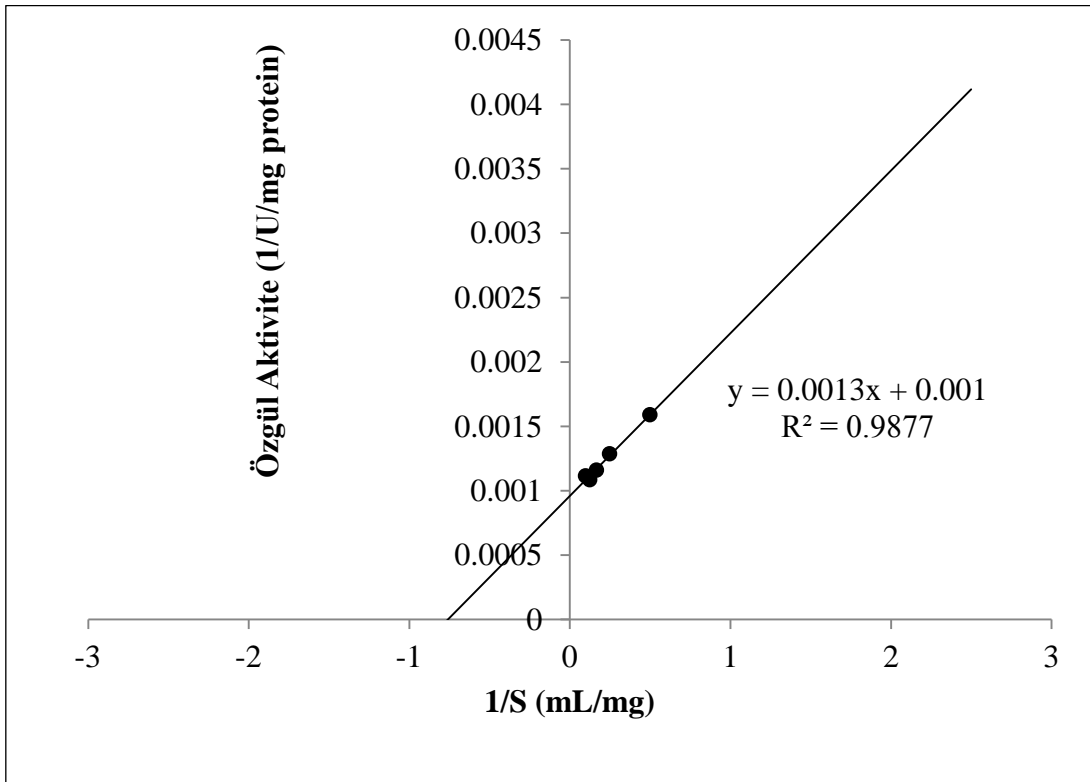
### 3.1.5.7. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 0,01-12 mg/mL substrat konsantrasyonlarında sırasıyla çözümlü patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Enzim, çözümlü patates nişastası varlığında en yüksek aktiviteyi 8 mg/mL substrat konsantrasyonunda gösterdi. Elde edilen veriler kullanılarak çözümlü patates nişastası substratı için enzimin  $K_m$  değerinin 0,9 mg/mL ve  $V_{maks}$  değerinin ise 833,3 U/mg protein olduğu tespit edildi (Şekil 19). Amilopektin substratı için  $K_m$  değeri 1,3 mg/mL,  $V_{maks}$  değeri ise 1000 U/mg protein olarak bulundu (Şekil 20). Amiloz substratı için  $K_m$  değeri 0,5 mg/mL,  $V_{maks}$  değeri ise 769 U/mg protein olarak belirlendi (Şekil 21).

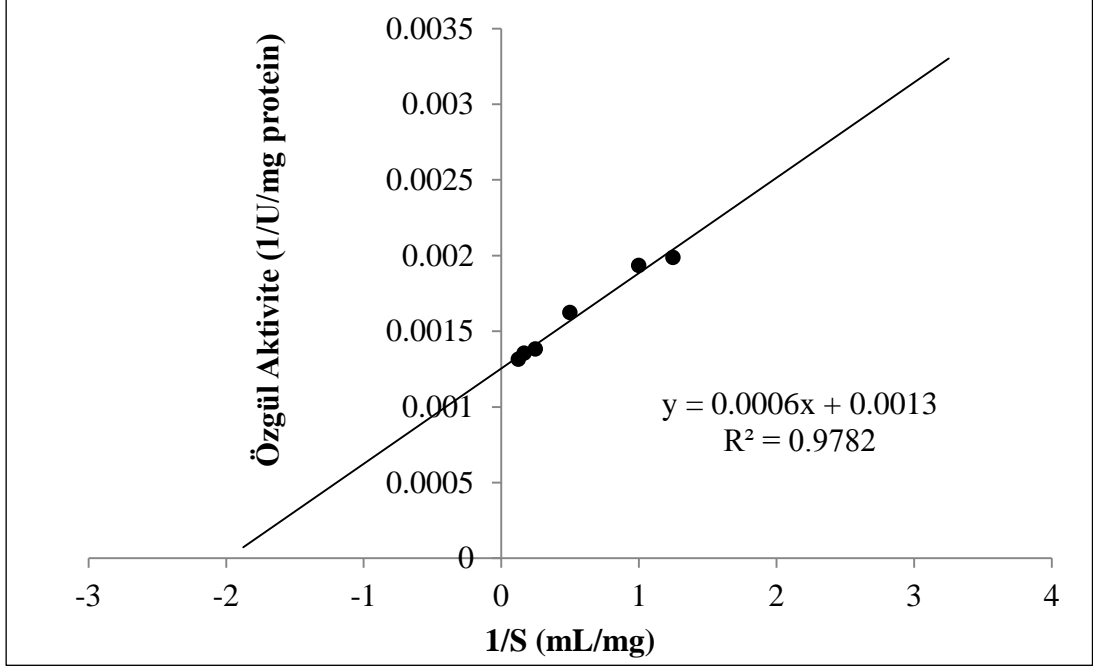




Şekil 19. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazı için çözünür patates nişastası substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 20. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazı için amilopektin substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi



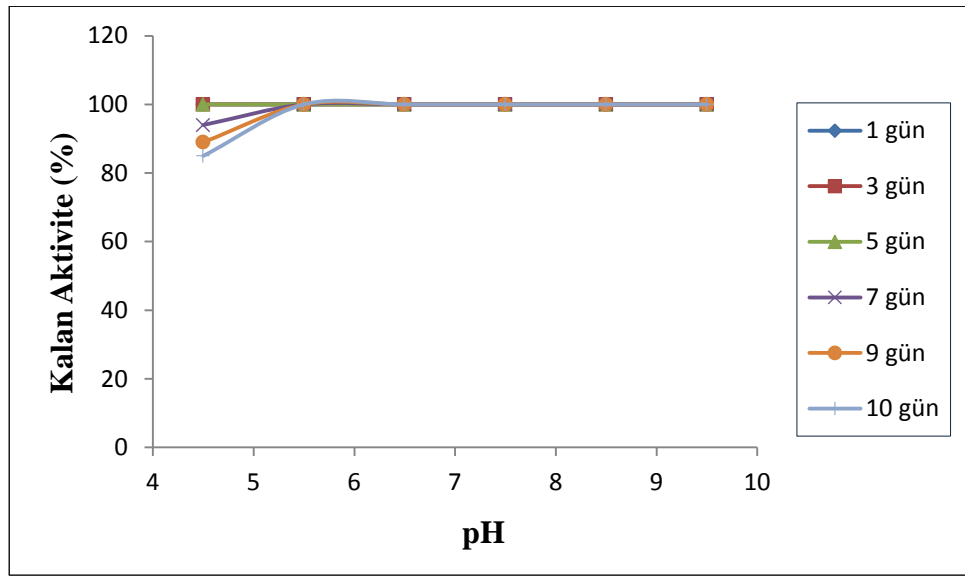
Şekil 21. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazı için amiloz substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi

### 3.1.5.8. Saflaştırılan Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

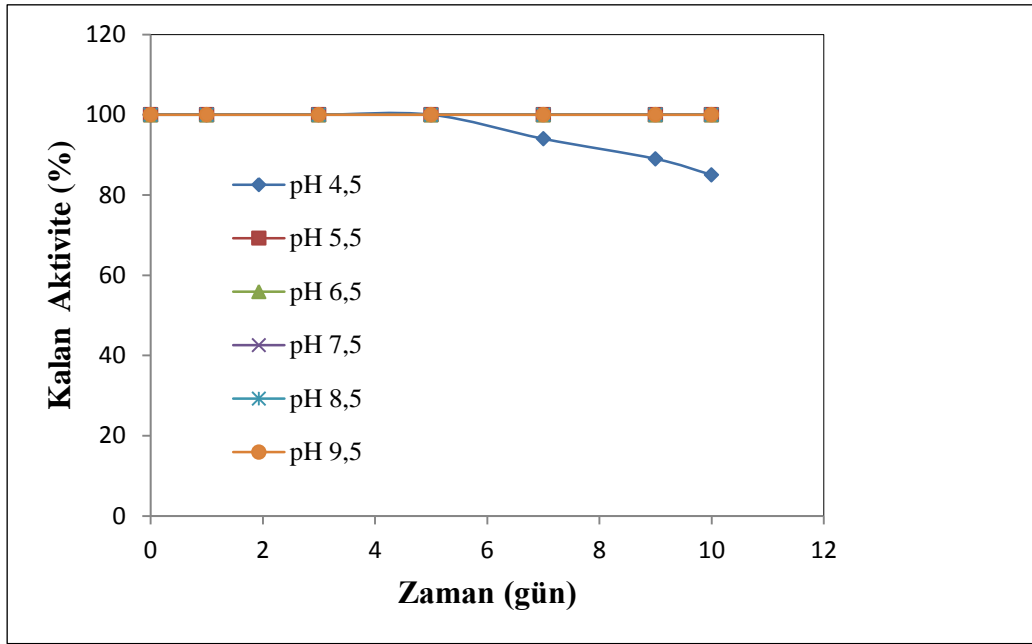
Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4,5 ve 5,5 asetat tamponu, pH 6,5 ve 7,5 MOPS tamponu, pH 8,5 ve 9,5 tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları, 4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C'de toplam 10 gün inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Gözlenen kalan aktiviteler, pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 21-28). Şekil 23 incelendiğinde +4 °C'de pH 4,5 hariç diğer bütün pH'larda enzimin 10 gün boyunca aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. 5 gün sonunda pH 4,5'ta enzim aktivitesinin tamamını, 7 gün sonunda enzim aktivitesinin % 94'ünü ve 10 gün sonunda enzim aktivitesinin % 85'ini koruduğu gözlemlendi. Şekil 25 incelendiğinde, 55 °C'de 10 gün sonunda pH 4,5'ta enzim aktivitesinin % 79' unu, pH 5,5'ta enzim aktivitesinin % 89' unu, pH 6,5'ta enzim aktivitesinin % 90' ını, pH 7,5'ta enzim aktivitesinin % 90' ını, pH 8,5'ta enzim aktivitesinin % 89' unu ve pH 9,5'ta enzim aktivitesinin % 90' ını koruduğu gözlemlendi.

Şekil 27 incelendiğinde, 70 °C’de 10 gün sonunda pH 4,5’te enzimın orjinal aktivitesinin % 51’ ini, pH 5,5’te % 63’ ünü, pH 6,5’te % 66’ sını, pH 7,5’te % 66’ sını, pH 8,5’te % 64’ ünü ve pH 9,5’te da enzimın aktivitesinin % 64’ ünü koruduğu gözlandı.

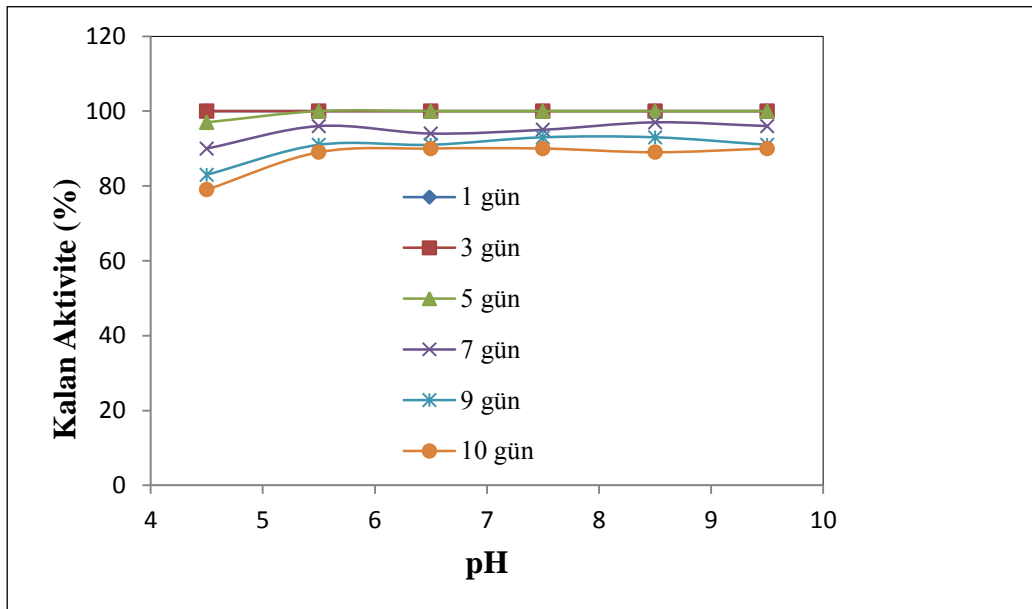
Şekil 29 incelendiğinde, 90 °C’de 10 gün sonunda pH 4,5’te enzimın orjinal aktivitesinin % 35’ ini, pH 5,5’te % 43’ ünü, pH 6,5’te % 45’ ini, pH 7,5’te % 47’ sini, pH 8,5’te % 45’ ini ve pH 9,5’te da enzimın aktivitesinin % 42’ sini koruduğu gözlandı.



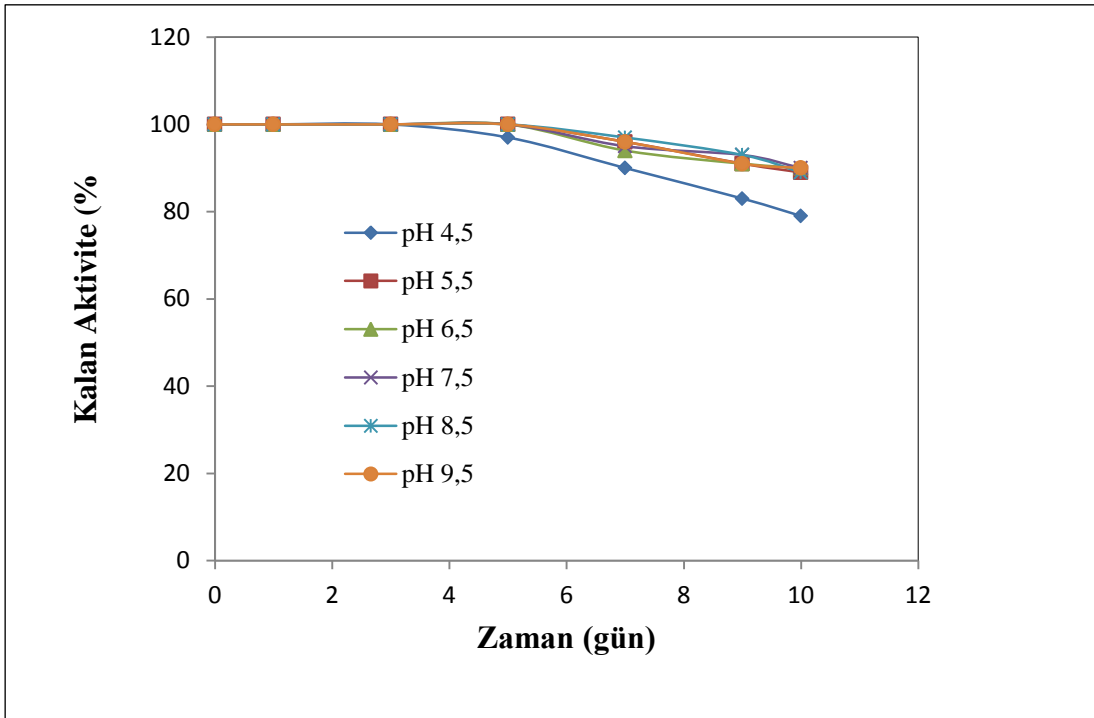
Şekil 22. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 4 °C’deki pH kararlılık grafiği



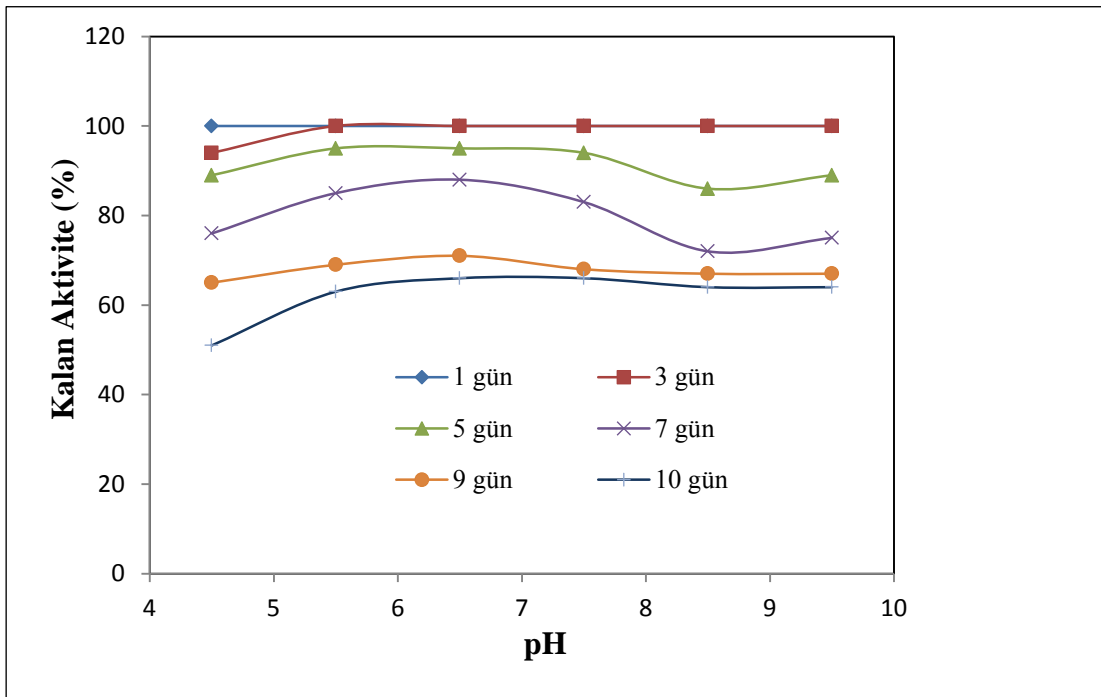
Şekil 23. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 4 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği



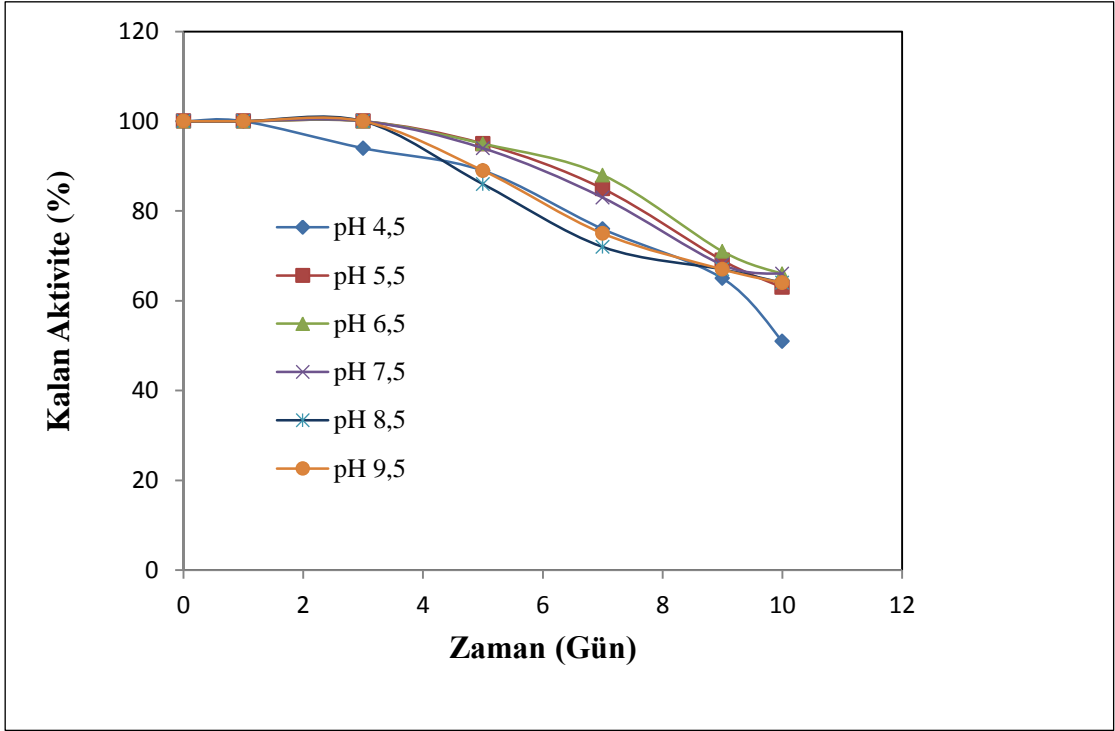
Şekil 24. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 55 °C'deki pH kararlılık grafiği



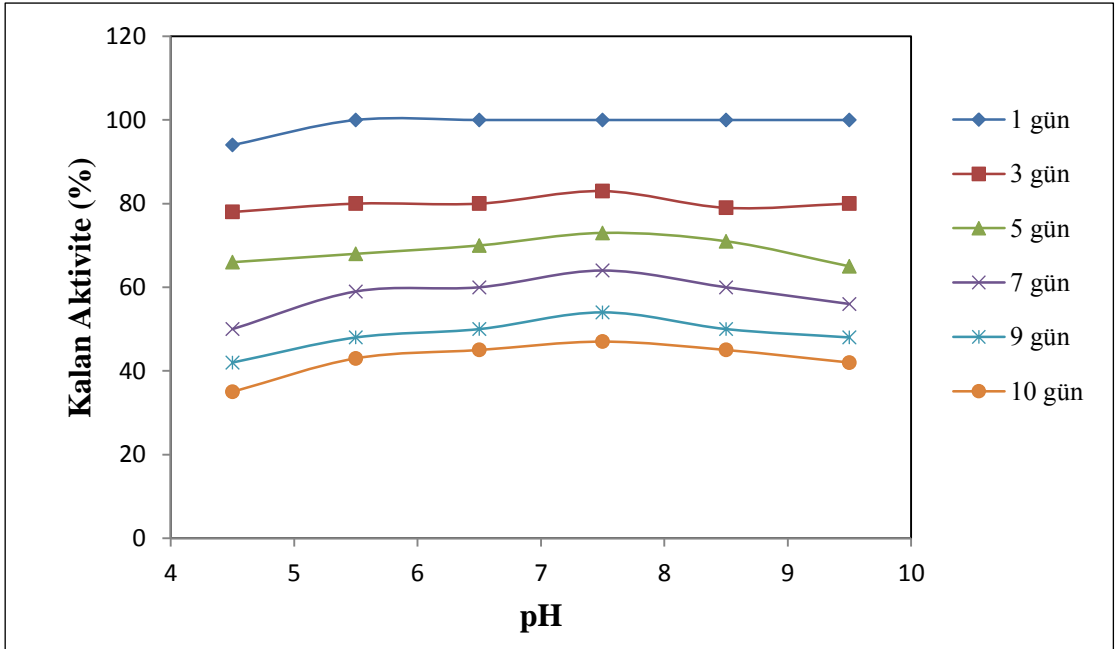
Şekil 25. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 55 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği



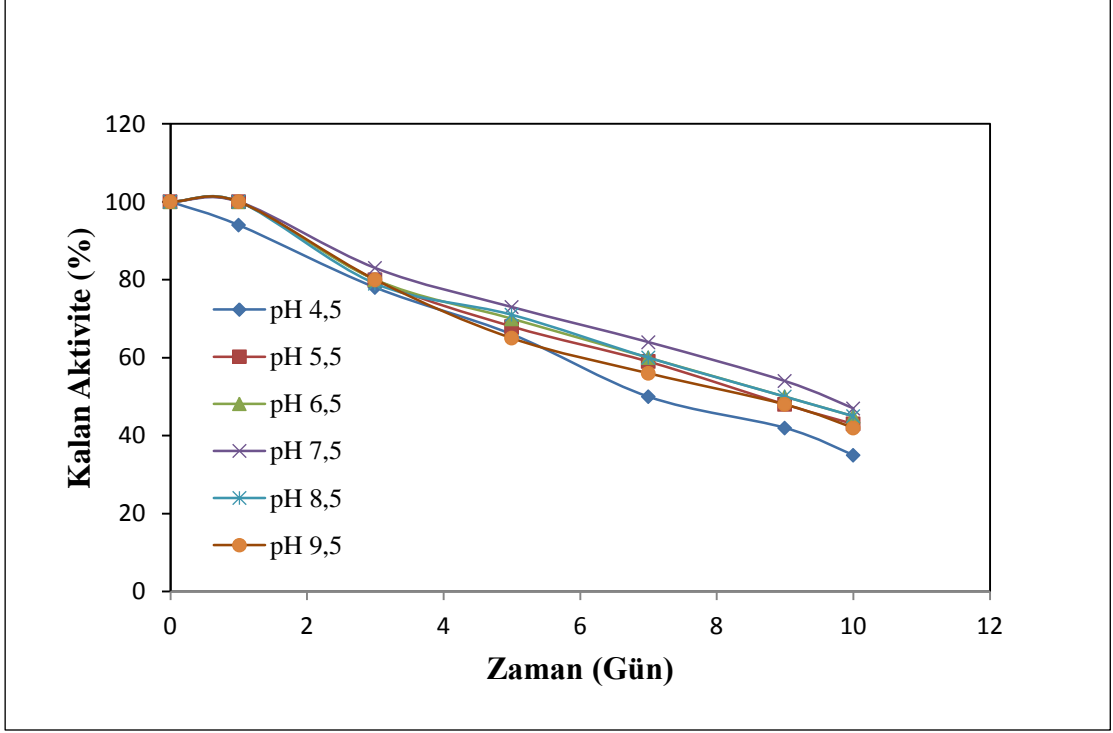
Şekil 26. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 70 °C'deki pH kararlılık grafiği



Şekil 27. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 70 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği



Şekil 28. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 90 °C'deki pH kararlılık grafiği

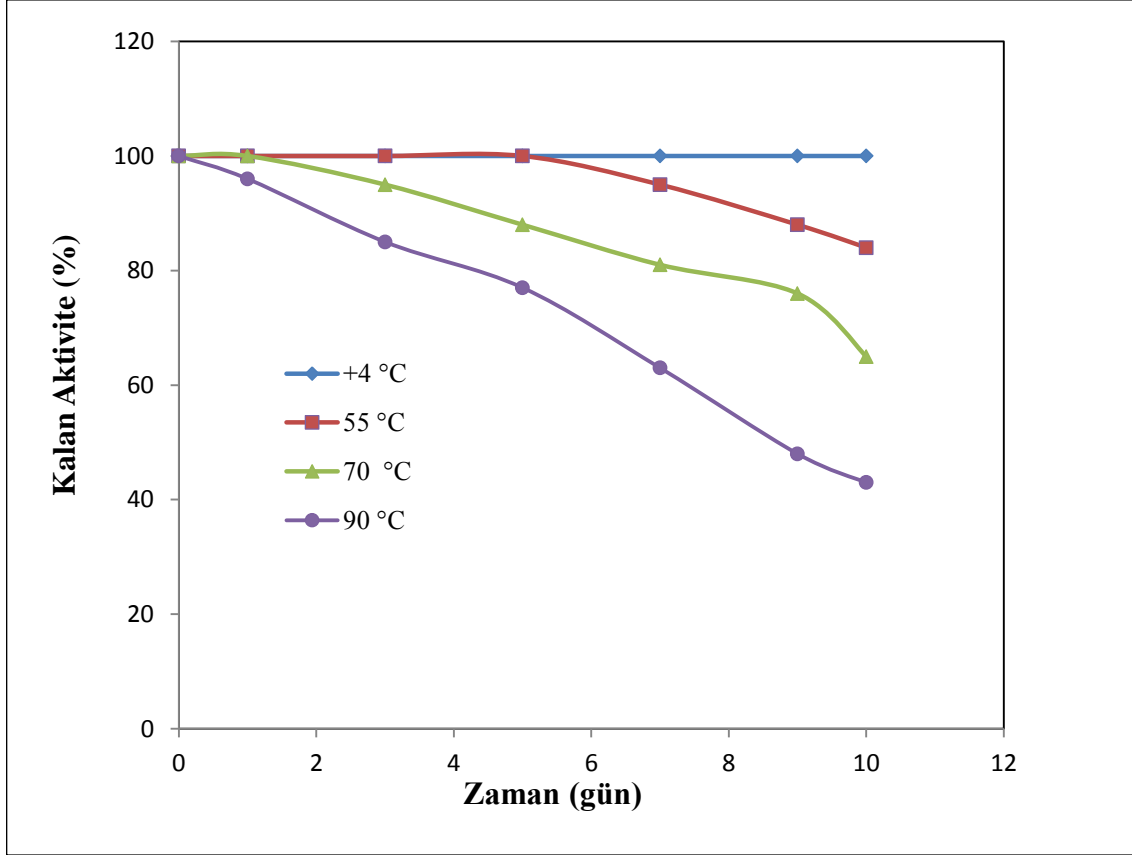


Şekil 29. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının 90 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği

### 3.1.5.9. Saflaştırılan Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, MOPS tamponu (50 mM, pH 7,0) içindeki saf enzim, +4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C sıcaklıklarda 10 gün boyunca bekletildi ve belirli zamanlarda optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Gözlenen kalan aktiviteler sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 30). Enzimin +4 °C de 10 gün boyunca aktivitesini koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun büyüme sıcaklığı olan 55 °C' de 5 gün sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu, 7 gün sonunda aktivitesinin % 95'ini, 9 gün sonunda aktivitesinin % 88'ini ve 10 gün sonunda aktivitesinin % 84'ünü koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun optimum sıcaklığı olan 70 °C' de 1 gün sonunda aktivitesinin tamamını, 3 gün sonunda aktivitesinin %95'ini, 5 gün sonunda %88'ini, 7 gün sonunda %81'ini, 9 gün sonunda %76'sını ve 10 gün sonunda ise orijinal aktivitesinin %65'ini koruduğu gözlemlendi.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun nişasta endüstrisinde kullanım sıcaklığı olan 90 °C’ de 1 gün sonunda aktivitesinin %96’sını, 3 gün sonunda %85’ini, 5 gün sonunda %77’sini, 7 gün sonunda %63’ünü, 9 gün sonunda %48’ini ve 10 gün sonunda ise aktivitesinin %43’ünü koruduğu gözlemlendi.



Şekil 30. *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının ısı kararlılık eğrisi

### 3.1.5.10. Metal İyonlarının, Anyonların, Bazı Kimyasal ve Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM’lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 1 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. EDTA’nın enzim aktivitesi üzerine etkisi de aynı konsantrasyonlarda çalışıldı.



Metal iyonu ve EDTA içermeyen karışımın aktivitesi % 100 kabul edilerek metal iyonu varlığındaki aktiviteler % Kalan aktivite olarak hesaplandı (Tablo 11).

Tablo 11. Bazı Metal İyonlarının *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine etkisi

Metal İyonu	1 mM % Kalan Aktivite	5 mM % Kalan Aktivite	10 mM % Kalan Aktivite	20 mM % Kalan Aktivite
Yok	100	100	100	100
Mn <sup>2+</sup>	132	148	156	175
Ca <sup>2+</sup>	120	129	134	141
Cu <sup>2+</sup>	121	124	125	132
Ba <sup>2+</sup>	102	106	112	130
Co <sup>2+</sup>	100	117	138	148
Zn <sup>2+</sup>	100	103	107	114
Fe <sup>2+</sup>	95,94	102	119	123
Ni <sup>2+</sup>	95,61	98,67	114	117
Mg <sup>2+</sup>	95,03	74,83	70,33	65,98
Hg <sup>2+</sup>	66,31	51,3	42,4	37,3
EDTA	82,9	64,8	43,1	27

Tablo 11' de de görüldüğü gibi Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve Ba<sup>2+</sup> metal iyonları 1 mM konsantrasyondan itibaren metal iyonu konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde farklı ve önemli miktarlarda artış meydana gelirken diğer metal iyonları aktiviteyi farklı seviyelerde inhibe etmiştir. 1 mM Mg<sup>2+</sup> iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 95,03 ünü korurken 20 mM Mg<sup>2+</sup> iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 34,02 sini kaybetmiştir. 1 mM Hg<sup>2+</sup> iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 66,31 ini korurken 20 mM Hg<sup>2+</sup> iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 41,56 sını korumaktadır. 1 mM EDTA varlığında enzim aktivitesinin % 82,9 unu korurken 20 mM EDTA iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 27'sini korumaktadır. EDTA ve Hg<sup>2+</sup> için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 8 mM ve 5,75 mM olarak bulundu.

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla OH<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, B<sub>4</sub>O<sub>7</sub><sup>-2</sup>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, Ac<sup>-</sup>, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-2</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>, WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ve HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonlarının sodyum tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Anyonların reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 1mM, 5 mM, 10mM ve 20 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Üre' nin de aynı konsantrasyonlarda enzim

aktivitesine etkisine bakıldı. Anyon ve üre içermeyen karışımın aktivitesi % 100 kabul edilerek anyon ve  $N_2H_4CO$  varlığındaki aktiviteler % Kalan aktivite olarak hesaplandı (Tablo 12).

Tablo 12. Bazı Anyonların *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine etkisi

Anyon	1 mM Kalan Aktivite (%)	5 mM Kalan Aktivite (%)	10 mM Kalan Aktivite (%)	20 mM Kalan Aktivite (%)
Yok	100	100	100	100
$ClO_4^-$	100	100	100	100
$Cl^-$	100	100	100	100
$Ac^-$	100	100	100	100
$NO_3^-$	100	100	100	100
$SO_4^{2-}$	102	104	105	106
$N_3^-$	98,98	89,94	100	100
$C_2O_4^{2-}$	110	106	102	101
$HCO_3^-$	103	101	95,16	88,71
$HPO_4^{2-}$	100	97,66	94,27	90,97
$HSO_3^-$	99,58	97,90	95,96	89,11
$WO_4^{2-}$	98,77	95,24	93,46	83,22
$C_8H_{11}N_2O_3^-$	99,1	94,75	92,77	82,5
$SO_3^-$	99,19	97,18	85,40	71,53
$CO_3^{2-}$	98,56	92,82	81,37	60,48
$PO_4^{3-}$	96,4	80,56	72,58	58,62
$B_4O_7^{2-}$	97,1	81,93	61,69	43,54
$OH^-$	98	91,20	65,73	37,1
$CN^-$	97,75	73,79	40,16	5,65
$N_2 H_4CO$	93,9	67,2	52,1	23,41

Elde edilen değerlerdende görüldüğü gibi  $ClO_4^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Ac^-$ ,  $NO_3^-$  iyonları varlığında enzim aktivitesinin tamamını,  $SO_4^{2-}$  iyonu varlığında 1mM konsantrasyonda % 2 artarken 20 mM konsantrasyonda % 6 artmıştır.  $HPO_4^{2-}$ ,  $HSO_3^-$ ,  $WO_4^{2-}$  ve  $C_8H_{11}N_2O_3^-$  iyonları varlığında enzim aktivitesinin benzer miktarlarda inhibe olduğu gözlemlendi.  $SO_3^-$  ve  $CO_3^{2-}$  iyonlarının enzimi inhibe etme yüzdeleri kendi aralarında,  $PO_4^{3-}$  ve  $B_4O_7^{2-}$  iyonlarının enzimi inhibe etme yüzdeleri kendi aralarında benzerlik göstermektedir. 1mM  $OH^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 2 sini kaybederken 20 mM  $OH^-$  iyonu varlığında enzim

aktivitesinin % 62,8 ini kaybetmiştir. Anyon etkisini incelemek amacıyla kullanılan anyonlar içerisinde  $\text{CN}^-$  anyonu enzim aktivitesini en fazla inhibe etmiştir. 1mM  $\text{CN}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 2,25 ini kaybederken 20 mM  $\text{CN}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 94,35 ini kaybetmiştir.  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CN}^-$  anyonları ve üre için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 16,5 mM, 15,2 mM, 8,2 mM ve 10,9 mM olarak bulundu.

*Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini incelemek amacıyla Triton X-114, Triton X-100, Tween 80, Tween 20, sıvı bulaşık makinası deterjanı, sıvı bulaşık el deterjanı, katı çamaşır makinası deterjanı, sıvı çamaşır makinası deterjanı ve leke çıkarıcı kullanıldı. Bu deterjanların % 10' luk stok çözeltileri hazırlandı. Deterjanların reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları % 0,5, % 1 ve % 2 olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Deterjan içermeyen karışımın aktivitesi % 100 kabul edilerek deterjan varlığındaki aktiviteler % kalan aktivite olarak hesaplandı (Tablo 13). %2 Triton X-114 varlığında enzim aktivitesi 1,14 kat artmıştır. Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20 varlığında enzim aktivitesinin tamamının korunduğu gözlemlendi. Sıvı bulaşık makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin tamamı korunurken %2 sıvı bulaşık el deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %3,4'ünü kaybetmiştir. %2 sıvı çamaşır makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %3'ünü, %2 katı çamaşır makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %7,3' ünü kaybetmiştir. % 0,5 SDS varlığında enzim aktivitesinin tamamını, % 1 SDS varlığında enzim aktivitesinin %98'ini ve % 2 SDS varlığında enzim aktivitesinin %95,4'ünü koruduğu gözlemlendi.

Tablo 13. Bazı deterjanların *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine etkisi

Deterjan Adı	% 0,5 Kalan Aktivite (%)	% 1 Kalan Aktivite (%)	% 2 Kalan Aktivite (%)
Yok	100	100	100
Triton X-114	113	114	115
Triton X-100	109	107	104
Tween-80	100	100	100
Tween-20	100	100	100
SDS	100	98	95,4
Sıvı bulaşık makina			
Deterjanı	100	100	100
Bulaşık el deterjanı	100	98	95,6
Sıvı çamaşır makina			
Deterjanı	100	99	97
Katı çamaşır makina			
Deterjanı	98,3	95,8	92,7
Leke çıkarıcı	100	98,2	96

Ayrıca PMSF ve 2-merkaptoetanol (2-ME) nihai konsantrasyonları sırasıyla 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. 1mM PMSF ilavesiyle enzim aktivitesini % 100 koruduğu gözlemlendi. Aynı şekilde 10 mM 2-merkaptoetanol (2-ME) ilavesinde de enzim aktivitesini % 100 koruduğu tespit edildi.

#### 4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada Erzurum ilindeki Ilıca kaplıcalarından izole edilen termofilik *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunda ekstraselüler amilolitik enzim aktivitesinin varlığı belirlendi (Şekil 10). Amilolitik enzimler ailesinden olan  $\alpha$ -amilaz enzimi jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırıldı ve enzimin biyokimyasal özellikleri ile kinetik parametreleri belirlendi.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan 9900 mL ekstraselüler ham enzim kaynağı üretildi. Ön saflaştırma işlemi olarak enzim kaynağı tuz doygunluğu %40 olacak şekilde amonyum sülfat ile doyuruldu. Santrifüjden sonra % 40 tuz doygunluğundaki enzim kaynağı %80 olacak şekilde tekrar tuzla doyuruldu ve varolan tuzu uzaklaştırmak ve proteinleri deriştirmek amacıyla amicon filtreden geçirildi. Bu işlemler sonunda elde edilen protein çözeltisi sefadex G-100 dolgu maddesinin paketlenildiği jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi ve enzim bu kromatografik yöntemle saflaştırıldı. Ham enzim kaynağında enzimin özgül aktivitesi 40,4 U/mg protein, amonyum sülfatla çöktürme ve amikon filtre sonrası 177,5 U/mg protein, son olarakta jel filtrasyon kromatografisi sonucu saflaştırılan enzimin özgül aktivitesi 1203,7 U/mg protein olarak bulundu (Tablo 9). Bu sonuçlara göre enzim % 74,6 verimle 29,8 kat saflaştırıldı. *Aspergillus flavus* F2Mbb ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi % 60  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesinin ardından Sefadeks G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (Sidkey, vd., 2010, Tablo 2). *Bacillus subtilis* KIBGE HAS ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (Bano, vd., 2011, Tablo 2). *Bacillus subtilis* ITBCCB148 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesinin ardından iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kolonu kullanılarak 148 kat saflaştırılmıştır (Yandri, vd., 2010, Tablo 2).

Jel filtrasyon kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra elde edilen saf enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edildi. Hazırlanan %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen saf enzim elüatının Commassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucu gözlenen tek bant başarılı bir saflaştırma işleminin gerçekleştirildiğini desteklemektedir (Şekil 12B). Hazırlanan %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen saf enzim elüatının substrat boyaması sonucu gözlenen beyaz bölgeler enzimin nişastayı parçaladığının bir işaretidir (Şekil 12A).

$\alpha$ -Amilazlar molekül ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında değişen proteinlerdir ve genelde tek polipeptid zincirinden oluşur (Janecek S, 1997). Molekül ağırlığı 10 kDa ve tek alt birim olan  $\alpha$ -amilaz *Bacillus caldolyticus* suşundan (Grooteoged vd, 1973), 210 kDa  $\alpha$ -amilaz enzimi ise *Chloroflexus ourantiacus* suşundan (Ratanakhanokchai vd, 1992) saflaştırılmıştır.

Jel filtrasyon kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim elüatı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile de incelendi (Şekil 13). Elektroforez sonucunda gözlenen tek protein bandı, enzimin tek alt birimden oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca SDS-PAGE sonrası çizilen grafikten (Şekil 14) enzimin tek alt birim molekül kütlesi yaklaşık 50 kDa olarak bulundu. *Lactobacillus plantarum* A6'dan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 50 kDa (Giraud vd., 1993, Tablo 2), *Bacillus licheniformis* CUMC 305'ten saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 28 kDa (Krishnan ve Chandra., 1983), *Streptococcus bovis* JB1' den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 77 kDa (Freer, SN., 1993, Tablo 2), *T. profundus* DT5432' den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 52 kDa (Chung vd., 1995, Tablo 2), *Bacillus subtilis* KIBGE HAS' tan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 56 kDa (Bano, vd., 2011, Tablo 2) ve *Bacillus subtilis* ITBCCB148' den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 67 kDa (Yandri, vd., 2010, Tablo 2) olarak bulunmuştur. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin tek alt birim molekül kütlesi bu sonuçlarla uyumludur.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak enzimin son ürünü glukoz olarak belirlendi (Ek Şekil 1, Ek Şekil 2, Ek Şekil 3, Ek Şekil 4 ve Ek Şekil 5). Buna paralel olarak enzim üniteside glukoz cinsinden birimlendirildi. Kozalak çekirdeklerinden saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin son ürünü TLC yöntemiyle glukoz olarak belirlenmiştir (Azad vd., 2009). *Vibrio* sp. ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin son ürünü TLC yöntemiyle glukoz olarak belirlenmiştir (Najafi vd., 2005, Tablo 2). *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilaz' ının son ürünü TLC yöntemiyle glukoz olarak belirlenmiştir (Demirkan vd., 2005, Tablo 2). *Bacillus* sp. WN 11  $\alpha$ -amilazının son ürünü TLC yöntemiyle maltoz olarak belirlenmiştir (Mamo vd., 2001, Tablo 2).

Optimum pH değeri enzim aktivitesinin ifade edilmesinde önemli bir faktördür. Enzimin endüstriyel olarak kullanıldığı birçok alan mevcuttur. Örneğin, nişastanın  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılarak sıvılaştırılması işlemi sırasında pH 6,0-6,5 civarında olmalıdır.

Deterjan endüstrisinde ise bu, pH 8,0-11,0 arasında değişmektedir.

Enzimin pH' ya duyarlı olmaması endüstride daha kolay kullanılmasını sağlar. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz için aktivitenin pH'ya olan bağılılığı pH 4,0-12,0 aralığında incelendi (Şekil 16). İnceleme sonucunda enzimin pH 5,0 ile pH 10,5 arasında aktivitesini koruduğu yani pH değişiminden etkilenmediği gözlemlendi. Ayrıca enzimin asidik pH' larda çok daha düşük aktivite gösterdiği gözlemlendi. Yapılmış olan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre *B. subtilis* 65'ten saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum çalışma pH'sının 6,0-9,0 arasında olduğu (Hayashida vd.,1988, Tablo 2), *B. licheniformis* NH1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum çalışma pH'sının 5,0-10,0 arasında olduğu (Hmidet vd., 2008, Tablo 2), *Clostridium acetobutylicum* ATCC' den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum çalışma pH' sı 5,6 olarak bulunmuştur (Paguet vd., 1991). *Bacillus mojavensis* A21' den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum çalışma pH' sı 6,5 (Hmidet, vd., 2010, Tablo 2), *Aspergillus flavus* F2Mbb' den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum çalışma pH' sı 6,4 olarak bulunmuştur (Sidkey, vd., 2010, Tablo 2). Bu sonuçlara bakılarak *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH bakımından literatürle uyumlu olduğu belirlendi.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 20-90 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde incelendi (Şekil 17). Elde edilen sonuçlara göre enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık 70 °C olarak belirlendi. Yapılan çalışma da bağıl aktivitenin 20 °C' de %5,2, 30 °C' de %13, 40 °C' de %32, 50 °C' de %58, 60 °C' de %85, 80 °C' de % 89 ve 90 °C' de % 61 olduğu bulundu. Literatürde yapılan incelemeler sonucu saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığının, *Bacillus sp. ferdowsicus* (Asoodeh vd., 2010, Tablo 2), *Bacillus sp. A3-15* (Arikan, B., 2008), *Bacillus sp. I-3* (Goyal vd., 2005, Tablo 2), *B. Licheniformis* NCIB 6346 (Morgan vd.,1981, Tablo 2) ve *Bacillus sp. GRE1* (Haki vd., 2008, Tablo 2)  $\alpha$ -amilazları ile aynı olduğu görüldü. Bunların dışındaki diğer termofilik mikroorganizmalardan saflaştırılan  $\alpha$ -amilazların optimum sıcaklıkları 50 °C (Marco vd.,1996, Freer, SN., 1993, Chakraborty vd., 2000, Tablo 2) ile 100 °C (Al-Quadani vd., 2009, Malhotra vd.,2000, Tablo 2) arasında değişmektedir. Tüm bu verilere dayanarak *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilazın termofilik bir enzim olduğunu söyleyebiliriz.

Safılaştırılan enzim için aktivitenin enzim konsantrasyonuna bağılılığı incelendiğinde 0,4 mg/mL' lik konsantrasyona kadar reaksiyon karışımındaki enzim miktarının aktiviteyi arttırdığı gürldü (şekil 18). Daha yüksek konsantrasyon değerlerinde ise  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu ve maksimum enzim miktarına ulaşıldıktan sonra aktivitenin enzim miktarından etkilenmediği belirlendi.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan safılaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilazın aktivitesinin substrat konsantrasyonuyla olan ilişkisini belirlemek amacıyla protein konsantrasyonu sabit tutularak değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. Çözünür patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (şekil 19, şekil 20, şekil 21) ve  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı. Çözünür patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için sırasıyla  $K_m$  değerleri 0,9 mg/mL, 1,3 mg/mL ve 0,5 mg/mL olarak bulundu. Çözünür patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için sırasıyla  $V_{maks}$  değerleri ise 833,3 U/mg protein, 1000 U/mg protein ve ise 769 U/mg protein olarak bulundu.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve bu değer ne kadar küçük olursa, enzimin substratına karşı olan ilgisi de o kadar fazladır. Sonuçlardan da gürldüğü gibi enzimin amiloz substratına olan ilgisi daha fazladır. Fakat amiloz ve amilopektin substratları doğada nişasta olarak bulunduğu için substrat olarak çözünür patates nişastası tercih edildi ve bundan sonraki  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin yapılmış olan diğer çalışmalarla irdelemesi de bu substrat üzerinden yapılacaktır. *Bacillus licheniformis* CUMC 305 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 1,274 mg/mL ve  $V_{maks}$  değeri 0,738mg glukoz/ml dak (Krishnan ve Chandra., 1983, Tablo 2), *Lactobacillus plantarum* A6 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 2,38 mg/mL (Giraud vd., 1993, Tablo 2), *Streptococcus bovis* JB1 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 0,88 mg/mL (Freer, SN., 1993, Tablo 2), *T. profundus* DT5432 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 2,3 mg/mL (Chung vd., 1995, Tablo 2), *Thermus filiformis* Ork A2 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 5,0 mg/mL (Egas, vd., 1998, Tablo 2) *Bacillus subtilis* KIBGE HAS ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 2,68 mg/mL,  $V_{maks}$  değeri 1773 U/ml (Bano, vd., 2011, Tablo 2) ve *Bacillus subtilis* ITBCCB148 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' nın  $K_m$  değeri 2,5 mg/mL,  $V_{maks}$  değeri 192,3  $\mu$ mol/mL dak (Yandri, vd., 2010, Tablo 2) olarak bulunmuştur. Bu değerlere bakılacak olursa da, bahsi geğen ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin nişastaya olan ilgilerinin *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz' na göre daha



düşük olduğu söylenebilir.

Saf enzim elüatının pH 7,0 değerinde +4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C sıcaklıklarda 10 gün boyunca inkübe edilmesi ve inkübasyon sırasında belirli zamanlarda aktivitede olan değişimin incelenmesiyle *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının ısı kararlılığı incelendi (Şekil 30). Enzimin +4 °C de 10 gün boyunca aktivitesini koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun büyüme sıcaklığı olan 55 °C' de 5 gün sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu, 7 gün sonunda aktivitesinin %95'ini, 9 gün sonunda aktivitesinin %88'ini ve 10 gün sonunda aktivitesinin %84'ünü koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun optimum sıcaklığı olan 70 °C' de 1 gün sonunda aktivitesinin tamamını, 3 gün sonunda %95'ini, 5 gün sonunda %88'ini, 7 gün sonunda %81'ini, 9 gün sonunda %76'sını ve 10 gün sonunda ise aktivitesinin %65'ini koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun nişasta endüstrisinde kullanım sıcaklığı olan 90 °C' de 1 gün sonunda aktivitesinin %96'sını, 3 gün sonunda %85'ini, 5 gün sonunda %77'sini, 7 gün sonunda %63'ünü, 9 gün sonunda %48'ini ve 10 gün sonunda ise aktivitesinin %43'ünü koruduğu gözlemlendi. *Bacillus licheniformis* CUMC305 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı optimum sıcaklığı olan 90 °C' de 2 gün sonunda aktivitesinin tamamını, 100 °C' de 1 gün sonunda ise enzim aktivitesini %91 oranında korumuştur (Krishnan ve Chandra., 1983, Tablo 2). Bu sonuçlara bakılarak *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ının +4 °C' de oldukça yüksek bir ısı kararlılığına sahip olduğu ve 55 °C' de çok iyi bir ısı kararlılığına sahip olduğu söylenebilir.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilazın pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4,5 ve 5,5 asetat tamponu, pH 6,5 ve 7,5 MOPS tamponu, pH 8,5 ve 9,5 tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C'de toplam 10 gün inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı (Şekil 22-29). 4°C için yapılan pH kararlılık denemelerinde pH 4,5 hariç diğer tüm pH'lar da 10 gün boyunca enzim aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. pH 4,5'te ise 5 gün sonunda aktivitenin tamamını, 7 gün sonunda %94' ünü ve 10 gün sonunda ise aktivitenin %85' ini koruduğu gözlemlendi. 55 °C için yapılan pH denemelerinde pH 4,5' te 3 gün sonunda aktivitenin tamamını, 7 gün sonunda %90' ını ve 10 gün sonunda ise aktivitenin %79'unu koruduğu gözlemlendi. pH 5,5 ve 6,5'te 3 gün sonunda aktivitenin tamamını, 7 gün sonunda sırasıyla aktivitenin %96 ve %94' ünü ve 10 gün sonunda sırasıyla aktivitenin %89 ve %90' ını koruduğu gözlemlendi. 90 °C için yapılan pH denemelerinde pH 8,5 ve 9,5'te 1 gün

sonunda aktivitenin tamamını, 5 gün sonunda sırasıyla %71 ve %65'ini, 10 gün sonunda ise sırasıyla %60 ve %56'sını koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH denemelerinde pH 5,5 ile 10,5 arasında aynı aktivite profilini gösterdiğini daha önce belirtmiştik. pH karalılık denemelerinde de pH 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5'te aynı sıcaklıkta ve aynı inkübasyon sürelerinin sonunda bulunan % kalan aktiviteler çok benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara bakılarak *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin pH 5,5 ile 9,5 arasında oldukça kararlı olduğu söylenebilir. *Bacillus* Strain HUTBS71  $\alpha$ -amilaz'ının pH 5,2 ile 10,0 arasında (Al-Quadri vd., 2009, Tablo 2) *B. subtilis* 65  $\alpha$ -amilaz'ının pH 6,0 ile 9,0 arasında (Hayashida vd., 1988, Tablo 2) *B. licheniformis* NH 1  $\alpha$ -amilaz'ının pH 5,0 ile 10,0 arasında (Hmidet vd., 2008, Tablo 2) ve *B. licheniformis* CUMC 305 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ının pH 7,0 ile 9,0 arasında oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir (Krishnan ve Chandra., 1983, Tablo 2).

$\alpha$ -Amilazlar genelde aktivitelerini gösterebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duyduklarından dolayı, çeşitli metal iyonlarının ve bunun yanında bazı kimyasalların aktiviteyi nasıl etkilediği araştırıldı.  $\alpha$ -Amilazlar özellikle divalent katyonların varlığında daha iyi aktivite göstermektedirler.  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Ba^{2+}$  metal iyonları 1 mM konsantrasyondan itibaren metal iyonu konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde farklı ve önemli miktarlarda artış meydana gelirken diğer metal iyonları aktiviteyi farklı seviyelerde inhibe etmiştir. 1 mM  $Mg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 95,03 ünü korurken 20 mM  $Mg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 34,02 sini kaybetmiştir. 1 mM  $Hg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 66,31 ini korurken 20 mM  $Hg^{2+}$  iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 41,56 sını korumaktadır. 1 mM EDTA varlığında enzim aktivitesinin % 82,9 unu korurken 20 mM EDTA iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 27'sini korumaktadır. 1 mM  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,2 kat, 5 mM  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,29 kat, 10 mM  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,34 kat, 20 mM  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,41 kat artmıştır. *Thermus filiformis* Ork A2 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ı (Egas, vd., 1998, Tablo 2), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ı (Paguet vd., 1991, Tablo 2), *Geobacillus* sp. LH8  $\alpha$ -amilaz'ı (Mollania vd., 2010, Tablo 2), *B. subtilis* 65  $\alpha$ -amilaz'ı (Hayashida vd., 1988, Tablo 2), *Bacillus* sp. A3-15  $\alpha$ -amilaz'ı (Arikan, B., 2008, Tablo 2), *Bacillus licheniformis* CUMC 305 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ı (Krishnan ve Chandra., 1983,

Tablo 2) ve *Bacillus sp. ferdowsicus*  $\alpha$ -amilaz'ının (Asoodeh vd., 2010, Tablo 2)  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitelerinin arttığı ve EDTA varlığında enzim aktivitelerinin inhibe olduğu bildirilmiştir. EDTA ve  $\text{Hg}^{2+}$  için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 8 mM ve 5,75 mM olarak bulundu.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazın aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla  $\text{OH}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Ac}^-$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  ve  $\text{HSO}_3^-$  anyonlarının sodyum tuzlarının farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ac}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  iyonları varlığında enzim aktivitesinin tamamını,  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonu varlığında 1mM konsantrasyonda % 2 artarken 20 mM konsantrasyonda % 6 artmıştır.  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  ve  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^-$  iyonları varlığında enzim aktivitesinin benzer miktarlarda inhibe olduğu gözlemlendi.  $\text{SO}_3^-$  ve  $\text{CO}_3^{2-}$  iyonlarının enzimi inhibe etme yüzdeleri kendi aralarında,  $\text{PO}_4^{3-}$  ve  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  iyonlarının enzimi inhibe etme yüzdeleri kendi aralarında benzerlik göstermektedir. 1mM  $\text{OH}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 2 sini kaybederken 20 mM  $\text{OH}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 62,8 ini kaybetmiştir. Anyon etkisini incelemek amacıyla kullanılan anyonlar içerisinde  $\text{CN}^-$  anyonu enzim aktivitesini en fazla inhibe etmiştir. 1mM  $\text{CN}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 2,25 ini kaybederken 20 mM  $\text{CN}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 94,35 ini kaybetmiştir. Ayrıca 1mM PMSF ilavesiyle enzim aktivitesi % 100 korunmuştur. Aynı şekilde 10 mM 2-merkaptetanol (2-ME) ilavesinde de enzim aktivitesi % 100 korunmuştur. *Thermococcus profundus* DT5432 ekstraselüler amilazının 1mM 2-merkaptetanol varlığında enzim aktivitesinin %94'ünü koruduğu gözlemlenmiştir (Chung vd., 1995, Tablo 2). *Vibrio sp.*  $\alpha$ -amilaz'ının 5mM PMSF varlığında enzim aktivitesinin %4'ünü kaybettiği bildirilmiştir (Najafi vd., 2005, Tablo 2). 1mM üre ilavesinde enzim aktivitesinin %93,9'u, 5 mM üre ilavesinde enzim aktivitesinin %67,2'si ve 20 mM üre ilavesinde enzim aktivitesinin %23,41'i nin korunduğu gözlemlendi. *B. stearothermophilus* ATCC 12980 (Vihinen, vd.,1990, Tablo 2)  $\alpha$ -amilaz'ının ve *Lactobacillus manihotivorans* (Aguilar, vd., 2000, Tablo 2) ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ının üre varlığında inhibe olduğu bildirilmiştir. *Bacillus sp.* A3-15  $\alpha$ -amilaz'ının 8 M üre varlığında enzim aktivitesinin % 20'sini ve 3 mM PMSF varlığında enzim aktivitesinin %90'ını koruduğu bildirilmiştir (Arikan, B., 2008, Tablo 2). *Thermococcus profundus* DT5432 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının 2M üre varlığında enzim aktivitesinin 1,07 kat arttığı gözlemlenmiştir (Chung vd., 1995, Tablo 2).  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CN}^-$  ve üre için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 16,5 mM, 15,2 mM, 8,2

mM ve 10,9 mM olarak bulundu.  $B_4O_7^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $CN^-$  ve üre için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 16,5 mM, 15,2 mM, 8,2 mM ve 10,9 mM olarak bulundu.

*Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazın aktivitesi üzerine bazı adeterjanların etkisini incelemek amacıyla nihai konsantrasyonları %0,5, %1 ve %2 olacak şekilde Triton X-114, Triton X-100, Tween 80, Tween 20, sıvı bulaşık makinası deterjanı, sıvı bulaşık el deterjanı, katı çamaşır makinası deterjanı, sıvı çamaşır makinası deterjanı ve leke çıkarıcı kullanıldı ve kalan aktivite hesaplandı. %2 Triton X-114 varlığında enzim aktivitesi 1,14 kat artmıştır. Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20 varlığında enzim aktivitesinin tamamının korunduğu gözlemlendi. Sıvı bulaşık makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin tamamı korunurken %2 sıvı bulaşık el deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %3,4'ünü kaybetmiştir. %2 sıvı çamaşır makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %3'ünü, %2 katı çamaşır makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %7,3'ünü kaybetmiştir. %0,5 SDS varlığında enzim aktivitesinin tamamını, %1 SDS varlığında enzim aktivitesinin %98'ini ve %2 SDS varlığında enzim aktivitesinin %95,4'ünü koruduğu gözlemlendi. *Bacillus* sp. A3-15  $\alpha$ -amilaz'ının %1 SDS varlığında enzim aktivitesinin %18'ini kaybettiği bildirilmiştir (Arikan, B., 2008, Tablo 2). *Thermococcus profundus* DT5432 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının %2 SDS varlığında enzim aktivitesinin %22'sini koruduğu gözlemlenmiştir (Chung vd., 1995, Tablo 2). Tüm bu sonuçlara bakarak *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz'ının deterjan endüstrisi için oldukça uygun bir enzim olduğunu söyleyebiliriz.

## 5. SONUÇLAR

“*Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- 1- Ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak % 74,6 verimle 29,8 kat saflaştırıldı (Tablo 9).
- 2- Saflaştırılan enzimin tek alt birim molekül kütlesi yaklaşık 50 kDa olarak belirlendi (Şekil 14).
- 3- *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum çalışma pH'sı 5,5-10,5 arasında olduğu ve optimum sıcaklık 70 °C olarak belirlendi (Şekil 16-17).
- 4- Saflaştırılan enzim için optimum protein çalışma konsantrasyonunun 0,4 mg/mL olduğu belirlendi (Şekil 18).
- 5- Saflaştırılan enzim için patates nişastası substratı optimum çalışma konsantrasyonu 8 mg/mL olarak belirlendi. Ayrıca çözümlü patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için sırasıyla  $K_m$  değerleri 0,9 mg/mL, 1,3 mg/mL ve 0,5 mg/mL olarak bulundu. Çözümlü patates nişastası, amilopektin ve amiloz substratları için sırasıyla  $V_{maks}$  değerleri ise 833,3 U/mg protein, 1000 U/mg protein ve ise 769 U/mg protein olarak bulundu (Şekil 19-21).
- 6- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazında, enzimin substratla 10, 20, 30 ve 45 dakikalık inkübasyon sonrası oluşan son ürün glukoz olarak belirlendi (Ek Şekil 1, Ek Şekil 2, Ek Şekil 3, Ek Şekil 4 ve Ek Şekil 5).
- 7- Saf enzim elüatının pH 7,0 değerinde +4 °C, 55 °C, 70 °C ve 90 °C sıcaklıklarda 10 gün boyunca inkübe edilmesi ve inkübasyon sırasında belirli zamanlarda aktivitede olan değişimin incelenmesiyle *Anoxybacillus gonensis* Z4 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının ısıl kararlılığı incelendi (Şekil 30). Enzimin +4 °C de 10 gün boyunca aktivitesini koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun büyüme sıcaklığı olan 55 °C' de 5 gün sonunda aktivitesinin tamamını korduğu, 7 gün sonunda %95'ini, 9 gün sonunda %88'ini ve 10 gün sonunda ise aktivitesinin %84'ünü koruduğu gözlemlendi.

8- *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun optimum sıcaklığı olan 70 °C' de 1 gün sonunda aktivitesinin tamamını, 3 gün sonunda %95'ini, 5 gün sonunda %88'ini, 7 gün sonunda %81'ini, 9 gün sonunda %76'sını ve 10 gün sonunda ise aktivitesinin %65'ini koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun nişasta endüstrisinde kullanım sıcaklığı olan 90 °C' de 1 gün sonunda aktivitesinin %96'sını, 3 gün sonunda %85'ini, 5 gün sonunda %77'sini, 7 gün sonunda %63'ünü, 9 gün sonunda %48'ini ve 10 gün sonunda ise aktivitesinin %43'ünü koruduğu gözlemlendi.

8- pH kararlılık çalışmalarında; 4°C için yapılan pH kararlılık denemelerinde pH 4,5 hariç diğer tüm pH'lar da 10 gün boyunca enzim aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. pH 4,5'te ise 5 gün sonunda aktivitenin tamamını, 7 gün sonunda %94' ünü ve 10 gün sonunda ise aktivitenin %85' ini koruduğu gözlemlendi. 55 °C için yapılan pH denemelerinde pH 4,5' te 3 gün sonunda aktivitenin tamamını, 7 gün sonunda aktivitenin %90' ını ve 10 gün sonunda aktivitenin %79'unu koruduğu gözlemlendi. pH 5,5 ve 6,5'te 3 gün sonunda aktivitenin tamamını, 7 gün sonunda sırasıyla aktivitenin %96 ve %94' ünü ve 10 gün sonunda sırasıyla aktivitenin %89 ve %90' ını koruduğu gözlemlendi. 90 °C için yapılan pH denemelerinde pH 8,5 ve 9,5'te 1 gün sonunda aktivitenin tamamını, 5 gün sonunda sırasıyla %71ve %65'ini, 10 gün sonunda ise sırasıyla %60 ve %56'sını koruduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH denemelerinde pH 5,5 ile 10,5 arasında aynı aktivite profilini gösterdiğini daha önce belirtmiştik. pH kararlılık denemelerinde de pH 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 ve 9,5'te aynı sıcaklıkta ve aynı inkübasyon sürelerinin sonunda bulunan % kalan aktiviteler çok benzerlik göstermektedir (Şekil 22-29).

9-  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Ba^{2+}$  metal iyonları 1 mM konsantrasyondan itibaren metal iyonu konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde farklı ve önemli miktarlarda artış meydana gelirken diğer metal iyonları aktiviteyi farklı seviyelerde inhibe etmiştir. 1 mM  $Mg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 95,03 ünü korurken 20 mM  $Mg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 34,02 sini kaybetmiştir. 1 mM  $Hg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 66,31 ini korurken 20 mM  $Hg^{2+}$  iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 41,56 sını korumaktadır. 1 mM EDTA varlığında enzim aktivitesinin % 82,9 unu korurken 20 mM EDTA iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 27'sini korumaktadır. 1 mM  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,2 kat, 5 mM  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,29 kat, 10 mM  $Ca^{2+}$

iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,34 kat, 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesi 1,41 kat artmıştır (Tablo 11). EDTA ve  $\text{Hg}^{2+}$  için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 8 mM ve 5,75 mM olarak bulundu.

10-  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ac}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  iyonları varlığında enzim aktivitesinin tamamını,  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonu varlığında 1mM konsantrasyonda % 2 artarken 20 mM konsantrasyonda % 6 artmıştır.  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  ve  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^-$  iyonları varlığında enzim aktivitesinin benzer miktarlarda inhibe olduğu gözlemlendi.  $\text{SO}_3^-$  ve  $\text{CO}_3^{2-}$  iyonlarının enzimi inhibe etme yüzdeleri kendi aralarında,  $\text{PO}_4^{3-}$  ve  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$  iyonlarının enzimi inhibe etme yüzdeleri kendi aralarında benzerlik göstermektedir. 1mM  $\text{OH}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 2 sini kaybederken 20 mM  $\text{OH}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 62,8 ini kaybetmiştir. Anyon etkisini incelemek amacıyla kullanılan anyonlar içerisinde  $\text{CN}^-$  anyonu enzim aktivitesini en fazla inhibe etmiştir. 1mM  $\text{CN}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 2,25 ini kaybederken 20 mM  $\text{CN}^-$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 94,35 ini kaybetmiştir. Ayrıca 1mM PMSF ilavesiyle enzim aktivitesi % 100 korunmuştur. Aynı şekilde 10 mM 2-merkaptotanol (2-ME) ilavesinde de enzim aktivitesi % 100 korunmuştur (Tablo 12).  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CN}^-$  anyonları ve üre için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 16,5 mM, 15,2 mM, 8,2 mM ve 10,9 mM olarak bulundu.

11- %2 Triton X-114 varlığında enzim aktivitesi 1,14 kat artmıştır. Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20 varlığında enzim aktivitesinin tamamının korunduğu gözlemlendi. Sıvı bulaşık makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin tamamı korunurken %2 sıvı bulaşık el deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %3,4'ünü kaybetmiştir. %2 sıvı çamaşır makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %3'ünü, %2 katı çamaşır makinası deterjanı varlığında enzim aktivitesinin %7,3' ünü kaybetmiştir. % 0, 5 SDS varlığında enzim aktivitesinin tamamını, % 1 SDS varlığında enzim aktivitesinin %98'ini ve % 2 SDS varlığında enzim aktivitesinin %95,4'ünü koruduğu gözlemlendi (Tablo 13).

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada yeni bir termofilik suş olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan  $\alpha$ -amilaz enzimi saflandırıldı ve biyokimyasal özellikleri karakterize edildi. Nişasta, kağıt, deterjan ve tekstil endüstrinin ihtiyaç duyduğu önemli enzimlerden biri olan  $\alpha$ -amilaz üzerine birçok araştırma yapılmakta ve özellikle ısı kararlılığı yüksek olan ekstraselüler ve intraselüler  $\alpha$ -amilazların üretimi için yeni mikrobiyal kaynakların ortaya çıkarılmasına önem verilmektedir. Endüstrinin yeni üretilen  $\alpha$ -amilazlardan en büyük beklentisi kolay saflaştırılabilmesi, yüksek ısı kararlılık göstermeleri ve pH'dan aktivitelerinin etkilenmemesidir.

Son zamanlarda enzim üretimini daha verimli hale getirebilmek için yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlardan biri rekombinant DNA teknolojisidir. Bu teknoloji sayesinde enzimleri kodlayan genleri izole etmek ve bu genlerin üzerinde çalışmak ve genetik mutasyonlar yaparak enzimlerin özelliklerini iyileştirmek, günümüzde artık olanaklı hale gelmiştir. Ayrıca bu gibi ileri teknolojik yöntemlerle  $\alpha$ -amilaz enziminin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi sağlanabilir. Bu sebeple, *Anoxybacillus gonensis* Z4  $\alpha$ -amilazı uygun bir konakçıya klonlanarak, bol miktarda ekspres edilmesi ve saflaştırma işleminin daha kolay hale getirilmesi sağlanabilir. Bunun yanında çeşitli mutasyon teknikleri kullanılarak saflaştırılan enzimin ısı kararlılığı da artırılabilir. Enzimin  $K_m$ 'sini düşürmeye yönelik mutasyonlar yapılarak substrata olan ilgisi daha da artırılabilir. Böyle bir durumda yapılan mutasyonların optimum pH, optimum sıcaklık, ısı ve pH kararlılığı üzerine etkileri de incelenmelidir.

$\alpha$ -Amilaz enzimi kullanımı pahalı olan bir enzimdir ve pek çok endüstriyel süreçte geri kazanım ihtimali düşüktür. Bu nedenle enzimin immobilize edilerek defalarca kullanımı endüstriyel işlemlerdeki maliyeti azaltacaktır. Böylelikle, saflaştırılan enzimin immobilizasyon sonrası, enzimin kararlılığı da artacağı için ileri derecede karakterize edilebilir.

Bunlara ilave olarak,ü çalışmayı daha zenginleştirmek için enzimim izoelektrik pH'sı belirlenebilir. Ayrıca HPLC gibi bir yöntemle kesin molekül ağırlığı belirlenebilir.



## 7. KAYNAKLAR

- Abdu Al-ZaZae, M. M., Neelgund, S., Gurumurthy, D.M. ve Rajeshwara, A.N., 2011. Identification, Characterization of Novel Halophilic *Bacillus Cereus Ms6: a Source* for Extra Cellular  $\alpha$ -Amylase. Advances in Environmental Biology. 5, 992-999.
- Adams, M.R., 1986. Progress in Industrial Microbiology. Elsevier, 23, Amsterdam.
- Adams, M.W.W., Perler, F.B. ve Kelly, R.M. 1995. Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. Bio/Technology 13, 662–668.
- Aguilar, A., 1996. Extremophile Research in the European Inion: from Fundamental Spring Term, 78,1-10.
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. ve Jp, Guyot., 2000. Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010(T), an amyolytic lactic acid bacterium. Enzyme and Microbial Technology. 27, 406-413
- Al-Quadani, F., Akel, H. ve Natshi, R., 2009. Characteristics of a Novel Highly Thermostable and Extremely Thermophilic Alkalitolerant Amylase from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. Journal of Biological Sciences. 3, 67-74.
- Al-Quadani, F., Akel, H. ve Natshi, R., 2012. Characteristics of a novel, highly acid- and thermo-stable amylase from thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62 under different environmental conditions. Journal of Biological Sciences. 61, 887-892.
- Anonymous., 1988. Handbook of amylases and related enzymes. Edited by the amylase research society of japan. Pergamon press, Oxford.
- Antranikian G., 1992. Microbial degradation of starch, In; Winkelmann G (eds), Microbial degradation of natural products, 2, 28-50.
- Antranikian, G., Herzberg, C. ve Gottschalk, G., 1987. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase in continuous culture by a new *Clostridium* isolate. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1668–1673.
- Arikan, B., 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. Bioresource Technology. 99, 3071–3076.
- Asoodeh, A., Chamani, J. ve Lagzian, M., 2010. A novel thermostable, acidophilic  $\alpha$ -amylase from a new thermophilic “*Bacillus sp. Ferdowsicus*” isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 46, 289-297.
- Azad, M.A.K., Bae, J.H., Kim, J.S., Lim, J.K., Song, K.S., Shin, B.S. ve Kim, H.R., 2009. Isolation and characterization of a novel thermostable  $\alpha$ -amylase from Korean pine seeds. New Biotechnology, 26, 143-149.

- Bailey J.E. ve Ollis D.F., 1977. Biochemical Engineering Fundamentals; International Student Edition, Chapter 1-7, 39-50.
- Bano, S., Ali, S., Qader, U., Aman, A., Syed, M. N. ve Azhar, A., 2011. Purification and Characterization of Novel  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech., 12, 255-261.
- Bender, H., 1993. Purification and characterization of a cyclodextrin-degrading enzyme from *Flavobacterium* sp., Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 714-719.
- Bertoldo, C. ve Antranikian G., 2002. Starch- hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology., 6, 151-160.
- Bharat, B. ve Hoondal, G., 1998. Isolation, purification and properties of thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. Biotechnol. Lett., 20, 157–159.
- Bolton, D.J., Kelly, C.T. ve Fogarty W.M., 1997. Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase of *Bacillus Flavothermus*. Enzyme and Microbial Thecnology, 20, 340-343.
- Brock, T. D., 1985. Life at High Temperatures, Science, 230, 132-138.
- Brock, T. D., 1986. Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiolgy, Brock, T. D. (Ed.), Jhon Wileyand Sons, New York.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E.M. ve Boom,R.M., 2000. Thermozyms and Their Applications, A Review of Recent Literature and Patents, Appl. Biochem. Biotech., 90, 102, 155-186.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Biao, R., Jian, W., Liu X.Y., Mahadik, K., Chopade, B., Zhang, L. ve Kokare, C., 2011. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable  $\alpha$ -amylase from marine haloalkaliphic *Saccharopolyspora* sp. A9. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic. 68, 52-58.
- Chakraborty, K., Bhattacharyya B.K. ve Sen, S.K., 2000. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*, Folia Microbiol. 45, 207–210.
- Chitradon, L., Mahakhan, P. ve Bucke, C., 2000. Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Mol. Catal. B: Enzym., 10, 273–280.
- Chung, Y. C., Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T. ve Kudo, T., 1995. Purification and Properties of Extracellular Amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Applied and Environmental Microbiology, 61, 4,1502–1506.
- Collins, B.S., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. ve Doyle, E.M. ,1993. The high maltose producing  $\alpha$ -amylase of the thermophilic actinomycete, *Thermomonospora curvata* . Appl Microbiol Biotechnol., 39, 31-35.
- Çağatay M., 1976. Bitki biyokimyası, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları (A.Ü. Basımevi) 98-109.
- Çetin E.T., 1983. Endüstriyel mikrobiyoloji, İstanbul tıp fakültesi vakfı, Bayda yayın, I, 2, 145-146.

- Demirkan, E. S., Mikami B., Adachi M., Higasa, T. ve Utsumi S., 2005.  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. Coli*. Process Biochemistry, 40, 2629-2636.
- Dey, G., Palit, S., Banerjee, R. ve Maiti, B.R.J., 2002. Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313. Ind. Microbiol. Biotechnol., 28, 193–200.
- Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y. K. ve Adhikari, D. K., 2010. Characterization of hyperthermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus sp.* IPTN. Appl. Microbiol. Biotechnol., 86, 1857–1866.
- Egas, M. C., Costa, M. S., Cowan, D.A. ve Pires, E. M., 1998. Extracellular alpha-amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. Extremophiles, 1, 23-32.
- Ekşi, A., 1988. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği, 9, 127.
- Elarbi, M.B., Khemiri, H., Jridi, T. ve Hamida, J.B., 2009. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds. C. R. Biologies., 332, 426-432.
- Everly, C. ve Alberto, J., 2000. Stressors, stress and survival: overview. Front. Biosci. 5, 780–786.
- Fredrich, A. ve Antrakian, G., 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2875–2882.
- Freer, S.N., 1993. Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* JB 1. Appl Environ Microbiol., 59, 1398-1402.
- Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J. L. ve Raimbault, M., 1993. Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain 6. Journal of Applied Bacteriology, 75, 276-282.
- Goyal N, Gupta J.K. ve Soni S.K., 2005. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus sp. I-3* and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology, 37, 7, 723-734.
- Grootegeed, J.A., Lauwers, A.M. ve Heinen W., 1973. Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. Arch. Microbiol., 90, 223.
- Guagliardi, A., Martino, M., Iaccarino, I., de Rosa, M., Rossi, M. ve Bartolucci, S., 1996. Purification and Characterization of the Alcohol Dehydrogenase from a Novel Strain of *Bacillus steraothermophilus* Growing at 70 ° C. Int. J. Biochem. Cell Biol., 28, 239-246.
- Haki, G. D., Anceno, A. J. ve Rakshit, S. K., 2008. A typical  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, raw-starch hydrolysing  $\alpha$ -amylase from *Bacillus sp.* GRE1: characterization and gene isolation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 2517-2524.
- Haki, G.D. ve Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89, 17–34.

- Hamilton, L. M., Kelly, C. T. ve Fogarty W. M., 1999. Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. Process Biochemistry, 35, 27–31.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T. ve Fogarty W. M., 1999. Purification and properties of the raw starch-degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. Biotechnology Letters, 21, 111–115.
- Hayashida, S., Teramoto, Y. ve Inoue, T., 1988. Production and characteristics of raw potato starch digesting  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* 65. Appl. Environ. Microbiol., 54, 1516-1522.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochem. J., 280, 309-316.
- Hmidet, N., Bayouhd, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N. ve Nasri, M., 2008. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Licheniformis* NH1. Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escheria coli*. Process Biochemistry, 43, 499-510.
- Hmidet, N., Maalej, H., Haddar, A. ve Nasri, M., 2010. A novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and biochemical characterization. Appl. Biochem. Biotechnol., 162, 1018-1030.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Agihara, H., Saeki, K., Takaiwa S., Kobayashi, T. ve İto. S., 1998. Enzymatic Properties of a Novel Liquefying  $\alpha$ -Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus* Isolate and Entire Nucleotide and Amino Acid Sequences. Applied and Environmental Microbiology, 64, 9, 3282-3289.
- Ivanova, V., Dobрева, E. ve Emanuilova, E., 1993. Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, J. Biotechnol., 28, 277–289.
- Janecek, S., 1997.  $\alpha$ -Amylase Family: Molecular Biology and Evaluation. Prog. Biophys. Molec. Biol., 67, 1, 67-97.
- Keskin, H., 1982. Besin Kimyası. Cilt II. S : 558. Fatih Yayınevi, İstanbul.
- Kim, J.S., Cha, S.S., Kim, H.J., Kim, T.J., Ha, N.C., Oh, S.T., Cho, H.S., Cho, M.J., Kim, M.J., Lee, H.S., Kim, J.W., Choi, K.Y., Park, K.H. ve Oh, B.H., 1999. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. J. Biol. Chem., 274, 26279-26286.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. ve Chaudhary, K., 2001. Thermostable, alkaliphilic and cellulase free xylanases production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. Enzyme Microb. Technol., 28, 606–610.
- Krahe, M., Antranikian, G. ve Markel, H., 1996. Fermentation of extremophilic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev., 18, 271–285.
- Krishnan, T. ve Chandra, A.K., 1983. Purification and Characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Licheniformis* CUMC305. Applied and Environmental Microbiology, 46, 2, 430-437.
- Kristjansson, J. K. ve Stetter, K. O., 1992. Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J. K.(Ed.), CRC Pres, Boca Raton.

- Kristjansson, J. K., 1989. Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes. Trend Biotechnol., 7, 349.
- Kumar, S. ve Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. Cell. Mol. Life Sci., 58, 1216–1233.
- Kuriki, T., Takata, H., Okada, S. ve Imanaka, T., 1991. Analysis of active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. J. Bacteriol., 173, 105, 6147-6152.
- Kwak, Y. S., Akiba, T. ve Kudo T., 1998. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyzes both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 glucosidic linkages. Journal of Fermentation and Engineering, 86, 363-367.
- Lehninger A.L., 1982. Principles of Biochemistry; First printing, Worth Publisher, 432-478.
- Leuschner, C. ve Antranikan, G., 1995. Heat stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic micorganisms. World J. Microbiol. Biotechnol., 11, 95–114.
- Li, W.F., Zhou, X.X. ve Lu, P., 2005. Structural features of thermozymes. Biotechnol Adv., 23, 271–281.
- Lin L. L., Chyau C.C. ve Hwei, H. W., 1998, Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. Biotechnology and Applied Biochemistry, 28, 61-68.
- Lo, H., Lin, L., Chen, H., Hsu W. ve Chang, C., 2001. Enzymic properties of a SDS-resistant *Bacillus sp* TS-23 alpha-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. Process Biochemistry, 36, 743-750.
- Lopez, G., 1999. DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life. J. Mol. Evol., 46, 439–452.
- Lowe, S.E., Jain, M.K. ve Zeikus, J.G., 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. Microbiol. Rev., 57, 451–509.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Rao, M. D., Ratnam B.V.V., Ramesh D.V. ve Ayanna C., 2005. Rapid Method for the affinity purification of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Licheniformis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 371-375.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. ve Parker, J., 2000. Brock Biology of Microorganisms. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Maldonado H.G. ve Lopez O. P., 1995, Amylolytic enzymes and products derived from starch. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, 373-403.
- Malhotra, R., Noorwez, S.M. ve Satyanarayana, T., 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54, Appl. Microbiol., 31, 378–384.

- Mamo, G., Gashe, B. A. ve Gessesse, A., 2001. A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. Journal of Applied Microbiology, 86, 557-560.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manning, G.B. ve Campbell, L.L., 1961. Thermostable  $\alpha$ -Amylase of *Bacillus stearothermophilus*. J. Biol. Chem., 236, 11, 2952-2957.
- Marco, J.L., Bataus, L.A., Valencia, F.F., Ulho C.J., Astolfi-Filho, S. ve Felix, CR., 1996. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase produced by *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol., 44, 746-752.
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. ve Kakudo, M., 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. J. Biochem., 95, 697-702.
- McCarter, J.D. ve Withers, S.G., 1996. Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. J. Biol. Chem., 271, 6889-6894.
- Mcmahon, H. E.M., Kelly, C.T. ve Fogarty W. M., 1999. Thermostability of three  $\alpha$ -amylases of *Streptomyces* sp IMD 2679. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 22, 96-99.
- Meer, J.L., 1972. The Regulation Of  $\alpha$ -Amylase Production in *Bacillus licheniformis*. Antonievon Leuvenhoek: J. Microb. Serol., 38, 570-585.
- Michelena, V.V. ve Castillo, F.J., 1984. Purification and characterization of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flavor medium. J. Appl. Bacteriol., 56, 395-407
- Michelin, M., Silva, T.M., Benassi, V.M., Peixoto-Nogueira, S.C., Moraes, L.A.B., Leao, J.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F. ve Polizeli, M.L., 2010. Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotti*. Carbohydrate Research, 345, 2348-2353.
- Miller, C.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. Anal. Chem., 31, 426-428.
- Miquel, P., 1988. Monographie d'un Bacille Vant Au-Dela de 70 ° C, Ann. Micrographic, 1, 3.
- Mollania, N., Khajeh, K., Hosseinkhani, S. ve Dabirmanesh, B., 2010. Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. LH8. International Journal of Biological Macromolecules, 46, 27-36.
- Morgan, F. J. ve Priest F. G., 1981. Characterization of a Thermostable  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Journal of Applied Microbiology, 50, 107-114.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. Trends Biotechnol., 11, 88-95.
- Muralikrishna, G. ve Nirmala, M., 2005. Cereal  $\alpha$ -amylases-an overview. Carbohydrate Polymers, 60, 163-173.

- Najafi, M. F. ve Kembhavi, A., 2005. One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio sp.* Enzyme and Microbial Technology, 36, 535-539.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D. ve Deobagkar, D., 2005. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Subtilis* AX20. Protein Expression and Purification, 41, 349-354.
- Nazmi, A.R., Reinisch, T. ve Hinz H.J. 2006. Ca-binding to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA). Archives of Biochemistry and Biophysics, 453, 18–25.
- Nielsen E., J. ve Borchert, T. V., 2000. Protein engineering of bacterial K-amylases. Biochimica et Biophysica Acta., 1543, 253-274.
- Okolo, B.N., Ire FS, Ezeogu, L., Anyanwu, C.U. ve Odibo, F.J.C., 2000. Purification and some properties of a novel raw starch digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. J. Sci. Food. Agric., 81: 329-336.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. ve Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. Biotech. and Appl. Biochem., 31,135-152.
- Paquet, V., Croux, C., Goma, G. ve Soucaille, P., 1991. Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol., 57, 212-218.
- Park, K.H., Kim, T.J., Cheong, T.K., Kim, J.W., Oh , B.H. ve Svensson, B., 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the  $\alpha$ -amylase family. Biochimica et Biophysica Acta., 1478, 165-185.
- Pazarlıoğlu, N., 1999. Enzim Üretimi ve Saflaştırılması. Enzimoloji. (Telefoncu, A.-ed.). E.Ü. Fen. Fak. 139-176. İzmir.
- Planchot, V. ve Colonna, P., 1995. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus fumigatus*. Carbohydrate Research, 272, 97–109.
- Poonam, N. ve Dalel, S., 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme Microb. Technol., 17, 770–778.
- Radley, J.A., 1976. Production of Microbial Amylolytic Enzymes : Starch Production Technology (L.A. Underkofler Editör). Chapter 16., Applied Science Publisher Ltd., England, 295-309.
- Rao, M. D., Ratnam B.V.V., Ramesh, D. V. ve Ayyanna, C., 2005. Rapid method for affinity purification of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Licheniformis*. World Journal of Microbiology and Biothecnology, 21, 371-375.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y. ve Izaki, K., 1992. Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. Appl. Environ Microbiol., 58, 2490-2494.
- Robyt, J., ve Ackerman, R.J., 1971. Isolation, purification and characterization of a maltotetraose producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*. Arch Biochem Biophys., 145, 105-114.
- Rüdiger, A., Sunna A. ve Antranikian G., 1994. Enzymes from extreme thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. Carbohydrases, 946-961.

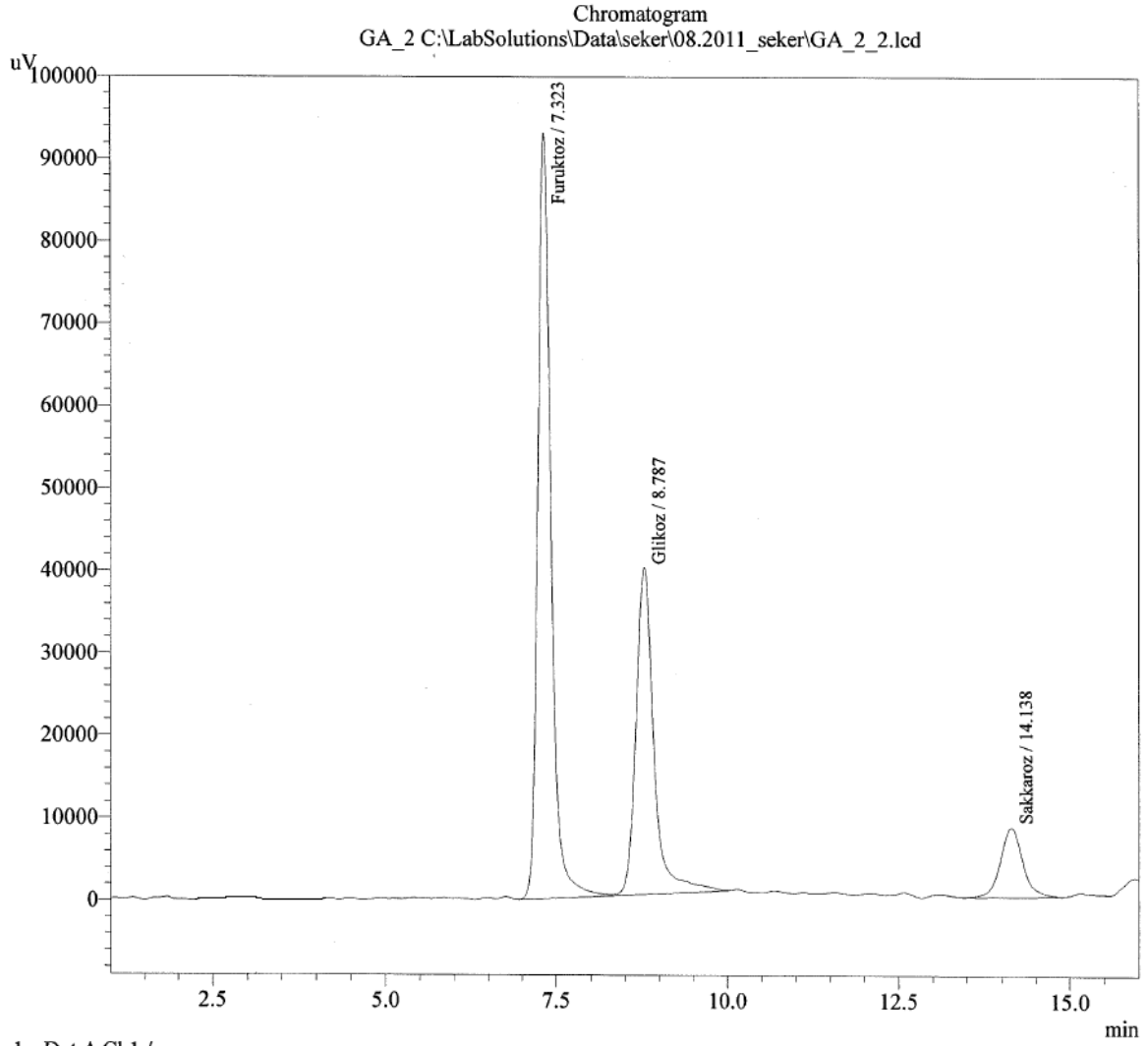
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Rnjbar, B., Asoodeh, A. ve Moradian, F., 2005. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active site and stable at low pH from the *Bacillus sp.* KR-8104. Enzyme and Microbial Thecnology. 36, 666-671.
- Sarıkaya, E., 1995.  $\alpha$ -Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Segel, H. I., 1976. Biochemical Calculations. John Willey&Sons, New York, USA.
- Sidkey, N. M., Abo-Shadi, M. A., Balahmar, R., Sabry, R. ve Badrany, G., 2011. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F2Mbb. International Research Journal of Microbiology, 2, 96-103.
- Svensson, B., 1994. Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability, Plant Mol. Biol., 25, 141-157.
- Swinkels, J.J.M., 1985. Composition and properties of commercial native starches. Starch, 37, 1-5.
- Taniguchi, A. ve Honnda, Y., 2009. Amylases, Applied Microbiology: Industrial, 159-173.
- Tao, B.Y., Reilly, P.J. ve Robyt, J.F., 1989. Detection of a covalent intermediate in the mechanism of action of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase by using  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. Biochim. Biophys. Acta., 995, 214-220.
- Tarakçıoğlu, Y., 1979. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem., 49, 4, 1091-1097.
- Telefoncu, A., 1999. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları. Enzimoloji. (Telefoncu, A.-ed.). Fen Fak. Yayınları No: 249-306. İzmir.
- Uhling, H., 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley&Sons, Inc.
- Uitdehaag, J.C.M., Mosi, R., Kalk, K.H., VanderVeen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G. ve Dijkstra, B.W., 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. Nat. Struct. Biol., 6, 432-436.
- Upadek H. ve Kottwitz, B., 1997. Application of amylases in detergents. Enzymes in detergency, Inc, NewYork, 203-212.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starchconverting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. J. Biotechnol., 94, 137-155.
- Vieille, C. ve Zeikus, J.G., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiol Mol Biol R., 65, 1-43.
- Vieille, C., Burdette, D.S. ve Zeikus, J.G., 1996. Thermozyms. Biotechnol. Annu. Rev., 2, 1-83.
- Vihinen, M. ve Mantsala, P., 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase. Biotechnol Appl Biochem., 2, 427-435.
- Windish, W.W. ve Mhatre N.S., 1965, Microbial amylase, Advanture Applied Microbial., 7, 273-304.



- Wiseman, A., 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, 274-373.
- Yandri, Suhartati, T. ve Hadi, Sutopo., 2010. Purification and Characterization of Extracellular  $\alpha$ -Amylase Enzyme from Local Bacteria Isolate *Bacillus Subtilis* ITBCCB148. European Journal of Scientific Research, 39, 64-74.
- Yenson, M., 1981, İnsan Biyokimyası, İst. Üniv. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü, 143-145.

## 8. EKLER

Shimadzu 1  
Acquired by : Admin Method Filename : r1d\_metod.lcm  
Batch Filename : seker tek\_yeni.lcb Data Filename : GA\_2\_2.lcd  
Date Acquired : 20.04.2012 11:14:08  
Data Processed : 24.04.2012 14:07:13  
Sample Name : GA\_2  
Sample ID :  
Vial# : 2  
Injection Volume : 10 uL  
Dilution Factor : 200

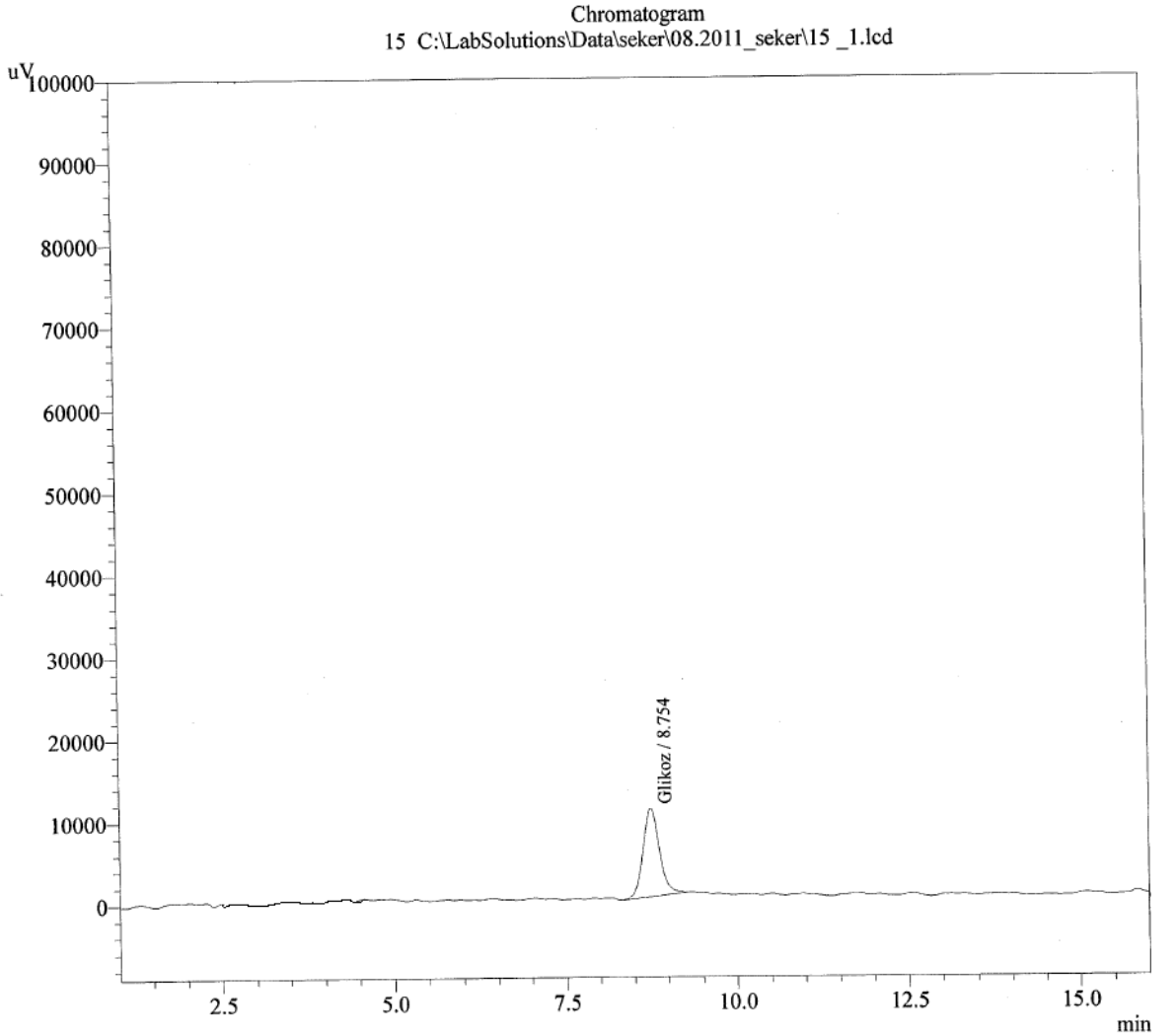


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Conc.	Units
1	7.323	1246787	92937	Furuktoz	37.690	%
2	8.787	732553	39647	Glikoz	35.518	%
3	14.138	189839	8393	Sakkaroz	5.732	%
Total		2169179	140977			

Ek Şekil 1. Glukoz, Fruktoz ve Sakkaroz standartlarının HPLC Kromotogramları

Shimadzu 1  
 Acquired by : Admin Method Filename : rd\_metod.lcm  
 Patch Filename : seker tek\_yeni.lcb Data Filename : 15\_1.lcd  
 Date Acquired : 24.04.2012 10:56:35  
 Data Processed : 24.04.2012 13:35:15  
 Sample Name : 15  
 Sample ID :  
 Inial# : 1  
 Injection Volume : 10 uL  
 Dilution Factor : 200



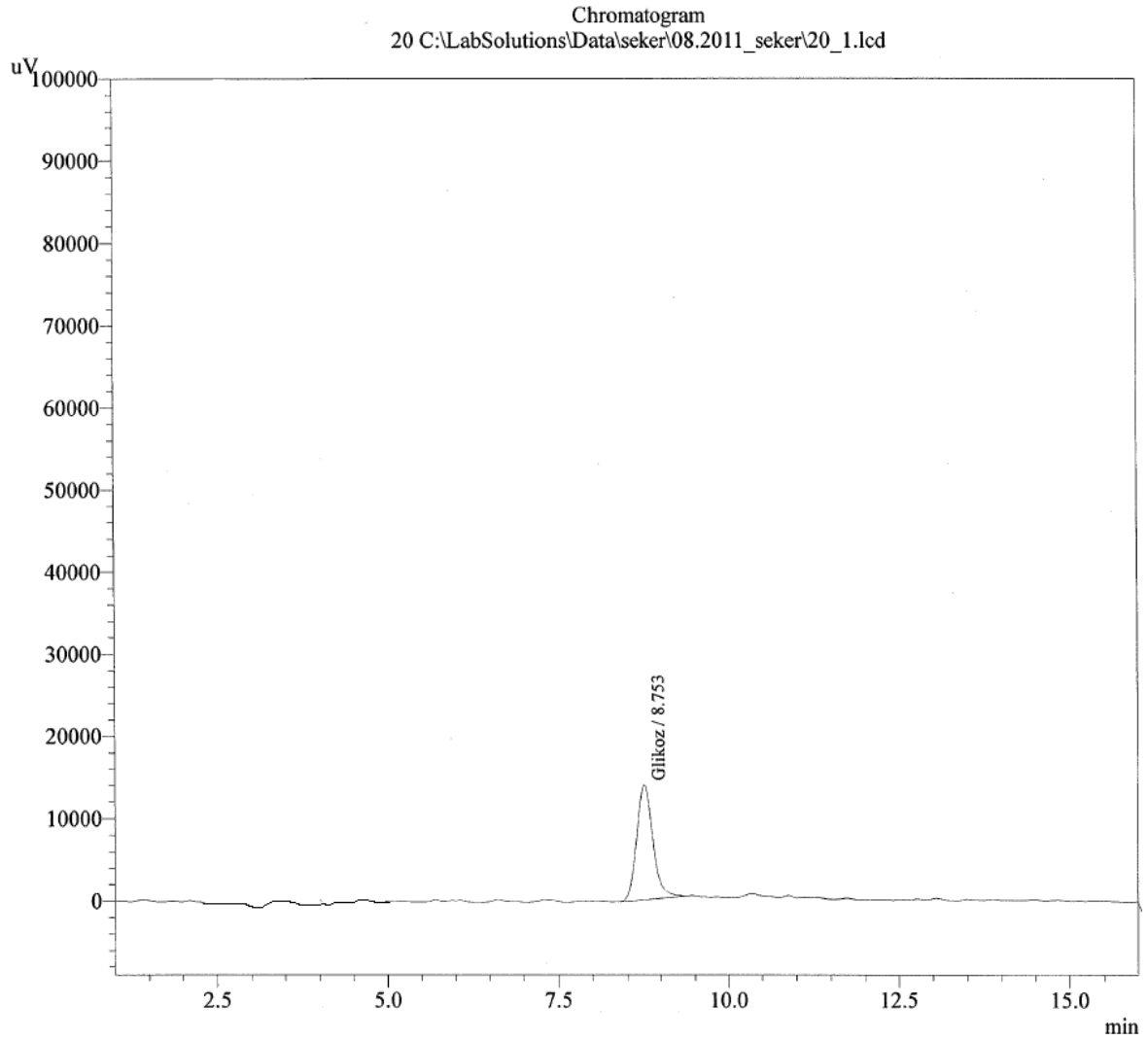
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Conc.	Units
1	8.754	182236	10704	Glikoz	8.836	%
Total		182236	10704			

Ek Şekil 2. Enzim ile substratın 10 dakika inkübasyon sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı

Shimadzu 1

Required by : Admin Method Filename : rid\_method.lcm  
 Patch Filename : seker tek\_yeni.lcb Data Filename : 20\_1.lcd  
 Date Acquired : 24.04.2012 11:22:59  
 Data Processed : 24.04.2012 13:32:22  
 Sample Name : 20  
 Sample ID :  
 Inj. Volume : 10 uL  
 Dilution Factor : 200



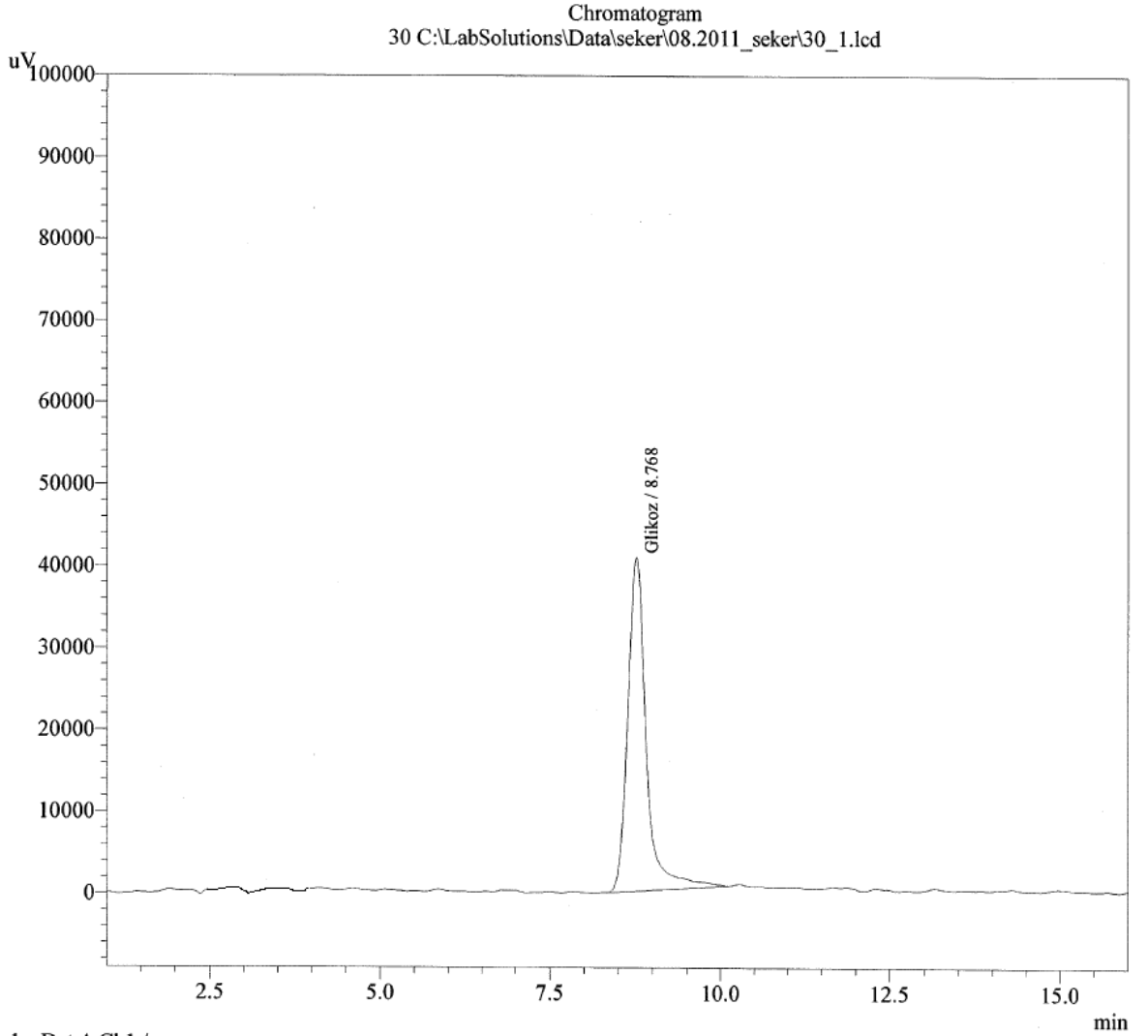
PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Conc.	Units
1	8.753	238233	13892	Glikoz	11.551	%
Total		238233	13892			

Ek Şekil 3. Enzim ile substratın 20 dakika inkübasyon sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı

Shimadzu 1  
 Acquired by : Admin Method Filename : rid\_metod.lcm  
 Patch Filename : seker tek\_yeni.lcb Data Filename : 30\_1.lcd  
 Date Acquired : 24.04.2012 12:19:03  
 Data Processed : 24.04.2012 13:33:03  
 Sample Name : 30  
 Sample ID :  
 Inial# : 1  
 Injection Volume : 10 uL  
 Dilution Factor : 200

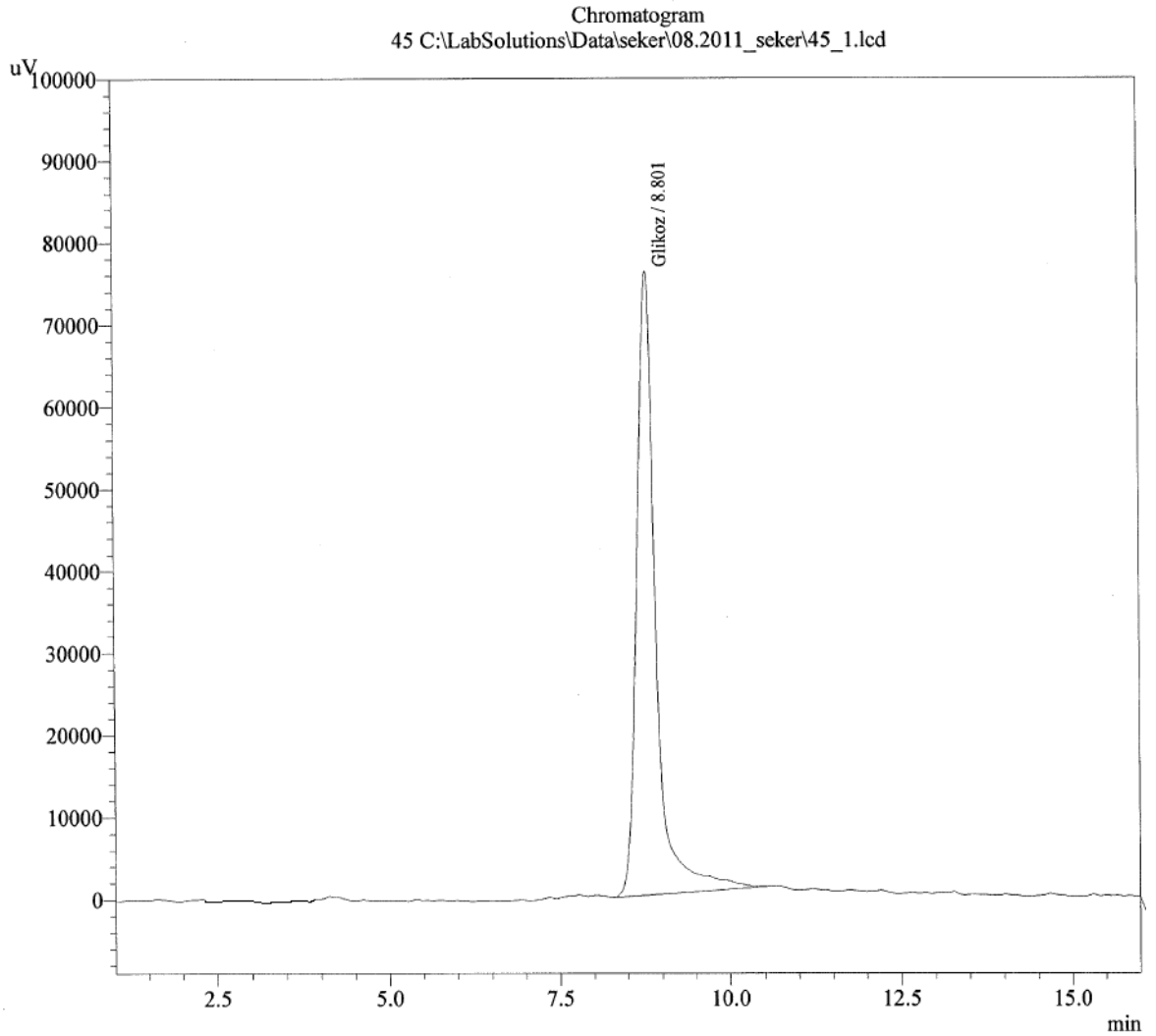


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Conc.	Units
1	8.768	766437	40796	Glikoz	37.161	%
Total		766437	40796			

Ek Şekil 4. Enzim ile substratın 30 dakika inkübasyonu sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı

Shimadzu 1  
 Acquired by : Admin Method Filename : rid\_metod.lcm  
 Patch Filename : seker tek\_yeni.lcb Data Filename : 45\_1.lcd  
 Date Acquired : 24.04.2012 12:47:55  
 Data Processed : 24.04.2012 13:33:44  
 Sample Name : 45  
 Sample ID :  
 Serial# : 1  
 Injection Volume : 10 uL  
 Dilution Factor : 200



PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Conc.	Units
1	8.801	1455463	75913	Glikoz	70.569	%
Total		1455463	75913			

Ek Şekil 5. Enzim ile substratın 45 dakika inkübasyonu sonrası oluşan ürünlerin kromotogramı



## ÖZGEÇMİŞ

01.02.1982 yılında Antalya'nın Gazipaşa İlçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gazipaşa'da tamamladı. 1999 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2003 yılında lisansını tamamladı.

2003 Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İlk yıl İngilizce hazırlık programına katıldı. 2005 yılı Kasım ayında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümün de Okutman olarak göreve başladı.2006 yılında yüksek lisansını bitirip aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde doktora eğitimine başladı. Bir çocuk annesi olup halen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesinde görevine devam etmekte ve iyi derecede İngilizce bilmektedir.