

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

B.licheniformis ATCC 27811 KÖKENLİ
REKOMBİNANT ALFA-AMİLAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Abdullah SARRAÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2005

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

B.licheniformis ATCC 27811 KÖKENLİ
REKOMBİNANT ALFA-AMİLAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Abdullah SARRAÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Füsun GÜMÜŞEL

GEBZE
2005

ÖZET

α -Amilazlar (α -1,4-glukan-4-glukanhidrolaz; EC 3.2.1.1) kalsiyum taşıyan ve endo-amilazlar enzim ailesine üye bir enzim grubudur. Dünya enzim pazarının % 30'unu oluşturan amilazlar, günümüzde şekerlendirme, tekstil, gıda, mayalama, damıtma, deterjan, kağıt ve yakıt alkol üretimi gibi birçok endüstriyel süreçte yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardan, bitkilere ve diğer yüksek organizasyonlu canlılara kadar birçok canlı türünde bulunan α -amilazlar; karbohidrat metabolizmasında önemli bir role sahiptirler. Son yıllarda, sıcaklığa dayanıklı α -amilazların endüstriyel uygulamalarda başarıyla kullanılmaları; yüksek sıcaklık, geniş pH aralıkları ve zor çevresel koşullarda aktivite gösterebilen, α -amilazlar üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır.

Bu tez çalışmasında; *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 kökenli rekombinant α -amilazın üretimi, saflaştırılması ve nitelendirilmesi hedeflenmiştir.

Rekombinant α -amilaz, amonyum sülfat çöktürmesi, Q-sefaroze FF anyon değiştirme ve Sefakril S-200 HR moleküler elek kolon kromatografilerinin kullanıldığı bir sistemle, başlangıç örneğine oranla % 13.4 verimle ve ~653 kez saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizi bulgularına göre; rekombinant α -amilazın moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak önerilmiştir. Yapılan zimogram analizinde, 55 kDa büyüklüğündeki banda karşı gelen kısımda, hidrolize uğrayan nişastanın sarı renkli bir bölge oluşturduğu gözlenmiştir.

Rekombinant α -amilazı nitelendirme çalışmaları kapsamında optimum sıcaklık ve pH ile, sıcaklık ve pH kararlılıkları yönünden test edilmiştir. Enzimin en yüksek aktiviteyi 87 °C'ta gösterdiği ve 77 °C'ta, başlangıçtaki aktivitesinin % 98'ini bir saat boyunca koruduğu görülmüştür. En yüksek aktivite değeri pH, 7.0'da elde edilmiş, rekombinant α -amilazın pH 7.0-12 aralığında kararlı olduğu bulunmuştur.

Metal iyonlarından, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Na^{+} , enzim aktivitesinde bir değişikliğe neden olmadığı halde, K^{+} ve Ba^{+2} 'un aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir. Düşük derişimdeki Al^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının enzim aktivitesini hafifçe arttırmasına karşın, yüksek derişimler inhibisyona neden olmakta, Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonları kuvvetli inhibitörler olarak göze çarpmaktadır.

İyonik ve iyonik olmayan deterjanlar ile yapılan testlerde, α -amilazın denenen tüm deterjanlara karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, EDTA'nın enzimi inhibe ettiği, DTT ve β -merkaptotanolün enzim aktivitesini arttırdığı, PMSF'in ise enzim aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir. Gliserol ve DMSO'nun enzimin sıcaklık kararlılığını arttırdığı buna karşın, EG'ün azalttığı belirlenmiştir.

SUMMARY

In this study, we aimed to cultivate, purify and characterize recombinant α -amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 27811, expressed in *Bacillus subtilis*.

After a cultivation step, we purified recombinant α -amylase with a combination of Ammonium sulfate precipitation, Q-sepharose FF anion exchange and Sephacryl S-200 HR gel exclusion column chromatographies, ~ 653 fold with a yield of 13.4 %. In order to determine molecular mass of the enzyme, SDS-PAGE analysis was performed and the molecular mass of α -amylase is predicted as ~ 55 kDa.

For characterization studies, the enzyme is tested for its optimal temperature and pH, besides its pH and thermo-stability. The optimum temperature and pH of the enzyme are found to be 87 °C and pH 7.0 respectively. The enzyme is determined to be resistant to 77 °C for one hour. The enzyme was stable between pH, 7.0 – 12.0.

Besides, on the purified enzyme, effects of several metal ions, detergents and various chemicals which are known with their inhibitory, activatory or stabilizing effects were also tested.

On the enzyme activity, there were no significant effect of the metal ions such as Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} and Na^{+} . But, it was shown that K^{+} and Ba^{+2} are potent activators of the recombinant α -amylase. The metal ions, Al^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} and Fe^{+3} which are known as heavy metals that increased the enzyme activity at low concentrations while their high levels showed inhibitory effect. Cu^{+2} and Zn^{+2} ions were found to be strong inhibitors of the enzyme.

All the detergents tested have no significant denaturant effect on the α -amylase whereas EDTA is a strong inhibitor of the enzyme. Sulphydril reducing agents, DTT and β -mercaptoethanol increased enzyme activity while PMSF had no significant activatory effect on the enzyme.

DMSO which is an organic solvent, interestingly elevated the enzyme activity to % 580. It was shown that glycerol has a stabilizing effect on the enzyme, while EG decreased the activity.

TEŞEKKÜR

Söze başlarken, bu tez çalışması boyunca, bir danışman, bir öğretmen ve bir anne olarak bizlere doğruyu gösterme adına hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, çok değerli hocam, Prof. Dr. Füsün GÜMÜŞEL'e şükranlarımı sunmak istiyorum. Güler yüzü, bilgisi ve deneyimiyle bizlere ilham kaynağı olan, Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK'e ve akademik ve sosyal konulardaki desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarı bir bilim ocağının yanında, sıcak bir arkadaşlık ortamına dönüştüren, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, Arş. Gör. Merve TUZLAÇOĞLU, Arş. Gör. Mutlu BATTAL ve Arş. Gör. Nagihan AKBULUT'a, okul içinde ve dışında hep yanımda olan, zorlukları ve güzellikleri paylaştığımız can dostum Alper ALDENİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

İmmobilizasyon ön denemesindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN ve Arş. Gör. Oltan CANLI'ya özel olarak teşekkür ederim.

Doğduğum günden beri, başarıyı kendi başarıları sayan ve bunun için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan Anneme, Babama ve kardeşlerime ve hayatıma yeni girdiği halde, bana çok şey katan sevgili eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLERDİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. α -Amilaz Kaynakları	1
1.2. α -Amilazların Sınıflandırılması	2
1.2.1. Amilazların Substrat Özgüllüklerine Göre Sınıflandırılması	3
1.2.2. α -Amilazların DNA Dizilerine Göre Sınıflandırılması: ‘CAZy’ Veri Tabanı	5
1.3. α -Amilazın Kullanım Alanları	6
1.3.1. Ekmek ve Fırıncılık Endüstrisi	7
1.3.2. Endüstriyel Glukoz ve Fruktöz Üretimi	8
1.3.3. Tekstil Endüstrisi ve Haşılama	10
1.3.4. Kağıt Endüstrisi	11
1.3.5. Deterjan Endüstrisi	11
1.3.6. Siklodekstrin Üretimi	12
1.3.7. Çeşitli Uygulamalar	12
1.4. α -Amilaz	13
1.4.1. α -Amilazın Biyokimyasal Özellikleri	13
1.4.2 α -Amilazın Yapısal ve Katalitik Özellikleri	15
1.5. α -Amilazın Üretimi ve Saflaştırılması	19
1.5.1. α -Amilazın Üretimi	19
1.5.2. α -Amilazın Saflaştırılması	19
1.6. Protein Saflaştırma Teknikleri	20
1.6.1. Çöktürme Yöntemleri	21
1.6.2 Kromatografik Yöntemler	22

1.6.2.1. İyon Değişirme Kromatografisi	23
1.6.2.2. Moleküler Elek Kromatografisi	24
1.6.2.3. Afinite Kromatografisi	24
1.7. <i>Bacillus subtilis</i> 'in Moleküler Biyolojik ve Biyoteknolojik Uygulamalardaki Yeri	24
1.8. Tezin Amacı	26
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
2.1. Gereçler	27
2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi	27
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	29
2.2. Yöntem	30
2.2.1. <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 27811 Kökenli Rekombinant α -amilazın, amy-pUC19- <i>Bacillus subtilis</i> Hücrelerinde Üretimi ve Saflaştırılması	30
2.2.1.1. α -amilazın Klonlanması ve Ekspresyonunun Optimize Edilmesi	30
2.2.1.2. Rekombinant <i>Bacillus subtilis</i> Hücrelerinin Üretimi	31
2.2.1.3. Rekombinant α -Amilaz Üreticisi <i>Bacillus subtilis</i> Hücrelerinin Sonikasyonu	33
2.2.1.4 Rekombinant α -Amilazın Saflaştırılması	33
2.2.2. α -Amilaz Aktivite Testi	37
2.2.3. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi	39
2.2.4. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi) analizi	40
2.2.5. Zimogram Analizi	42
2.2.6. Rekombinant α -Amilazın Nitelendirilmesi	43
2.2.6.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığının Belirlenmesi	43
2.2.6.2. Optimum Reaksiyon pH'sının Belirlenmesi	44
2.2.6.3. Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi	44
2.2.6.4. pH Kararlılığının Belirlenmesi	44
2.2.6.5. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	45
2.2.6.6. Deterjanların Enzim Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi	45

2.2.6.7. Bazı Efektör Maddelerin α -Amilaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi	45
2.2.6.8. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi	46
2.2.7. Poligluteralehit Polistirendivinil Benzen Matriksi İçine Rekombinant α -Amilaz İmmobilizasyonu	46
3. BULGULAR	48
3.1. <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 27811 Kökenli Rekombinant α -Amilazın, <i>amy</i> -pUC19- <i>Bacillus subtilis</i> Hücrelerinde Üretimi ve Saflaştırılması	48
3.1.1. Rekombinant <i>amy</i> -pUC19- <i>Bacillus subtilis</i> Hücrelerinin Üretimi	48
3.1.2. Rekombinant α -Amilazın, <i>amy</i> -pUC19- <i>Bacillus subtilis</i> Hücrelerinden Saflaştırılması	49
3.1.3. SDS-PAGE ve α -Amilaz Aktivite Testi ile Kolon Fraksiyonlarının Seçimi	50
3.1.4. SDS-PAGE Analizi ile Moleküler Ağırlık Tayini	53
3.1.5. Zimogram Analizi ile Rekombinant α -Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	55
3.2. Rekombinant α -Amilazın Nitelendirilmesi	56
3.2.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığı	56
3.2.2 Optimum Reaksiyon pH'sı	56
3.2.3. Sıcaklık Kararlılığı	57
3.2.4. pH Kararlılığı	58
3.2.5. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	59
3.2.6. Deterjanların Enzim Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi	61
3.2.7. Bazı Efektör Maddelerin Rekombinant α -Amilaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi	63
3.2.8. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi	64
3.2.9. Poligluteralehit Polistirendivinil Benzen Matriksi İçine Rekombinant α -Amilaz İmmobilizasyonu	66
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	67

KAYNAKLAR

84

ÖZGEÇMİŞ

92

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	alfa
β	beta
AlCl_3	Alüminyum Klorür
BaCl_2	Baryum Klorür
CaCl_2	Kalsiyum Klorür
CoCl_2	Kobalt Klorür
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromid
CuCl_2	Bakır Klorür
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FeCl_3	Demir Klorür
FeSO_4	Demir Sülfat
HCl	Hidrojen Klorür
IPTG	İzopropil- β -D-tiogalaktozid
KCl	Potasyum Klorür
MgCl_2	Magnezyum Klorür
MnCl_2	Mangan Klorür
Na_2HPO_4	Sodyum Hidrojen Fosfat
NaH_2PO_4	Sodyum (II) Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH_4Ac	Amonyum Asetat
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum Sülfat
NiCl_2	Nikel Klorür
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
SDS	Sodyumdodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
ZnCl_2	Çinko Klorür
ZnSO_4	Çinko Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. α -Amilazın sınıflandırılması (Enzim Komisyonu)	3
1.2. Nişastanın hidrolizine katılan enzimler	4
1.3. Nişastadan endüstriyel olarak siklodekstrin, maltodekstrin, glukoz veya fruktoz şurubu ve kristal şeker üretimi	10
1.4. <i>B. licheniformis</i> α -amilazı	18
1.5. Genel bir protein izolasyonunun akış şeması	22
3.1. <i>amy</i> -pUC19- <i>B.subtilis</i> soyunda büyüme eğrisi ve enzim aktivitesi	48
3.2. Q-sefaroze kromatografisi fraksiyonlarına karşı çizilen α -amilaz aktivitesi ve A280 absorbans grafiği	51
3.3. Q-sefaroze anyon değiştirme kromatografisi fraksiyonları ile yapılan SDS-PAGE analizi	51
3.4. Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografisi fraksiyonlarına karşı çizilen α -amilaz aktivitesi ve A280 absorbans grafiği	52
3.5. Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografisinin ardından seçilen fraksiyonlarla yapılan SDS-PAGE analizi	53
3.6. Rekombinant α -amilazın moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi	54
3.7. Rekombinant α -amilazın zimogram analizi	55
3.8. Rekombinant α -amilazın optimum sıcaklık grafiği	56
3.9. Rekombinant α -amilazın optimum pH grafiği	57
3.10. Rekombinant α -amilazın sıcaklık kararlılığı grafiği	58
3.11. Rekombinant α -amilazın pH kararlılığı grafiği	59
3.12. Çeşitli metal iyonları ve NH_4Ac 'ın rekombinant α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	60
3.13. Çeşitli deterjanların enzim kararlılığı ve aktivitesi üzerine etkisi	63

3.14. Bazı efektör maddelerin rekombinant α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi	64
3.15. Çeşitli kimyasal maddelerin enzim sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi	65

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Mikrobiyal α -amilaz kaynakları	2
1.2. Glukoz içeren substratlar üzerinde etki gösteren α -amilazlar ailesine ait enzimler	16
1.3. Kromatografi çeşitleri	23
2.1. Bradford kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve toplam protein miktarının hesaplanması	40
3.1. Rekombinant α -amilazı saflaştırma tablosu	50
3.2. Çeşitli metal iyonları ve NH_4Ac 'ın rekombinant α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	62
3.3. Çeşitli deterjanların enzim kararlılığı ve aktivitesi üzerine etkisi	61
3.4. Bazı efektör maddelerin rekombinant α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi	63
3.5. Çeşitli kimyasal maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi	65

1. GİRİŞ

α -Amilazlar (α -1,4-glukan-4-glukanhidrolaz; EC 3.2.1.1) kalsiyum taşıyan ve endo-amilaz enzim ailesine üye olan bir enzim grubudur. Endo-amilazlar nişasta ve benzer yapıdaki karbohidratlardaki α -D-(1-4) glikozidik bağlarını kırarak, α -anomerik konfigürasyona sahip ürünler oluşturan enzimlerdir. Mikroorganizmalardan, bitkilere ve diğer yüksek yapılı canlılara kadar birçok canlı türünde bulunan α -amilazlar, karbohidrat metabolizmasında önemli bir role sahiptirler (Kandra, 2003). α -Amilazların temel substratı olan nişasta; buğday, pirinç, tapyoka ve patates gibi ekonomik öneme sahip mahsüllerin ana depo maddesidir. Nişasta içeren bitkiler, doğrudan tüketilebildikleri gibi, nişastanın kimyasal ve enzimatik süreçler ile işlenmesi yoluyla elde edilen bir çok ürünün de kaynağını oluştururlar (van der Maarel et al., 2002). Amilaz ailesindeki enzimler ve özellikle α -amilaz, endüstriyel bir çok alanda kullanılmakta ve biyoteknolojinin getirdiği imkanlar doğrultusunda, enzim pazarındaki yerini her geçen gün daha da kuvvetlendirmektedir (Pandey et al., 2000).

1.1. α -Amilaz Kaynakları

α -Amilaz, bir çok bakteri, arkea, maya, fungus, hayvan ve bitkiden elde edilebilen bir enzimdir (Gupta et al., 2003; Kwak et al., 1998; Wanderley et al., 2004; Kusuda., 2003; Ragunath et al., 2002; Nirmala and Muralikrishna, 2003). α -Amilazların çeşitli canlılardan elde edilebilmesine karşın, endüstriyel uygulamalar için genellikle mikroorganizmalardan (Tablo 1.1.) ve özellikle de bakterilerden elde edilen α -amilazlar tercih edilmektedir. Ürettikleri α -amilazlar endüstriyel uygulamalardaki düşük/yüksek pH gereksinimlerine cevap verebildikleri ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı oldukları için, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus licheniformis* en çok tercih edilen bakteriyel α -amilaz kaynaklarıdır (Pandey et al., 2000).

Tablo 1.1. Mikrobiyal α -amilaz kaynakları (Pandey et al., 2000).

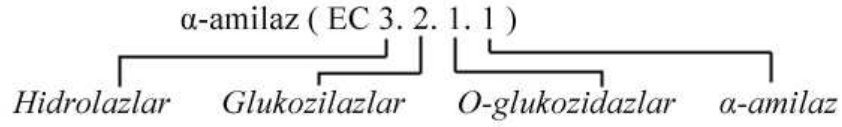
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Halobacterium halobium</i>
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	<i>H. salinarium</i>
<i>Alteromonas haloplanetis</i>	<i>Humicola insolens</i>
<i>Anaerobic bacterium</i>	<i>H. lanuginosa</i>
<i>Archaeobacterium pyrococcus woesei</i>	<i>H. stellata</i>
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>A. awamori</i>	<i>L. cellobiosus</i>
<i>A. flavus</i>	<i>Malbranchea pulchella var. Sulfurea</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>A. kawachi</i>	<i>M. varians</i>
<i>A. niger</i>	<i>Micromonospora vulgaris</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Mucor pusillus</i>
<i>A. usanii</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Myxococcus coralloides</i>
<i>B. acidocaldarius</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Penicillium brunneum</i>
<i>B. brevis</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>B. circulans</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
<i>B. flavothermus</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
<i>B. globisporus</i>	<i>Scytalidium sp.</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Talaromyces thermophilus</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Thermus sp.</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Thermoactinomyces sp.</i>
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	<i>T. vulgaricus</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Thermococcus profundus</i>
<i>C. butricum</i>	<i>Thermomonospora viridis</i>
<i>C. thermohydrosulfuricum</i>	<i>Thermonospora curvata</i>
<i>C. thermosulfurogenes</i>	<i>T. vulgaris</i>
<i>Eubacterium sp.</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	<i>Thermotoga maritima</i>

1.2. α -Amilazların Sınıflandırılması

α -Amilaz, farklı substrat/ürün özgülüğüne, farklı enzimatik yapı ve özelliklerine sahip bir grup enzim ile birlikte, nişasta ve benzer polisakkaritlerin hidrolizini katalizleyen ve ‘amilazlar’ adı verilen enzim ailesi içinde sınıflandırılmaktadır.

Enzim Komisyonu (EC) tarafından, 3.2.1.1 EC numarası verilmiş olan α -amilaz, “Hidrolazlar” sınıfındadır (EC 3). Doğadaki 6 temel enzim sınıfından biri olan hidrolazlar, C-O, C-N, C-C ve diğer bazı bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar içerisinde, glikozidik bağları hidroliz ettiği için

glukozilazlar (EC 3.2) alt sınıfında yer alan α -amilaz, substrat özgüllüğüne göre de O-glukozidazlar (EC 3.2.1) alt-alt sınıfındadır (IUBMB, 1992).



Şekil 1.1. α -Amilazın sınıflandırılması (Enzim Komisyonu)

Amilazlar, Enzim Komisyonu’nun sınıflandırma sistemine göre, sahip oldukları substrat özgüllüklerine göre sınıflandırılabilirler gibi, Henrissat tarafından önerilen ve DNA dizilerinin esas alındığı CAZy veritabanına göre de sınıflandırılabilirler (Nilsen and Borchert, 2000).

1.2.1. Amilazların Substrat Özgüllüklerine Göre Sınıflandırılması

Doğada temel olarak 4 grup nişasta parçalayıcı enzim bulunmaktadır. Bunlar; Endo-amilazlar, Ekzo-amilazlar, “Debranching” enzimler ve transferazlar olarak sıralanabilir (van der Maarel et al., 2002).

Endo ve ekzo-amilazlar

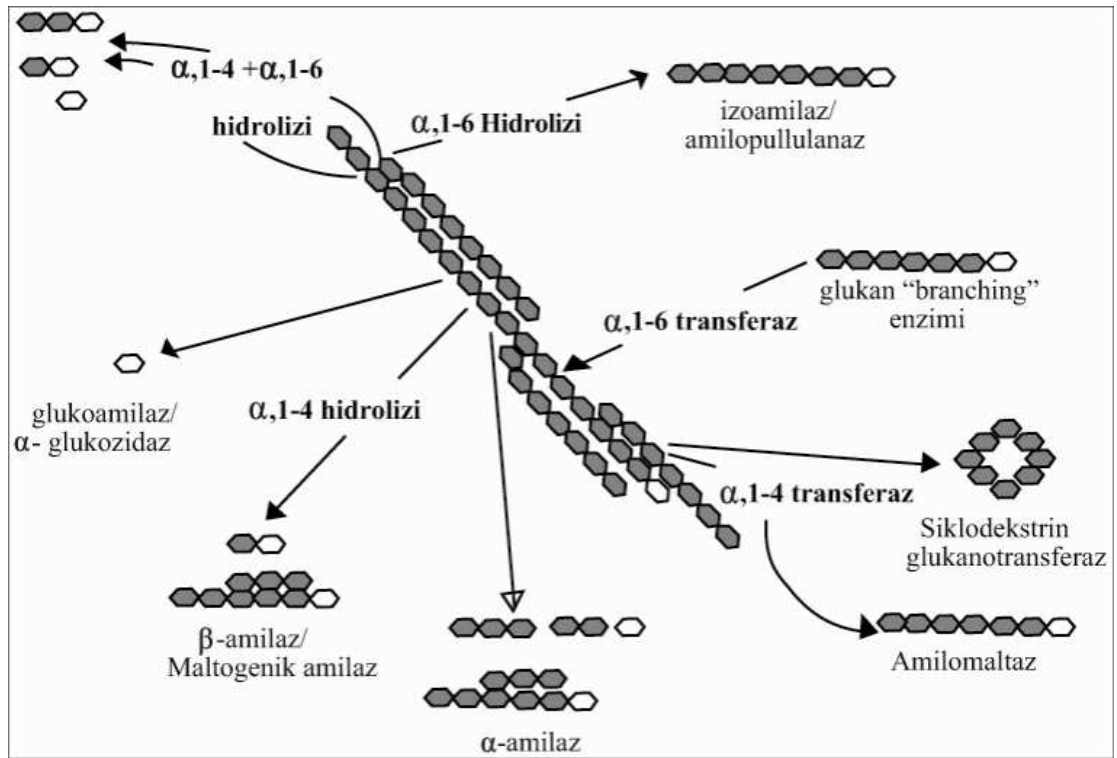
Endo-amilazlar, nişastanın iki temel birimi olan amiloz ve amilopektin zincirlerindeki iç (endo-) α ,1-4 glikozidik bağlarını kırabilen enzimlerdir. α -Amilaz (EC 3.2.1.1) iyi bilinen bir endo-amilazdır (Pandey et al., 2000). α -Amilazların enzimatik aktiviteleri sonucu oluşan son ürünler; değişik uzunluklarda ve α -konfigürasyona sahip oligosakkaritler ile dallı oligosakkaritlerden oluşan α -limit dekstrinlerdir (van der Maarel et al., 2002).

İkinci grubu oluşturan ekzo-amilazlardan β -amilaz (3.2.1.2) yalnızca α ,1-4 glikozidik bağlarını kırarken, amiloglukozidaz veya glukamilaz (EC 3.2.1.3) ile α -glukozidaz (EC 3.2.1.20) α ,1-4 ve α ,1-6 glikozidik bağlarının her ikisini de hidroliz edebilirler. Ekzo-amilazlar amilozun veya amilopektinin dış glukoz birimleri üzerinde aktivite gösterirler ve böylelikle yalnızca glukoz (glukamilaz ve α -glukozidaz), maltoz ve β -limit dekstrinlerin (β -amilaz) oluşumunu sağlarlar. Ayrıca

β -amilaz ve glukoamilaz enzimleri serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını α 'dan β 'ya çevirebilirler.

Glukoamilaz ve α -glukozidaz farklı substrat tercihlerine sahiptirler. α -Glukozidaz etkisini daha çok kısa maltooligosakkaritler üzerinde göstererek, α -konfigürasyona sahip serbest glukoz birimleri oluştururken, glukoamilazlar en iyi uzun zincirli polisakkaritleri hidroliz ederler. β -amilazlar ve glukoamilazlar da birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir (Pandey et al., 2000).

Diğer ekzo-amilazlar arasında, ek olarak transglukozilasyon aktivitesine sahip siklodekstrin glikoziltransferaz (CGTase) (EC 2.4.1.19); maltogenik α -amilaz (glukan 1,4- α -glukanhidrolaz, EC 3.2.1.133) ve maltooligosakkarit oluşturan amilazlar bulunmaktadır (maltotetraoze ve maltohekzaöz üreten amilazlar) (van der Maarel et al., 2002).



Şekil 1.2. Nişastanın hidrolizine katılan enzimler. Açık halka şeklindeki yapı, poli-glukoz molekülündeki indirgen şekerleri temsil etmektedir (van der Maarel et al., 2002).

“Debranching” Enzimler

Nişasta parçalayıcı enzimler arasındaki üçüncü grup, yalnızca α ,1-6 glikozidik bağlarını kıran izoamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanaz tip I'dir (EC 3.2.1.41). Pullulanaz ve izoamilaz arasındaki temel fark, pullulanazın, pullulan

adındaki, α ,1-6 bağlarıyla bağlanmış ve tekrar eden maltotrioz birimlerinden oluşan bir polisakkariti hidroliz edebilmesidir (Barnett et al., 1999). Pullulanaz, amilopektin ve pullulandaki α ,1-6 glikozidik bağlarını hidroliz edebilirken, izoamilaz yalnızca amilopektindeki α ,1-6 bağlarını kırabilir. Bu enzimler yalnızca amilopektini parçalayarak, uzun lineer polisakkaritlerin oluşumunu sağlarlar (van der Maarel et al., 2002).

“Debranching” enzimler arasında α ,1-4 ve α ,1-6 glikozidik bağlarını hidroliz eden bir dizi enzime de grup II pullulanazlar adı verilmekte, bu enzimler ayrıca α -amilaz-pullulanaz veya amilopullulanaz olarak da bilinmektedir. Bu enzim grubunun hidroliz ürünlerini maltoz ve maltotrioz oluşturmaktadır (Takata et al., 1992).

Transferazlar

Nişasta parçalayıcı enzimlerin dördüncü grubunu transferazlar oluşturmaktadır. Bu enzimler, verici bir moleküldeki α ,1-4 glikozidik bağı kırarak bu molekülün bir parçasını glikozidik bir alıcıya transfer ederler ve böylece yeni bir glikozidik bağ oluştururlar. Amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19) bu enzim grubuna dahildir (van der Maarel et al., 2002).

1.2.2. α -Amilazların DNA Dizilerine Göre Sınıflandırılması: ‘CAZy’ Veri Tabanı

α -Amilaz (EC 3.2.1.1) için Enzim Komisyonu tarafından verilen EC numarası 3.2.1.1 şeklinde olup reaksiyon; ‘oligosakkarit ve polisakkaritlerdeki 1,4- α -glikozidik bağlarının endo-hidrolizi’ olarak tanımlanmıştır (Nilsen and Borchert, 2000).

Çok yakın enzimatik reaksiyonları kataliz eden enzimlere farklı EC numaraları atanmaktadır. Örneğin, siklodekstrin glukano-transferaz’lar (CGTases) (EC 2.4.1.19) kendilerine ait farklı bir EC numarasına sahip olmalarına rağmen, α -amilazlarla çok benzer enzimatik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (Wind et al., 1998). Yine aynı şekilde, α -amilazlar ile çok benzer enzimatik yapı ve özelliklere sahip olan, α -glukozidazlar (EC 3.2.1.20), maltogenik α -amilazlar (glukan 1,4- α -maltohidrolazlar (EC 3.2.1.133) ve maltotetraoz oluşturan amilazlar (glukan 1,4- α -maltotetrahidrolaz) (EC 3.2.1.60) ekzo-enzim olmaları nedeniyle α -amilazlar ile beraber sınıflandırılmamaktadır (Nilsen and Borchert, 2000).

EC sistemi, enzimlerin sınıflandırılmasında çok kullanışlı olmasına rağmen, herhangi bir enzim sınıfı incelenirken diğer EC sınıflarında yer alan enzimlerin de göz önünde bulundurulması daha sağlıklı olacaktır. Henrissat tarafından başlatılan ve karbohidratlar ile ilişkili enzimleri DNA dizilerine göre sınıflandırmayı hedef alan ‘Karbohidrat Aktif Enzimler’ (CAZy) veritabanı; bu tür bir sınıflandırmaya örnek oluşturmaktadır (Coutinho et al., 2003)

CAZy veritabanına göre α -amilaz aktivitesi gösteren ve yapısal olarak farklılık gösteren iki farklı glukozil hidrolaz ailesi (aile 13 ve 57) bulunmaktadır.

Aile 13’te farklı DNA dizilerine sahip 514 enzim ve 19 değişik enzim aktivitesi yer almaktadır. Bunlar arasında; α -amilazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, α -glukozidazlar ve maltotetraoz üreten amilazlar bulunmakta olup, bu ailede 73 enzimin X-ray yapısı elde edilmiş durumdadır.

Buna karşın aile 57 üyeleri, yalnızca 13 farklı DNA dizisi ve başlıca α -amilaz (EC 3.2.1.1) ve 4- α -glukanotransferaz (2.4.1.1) olmak üzere iki farklı enzim aktivitesi göstermektedir. Bu aile için herhangi bir X-ray yapısı bulunmadığı ve aile 13 ile karşılaştırıldığında çok daha az incelendiği görülmektedir. Aile 57’ye ait olan α -amilazlar, aile 13 üyelerine göre tamamen farklı yapısal ve enzimatik özellikler taşımaktadır (Nilsen and Borchert, 2000).

1.3. α -Amilazın Kullanım Alanları

Amilazların nişastanın hidrolizinde kullanılması M.S. 9. Yüzyıla kadar uzanmaktadır. O devirde, malt kullanılarak ararot nişastasından tatlandırıcı elde edilmekteydi. 1833 yılında, malt çökeleğinin bir çeşit şeker ürettiği gözlenmiş ve bu reaksiyondan sorumlu olan madde Fransızca’da ayırmak manasına gelen ‘diyastaz’ olarak isimlendirilmiştir. Diyastaz daha sonra amilazlar için genel bir isim olarak kullanılmıştır. Fungal ve mikrobiyal α -amilazların gelişimi ve ticari olarak kullanımı 19. Yüzyılın sonlarında önemli ölçüde artış göstermiş ve 1930’lu yıllarda mayalama, tekstil, kağıt ve mısır şurubu endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır.

Bakteriyel amilazların pişirilmiş gıdalarda bayatlamayı önleyici etkisi ancak 20. Yüzyılın ortalarında fark edilmiştir. Amilazların üretim ve kullanımlarındaki en önemli aşamalardan biri de; nişastadan dekstroz üretiminde kullanılan asit hidrolizi yerine, *Bacillus subtilis* α -amilazının ve *Aspergillus niger* glukamilazının kullanılmasıdır. 1970’li yıllarda, genetik mühendisliğindeki gelişmeler

doğrultusunda, α -amilazların endüstriyel uygulamalardaki kullanımları da önemli ölçüde artış göstermiştir. α -Amilazların endüstriyel kullanımlarının optimizasyonu ve daha verimli enzimlerin üretimi; 1980'li yıllarda yaygınlaşan klonlama, dizileme ve X-ray çalışmaları ile hız kazanmıştır (Muralikrishna and Nirmala, 2005).

Dünya enzim pazarının % 30'unu oluşturan amilazlar, günümüzde şekerlendirme, tekstil, gıda, mayalama, damıtma, deterjan, kağıt ve yakıt alkol üretimi gibi bir çok endüstriyel süreçte yaygın olarak kullanılmaktadır. Amilazların kullanımı ile, nişastanın kimyasal yollarla hidrolizi son bulmuş, diğer bir ifadeyle bu endüstrilerde 'amilaz' devri başlamıştır. Son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak, amilazlar; tıp, farmasötik, analitik kimya ve ince kimyasal endüstrilerinin de vazgeçilmez öğeleri halini almaktadır (Kandra, 2003; Gupta et al., 2003; Haki and Rakshit, 2003).

1.3.1. Ekmek ve Fırıncılık Endüstrisi

Amilazların fırıncılık endüstrisinde kullanımları, yüzlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Malttan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen α -amilazlar fırıncılık endüstrisinde çok yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Bu enzimlerin kullanımıyla, daha hacimli, daha iyi renklerde ve daha yumuşak hamura sahip ekmek ve simit üretimi mümkün olmaktadır. Birçok enzimin fırıncılık endüstrisinde kullanımının yolunu açan; malt özütünün bu endüstride kullanılmaya başlamasıdır. Günümüzde, lipaz, proteaz, ksilanaz, pullulanaz, pentosanaz, selüloz, glukoz oksidaz ve lipoksigenaz gibi birçok enzimin, fırıncılıkta çeşitli amaçlarla kullanılmasına karşın; hiçbirisi α -amilazların yerini dolduramamaktadır (Gupta et al., 2003). α -Amilazlar, ekmek ununda katkı maddesi olarak kullanılmakta, bu işlem fermantasyon oranının yükselmesini ve ekmek hamurunun akışkanlığının artmasını sağlamaktadır. α -Amilazların endüstrideki yeni uygulamalarından biri de, pişmiş ürünlerin raf ömrünün azalmasına neden olan bayatlamının geciktirilmesidir. Bu tip ürünlerin saklanması ile birlikte, ekmek hamuru kurur ve sertleşir, ekmek kabuğu gevrekliğini kaybeder ve tadında bozulma olur. Fırıncılıkta, bu istenmeyen değişikliklerin tümüne bayatlama denilmektedir. Günümüzde yaygın olarak, bayatlamının önlenmesi ve fırın ürünlerinin görüntü ve lezzetlerinin artırılması adına birçok katkı maddesi kullanılmaktadır. Kullanılan katkı maddelerine alternatif olarak, hamur kalitesinin artması ve bayatlamının geciktirilmesi için birçok amilaz tipi kullanıma girmiştir. Bu amaçla kullanılan enzimlerden biri olan α -amilaz, pullulanazlar ile birlikte

bayatlamayı önleyici ajan olarak etkili bir biçimde kullanılmaktadır (Gupta et al., 2003). Ancak, kullanılan α -amilaz miktarındaki ufak artışlar bile ürünlerde istenmeyen düzeylerde yapışkanlığa yol açtığından, orta sıcaklıklarda kararlılık gösteren α -amilazların (ITS) kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bu enzimlerin özelliği; nişasta jelatinizasyonunun ardından aktivitelerini korudukları halde, pişirme işleminin çok öncesinde aktivitelerini kaybetmeleridir. Bunun ötesinde, bu enzimler tarafından üretilen ve 4-9 arasında monomer içeren dekstrinler, bayatlamayı önleyici etki göstermektedir. Bir çok mikrobiyal α -amilaz bilinmesine rağmen, ITS özelliği gösteren α -amilazlar yalnızca birkaç mikroorganizmada rapor edilmiştir (Gigras et al., 2002).

1.3.2. Endüstriyel Glukoz ve Fruktöz Üretimi

Yüksek miktarlardaki nişastanın işlenmesine olanak veren endüstriyel gelişmeler 1900'lerin ortalarında ortaya çıkmıştır. Alman bilim adamı Kirchhoff'un 1881'de nişastanın asit hidrolizini bulması ile başlayan ve Newkirk'in ondan çok sonra, 1921 de geliştirdiği nişastadan glukoz üretimini sağlayan ticari bir süreç; nişastanın yüksek glukoz ve fruktoz şurubuna çevrilmesindeki ilk adımlar olarak nitelenebilir.

Nişasta şurubunun tatlılığı, nişastanın hidroliz miktarına bağlıdır. Nişastanın tamamen hidrolizi yalnızca glukoz ya da diğer bir ifadeyle dekstroz (glukozun, Amerika ve İngiltere'de yaygın olarak kullanılan diğer bir ismi) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Nişastanın hidrolizi neticesinde oluşan şurup içerisindeki dekstroz miktarı; "DE" ya da "dekstroz eşdeğeri" terimi ile ifade edilmektedir. DE değeri, "indirgen, eşdeğer şeker" miktarını vermekte ve birim kuru ağırlıktaki glukoz olarak ifade edilmektedir. Bu sisteme göre glukozun DE değeri 100 iken, maltoz 53, maltotrioz 36 ve nişasta için yaklaşık olarak 0'dır (van der Maarel et al., 2002).

Glukoz üretimi için kullanılan asit hidrolizi yöntemi, yerini, üç veya dört farklı enzimin kullanıldığı bir enzimatik uygulamaya bırakmıştır (Crabb and Mitchinson, 1997; Crabb and Shetty, 1999). Yüksek yoğunlukta glukoz şurubu üretiminin birinci aşaması, nişastanın, çözünür kısa zincirli dekstrinlere "sıvılaştırılmasıdır". % 30 – 35 oranında kuru madde içeren nişasta – su karışımı, pH 6.0'a ayarlanarak ve α -amilaz ile karıştırılarak, sıcaklığın 95 – 105 °C olduğu bir sistem içinde 90 dakika muamele edilmektedir. 100 °C üzerindeki sıcaklıkların tercih

edilmesinin nedeni, lipit – nişasta komplekslerinin giderilmesidir. Başlangıçta, *Bacillus amyloliquefaciens* α -amilazının (Demirkan et al., 2005) kullanıldığı sıvılaştırma aşaması için artık *Bacillus stearothermophilus* (Manning and Campbell, 1961) veya *Bacillus licheniformis* α -amilazı (Bertoldo and Antranikian, 2002) kullanılmaktadır.

Kullanılan α -amilazların genel dezavantajlarından biri, yüksek sıcaklıklarda, pH 5.9'un altında aktif olmamalarıdır. Bu nedenle, pH değeri, NaOH ilavesiyle nişastanın doğal değeri olan pH 4.5'tan, pH 6.0'a çıkarılmaktadır. Son yıllarda yapılan protein mühendisliği çalışmaları sonucunda düşük pH değerlerinde aktivite gösterebilen α -amilazlar elde edilmiştir (Shaw et al., 1999). Öte yandan, α -amilazın Ca^{2+} iyonuna ihtiyaç duymasından dolayı, işlem sırasında ortamda Ca^{2+} bulunması da gerekmektedir. Yine genetik mühendisliğindeki gelişmeler sonucunda, kalsiyum gereksinmeyen α -amilazlar üretilmiştir (Kirk et al., 2002).

Nişastanın hidrolizindeki ikinci aşama “şekerlendirme” olarak ifade edilmektedir. Bu aşamanın sonunda elde edilen glukoz oranı % 95'tir. Bu adımda, amilozun veya amilopektinin indirgen olmayan uçlarında bulunan α ,1-4 glikozidik bağlarını kırarak aktivite gösteren bir ekzo-amilaz olan glukoamilaz kullanılmaktadır. En çok kullanılan glukoamilazlar, *Aspergillus niger* ve diğer yakın türlere aittir (Sutthirak et al., 2005; Nguyen et al., 2002; Nielsen et al., 2002). Şekerlendirme aşamasında karşılaşılan sınırlayıcı etken, glukoamilazın α ,1-4 bağlarını kırmak üzere özelleşmiş olması ve dolayısıyla maltodekstrinlerdeki α ,1-6 bağlarının çok yavaş hidroliz etmesidir. Bu nedenle ortamda izomaltoz birikimi olmaktadır. Bu problem, α ,1-6 bağlarını etkili bir şekilde kırabilen pullulanazların kullanımı ile çözülebilmektedir (Gomes et al., 2003).

Endüstriyel nişasta işlenmesinin üçüncü adımı, yüksek yoğunlukta elde edilen glukoz şurubunun yine yüksek yoğunluktaki fruktoz şurubuna çevrilmesi işlemidir. Fruktoz glukozun bir izomeri olup neredeyse glukozdan iki kat daha tatlıdır ve bu yüzden pastacılık, içecek ve diğer benzeri endüstrilerde oldukça önemli bir yere sahiptir. Glukozun fruktoza çevrimi, yaygın olarak glukoz izomeraz olarak bilinen D-ksiloz-ketol-izomeraz (EC 5.3.1.5) tarafından gerçekleştirilir. Endüstriyel süreçlerde, uygun fizikokimyasal değerlere ayarlanan glukoz şurubu, glukoz izomeraz immobilize edilmiş bir kolondan geçirilerek yüksek değerlerde fruktoz şurubu elde edilmektedir (Bhosale et al., 1996).



Şekil 1.3. Nişastadan endüstriyel olarak siklodekstrin, maltodekstrin, glukoz veya fruktoz şurubu ve kristal şeker üretimi (van der Maarel et al., 2002).

1.3.3. Tekstil Endüstrisi ve Haşılama

Tekstil endüstrisindeki modern üretim süreçlerinde, çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu zorluklardan birisi, dokuma sırasında dokuma ipliğinde gerçekleşen kopmalardır. Bu yüzden, iplik üzerine koruyucu bir katman kaplanmakta, bu amaçla dokumacılıkta kullanılan nişasta, bir çok avantajı da beraberinde getirmektedir. Bunlar arasında, ucuz olması, dünyanın herhangi bir yerinde kolayca bulunabilmesi ve kolayca uzaklaştırılabilmesi sayılabilir. Nişasta ile kaplanmış kumaşlardan nişastanın uzaklaştırması α-amilaz ile kolayca gerçekleştirilebilmektedir. α-Amilaz, nişasta katmanını hidroliz ederek suda çözünebilir dekstrinleri oluşturur ve oluşan dekstrinler yıkamayla rahatça giderilebilir (Gupta et al., 2003).

1.3.4. Kağıt Endüstrisi

Kağıt ürünlerinin kaplanması için yüksek akışkanlıkta ve yüksek moleküler ağırlıklı nişasta kullanılmaktadır. α -Amilazlar kullanılarak modifiye edilen ve uygun hale getirilen nişasta, kağıt üzerine kaplanmak suretiyle bir koruyucu katman olarak işlev görmektedir. Kağıdın işlenmesi sırasında mekanik hasarları önleyici etkisi olan nişasta katmanının ayrıca, kullanıma hazır haldeki kağıdın kalitesini de arttırdığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, kağıdın nişasta ile kaplanması, kağıdın sertliğini arttırarak daha dayanıklı olmasını ve daha silinebilir olmasını da sağlamaktadır. Çözünmüş nişasta ile beslenen iki merdane arasından geçen kağıt, sıvı haldeki nişasta ile kaplanmaktadır. Bu işlemin gerçekleştiği sıcaklık genellikle 45 - 60 °C arasındadır. Doğal nişastanın viskozitesi kağıt kaplamada kullanılamayacak kadar yüksektir. Bu nedenle, nişastayı suda çözünür hale getiren ve viskozitesini düşüren α -amilaz enzimi, kağıt kaplama işleminde de kullanılmaktadır (Gupta et al., 2003).

1.3.5. Deterjan Endüstrisi

Enzimler günümüz deterjanlarının vazgeçilmez öğeleri haline gelmektedir. Enzimlerin deterjanlarla kullanımlarının temel nedeni, enzim içeren deterjanların enzim içermeyenlerden çok daha yumuşak tabiatlı olmaları ve daha az mekanik ve kimyasal zarara yol açmalarıdır. Yutulduklarında problem oluşturabilen ve hassas maddelerden yapılmış ürünlerde zarara yol açan daha önceki deterjan tiplerinin yerini alan günümüz deterjanlarında enzimler, yıkama işleminin daha düşük sıcaklıklarda yapılmasına da olanak vermektedir. α -Amilazlar toz bulaşık deterjanlarında 1975'ten beri kullanılmaktadır. Günümüz deterjanlarının % 90'ı α -amilaz içermekle birlikte, otomatik bulaşık makinesi deterjanlarına olan ilgi gün geçtikçe daha da artmaktadır. α -Amilazların deterjan endüstrisindeki kullanımlarında en önemli dezavantajlardan birisi, aktivite göstermeleri için kalsiyuma ihtiyaç duymalarıdır. Öte yandan, α -amilazlar genel olarak birçok deterjanda bulunan oksidanlı bileşiklere de duyarlıdır. α -Amilazların deterjanlarda oksidasyona neden olan bileşiklere karşı kararlılığı, dünyanın iki büyük enzim üreticisi Novozymes ve Genencore International tarafından yapılan çalışmalarla arttırılmıştır. Bu çalışmalarla, oksidasyona uğrayan amino asitler değiştirilerek, α -amilaz, saklama ve performans açısından daha kararlı kılınmıştır (Gupta et al., 2003).

1.3.6. Siklodekstrin Üretimi

Siklodekstrinler, halkasal, α ,1-4 bağlı ve 6, 7 ya da 8 glukoz biriminden (sırasıyla, α -, β - ya da γ -siklodekstrin) oluşan oligosakkaritlerdir. Halka içerisindeki glukoz birimleri, halkanın iç kısmı hidrofobik olacak ve apolar bir çukur oluşturacak şekilde dizilirler. Bu dizilim sayesinde dış kısım hidrofilik bir özellik kazanmaktadır. Siklodekstrinler bu özelliklerinden dolayı çeşitli konuk hidrofobik moleküller ile inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır (Singh et al., 2002). Inklüzyon cisimciklerinin oluşması diğer konuk moleküllerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır. Bunlar arasında, ışık veya oksijene duyarlı moleküllerin ve uçucu maddelerin kararlılığının artması ve çeşitli maddelerin çözünürlük, tat ve kokularında gözlenen iyileşmeler sayılabilir. Bileşiklerin özelliklerinde gerçekleşen bu değişiklikler siklodekstrinlerin gıda, farmasötik, kozmetik ve analitik kimya gibi birçok endüstride kullanılmasına olanak vermektedir (Gupta et al., 2003; Singh et al., 2002).

Siklodekstrinlerin endüstriyel üretimleri için, nişasta ilk olarak sıcaklık kararlılığı olan α -amilazlar ile sıvılaştırılmaktadır. Bu işlemin ardından oluşan dekstrinler, siklodekstrin glikoziltransferazlar ile muamele edilerek, halkasal siklodekstrin molekülleri oluşturulmaktadır (Gupta et al., 2003). Bu işlemin en önemli dezavantajı, kullanılan CGTaz enziminin genellikle sıcaklığa duyarlı olması ve sıvılaştırma işleminin ardından soğutmaya gereksinim duyulmasıdır. Bu problem, sıcaklık kararlılığı olan siklodekstrin glikoziltransferaz kullanılarak çözülebilmektedir (Chung et al., 1998).

1.3.7. Çeşitli Uygulamalar

Çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım alanı bulan amilazlar arasında, en yaygın kullanılan enzim α -amilazdır. Nişastanın şekerlendirme ve sıvılaştırma aşamalarında kullanımının yanında, tıpta, analitik kimyada, dokumacılıkta kıvamlı ve kararlı nişasta üretiminde, bira ve meyve sularının iyileştirilmesinde ve hayvan yemlerinin daha iyi sindirilmesi için katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Gupta et al., 2003).

1.4. α -Amilaz

1.4.1. α -Amilazın Biyokimyasal Özellikleri

Substrat özgülüğü

Diğer enzimlerde olduğu üzere, α -amilazların substrat özgülüğü de ait oldukları organizmaya göre değişiklik göstermektedir. Enzimin en yüksek özgülüğü nişastaya karşı göstermesine karşın, amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz da α -amilazın substratları arasındadır (Gupta et al., 2003).

Optimum reaksiyon pH'sı ve pH kararlılığı

α -amilazların optimum reaksiyon pH'sı 2 ile 8 arasında değişim göstermektedir. Fungus ve bakterilere ait bir çok α -amilaz, asidik – nötral pH aralığında optimum aktivite göstermektedir. Örneğin *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazı pH 3'te optimum aktivite gösterir. Ancak, alkali sever bir *Bacillus* türünden elde edilen α -amilaz pH 9 – 10.5 aralığında optimum aktivite göstermektedir. Yine 11 – 12 pH aralığında aktivite gösteren ve *Bacillus* sp. GM8901 türüne ait olan bir α -amilaz rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003). *B. stearothermophilus* DONK BS-1 de görüldüğü gibi bazı durumlarda, optimum pH değeri sıcaklığa göre değişiklik göstermektedir. Kalsiyumun *B. stearothermophilus*'ta optimum pH'yı etkilediği rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003).

α -Amilazların genel olarak pH 4 ile 11 arasında kararlı oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, daha dar aralıklarda kararlılık gösteren α -amilazlara da rastlanmıştır (Gupta et al., 2003).

Optimum reaksiyon sıcaklığı ve sıcaklık kararlılığı

α -Amilazların optimum reaksiyon sıcaklıkları genellikle ait oldukları organizmaya göre değişiklik göstermektedir. Rapor edilen en düşük optimum sıcaklık 25 – 30 °C ile *F. oxysporum* α -amilazına aittir. Rastlanan en yüksek optimum sıcaklıklar ise birer arkea bakteri olan *Pyrococcus furiosus* için 100 °C ve *Pyrococcus wosei* için 130 °C dir. *Micrococcus varians* α -amilazının optimum sıcaklığı kalsiyuma bağlı olarak değişiklik gösterirken, *H. meridia* α -amilazının optimum aktivite sıcaklığı sodyum klorüre bağlıdır.

Diğer faktörler gibi, sıcaklık kararlılığı da organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. *Bacillus licheniformis* CUMC 305 α -amilazı, 100 °C'ta 4 saat boyunca kararlılık göstermektedir. Bir çok faktör sıcaklık kararlılığını etkilemektedir. Bunlar arasında, kalsiyum, substrat ve diğer kararlılık arttırıcı maddeler sayılabilir. *Bacillus licheniformis* CUMC 305 α -amilazı ve *Lipomyces kononenkoae* ve *Bacillus* sp. WN 11 α -amilazları için substrat, kararlılık arttırıcı bir etken olarak rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003).

Molekül ağırlığı

α -amilazların molekül ağırlığı 10 ile 210 kDa arasında farklılık göstermektedir. Mikrobiyal amilazların molekül ağırlıklarının, klonlanmış α -amilaz genleri ya da amino asit dizileri üzerinden hesaplanan değerleri 50 ile 60 kDa arasında bildirilmiştir. Bazı amilazlarda rastlanan karbohidrat parçaları bu enzimlerin moleküler ağırlıklarını arttırmaktadır. Bu gibi glukoproteinlere *A. oryzae*, *L. kononenkoae* ve *B. stearothermophilus* α -amilazlarında rastlanmıştır (Gupta et al., 2003).

İnhibitörler

Birçok metal katyonu, özellikle ağır metal iyonları, sülfidril grubu bileşikleri, N-bromosüksinimid, *p*-hidroksil merküribenzoik asit, iyodoasetat, BSA, EDTA ve EGTA gibi bazı bileşiklerin α -amilazları inhibe ettiği bilinmektedir (Gupta et al., 2003).

Kalsiyum ve α -amilazın kararlılığı

α -Amilaz, yapısında en az bir Ca^{2+} içeren bir metalloenzim olup, Ca^{2+} a olan ilgisi diğer iyonlara göreceli çok daha fazladır. α -Amilazın yapısında, bağlı olarak yer alan kalsiyum iyonu sayısı 1 - 10 arasında değişmektedir. Taka amilazı A (TAA) on adet Ca^{2+} iyonu içermektedir, ancak bunlardan yalnızca bir tanesinin enzime kuvvetli bir şekilde bağlı olduğu, yapılan kristallografi çalışmaları ile gözlenmiştir. Diğer α -amilazlar için tek bir kalsiyum iyonunun varlığı, kararlılığın korunması için yeterlidir. Kalsiyum iyonu α -amilazdan, EDTA'ya karşı diyaliz edilerek ya da elektrodializ yöntemiyle uzaklaştırılabilir. Ca^{2+} yerine, Sr^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının, kararlılık arttırıcı ajan olarak kullanılabildikleri rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003).

1.4.2 α -Amilazın Yapısal ve Katalitik Özellikleri

Niştayı hidroliz eden çoğu enzim, amino asit dizilimlerine göre aile 13 glikozil hidrolazlara aittir. Henrissat'ın sınıflandırmasına göre bu aile, kendisine ait bazı karakteristik özelliklere sahiptir:

- (i). Bu enzimler α -glikozidik bağlar üzerinde etki göstererek, α -anomerik mono-veya oligosakkaritleri oluştururlar (hidroliz), α ,1-4 ya da α ,1-6 glikozidik bağların oluşumunu sağlarlar (transglikozilasyon) veya iki eylemi birlikte gerçekleştirirler.
- (ii). Ailenin tüm üyeleri, katalitik özellik gösteren amino asitlerin bulunduğu özelleşmiş bir yapı olan “ $(\beta/\alpha)_8$ barrel” veya diğer bir ifade ile “TIM barrel” taşırlar.
- (iii) Katalitik bölgeyi oluşturan ve “TIM barrel” yapısının kararlılığını sağlayan amino asitlerin bulunduğu oldukça korunmuş dört farklı bölgeye sahiptirler. Henrissat'ın sınıflandırmasına göre, yukarıdaki özellikleri taşıyan enzimlerin hepsi α -amilaz ailesinin üyeleridir (van der Maarel et al., 2002).

Tablo 1.2. Glukoz içeren substratlar üzerinde etki gösteren α -amilazlar ailesine ait enzimler (van der Maarel et al., 2002).

Enzim	EC Numarası	Bölge	Ana Substrat
Amilosükraz	2.4.1.4		Sükroz
Sükroz fosforilaz	2.4.1.7		Sükroz
Glukan "branching" enzim	2.4.1.18	A, B, F	Nişasta, Glikojen
Siklodekstrin glukanotransferaz	2.4.1.19	A, B, C, D,	Nişasta
Amilomaltaz	2.4.1.25	A, B1, B2	Nişasta, Glikojen
Maltopentaoz oluşturan amilaz	3.2.1.–	A, B, I	Nişasta
α -Amilaz	3.2.1.1	A, B, C	Nişasta
Oligo-1,6-glukozidaz	3.2.1.10	A, B	Amilopektin
α -Glukozidaz	3.2.1.20		Nişasta
Amilopullulanaz	3.2.1.41 or 3.2.1.1	A, B, H, G, 1	Pullulan
Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	A, B	Siklodekstrinler
İzopullulanaz	3.2.1.57		Pullulan
İzomaltaz	3.2.1.68	A, B, F, 7	Amilopektin
Maltotetraoz oluşturan amilaz	3.2.1.60	A, B, C, E	Nişasta
Glukodekstranaz	3.2.1.70		Nişasta
Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	3.2.1.93		Trehaloz
Maltohekzaoz oluşturan amilaz	3.2.1.98		Nişasta
Maltogenik amilaz	3.2.1.133	A, B, C, D, E	Nişasta
Neopullulanaz	3.2.1.135	A, B, G	Pullulan
Malto-oligozil trehalaz hidrolaz	3.2.1.141		Trehaloz
Malto-oligozil trehalaz sentetaz	5.4.99.15		Maltoz

Katalitik Mekanizma

α -Glikozidik bağ, çok kararlı ve oda sıcaklığındaki hidroliz oranı çok düşük olan bir bağıdır ($2 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$). α -Amilaz ailesindeki enzimler, bu oranı en etkin şekilde attırdığı bilinen enzimler arasında yer almaktadırlar. Örneğin, siklodekstrin glikoziltransferaz saniyede 3 bağ kırarak hidroliz oranını 10^{15} kat artırmaktadır (van der Maarel et al., 2002).

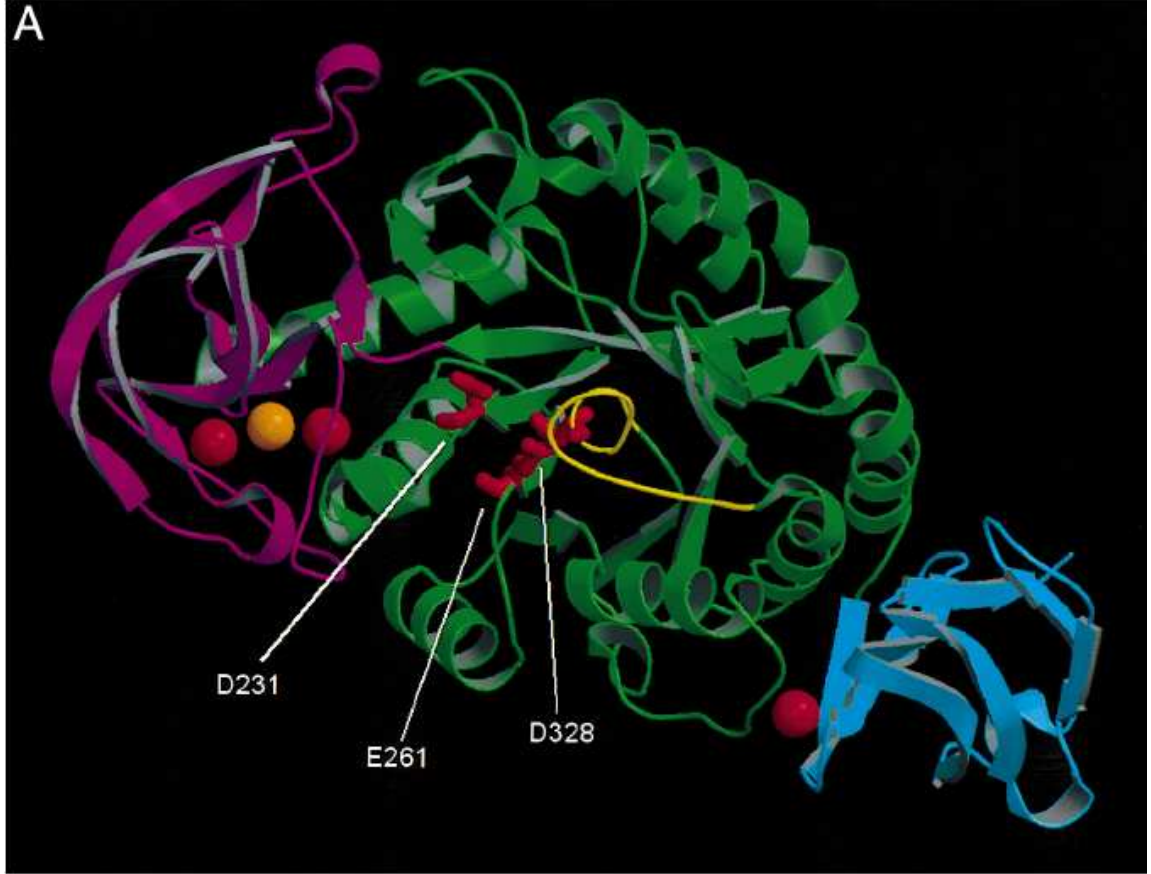
α -amilaz ailesi için genel kabul gören katalitik mekanizmaya göre, aktif bölgede işlev gören iki katalitik amino asit bulunmaktadır. Bunlardan birisi, asit/baz katalizörü olarak işlev gören bir Glutamik asit ve nükleofil görevi yapan bir Aspartat'tır.

α -Amilaz α ,1-4 glikozidik bağlarını kıran bir enzimdir. Substratın hidrolizi ile oluşan indirgen uç, α konfigürasyonuna sahip bir şekilde serbest bırakılmaktadır. Bu mekanizma tüm "alıkoyan" glikozil hidrolazlar için geçerlidir. α -Amilazların katalitik mekanizması üç aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama, glikozidik oksijenin proton verici Glu261 tarafından protonlanmasıdır. Bunu takiben, katalitik nükleofil Asp231, -1 alt bölgesindeki şeker rezidüsünün C1 karbonuna nükleofilik atak yapmaktadır. Substratın aglikon parçası ayrıldıktan sonra, bir su molekülü, muhtemelen protonunu vermiş olan Glu261 tarafından aktiveleştirilmektedir. Su molekülü, nükleofilin oksijeni ile şeker rezidüsünün C1 karbonu arasındaki bağı hidroliz etmekte ve böylelikle katalitik döngüyü tamamlamaktadır (Nielsen and Borchert, 2000).

Koshland tarafından önerilen, α -amilazlar için genel kabul gören ve yukarıda anlatılan "çifte yer değiştirme" (Double displacement) mekanizmasında, 3 korunmuş katalitik amino asitten yalnızca 2 tanesi doğrudan rol oynamaktadır. Üçüncü korunmuş amino asit olan ikinci aspartat, substratın OH-2 ve OH-3 gruplarına hidrojen bağları ile bağlanarak, substratın aktif bölgedeki "distorsiyonunu" sağlamaktadır. Diğer korunmuş amino asitler; histidin, arginin ve tirozin olabilir. Bu amino asitler, substratın ve nükleofilin doğru konuma yerleşmesini ve geçiş durumunun kararlılığı ile substratın elektronik yapısının polarizasyonunu sağlamaktadır.

α -Amilaz enzim ailesinin üyelerinde, dört korunmuş amino asit dizi bölgesinin yanında beşinci bir korunmuş amino asit dizisine rastlanmıştır. Bu bölge

ayrıca kalsiyum “ligand’ı” olarak görev yapan bir aspartat da içermektedir (van der Maarel et al., 2002).



Şekil 1.4. *B. licheniformis* α -amilazı (PDB kodu 1BLI). A domain’i yeşil, B domain’i mor ve C domain’i turkuaz olarak gösterilmiştir. Kalsiyum ve sodyum iyonları sırasıyla kırmızı ve portakal rengindedir. Aktif bölge amino asitleri Asp231, Glu261 ve Asp328 kırmızı olarak gösterilmiştir. $\beta 7$ ’yi $\alpha 7$ ye bağlayan ilmek (loop) sarı olarak gösterilmiştir (Nielsen and Borchert, 2000).

Domain organizasyonu

Hepsinin aynı katalitik mekanizmaya sahip olmasına karşın, α -amilaz ailesine üye enzimlerde görülen karakteristik özellikler arasında, değişik ürünler oluşturmaları ve farklı substrat özgüllükleri göstermeleri sayılabilir. Bu farklılıklar, katalitik özdeki farklı “domain”lerden ya da katalitik bölge çevresinde bulunan ek şeker-bağlanma alt bölgelerinden kaynaklanmaktadır. Tüm α -amilaz ailesi enzimlerinde bulunan en iyi korunmuş domain; bir varil şeklinde olan, sekiz α -heliks tarafından çevrelenmiş ve simetrik olarak dizilenmiş 8 paralel β -tabakasından oluşan

“A domain”’idir. α -Amilaz ailesinde, kataliz ve substrat bağlanmasında rol oynayan korunmuş amino asitler; bu “domain”’in β -tabakalarının C-uçlarındaki ilmeklerde bulunmaktadır. Yukarıda sözü geçen $(\beta/\alpha)_8$ varili, ilk olarak piliç kasındaki trioz fosfat izomeraz enziminde bulunmuş ve bu nedenle TIM varili olarak isimlendirilmiştir (van der Maarel et al., 2002). Bilinen tüm enzimlerin yaklaşık % 10’unda $(\beta/\alpha)_8$ variline rastlanmıştır (Reardon and Farber, 1995).

α -Amilaz ailesindeki tüm enzimler, β -tabaka 3’ten α -heliks 3’e uzanan B “domain”ine sahiptirler. Amino asit sayısı 44’ten 133’e kadar değişebilen B “domain”i, substrat ve Ca^{2+} bağlanmasında rol oynamaktadır.

α -Amilaz ailesindeki enzimlerde, A ve B “domain”lerinin yanında değişik işlevlere sahip 9 farklı “domain”e de rastlanmıştır (van der Maarel et al., 2002).

1.5. α -Amilazın Üretimi ve Saflaştırılması

1.5.1. α -Amilazın Üretimi

α -Amilaz genel olarak, sıvı tipi fermentasyon (SmF) ve katı hal fermentasyonu (SSF) olmak üzere iki yöntemle üretilmektedir. *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* türlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, katı hal fermentasyonunun, enzim üretimi ve nişasta hidrolizi için ekonomik ve etkin bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Pandey et al., 2000).

α -Amilaz üretimi bir çok fizikokimyasal etkene bağlıdır. Bunlar arasında, besi yerinin bileşimi ve pH’sı, fosfat konsantrasyonu, yüzey aktif maddeler, metal iyonları, sıcaklık, havalandırma, karbon kaynağı ve azot kaynağı sayılabilir (Gupta et al., 2003).

1.5.2. α -Amilazın Saflaştırılması

Endüstriyel ve ticari α -amilazlar, kullanıldıkları alanlar ve kullanım şekilleri nedeniyle yüksek saflık gerektirmeyen enzimlerdir. Bu nedenle endüstriyel α -amilazların ileri derecede saflaştırılması çok tercih edilen bir işlem değildir. Ancak, farmasötik ve klinik uygulamalarda yüksek saflıktaki α -amilazlar kullanılmaktadır. Yapı-işlev ilişkilerinin ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesinde kullanılan α -amilazlar da yine yüksek saflıkta üretilmektedir.

Mikrobiyal kaynaklı α -amilazların saflaştırılmasında birçok teknik kullanılmakla birlikte genel saflaştırma basamakları şu şekildedir:

- (i). Hücrelerin fermentasyon ortamından ayrılması,
- (ii). Amonyum sülfat ile veya soğuk aseton gibi bir çözücü kullanılarak, çöktürme yolu ile seçici konsantrasyon,
- (iii). Afinite, iyon-değiştirme ve/veya moleküler elek kromatografileri kullanılarak enzimin yüksek saflıkta üretimi (Gupta et al., 2003).

Bakteriyel α -amilazların üretiminde genellikle, *Bacillus* cinsi üyeleri kullanılmaktadır. Şu ana kadar hem mezofilik, hem de termofilik türlerin kullanıldığı birçok saflaştırma ve nitelendirme çalışması yapılmıştır. *Bacillus subtilis* kökenli ve sıcaklık kararlılığı olan bir α -amilazın 2200 ünite/mg/l olan spesifik aktivitesinin saflaştırma yoluyla 24 kez artırıldığı rapor edilmiştir (Uguru et al., 1997). Bolton ve arkadaşları, yüksek saflıkta elde ettikleri α -amilazın saflaştırılması amacıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değiştirme kromatografisi ve moleküler elek kromatografisi yöntemlerini kullanmışlardır (Bolton et al., 1997). *B. licheniformis* kökenli, sıcaklığa dayanıklı ve hücre dışı bir α -amilaz; iki fazlı polietilenglikol / dekstran ayırma sistemini izleyen moleküler elek ve iyon değiştirme kromatografilerinin kullanıldığı bir saflaştırma sistemi ile saflaştırılmıştır (Pandey et al., 2000). Katoh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, rekombinant hücreler tarafından üretilen α -amilaz, anti-peptid antikorların kullanıldığı bir immüno-afinite yöntemiyle saflaştırılmıştır (Katoh et al., 1997). Bir arkea bakteri olan *Thermococcus profundus*'tan yüksek saflıkta elde edilen α -amilaz; amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Toyopearl kromatografisi ve moleküler elek kromatografisi yöntemlerinin beraberce kullanıldıkları bir sistemle saflaştırılmıştır (Young et al., 1995).

1.6. Protein Saflaştırma Teknikleri

Proteinlerin saflaştırılmasındaki genel amaç, istenilen proteinin, protein olmayan hücre birimlerinden ve diğer proteinlerden ayrılmasıdır. İstenilen proteinin diğer proteinlerden ayrılması, bütün proteinlerin benzer yapı ve büyüklükte olmalarından dolayı oldukça zor bir işlemdir. Protein saflaştırmasındaki ideal sonuç, istenilen protein miktarında ve aktivitesinde azalma olmaksızın diğer proteinlerin miktarındaki azalmadır.

Genel bir protein saflaştırma işlemi; istenilen proteinin aktivitesinin, diğer proteinlerin de bulunduğu başlangıç materyali içerisinde tayini ile başlamaktadır. Seçilen kaynak materyal, düşük ozmotik güce sahip bir tampon içerisinde (düşük ozmotik basınç, hücre ve organellerin parçalanmasına yardımcı olmaktadır) homojen hale getirilip, süzme ve/veya santrifüj işlemleriyle daha sonraki saflaştırma basamaklarına hazır hale getirilir.

Elde edilen özüt, saflaştırma işlemlerinin düşük hacimlerde daha rahat gerçekleştirilebilmesi nedeniyle konsantre edilir. Çeşitli konsantrasyon yöntemleri uygulanmakla birlikte, diyaliz, ultrafiltrasyon, TPP (üç fazda ayırma) ve çeşitli çöktürme işlemleri en çok tercih edilen yöntemler arasında sayılabilir (Dennison, 2002).

1.6.1. Çöktürme Yöntemleri

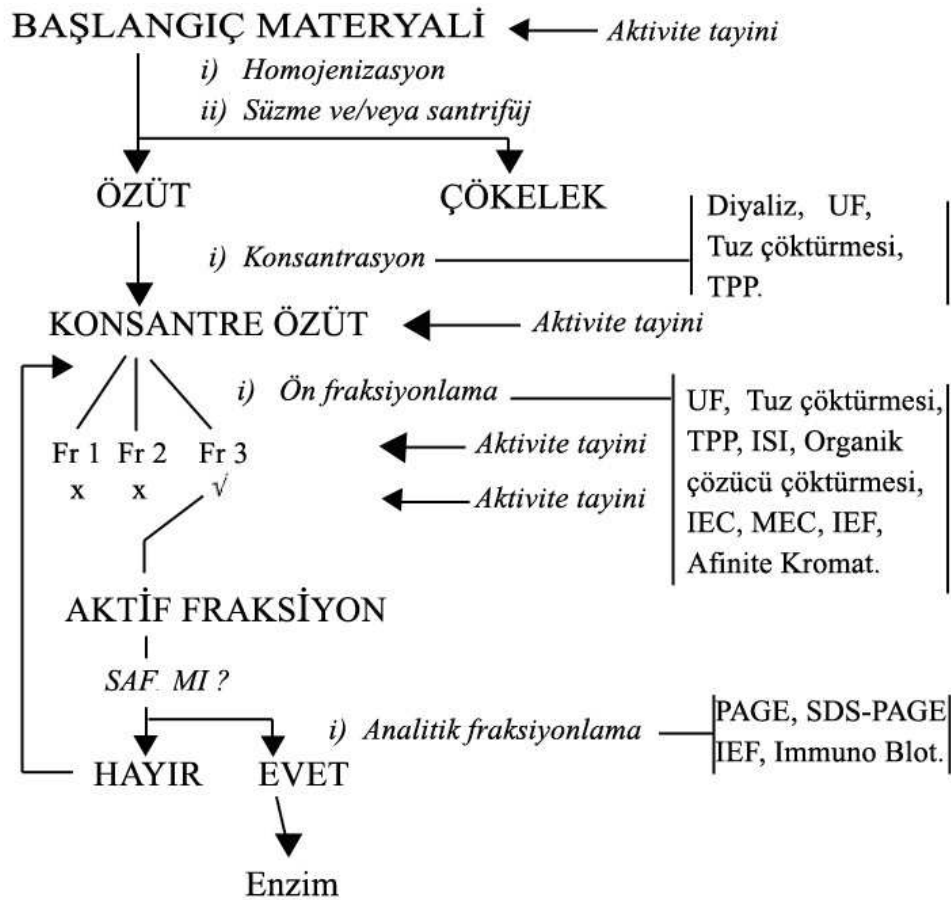
Protein kimyası çalışmalarının erken evrelerinde, farklı tipteki enzimlerin birbirinden ayrılması için kullanılan başlıca yol, proteinlerin içinde bulunduğu çözücüde yapılan değişikliklerle proteinlerin çökmesini sağlamaktır. Bu işlemin ardından çökelti, filtre edilip tekrar esas çözücü içerisinde çözülmekteydi. Bu metotlar halen proteinlerin saflaştırılmasında yaygın şekilde kullanılmakla birlikte, filtrasyonun yerini santrifüj işlemi almıştır. Günümüzde çeşitli çöktürme yöntemleri uygulanmakla birlikte, en yaygın kullanılanlar arasında; polietilen glikol çöktürmesi, çeşitli çözücüler kullanılarak çöktürme ve tuz çöktürmesi sayılabilir (Scopes, 1994).

Yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürme

Çözücü içindeki tipik bir protein molekülünde, hidrofobik yan zincirleri bulunan bazı amino asitlerin yüzeyde yerleşmelerinden dolayı, hidrofobik noktalar bulunmaktadır. Bu nedenle, sulu çözeltiler içindeki su molekülleri, bu yan zincirler etrafında toplanarak kümeler oluşturmaktadır. Proteinlerin yüksek tuz konsantrasyonlarında çökme nedeni; çözünen tuz iyonlarının, proteinlerin çevresinde kümelenen serbest su molekülleriyle etkileşime girip, proteinlerdeki yan zincirlerin birbirleriyle etkileşime girmesine izin vermesi ve proteinlerin kümeler halinde çökmesini sağlamasıdır. Bu nedenle, yüzeylerinde çok fazla hidrofobik nokta bulunan proteinler daha erken çökerken, daha az apolar yan zincire sahip proteinler daha yavaş çökeceklerdir.

Çöktürme işleminde kullanılacak tuzlar, proteinle doğrudan etkileşime girmek yerine, kümelenen su molekülleriyle bağlanarak proteinlerin kolayca çökmesini sağlayacak özellikte tuzlardır. Bu nedenle, sülfat ve fosfat gibi anyonların; potasyum, sodyum veya amonyum gibi katyonlarla olan tuzları tercih edilmektedir.

pH, çözünürlük, ısı, yoğunluk gibi etkenlere uyumluluğu nedeniyle amonyum sülfat çöktürmesi, en çok kullanılan yöntemlerden birisidir.



Şekil 1.5. Genel bir protein izolasyonu akış şeması. Kullanılan kısaltmalar; UF: ultrafiltrasyon, TPP: Three Phase Partitioning (üç fazda ayırma), IEC: iyon değiştirme kromatografisi, MEC: moleküler elek kromatografisi (Molecular Exclusion Chromatography), IEF: İzo-Elektrik Odaklama (Dennison, 2002).

1.6.2 Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemler genellikle, içinde yalnızca proteinlerin bulunduğu konsantre bir örnekten, hedef proteinin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. İstenilen

proteinin saf halde elde edilebilmesi için, özütün protein karakterine bağlı olarak tek bir kromatografik yöntem yeterli olabileceği gibi, bir dizi değişik yöntemin art arda uygulanması da gerekebilir. Genel olarak tutunma (adsorpsiyon) ilkesine göre çalışan kromatografik yöntemler, sahip oldukları matriks ve taşıyıcı sıvıya göre sınıflandırılmaktadırlar. Kromatografi çeşitleri Tablo 1.3'te özetlenmektedir:

Tablo 1.3. Kromatografi çeşitleri (Dennison, 2002).

Durağan faz	Taşıyıcı faz	Dağılım Mekanizması	Tip
Katı	Sıvı	Tutunma (Adsorpsiyon)	Adsorpsiyon Kromatografisi
Sıvı	Sıvı	Ayırma	Kağıt Kromatografisi
Katı	Sıvı	İyon-değişirme	İyon Değişirme Kromatografisi
Sıvı (gel)	Sıvı	Moleküler Filtrasyon	Moleküler Elek
İmmobilize biyomolekül	Sıvı	Biyo-afinite	Afinite Kromatografisi
Sıvı	Gaz	Ayırma	Gaz-Sıvı Kromatografisi

Proteinlerin saflaştırılmasında en çok kullanılan kromatografi yöntemleri; iyon-değişirme kromatografisi, moleküler elek ve afinite kromatografisidir.

1.6.2.1. İyon Değişirme Kromatografisi

İyon değişirme kromatografisi ile proteinler, sahip oldukları net yüke göre ayrılmaktadırlar. Eğer istenen protein pH 7'de pozitif bir net yüke sahipse kromatografi işlemi, üzerinde negatif yükler bulunan bir matriks kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kolon tamponu içindeki tuz konsantrasyonunun (ör: NaCl) artırılmasıyla; pozitif yüklü proteinler bağlanmış oldukları matriksten ayrılırlar. Bunun nedeni, tampon içindeki Na^+ 'un proteinlerdeki pozitif yüklü gruplar ile yarışarak, onların matriksten ayrılmasını sağlamasıdır. Düşük yoğunlukta pozitif yüklü gruplar içeren proteinler erken ayrılırken, yüksek yoğunlukta içerenler geç ayrılmaktadırlar. Pozitif yüklü proteinler, Karboksimetil (CM-), Sülfopropil (SP-) gibi katyon değiştirici kolonlar ile ayrılabilirken; negatif yüklü proteinler, Kuaterner

amonyum (Q-) ya da Dietilaminoetil (DEAE-) gibi anyon değiştirici kolonlar ile ayrılabilirler. Bu tip iyon değiştirici kolonlarda genellikle, selüloz ve agaroz gibi matriksler kullanılmaktadır (Streuer et al., 2002).

1.6.2.2. Moleküler Elek Kromatografisi

Moleküler elek kromatografisinin ayırım gücü daha yüksektir. Protein örneği, çözünmeyen fakat yapısında yüksek derecede su içeren dekstran ve agaroz gibi karbohidratlardan ya da poliakrilamid'ten oluşan porlar içeren boncuklardan ibaret bir matriks üzerine uygulanmaktadır. Sefadeks, Sefaroz ve Bio-Gel sıklıkla kullanılan matrikslerden birkaçıdır. Moleküler elek boncuklarının büyüklükleri genellikle 0.1 mm çapındadır. Bu tip bir matriks kullanıldığında, küçük proteinler, boncukların içinde ve çevresinde bulunan sulu ortamda dağılırken; büyük olanlar, yalnızca boncukların arasındaki sulu ortamda bulunmaktadır. Bu şekilde, uygulanan proteinlerden büyük olanları, boncuklar arasından hızla akarak kolonu erken evrelerde terk ederken, daha küçük moleküler büyüklüğe sahip olanlar daha uzun sürede kolondan çıkmaktadırlar (Streuer et al., 2002).

1.6.2.3. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, diğer bir etkin kromatografi yöntemidir. Bu teknik ile, çeşitli kimyasal gruplara yüksek afinite gösteren proteinlerin saflaştırılması mümkün olmaktadır. Örneğin, bir bitki proteini olan Konkanavalin A, üzerinde kovalen bağlı glukoz birimleri bulunan bir matriksten geçirilerek saflaştırılabilmektedir. Matriks üzerindeki glukoz birimlerine tutunmuş konkanavalin A proteini, matriksten, yüksek yoğunluğa sahip glukoz çözeltisinin geçirilmesiyle ayrılmaktadır. Aynı şekilde, matriks üzerine, transkripsiyon faktörlerinin özgülük gösterdiği DNA dizileri tutturularak, bu tip proteinlerin saflaştırılması mümkün olmaktadır. Bu durumda, bağlanmış proteinler matriksten yüksek değerlerde tuz içeren bir çözeltinin geçirilmesi ile toplanabilmektedirler. Afinite kromatografisinin verimi, protein ve yem olarak kullanılan molekülün birbirlerine ilgisinin derecesine bağlıdır (Streuer et al., 2002).

1.7. *Bacillus subtilis*'in Moleküler Biyolojik ve Biyoteknolojik Uygulamalardaki Yeri

Genlerin moleküler yapıları ve işlevlerinin analizi, özğün DNA parçalarının, genomik DNA moleküllerinden alınmasını, uygun taşıyıcı sistemlere aktarımını ve

çoğaltımlarını gerektirmektedir. Bu şekilde rekombinant DNA molekülleri oluşturulmakta ve ilgili DNA molekülü tarafından kodlanan bilgi analiz edilebilmekte, nükleotid dizisi belirlenmekte, gen ekspresyonu sağlanarak, elde edilen ürün çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır (Watson, 2004).

Rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulması ve hücreler içine aktarılmasına DNA klonlaması denmektedir. Bu süreçte, vektör adı verilen ve klonlanan DNA'nın hücre içinde çoğaltılması için gerekli bilgiyi içeren halkasal DNA ile, bu vektöre eklenen DNA parçası kullanılmaktadır. Rekombinant DNA moleküllerinin elde edilmesi için, DNA'yı özgün bölgelerinden kesebilen restriksiyon enzimlerine ve kesilmiş DNA'ları birleştiren diğer enzimlere gereksinim vardır. DNA restriksiyon enzimleri eliyle fragmanlara ayıldıktan sonra veya ilgili gen, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra, bir vektör içine yerleştirilir. Kurulan plazmit DNA'larını çoğaltmak ve üzerlerine yerleştirilen genleri eksprese etmek üzere sıklıkla kullanılan konakçılardan başında *E. coli* ve *B. subtilis* bakterileri gelmektedir. Klonlama için kullanılan vektör DNA'ları tipik olarak 3 temel özelliğe sahiptir:

1. Konak hücrenin kromozomundan bağımsız olarak çoğalmayı sağlayan bir replikasyon orijini,
2. Vektörü taşıyan hücrelerin diğer hücreler arasında seçilmesini sağlayacak seçtirici bir işaret,
3. DNA fragmanlarının eklenebilmesi için, bir veya daha fazla restriksiyon enzimi tanıma bölgesi

Çoğu vektör, plazmit adı verilen, küçük, halkasal DNA molekülleridir. Bu DNA molekülleri, birçok bakteride ve tek hücreli ökaryotlarda doğal olarak bulunabilir. Plazmitler genellikle antibiyotiklere karşı direnç sağlayan genler taşımaktadırlar. Böylelikle, doğal plazmitler gerekli olan iki özelliği sağlamaktadırlar: konak içinde bağımsız çoğalma ve seçtirici bir işareti taşıma.

İstenen bir genin, bir başka konak organizmaya aktarılmasının ilk aşaması klonlama olarak ifade edilebilir. Kompetan hücrelerin, DNA parçaları ile transformasyonu, görece kolay ve tekrar edilebilir bir uygulamadır. Kompetanlık (hücrelerin, dışarıdan gelen DNA'yı alabildikleri fizyolojik durum), *Bacillus subtilis*'te yoğun büyümenin ardından kendiliğinden gelişmektedir. Ancak,

kompetanlık deneysel olarak da uyarılabilen bir özelliktir (Harwood., 1992). *B. subtilis*, genetik değişikliklere olumlu tepkiler verdiği için, çok gelişmiş bir doğal transformasyon sistemi olarak düşünölmektedir (Harwood., 1992). Patojen olmayan bir organizma olarak kabul edilen *B. subtilis*'e, ilk DNA aktarımı 30 yıl önce Spizizen ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Harwood., 1992).

Patojen bir bakteri olmayan *Bacillus subtilis*, ilk genetik transformasyonun yapıldığı 1959 yılından bu yana Gram pozitif bakterilerin, biyokimya, genetik ve fizyolojisinin çalışılmasında model bir organizma olarak kullanılmıştır. Çeşitli moleküler biyolojik çalışmalarda yararlanılan *B. subtilis*, endüstriyel üretim ve heterolog protein üretimi için çok önemli bir konak halini almıştır (Harwood., 1992).

Bacillus cinsi bakteriler, aerobik, endo-spor oluşturan, gram-pozitif ve çubuk şekilli bakterilerdir. *Bacillus* cinsindeki metabolik çeşitlilik, bu organizmaların, enzim, antibiyotik, çeşitli biyokimyasal maddeler ve insektisitlerin üretiminde kullanılmasına olanak vermektedir. *Bacillus subtilis*'in patojen olmaması (GRAS status), ürünlerinin, gıda deterjan ve ilaç endüstrilerinde kullanılmasına olanak vermiştir (Harwood., 1992).

1.8. Tezin Amacı

Enzimlerin, günümüz endüstrilerinde ve gıda sanayinde kullanımı her geçen gün artış göstermektedir. Üretim maliyetleri, zaman, performans ve kalite gözetilerek, yüksek / düşük sıcaklık ve pH değerlerinde aktivite gösterebilen, çeşitli dış etmenlere bağımlılığı az olan, yüksek saflıktaki enzimlerin üretimi giderek önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışması ile, *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 soyundan köken alan ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebilen rekombinant α -amilazın amy-pUC19-*Bacillus subtilis* hücrelerinden hareket edilerek üretimi, saflaştırılması ve nitelendirilmesi hedef alınmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi

<u>Kullanılan Malzemeler</u>	<u>Üretici Firma</u>
2-Propanol	RIEDEL 24137
3-5-dinitrosalisilik asit	SIGMA D 0550
Akrilamit	SIGMA A 8099
Akuazid	SIGMA
AlCl ₃	BAKER
Amonyum per sülfat	BIORAD 161-0700
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	MERCK 1.01216.1000
Ampisilin	SİGMA/BOEHRİNGER
Asetik Asit	RIEDEL 27225
β–Merkaptoetanol	SIGMA M-6250
BaCl ₂	FLUKA
Bisakrilamit	BIORAD 161-0201
Bradford Protein Assay	BIORAD 500-0006
Brillant Blue R	SIGMA B 7920
Bromofenol blue	SIGMA B-6131
CoCl ₂	SIGMA C 2644
CaCl ₂	SIGMA C-3306
CTAB (setil trimetil amonyum bromid)	Sigma H 6269
CuCl ₂	SIGMA C-6641
Çözünür nişasta	SIGMA S 2630
DMSO (Dimetilsülfooksit)	SIGMA D 5879
DTT (Ditiotreitol)	Anonim
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit)	SIGMA E 5134
Etanol	J. T. BAKER 8228
Etilen Glikol	MERCK

FeCl ₃	MERCK
FeSO ₄	SIGMA F-7002
Glisin	SIGMA G 7126
Gliserol	RIEDEL 15524
HCl	RIEDEL 0.7102
IPTG (İzopropil-β-D-tiogalaktozid)	BOEHRİNGER MANNHAİM
KCl	RIEDEL 12636
Lizozim	BOEHRİNGER MANNHAİM
Lugol	SIGMA L 6146
Maltoz	SIGMA M 2250
MnCl ₂	Anonim
MgCl ₂	MERCK 105832
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaH ₂ PO ₄	RIEDEL 0.4269
Na ₂ HPO ₄	Anonim
NaOH	MERCK 1.06462.1000
NiCl ₂	SIGMA N 5756
NH ₄ Ac	RIEDEL
Nutrient Broth	DIFCO 234000
PMSF (Fenil metil sülfonil florid)	SIGMA 7626
Protein Standartı	SIGMA SDS-6H
Q-sepharose Fast Flow (Anyon değiştirici rezin)	Amersham Biosciences AB 17-0510-01
SDS	SIGMA 5750
Sephacryl S-200 High Resolution (Moleküler elek kromatografi rezini)	Amersham Biosciences AB 17-0584-10
Sodyum Asetat	RIEDEL 25022
Sodyum deoksikolat	SİGMA
Sodyum potasyum tartarat	SIGMA S 2377

Streptomisin sülfat	SİGMA
TEMED	SIGMA T 7024
Trikloro asetik asit	RIEDEL 27242
Tris baz	SIGMA T-1503
Triton X-100	MERCK
Tween 20	SIGMA P 1379
Yeast ekstrakt	MERCK 1.03753
ZnCl ₂	Anonim
ZnSO ₄	Anonim

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar

Üretici Firma

+4 °C Soğutucu	ARİSTON NOFROST
-20 °C dondurucu	ARİSTON NOFROST
-80 °C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
Buz Makinesi	BAR LINE BF 85
Etüv	EDMUNT BÜHLER-TH 15
Fraksiyon toplayıcı	BIORAD 2110
Gradyan pompası	BIORAD Econogradient Pump
Güç kaynağı	BIORAD POWER PACK 1000
Hassas Terazî	SARTORIUS-BL 210S
İnkübatör	CERTOMAT-BS-T
Jel kurutucu	E-C Apparatus Corporation EC 355
Jel kurutucu pompası	E-C Apparatus Corporation EC 353
Manyetik Karıştırıcı	HEİDOLPH MR3001
Masa Üstü Santrifüj	HERAEUS Sepatech, Biofuge 15R
Masa Üstü Santrifüj	BECKMAN COULTER, Allegra 25R
Microsantrifüj	BECKMAN Microfuge 18
Mikrodalga Fırın	BEKO-1550

Orbital Karıştırıcı	BIOMETRA WT12
Otoklav	HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50
Otoklav	VARIOKLAV-Dampfsterilizator 300
Otomatik Pipet 5000 µl	GILSON
Otomatik Pipet 1000 µl	GILSON
Otomatik Pipet 200 µl	GILSON
Otomatik Pipet 20 µl	GILSON
pH Metre	İNOLAB pH LEVEL 1
Protein Elektroforezi Sistemi	BIORAD Mini Protean II
Recorder	BIORAD Econorecorder 1327
Spektrofotometre	BIORAD-Smartspec 3000
Sonikatör	BRANSON Digital Sonifier 250
Steril Kabin	HERAEUS-Herasafe-HS 12
Sterilizatör	BİNDER-ED115
Su Banyosu	JULABO-SW 21
Su Banyosu	JULABO-MP 13
Su Banyosu	Techne TE-10A
Terazi	SARTORIUS-BL 3100
UV monitörü	BIORAD EM1 Econo UV Monitor
Vorteks	IKA-MS 2-Minishaker

2.2. Yöntem

2.2.1. *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 Kökenli Rekombinant α -amilazın, amy-pUC19-*Bacillus subtilis* Hücrelerinde Üretimi ve Saflaştırılması

2.2.1.1. α -amilazın Klonlanması ve Ekspresyonunun Optimize Edilmesi

Bu tez çalışmasında, İşsever-Öztürk ve ark. (2002) tarafından *B. licheniformis* ATCC 27811 soyunun genomik DNA'sı üzerinden PCR aracılığı ile klonlanan α -amilaz genini taşıyan amy-pUC 19-*B. subtilis* hücreleri biyolojik kaynak olarak

kullanılmıştır. Belirtilen çalışmada, α -amilaz geni (*amy*), *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 soyu genomik DNA'sı üzerinden, yapısal geni sınırlayacak şekilde düzenlenmiş oligonükleotitlerin kullanıldığı PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) aracılığı ile çoğaltılmış, pUC 19 vektörü üzerine klonlanmıştır. *E. coli* JM109 ve *B. subtilis* 54 soyları bu vektör ile transforme edilmiştir.

Rekombinant α -amilazı kodlayan *amy* geni, pUC 19 vektörü üzerinde *lac* promotorunun alt tarafındaki çoklu klonlama bölgesine yerleştirilmiştir. Konstitütif ve IPTG uyarımlı olarak yapılan testlerde rekombinant α -amilaz ekspresyonunun, 50 μ M izopropil- β -D-tiyogalaktozit (IPTG) varlığında uyarıldığı ve enzim üretiminin glukoz varlığında baskılandığı belirlenmiştir. Büyüme eğrisi hazırlanmış ve plazmit kararlılık testleri yapılmıştır (İşsever Öztürk, S., 2002).

2.2.1.2. Rekombinant *Bacillus subtilis* Hücrelerinin Üretimi

Optimum hücre büyümesi ve enzim aktivitesi değerlerinin bulunması

α -Amilaz üreticisi *amy*-pUC 19-*B. subtilis*'in en fazla α -amilaz üretimi yaptığı inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla, 75 saat süren bir kültür çalışması yapıldı. 165 ml LB besi yerinde, 100 μ g/ml ampicilin varlığında, 30 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakılan *amy*-pUC19-*B. subtilis* kültüründen indüksiyon sonrası; 3., 6., 20., 26., 44., 51., 68. ve 75. saatlerde alınan örneklerin 600 nm'de hücre yoğunlukları ölçüldü. Alınan örneklerin sonike edilmesinin ardından elde edilen üst sıvıdan, amilaz aktivite testinin yapılması ile elde edilen sonuçlar ışığında, optimum büyüme/enzim aktivitesinin gözlemlendiği inkübasyon süresi belirlendi ve bunu takip eden tüm hücre kültürü çalışmalarında bu inkübasyon süresi uygulandı.

Hücre kültürü çalışmaları

Hücre içi rekombinant α -amilaz üreticisi *amy*-pUC19-*B. subtilis*'in üretilmesi amacıyla, birbirini takip eden iki ön ve bir ana kültür çalışması yapıldı.

I. Ön Kültür

Son konsantrasyonda 100 μ g/ml olacak şekilde ampicilin içeren, 2 ml LB Broth besi yeri, -20 °C dondurucuda saklanan kültür stoğunun 20 μ l'si ile aşılandı ve 30 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak gece boyu büyümeye bırakıldı.

II. Ön Kültür

Son konsantrasyonda 100 µg/ml olacak şekilde ampicilin içeren 50 ml LB Broth besi yeri, I. ön kültürden alınan 500 µl kültür örneği ile aşılandı ve 30 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak gece boyu büyümeye bırakıldı.

Ana Erlen Kültürü

Son konsantrasyonda 100 µg/ml olacak şekilde ampicilin içeren, iki adet 825 ml ve 4 adet 330 ml LB Broth besi yeri, II. ön kültürde büyütülen hücreler ile 1/100 (hücre/besi yeri) oranında aşılandı ve kültür/flask hacmi oranının 1/6 olduğu koşullarda, 30 °C'ta, 170 rpm'de, 26 saat boyunca çalkalanarak büyümeye bırakıldı.

IPTG ile uyarım

Hücre büyümesi, 600 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerle izlendi. $OD_{600} = 0.6 - 0.8$ aralığında hücre yoğunluğu gösteren ana erlen kültürlerine, son derişimi 50 µM olacak şekilde IPTG eklenerek, uyarım yapıldı. Uyarım işleminin ardından, örnekler 30 °C'ta 170 rpm'de gece boyu çalkalanarak büyümeye bırakıldı. Kültürlerden uyarım öncesi ve sonrası 10'ar ml örnek alınarak, 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı dökülerek, çökelek -20 °C dondurucuya kaldırıldı. Uyarımdan ve kültürün toplanmasından hemen önce SDS-PAGE için örnek alınarak, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen çökelek -20 °C dondurucuya kaldırıldı.

26. saat sonunda toplanan örnekler, 7000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilip, oluşan üst sıvı döküldü. Hücreler, % 0.9'luk 300 ml NaCl (serum fizyolojik) içerisinde çözüldü ve 7000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan üst sıvı döküldü ve çökelek -20 °C dondurucuda gece boyu saklandı.

LB Broth besi yeri: 10 g nutrient broth, 5 g yeast ekstrakt, 8 g NaCl, 0,52 g Trizma baz, saf su ile 1 litreye tamamlanıp, 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilir.

IPTG, (İzopropil-β-D-tiogalaktozit): 100 mM stok çözeltisi hazırlanır. 0.283 g IPTG, 10 ml steril distile su içerisinde çözülür. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20°C'ta saklanır.

Ampicilin: 10 mg/ml stok çözeltisi hazırlanır. 1 g ampicilin, 100 ml steril distile su içerisinde çözülür ve çözelti pH'sı 1M NaOH ile 8.5' e ayarlanır. 0.22 nm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20°C'ta saklanır.

2.2.1.3. Rekombinant α -Amilaz Üreticisi *Bacillus subtilis* Hücrelerinin Sonikasyonu

Bacillus subtilis, rekombinant α -amilazı hücre dışına salgılamadığından, hücre içindeki enzimi elde etmek üzere, hücrelerin bir dizi ön işlem ile sonikasyona hazırlanması ve sonikasyon eliyle parçalanması gerekmektedir.

Bakteriyel hücrelerin parçalanması için bir çok yöntem kullanılmakla birlikte, en çok kullanılan yöntemler arasında; cam boncuk kullanımı, French press ve sonikasyon sayılabilir (Scopes, 1994).

Sonikasyon, 20.000 megahertz'ten daha yüksek olan ve "ultrasound" olarak adlandırılan ses dalgalarının parçalayıcı ve bozucu etkisi kullanılarak hücre ve organel duvarlarının parçalanması işlemidir.

Sonikasyon öncesi işlemler

-20 °C dondurucuda saklanan hücreler, 300 ml, 100 mM CaCl₂ içerisinde çözüldü ve 1 saat boyunca buz içerisinde bekletildi. Buz uygulamasından çıkan örnek, 7000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı atıldı ve elde edilen pelet 330 ml, 100 mM Tris-HCl/10 mM Gliserol, pH 8.0 içerisinde çözüldü. Örneğe 16,5 ml, 10 mg/ml Lizozim ve son derişimi 1 mM olacak şekilde PMSF eklenerek 15 dakika boyunca buz içinde yatık şekilde çalkalandı. Bu işlemin ardından 693 μ l, 0,5 M EDTA eklenen örnek, buzda yatık olarak 45 dakika boyunca çalkalandı. Örneğe, buzdaki 45 dakikanın ardından, 42 °C'ta 1 dakika şok uygulandı ve yeniden buza alındı.

Sonikasyon

Ön işlemlerin ardından sonikasyon aşamasına geçildi. Her seferinde yaklaşık 30 ml örnek kullanıldı ve işlem sulu buz içinde gerçekleştirildi. Sonikasyon işlemi, her set için önce 5 dakika, eğer yeterli miktarda kırılma gerçekleşmemiş ise ilave olarak 3 dakika boyunca uygulandı. Hücrelerin kırılma oranı, ortaya çıkan protein miktarının Bradford yöntemi ile belirlenmesiyle izlendi. Sonikasyon sırasında, 20 saniye sonikasyon ve 30 saniye bekleme süreleri uygulandı.

2.2.1.4 Rekombinant α -Amilazın Saflaştırılması

Proteinlerin saflaştırılması, elde edilmek istenen proteinin, diğer protein ve hücre birimlerinden ayrılması işlemidir. Canlılar, çok karmaşık hücresel birimlerden

ve çeşitli özelliklere sahip birçok proteinden oluşmaktadır. Bu kompleks yapı nedeniyle, protein saflaştırma işlemi, birbirini takip eden bir çok aşamadan oluşmaktadır (Dennison, 2002).

1. Streptomisin sülfat çöktürmesi

Streptomisin, ribozomlar ile etkileşim kuran bir antibiyotiktir. Streptomisin sülfat çöktürmesi ile ribonükleer proteinlerin ve ribonükleotitlerin çöktürülerek uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Scopes, 1994).

Sonikasyon ile elde edilen özüt, 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelet -20°C dondurucuya kaldırıldı. Elde edilen üst sıvının pH'sı derişik HCl ile 7.0'ye ayarlandı. Üst sıvıya son derişimi % 0,7 olacak şekilde streptomisin sülfat eklendi ve +4°C'ta karışmaya bırakıldı. Homojen bir karışımın elde edilmesinin ardından, karışım 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvı toplanıp, amonyum sülfat çöktürmesi işlemine geçildi.

2. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler, yüksek tuz konsantrasyonlarında, yüzeylerinde sahip oldukları hidrofobik amino asit kompozisyonuna göre farklı çözünürlük değerlerine sahiptirler. Bu özellikten faydalanılarak tuz çöktürmesi yöntemi geliştirilmiştir. En çok kullanılan ve en yüksek verime sahip tuz, amonyum sülfattır (Scopes, 1994).

Streptomisin sülfat çöktürmesinin ardından elde edilen üst sıvı ile % 40 amonyum sülfat çöktürmesi işlemine geçildi. Miktarı üst sıvı hacmine göre hesaplanan amonyum sülfat, üst sıvıya eklendi ve +4 °C'ta, 2 saat boyunca karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda elde edilen karışım 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve oluşan çökelek -20 °C dondurucuya kaldırıldı.

Elde edilen üst sıvı ile, bir önceki aşamayla aynı koşullarda gece boyu, % 70 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. % 70 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından elde edilen karışım 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelek bir sonraki aşama için 10 ml, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0 içerisinde çözüldü. Üst sıvı daha sonraki testler için +4 °C'ta saklandı.

3. Diyaliz

Diyaliz işlemi çoğunlukla, istenmeyen düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerin örnekten uzaklaştırılması ve/veya örneğin içinde bulunduğu tamponun, farklı bir

tampon ile değiştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Diyaliz membranları, “yarı geçirgen zardan difüzyon” ilkesine göre çalışır ve 15 – 20 kDa’dan büyük moleküllerin geçişine izin vermez (Scopes, 1994).

Çöktürme işlemini takiben amonyum sülfatın uzaklaştırılması için diyaliz yapıldı. Diyaliz membranı, % 20 Etil alkol içerisinde 5 dakika kaynatıldı. 10 ml, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0 tamponu içerisinde çözülen ve 16,5 ml toplam hacime sahip % 70 amonyum sülfat çökeleği, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0 tamponuna karşı gece boyunca diyaliz edildi. Ertesi gün diyaliz tamponu, iki kez daha değiştirildi.

Diyaliz işleminin ardından toplanan 25,1 ml hacmindeki örnek, 10.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi ve beyaz bir pelet oluştu. Elde edilen 25 ml hacmindeki üst sıvı 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. 25 ml hacmindeki üst sıvı 0,45 µm por büyüklüğüne sahip filtreden geçirildi. 25 ml hacmindeki örneğe, son derişimi 1mM olacak şekilde PMSF eklendi.

4. Kromatografi

Rekombinant α-amilazın yüksek saflıkta elde edilmesi amacıyla, sırasıyla Q-sefaroze FF anyon değiştirici ve Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografi matrisleri ile hazırlanan ve birbirini takip eden, bir anyon değiştirici ve bir moleküler elek kolon kromatografisi yapıldı.

4.1. Kromatografi Rezinleri ve Kolonlarının Hazırlanması

Q-sefaroze FF, anyon değiştirici tabiatlı bir rezindir. Q-sefarozenin resin materyali, çapraz bağlı agaroz birimleridir ve fonksiyonel grup olarak da kuaterner amonyum ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) içermektedir.

Sefakril S-200 HR Moleküler elek rezini, 25 – 75 µm çapındaki “bead”lerden oluşmaktadır. Bu “bead”ler, allil dekstran / N,N’- metilenbisakrilamid birimlerinin çapraz bağlanması ile elde edilirler.

Q-sefaroze FF ve Sefakril S-200, % 20 etanol içinde ve şişirilmiş halde sağlandı. Rezinlerdeki etanol atılarak, üzerlerine resin hacminin % 75’i oranında yükleme tamponu eklendi. Karıştırılarak, çökmesi sağlandı ve bu işlem birkaç kere tekrar edildi. Jel-tampon karışımı degaze edildi. Cam kromatografi kolonu yıkandı,

kurutuldu ve kolonun tabanına cam pamuğu yerleştirildi. Rezin tek seferde kolon içerisine yüklendi. Kolon tamamen dolduktan sonra uygun tamponla yıkandı.

4.2. Q-Sefaroz FF Anyon Değiştirici Kolon Kromatografisi

Saflaştırma işlemine başlamadan önce kolon, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, 7 mM β-Merkaptoetanol (βME) pH 8.0 tamponuyla yıkandı. Diyaliz işleminin ardından elde edilen örnek, Q-sefaroze FF anyon değiştirici kolonuna yüklendi. Yükleme, birbirini takip eden üç seferde gerçekleştirildi. Yükleme tamponu olarak degaze edilmiş 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, 7 mM β-Merkaptoetanol (βME) pH 8.0 kullanıldı. Yükleme ve yıkama sırasında kullanılan tüm tamponlar degaze edildi ve buz içerisinde tutuldu.

Saflaştırma sistemi, her yüklemenin bitiminde, bütün fraksiyonların toplanmasının ardından, önce 1 M NaCl içeren ve onu takiben içermeyen, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, 7 mM β-Merkaptoetanol (βME) pH 8.0 tamponuyla yıkandı.

Elde edilen fraksiyonlar, buz içinde korundu. Sisteme bağlı olarak çalışan yazıcıdan elde edilen grafiğe göre, A₂₈₀'deki protein tepelerine karşı gelen fraksiyonlar belirlendi ve birer fraksiyon atlanarak seçilen fraksiyonlardan SDS-PAGE ve α-amilaz aktivite testi yapıldı. SDS-PAGE ve aktivite testi sonuçları birlikte değerlendirilerek seçilen fraksiyonlar birleştirildi. Bu işlemler her bir yükleme için gerçekleştirildi.

Her bir yüklemeden gelen benzer fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz membranına alındı ve Akuazid ile konsantre edildi.

Konsantre edilen örnek, 50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, 0,1 M NaCl, 7 mM βME pH 7.5 tamponuna karşı gece boyu diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, ertesi sabah tampon değiştirilerek sürdürüldü ve diyalizden çıkan örnek 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj öncesinde ve sonrasında alınan örneklerden Bradford ve α-amilaz aktivite testleri yapıldı. Santrifüj sonrası örnekten, SDS-PAGE için örnek ayrıldı.

4.3. Sefakril S-200 HR Moleküler Elek Kolon Kromatografisi

Kolon, saflaştırma işlemine başlamadan önce, 50 mM Tris-HCl 2 mM CaCl₂, 0,1 M NaCl, 7 mM βME pH 7.5 tamponu ile yıkandı. Bölüm 4.2.'de elde edilen diyaliz sonrası örnek (1025 µl), Sefakril S-200 HR kolonuna tek seferde yüklendi.

Yükleme tamponu olarak 50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , 0,1 M NaCl, 7 mM β ME pH 7.5 kullanıldı. Yükleme ve yıkama sırasında kullanılan tüm tamponlar degaze edildi ve buz içerisinde tutuldu.

Tüm fraksiyonların toplanmasının ardından sistem 50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , 1 M NaCl, 7 mM β ME pH 7.5 tamponuyla yıkandı.

Elde edilen fraksiyonlar, buz içinde korundu. Sisteme bağlı olarak çalışan yazıcıdan elde edilen grafiğe göre, protein tepelerine karşı gelen fraksiyonlar belirlendi ve birer fraksiyon atlanarak seçilen fraksiyonlardan SDS-PAGE ve α -amilaz aktivite testi yapıldı. SDS-PAGE ve aktivite testi sonuçları gözetilerek, en saftan daha az safa doğru üç farklı havuz oluşturuldu.

Sonikasyon işleminden başlayarak, enzim saflaştırma sürecinin sonuna değin her basamakta, Bradford ve α -amilaz aktivite testleri gerçekleştirildi.

2.2.2. α -Amilaz Aktivite Testi

α -amilaz aktivite testi, oluşan indirgen şeker miktarının tayinini temel alan bir yöntemdir.

α -Amilaz aktivite testi için; belirlenen miktardaki enzim çözeltisi, 6.7 mM NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 aktivite tamponu ile 500 μ l'ye tamamlanır. Enzim çözeltisi üzerine 500 μ l taze hazırlanmış % 1 nişasta çözeltisi eklenerek, 37 °C'ta 3 dakika inkübe edilir. Reaksiyon, 3 ml 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisinin eklenmesi ile durdurulur ve tüpler 10 dakika boyunca kaynar suda bekletilir. Kaynatma işleminin ardından tüpler, buza alınarak renk reaksiyonu durdurulur. Her bir tüpe 8 ml saf su ilave edilir ve renk reaksiyonu 540 nm dalga boyunda, enzim içermeyen blank'e karşı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Sodyum Fosfat Tamponu: 0.5 M Na_2HPO_4 ve 0.5 M NaH_2PO_4 stok çözeltileri hazırlanır. Bu stok çözeltilerden, 20 mM Na_2HPO_4 ve 20 mM NaH_2PO_4 hazırlanıp, pH 6.9 olacak şekilde birbirleriyle karıştırılır. Son derişimi 6.7 mM olacak şekilde 5M NaCl eklenir.

Substrat Çözeltisi: 20 mM sodyum fosfat, 6.7 mM NaCl, pH 6.9 aktivite tamponuna, son derişimi % 1 olacak şekilde çözünür nişasta eklenir ve mikrodalga fırında ısıtılarak nişastanın çözünmesi sağlanır.

DNS Çözeltisi: 10 g 3,5-dinitrosalisilik asit, 200 ml 2 M NaOH ve 300 g sodyum potasyum tartarat distile su içinde çözülür, 1 litreye tamamlanarak, gece boyu manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılır. DNS çözeltisi karanlık bir ortamda, tercihen renkli şişe içerisinde saklanmalıdır.

α -Amilaz aktivitesi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

α -amilaz kalibrasyon eğrisi için, distile su içerisinde çözülmüş maltoz kullanılmaktadır. 0'dan 10'a kadar numaralandırılmış iki set halindeki tüplere, 5 μ mol/ml şeklinde hazırlanan maltoz çözeltisinden 1 numaralı tüpe 100 μ l ve 10 numaralı tüpe 1000 μ l gelecek şekilde seri maltoz dilüsyonları hazırlanır. 0 numaralı tüpe yalnızca 1000 μ l distile su koyulurken, 1'den 9'a kadar numaralandırılmış tüpler distile su ile 1000 μ l'ye tamamlanır. Her bir tüpe, 3 ml dinitrosalisilik asit çözeltisi eklenerek 10 dakika kaynayan suda bekletilir. Kaynatmanın ardından buz yardımıyla oda sıcaklığına getirilen ve 8 ml distile su ilave edilen örnekler, 0 numaralı tüpe (blank) karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Ortalaması alınan setlerin maltoz dilüsyonlarına karşı absorbans grafiği çizilir. Grafikten elde edilen eğim, enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır.

Bir ünite enzim, pH 6.9'da, 37 °C'ta, 1 dakikada, 1 μ mol maltoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tarif edilir. Sıcaklığa dayanıklı rekombinant α -amilaz için bir ünite enzim, pH 6.9'da, 87 °C'ta, 1 dakikada, 1 μ mol maltoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak kabul edilmiştir.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Enzim aktivitesi: } \frac{\frac{A_{540} \text{ değeri}}{\text{Eğim}} \times \frac{1000}{\text{Maltoz MA}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dakika)}}$$

Reaksiyon Hacmi: 1 ml

Enzim Hacmi: 0,5 ml

Reaksiyon Süresi: 3 dakika

M.A (maltoz) : 360,3 g/mol

2.2.3. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi

Boya-bağlanması olarak da bilinen Bradford yöntemi, hızlı ve yüksek duyarlılıkta olması nedeniyle en çok tercih edilen protein miktar tayini yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan Coomassie Blue G-250 boyası, asit içerisinde çözüldüğünde kırmızı-kahverengi bir renk oluşmaktadır. Boyanın pozitif yüklü proteinlere bağlanması ile oluşan mavi renk, 595 nm dalga boyunda ölçülerek, protein miktarı tayin edilir (Scopes, 1994).

Belirlenen miktardaki enzim örneği, distile su ile 800 µl'ye tamamlanır. 200 µl Coomassie Blue G-250 boyası eklenen örnekler, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip, spektrofotometrede protein içermeyen blank'e karşı 595 nm dalga boyunda okunur.

Bradford yöntemi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Bradford analizi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında, Bovin Serum Albumin (BSA) standart olarak kullanılmaktadır. 500 µl, 0.1 mg/ml şeklinde hazırlanan BSA çözeltisinden, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 µl çekilip, distile su ile 800 µl'ye tamamlanır ve her bir tüpe 200 µl Bradford boyası eklenerek, spektrofotometrede BSA içermeyen blank'e karşı, 595 nm dalga boyunda okunur. Verilmiş BSA konsantrasyonlarına karşı elde edilen A₅₉₅ değerlerinin yerleştirilmesi ile oluşturulan grafiğin eğimi, toplam protein miktarının belirlenmesinde kullanılır.

Tablo 2.1. Bradford kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve toplam protein miktarının hesaplanması.

Tüp no	Eklenen BSA (0.1mg/ml) miktarı	Distile su
1	-	800
2	20 µl (2 µg)	780
3	40 µl (4 µg)	760
4	60 µl (6 µg)	740
5	80 µl (8 µg)	720
6	100 µl (10 µg)	700
7	120 µl (12 µg)	680

Toplam protein miktarı:

A595 / Eğim / örnek hacmi (µl)

2.2.4. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamit Jel Elektroforezi) analizi

Saflaştırılması amaçlanan α -amilazın moleküler ağırlığı, SDS-PAGE analizi ile ve protein belirteçler kullanılarak tayin edildi. SDS-PAGE analizinden ayrıca, iyon değiştirme kromatografisinin ardından elde edilen fraksiyonlardan, moleküler elek kolonuna yüklenecek örneklerin belirlenmesinde ve moleküler elek kromatografisinin ardından, enzim kaynağı olarak kullanılacak havuzların oluşturulmasında yararlanıldı.

Örneklerin hazırlanması

SDS-PAGE analizi için, kolon fraksiyonlarından 15 µl, kolon öncesi örneklerden 5 µl ve protein belirteçlerinden de 5 µl alındı ve yükleme tamponu ile toplam 20 µl'ye tamamlandı. 5 dakika boyunca kaynar suda bekletilen örnekler, hazırlanan SDS-PAGE jeline yüklendiler.

Yükleme Tamponu:

- 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 1 SDS,
- 2 mM EDTA,
- % 1 β -merkaptoetanol,
- % 10 gliserol,
- % 0,002 Bromofenol blue

Jelin hazırlanması

SDS-PAGE jeli, ayırma ve derişim jeli adı verilen üst üste iki farklı jel katmanından oluşmaktadır.

Ayırma jeli:

- 750 μ l dH₂O
- 3750 μ l 0,75 M Tris HCl, pH 8.8 / % 0.2 SDS
- 3 ml Akrilamit/ Bisakrilamit (30:1)
- 90 μ l %10 APS
- 6 μ l TEMED

Derişim jeli:

- 1050 μ l dH₂O
- 1500 μ l 0,25 M Tris HCl, pH 6.8 / % 0.2 SDS
- 390 μ l Akrilamit / Bisakrilamit (30:1)
- 60 μ l % 10 APS
- 3 μ l TEMED

Ayırma jeli hazırlanarak SDS-PAGE sisteminin cam plakları arasına dökülür ve jelin üzerine izopropanol (2-propanol) eklenerek düz bir yüzey oluşumu sağlanır. Ayırma jelinin polimerizasyonunun ardından, izopropanol uzaklaştırılır ve jel yüzeyi distile su ile yıkanır. Derişim jeli hazırlanarak, ayırma jeli üzerine dökülür ve jel tarağı dikkatlice yerleştirilir. Derişim jelinin polimerleşmesi ve kuyucukların oluşumunun ardından, tarak çıkartılır ve kuyucuklar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile yıkanır.

Daha önceden hazırlanmış olan örnekler, bir pipet yardımıyla kuyucuklara yüklenir ve cam plakları taşıyan kaset, 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankı içine yerleştirilir. Elektroforez işlemi, örnekler ayırma jeline geçene kadar 100 V'ta, geçtikten sonra 200 V'ta gerçekleştirilir ve yükleme tamponundaki Bromofenol Blue ayırma jelinden çıkana kadar sürdürülür.

Elektroforezin ardından, derişim jeli atılıp, ayırma jeli boyama çözeltisinde çalkalanarak bekletilir. Bantların boyanmasının ardından jel, arıtma çözeltisinde bekletilerek, fazla boya giderilir. Jel, kurutma sistemi ile kurutularak saklanır.

SDS-PAGE yürütme tamponu: 5X stok çözeltisi hazırlanır. 15 g Tris baz, 72 g Glisin ve 5 g SDS, distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Boyama çözeltisi:

100 ml % 10 asetik asit
100 ml % 95'lik alkolde çözölmüş % 0,25 Coomassie Blue

Arıtma çözeltisi:

% 5 asetik asit
% 50 etanol

2.2.5. Zimogram Analizi

Örneklerin hazırlanması

15 µl enzim örneği, 15 µl zimogram yükleme tamponu ile birlikte oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Protein belirteci Bölüm 2.2.4.'te verildiği şekilde hazırlandı. Süre bitiminde örnekler ve protein belirteçleri zimogram jeline yüklendi.

Jelin hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi

Zimogram analizinde kullanılan jellerin hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi Bölüm 2.2.4.'te anlatılan SDS-PAGE analizi ile aynıdır. Farklı olarak zimogram analizinde ayırma jeli % 0.2 oranında çözünür nişasta içermektedir. Zimogram analizinde elektroforez işlemi, 100 volt'ta 18 saat boyunca uygulandı. Elektroforez sırasında nişasta hidrolizinden kaçınmak amacıyla elektroforez işlemi

4°C’ ta gerçekleştirildi. Elektroforez işleminin ardından ayırma jeli, distile su ile yıkandıktan sonra geliştirme çözeltisi içinde, 37 °C’ ta 3 saat çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyonun ardından jel, % 12 TCA çözeltisi içinde 10 dakika bekletilerek enzimatik reaksiyonun durması sağlandı. Jel ortadan ikiye bölünüp, jelin bir tarafı Lügol ile, diğer tarafı ise Bölüm 2.2.4.’te anlatılan SDS-PAGE boyama çözeltisi ile boyandı. Bu yöntem, Martinez ve arkadaşlarından uyarlanmıştır (Martinez et al., 2000).

Yükleme Tamponu:

0,125 M Tris-HCl, pH 6,8

% 20 Gliserol

% 0,04 SDS

% 0,005 Bromophenol Blue

Geliştirme çözeltisi:

6,7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu, pH 6.9

2.2.6. Rekombinant α -Amilazın Nitelendirilmesi

Saflaştırılan rekombinant α -amilazın biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kapsamlı bir nitelendirme çalışması yapıldı. Değişik sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilen ilk analizler ile öncelikle, enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı ve pH’sı belirlendi. Daha sonra enzimin değişik sıcaklık ve pH değerlerindeki kararlılığı irdelendi. α -Amilaz enzimi çeşitli metal iyonları ile muamele edilerek, bu iyonların enzim aktivitesi üzerindeki etkisi belirlendi. Deterjanların enzim üzerindeki etkisini belirlemek üzere; bazı deterjanların varlığında bir dizi aktivite çalışması gerçekleştirildi. Literatürde yer alan çalışmaların ışığında, bilinen çeşitli efektör maddelerin α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi test edildi. Son olarak, α -amilaz kararlılığına etkisi bilinen bir dizi kimyasal madde kullanılarak, kararlılık çalışmaları yapıldı.

2.2.6.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi aşamasında, her bir sıcaklık değeri için iki set çalışıldı ve reaksiyonlar 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 95 ve 107 °C’ta

gerçekleştirildi. Enzim aktivite testi, Bölüm 2.2.2.'de belirtildiği üzere, 6.7 mM NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu içinde, 3 dakika inkübasyon sonucunda belirlendi. Bu aşamadan sonra, nitelendirme çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen tüm aktivite testlerinde, elde edilen optimum reaksiyon sıcaklığı uygulandı.

2.2.6.2. Optimum Reaksiyon pH'sının Belirlenmesi

Optimum reaksiyon pH'sının belirlenmesi amacıyla, her bir pH değeri için iki set çalışıldı ve çalışmalar pH 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11 ve 12 değerlerinde gerçekleştirildi. Daha önce 87 °C olarak belirlenen optimum reaksiyon sıcaklığında gerçekleştirilen ve her bir örnek için 20 µl enzim çözeltisinin kullanıldığı çalışmada, diğer parametrelerde değişiklik yapılmazken, yalnızca nişasta çözeltisinin hazırlandığı tamponun pH değerleri değiştirildi. Optimum pH çalışmalarında; 6.7 mM NaCl içeren 20 mM glisin-HCl (pH 3), sodyum asetat (pH 4, 5 ve 6), sodyum fosfat (pH 7, 8 ve 9) ve glisin-NaOH (pH 10 ve 11) tamponları kullanıldı. Optimum reaksiyon pH'sı belirlendikten sonra, diğer nitelendirme çalışmalarında bu değer kullanıldı.

2.2.6.3. Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

Rekombinant α -amilazın değişik sıcaklıklardaki kararlılığı, iki set halinde yapılan bir çalışma ile test edildi. Kontrol örneğinin 4 °C' ta bekletildiği çalışmada, 77, 82, 87 ve 92 °C'ta gerçekleştirilen kararlılık testlerinde her bir reaksiyon tüpü için 10 µl enzim örneği kullanıldı. 4, 77, 82 ve 87 °C'lardaki enzim kararlılığı, 5, 15, 30 ve 60'ıncı dakikalarda alınan örneklerin aktivite testine tabi tutulması ile belirlendi. 92 °C'ta gerçekleştirilen sıcaklık kararlılığı testinde 5 ve 15'inci dakika sonunda elde edilen değerler gözetilerek, daha uzun süreli uygulamalar yapılmadı. Kararlılık ve aktivite testlerinde; 6.7 mM NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu kullanıldı ve enzim aktivitesi 87 °C'ta değerlendirildi.

2.2.6.4. pH Kararlılığının Belirlenmesi

Rekombinant α -amilazın değişik pH değerlerindeki kararlılığı test edildi. İki set halinde gerçekleştirilen çalışmada, pH 2.2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 değerleri test edildi. 10 µl enzim örneği, ilgili pH tamponu ile 100 µl'ye tamamlandı ve bu işlem tüm pH değerleri için tekrar edildi. 4 °C'ta belirtilen tamponlarda 18 saat bekletilen örnekler, oda sıcaklığına alınarak, 30 dakika daha bekletildikten sonra, 6.7

mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu ile 500 µl'ye tamamlandı ve aktivite testine geçildi. Enzim aktivitesi 87 °C'ta değerlendirildi. pH kararlılığı çalışmalarında; 6.7 mM NaCl içeren 20 mM glisin-HCl (pH 2.2 ve 3), sodyum asetat (pH 4, 5 ve 6), sodyum fosfat (pH 7, 8 ve 9) ve glisin-NaOH (pH 10, 11 ve 12) tamponları kullanıldı.

2.2.6.5. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının, α -amilaz aktivitesi üzerine etkisinin gözlenmesi amacıyla, ilgili iyonların klor ile oluşturduğu tuzlara (KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, CuCl₂, BaCl₂, CoCl₂, NiCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₃), ek olarak çinko ve demirin oluşturduğu sülfatlı bileşikler (ZnSO₄, FeSO₄) ve ayrıca NH₄Ac kullanıldı. 6.7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu kullanılarak, son derişimde 1 ve 10 mM metal tuzu içerecek şekilde hazırlanan örnekler ile, iki set halinde çalışıldı. Her bir tüpe 10 µl enzim çözeltisi eklenmesinin ardından 5 dakika oda sıcaklığında (25 °C) bekletilen örneklerin aktivitesi 87 °C' ta değerlendirildi. Kontrol olarak, yalnızca enzim içeren, 6.7 mM NaCl, 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu kullanıldı.

2.2.6.6. Deterjanların Enzim Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi

Deterjanların enzim kararlılığı ve aktivitesi üzerindeki etkisi test edildi. Her bir test tüpüne 10 µl enzim çözeltisi konularak, örnekler 60 dakika boyunca, 37 °C'ta, çeşitli deterjanlarla muamele edildi. Örneklerin aktivitesi 0. ve 60. dakikalarda 87 °C'ta uygulanan test ile belirlendi. Çalışmalar iki set halinde gerçekleştirildi ve SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), sodyum deoksikolat, Triton X-100, Tween 20 ve CTAB (setil trimetil amonyum bromid) deterjanlarının % 0.1 ve % 1'lik derişimleri kullanıldı. Kontrol olarak, yalnızca enzim içeren, 6.7 mM NaCl, 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu kullanıldı. Diğer örnekler de aynı tampon içinde hazırlandı.

2.2.6.7. Bazı Efektör Maddelerin α -Amilaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi

α -Amilazın çeşitli kimyasal maddelerle olan ilişkisinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test yapıldı. Kontrol olarak, yalnızca enzim içeren, 6.7 mM NaCl, 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu kullanıldı. 10 mM EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit), PMSF (Fenil metil sülfonil florid) veya β -ME (Beta merkapt etanol) ya da 0.5, 1 veya 10 mM DTT (Ditiotreitol) varlığında, 5., 10. ve 30. dakikalarda 37

°C'ta inkübasyonunun ardından alınan örneklerin aktiviteleri belirlendi. Örnekler 6.7 mM NaCl, 20 mM sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu içinde hazırlandı. Aktivite testi 87 °C'ta, 10 µl enzim çözeltisi ile gerçekleştirildi.

2.2.6.8. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi

Bazı kimyasal maddelerin α -amilazın sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi test edildi. Kontrol olarak, yalnızca enzim içeren, 6.7 mM NaCl, 20 mM sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu kullanıldı. Enzim kararlılığı, 6.7 mM NaCl, 20 mM Sodyum fosfat, pH 6.9 tamponu içinde % 10 veya % 30 Gliserol, Etilen Glikol, DMSO (Dimetil sülfoksid) ya da 10 mM CaCl₂ veya 5 mM EDTA varlığında 82 °C'ta test edildi. 30. ve 60. dakikalarda alınan örneklerin aktivitesi 87 °C'ta değerlendirildi. Testler, 10 µl enzim örneği ile gerçekleştirildi.

2.2.7. Poligluteralehit Polistirendivinil Benzen Matriksi İçine Rekombinant α -Amilaz İmmobilizasyonu

Poligluteralehit polistirendivinil benzen (PPB) matriksine immobilizasyon denemesinde rekombinant hücrelerin sonikasyon üst sıvısı kullanıldı. Protein çözeltisinin, PPB matriks içinden özel bir sistem yardımıyla geçirilmesiyle elde edilen protein – matriks kompleksi üzerinden aynı düzenek kullanılarak, % 1 nişasta geçirildi ve bağlanan rekombinant α -amilazın aktivitesi değerlendirildi.

Çalışma sırasında, immobilizasyon matriksi olarak, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bölümü ile Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı tarafından geliştirilen PPB disk kullanıldı. İmmobilizasyon işleminin ilk aşaması; 25 ml, 6.7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat pH 6.9 tamponu, 1.5 ml sonikasyon üst sıvısı ve % 1 oranında poli etilen glikol (PEG)'un 24 saat boyunca immobilizasyon matriksi içinden özel bir sistem aracılığı ile geçirilmesiyle gerçekleştirildi. Kullanılan sistem, beher içinde tutulan enzim çözeltisinin bir devir daim pompası aracılığıyla, disk içinden yukarıdan aşağıya veya aşağıdan yukarıya geçirilmesini sağlamaktadır.

İkinci aşamada, 25 ml, 6.7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat pH 6.9 tamponu, % 1 PEG ve % 0.2 PGA (poli gluter aldehit) ile karıştırılarak, bir önceki aşamada protein bağlanmış disk içinden aynı sistem kullanılarak 18 saat boyunca

geçirildi. Bu aşamada, kullanılan PGA, enzimin matrikse çapraz bağlarla bağlanmasını sağlamaktadır.

Üçüncü aşamada, % 1 oranında çözünür nişasta içeren, 35 ml, 6.7 mM NaCl içeren, 20 mM sodyum fosfat pH 6.9 tamponu, protein – matriks kompleksi içinden, 2 saat boyunca 37 °C’ta geçirildi. Bu işlem ile, bağlanmış olduğu düşünülen rekombinant alfa-amilazın aktivitesinin belirlenmesi hedeflendi. 3, 60 ve 120’inci dakikalarda alınan örnekler ile birinci ve ikinci aşamalarda alınan örneklerle standart aktivite testi uygulandı. Bradford analizleri yapılarak, toplam protein miktarı tahmin edildi.

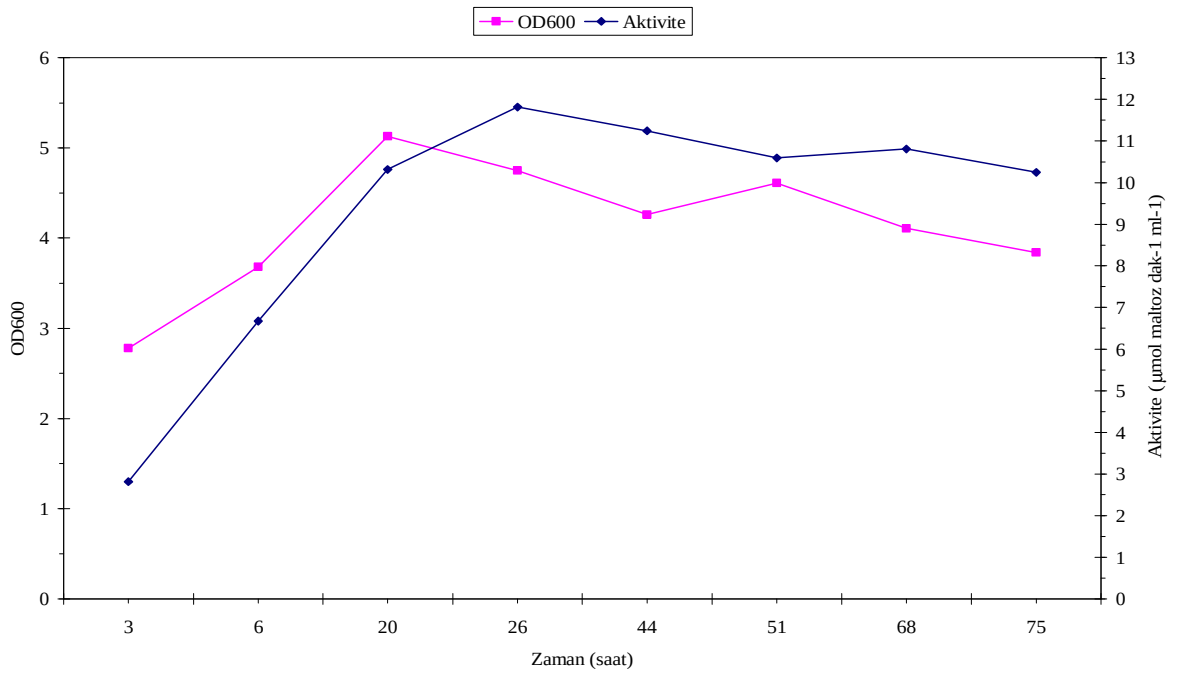
3. BULGULAR

3.1. *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 Kökenli Rekombinant α -Amilazın, *amy*-pUC19-*Bacillus subtilis* Hücrelerinde Üretimi ve Saflaştırılması

3.1.1. Rekombinant *amy*-pUC19-*Bacillus subtilis* Hücrelerinin Üretimi

Optimum hücre büyümesi ve enzim aktivitesi değerlerinin belirlenmesi

Optimum hücre büyümesi ve enzim aktivitesi değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada; son konsantrasyonu 100 μ g/ml olacak şekilde ampisilin içeren 165 ml LB besi yeri, ön kültürde büyütülen rekombinant α -amilaz üreticisi *amy*-pUC19 - *B. subtilis* hücreleri ile aşılandı ve 30 °C'ta, 170 rpm'de çalkalanarak büyümeye bırakıldı. A600 değeri 0,6-0,8 aralığına ulaştığında uyarılan hücrelerden, çeşitli saatlerde alınan örneklerde hücre büyümesi ve rekombinant α -amilaz aktivitesi değerlendirildi. Hücre yoğunluğu ile enzim aktivitesinin birbirine paralel bir seyir izlediği gözlemlendi ve en iyi büyüme / enzim aktivitesi değerlerine, IPTG ile uyarımı izleyen 26. saatte ulaşıldığı belirlendi.



Şekil 3.1.: *amy*-pUC19-*B. subtilis* soyunda büyüme eğrisi ve enzim aktivitesi.

3.1.2. Rekombinant α -Amilazın, *amy*-pUC19-*Bacillus subtilis* Hücrelerinden Saflaştırılması

Rekombinant α -amilaz, amonyum sülfat çöktürmesi, Q-sefaroze FF anyon değiştirici kromatografisi ve Sefakril S200 HR moleküler elek kromatografisinin birlikte kullanıldığı bir sistemle kısmen saflaştırıldı.

Tüm saflaştırma basamaklarında alınan örnekler ile yapılan Bradford ve aktivite testleri ile elde edilen sonuçlar, enzim aktivitesi, toplam enzim aktivitesi, protein konsantrasyonu, toplam protein miktarı, spesifik aktivite ve saflaştırma verimi değerleri hesaplanarak bir tablo halinde sunuldu (Tablo 3.1.)

Bölüm 2.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde üretilen *amy*-pUC19-*B. subtilis* hücreleri sonike edildi. Sonikasyon ile elde edilen özütün protein miktarı Bradford testi ile belirlendi ve protein konsantrasyonu 4.9 mg/ml bulundu. Rekombinant α -amilazın spesifik aktivitesi 2.8 U/mg olarak belirlendi. Sonikasyon ile elde edilen özüt santrifüj edildi ve oluşan üst sıvı ve çökelekten Bradford ve aktivite testleri yapıldı. Buna göre, sonikasyon üst sıvısının protein konsantrasyonu 2.5 mg/ml ve sonikasyon çökeleğinin 2.8 mg/ml olarak bulundu.

Ribonükleer proteinlerin ve ribonükleotitlerin çöktürülerek uzaklaştırılmasının amaçlandığı streptomisin sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen üst sıvıdaki protein konsantrasyonu, 1.44 mg/ml, rekombinant α -amilazın spesifik aktivitesi ise; 10.19 U/mg olarak belirlendi.

% 40 amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen üst sıvıdaki protein miktarı 1.34 mg/ml, rekombinant α -amilaz için spesifik aktivite ise 8.74 U/mg olarak belirlendi. Bu aşamada elde edilen çökeleğin protein konsantrasyonu ve spesifik aktivitesi sırasıyla, 0.25 mg/ml ve 3.39 U/mg ve saflaştırma verimi; % 88.9 bulundu.

% 70 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından elde edilen çökelekten yapılan Bradford ve aktivite testleri sonucunda; protein konsantrasyonu 17.34 mg/ml, spesifik aktivite 11.07 U/mg ve bu aşamadaki, saflaştırma verimi % 38.4 olarak belirlendi.

Diyaliz, santrifüj ve filtrasyon işlemlerinin ardından elde edilen örneğin protein konsantrasyonu, 15,78 mg/ml ve spesifik aktivitesi, 5.63 U/mg olarak belirlendi.

Q-sefaroze anyon değiştirici kolon kromatografisinin ardından, elde edilen fraksiyonlar birleştirildi. 33.2 ml hacmindeki bu örnekte protein konsantrasyonu 0.18 mg/ml, spesifik aktivite 208.38 U/mg ve saflaştırma verimi % 24.7 bulundu. Q-sefaroze kolon kromatografisinin ardından konsantre ve diyaliz edilen örneğin protein konsantrasyonu, 4.27 mg/ml ve spesifik aktivitesi, 231 U/mg olarak belirlendi.

Sefakril moleküler elek kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar, SDS-PAGE profillerine ve alınan α -amilaz aktivite değerlerine göre 3 ayrı havuzda toplandı. Nitelendirme çalışmalarının gerçekleştirildiği havuz 1 ile yapılan Bradford ve aktivite analizleri sonucunda, protein konsantrasyonu, 0.1 mg/ml, toplam protein miktarı 0.4 mg, spesifik aktivite 1808.4 U/mg, verim % 13.4 ve saflaşma oranı 653.5 olarak belirlendi. Yukarıda verilen değerler Tablo 3.1’de özetlenmektedir.

Tablo 3.1. Rekombinant α -amilazı saflaştırma tablosu

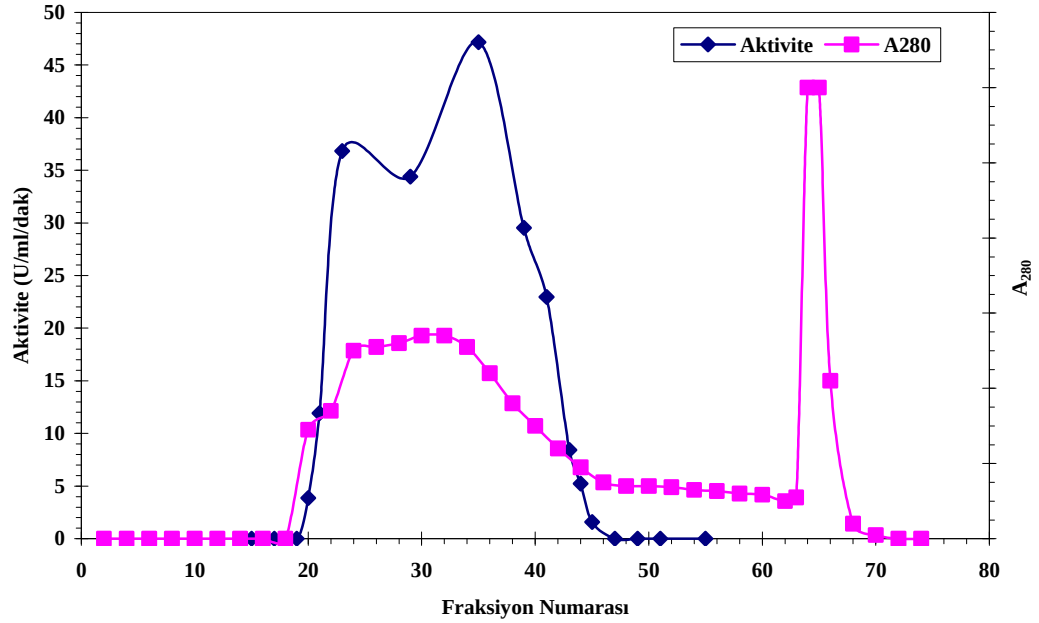
	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml/dak)	Konsantrasyon (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma verimi (%)
Sonikasyon toplam	372	13,42	4,85	2,77	100
Sonikasyon üst sıvı	346	9,29	2,47	3,77	64,37
Streptomisin üst sıvısı	350	14,69	1,44	10,19	102,97
%40 A. sülfat üst sıvısı	380	11,69	1,34	8,74	88,95
%70 A. sülfat peleti	410	191,92	17,34	11,07	38,44
Q- sefaroze havuz	33.2	37,15	0,18	208,38	24,70
Sefakril M.E.K	3.80	176,23	0,10	1808,41	13,41

3.1.3. SDS-PAGE ve α -Amilaz Aktivite Testi ile Kolon Fraksiyonlarının Seçimi

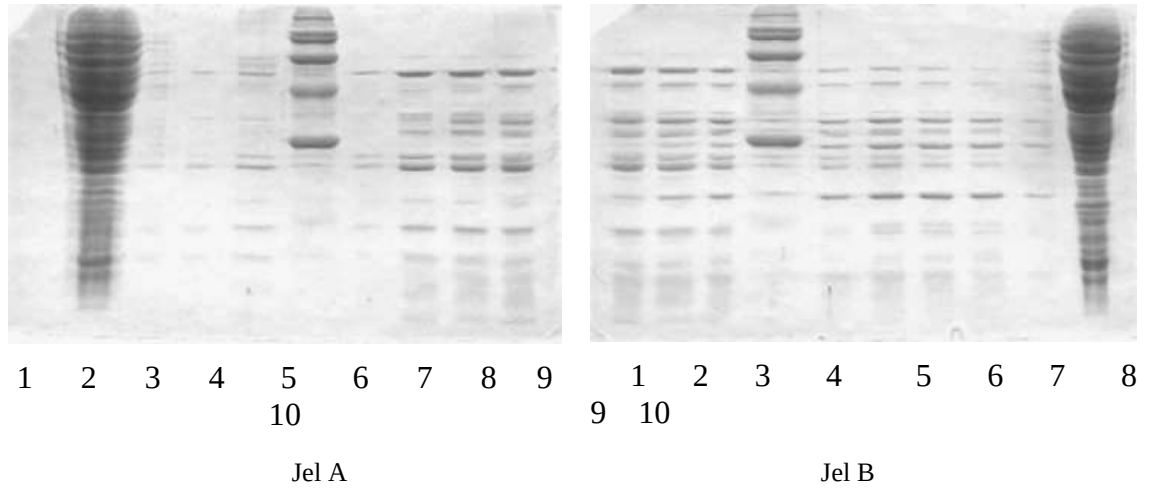
İyon değiştirme kromatografisinin ardından elde edilen fraksiyonlardan, moleküler elek kromatografisi kolonuna yüklenecek örneklerin belirlenmesinde ve moleküler elek kromatografisinin ardından, enzim kaynağı olarak kullanılacak havuzların oluşturulmasında SDS-PAGE analizi ve α -amilaz aktivite testi sonuçlarından yararlanıldı.

- Q-sefaroze kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların A280 ve aktivite değerleri şekil 3.2’ de; SDS-PAGE profilleri şekil 3.3’ de sunuldu. Yüksek

α -amilaz aktivitesi gösteren ve göreceli saf 20 - 41. fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki aşama için hazırlandı.



Şekil 3.2. Q-sefaroze kromatografisi fraksiyonlarına karşı çizilen α -amilaz aktivitesi ve A280 absorpsiyon grafiği.

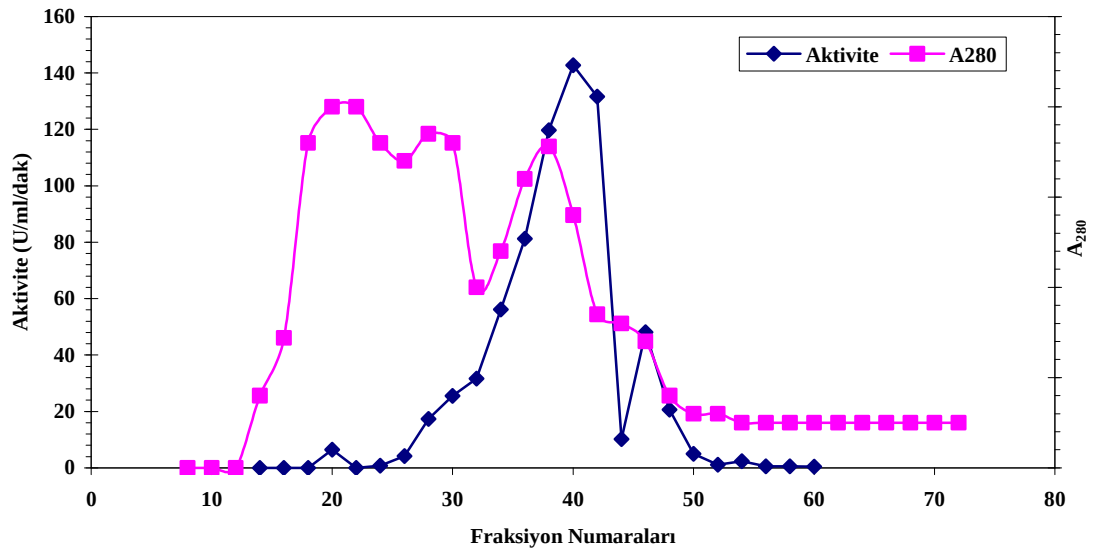


Şekil 3.3. Q-sefaroze anyon değişirme kromatografisi fraksiyonları ile yapılan SDS-PAGE analizi. **Jel A: Kuyular; 2: kolon öncesi örnek, 4: frk. 19, 5: frk. 21, 6: Protein belirteci, 7: frk. 23, 8: frk. 25, 9: frk. 27, 10: frk. 29. Jel B: Kuyular, 1: frk. 31, 2: frk. 33, 3: frk. 35, 4: Protein belirteci, 5: frk. 37, 6: frk. 39, 7: frk. 41, 8: frk. 43, 10: frk. 80. (frk: fraksiyon)**

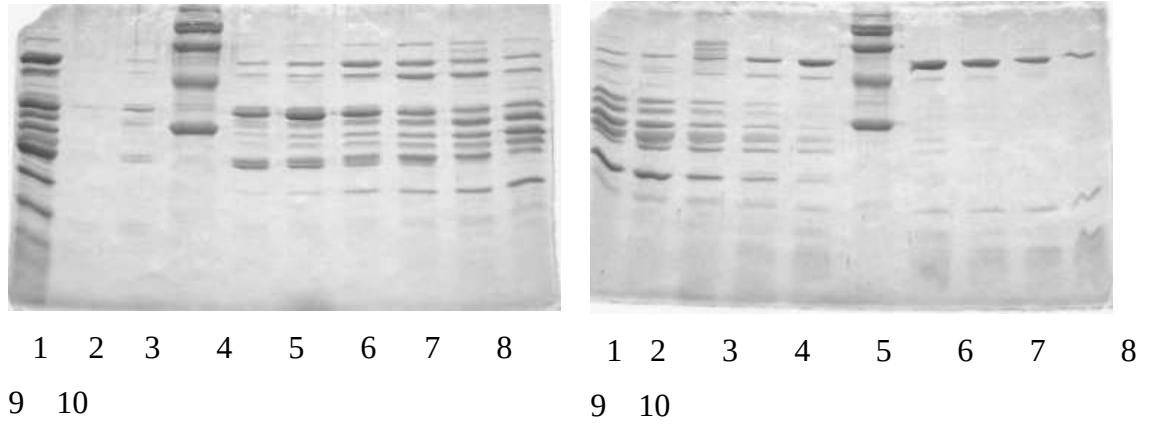
(Protein belirteci: karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa)

Q-sefaroze FF anyon değiştirici kolonunun 20 – 41. fraksiyonları, Bölüm 4.1.'de belirtilen işlemlerin ardından sefakril S-200 HR moleküler elek kolonuna yüklendi. Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografisi fraksiyonlarının A280 ve α -amilaz aktivite değerleri Şekil 3.4'de, SDS-PAGE profili Şekil 3.5.'de verildi. Bu sonuçlar birlikte değerlendirilerek 3 farklı havuz oluşturuldu.

- Sefakril havuz 1: 39 – 45. fraksiyonlar
- Sefakril havuz 2: 28 – 38. fraksiyonlar
- Sefakril havuz 3: 46 – 48. fraksiyonlar

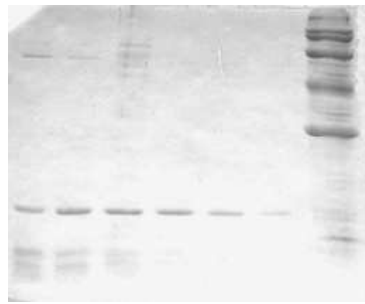


Şekil 3.4. Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografisi fraksiyonlarına karşı çizilen α -amilaz aktivitesi ve A280 grafiği.



Jel A

Jel B

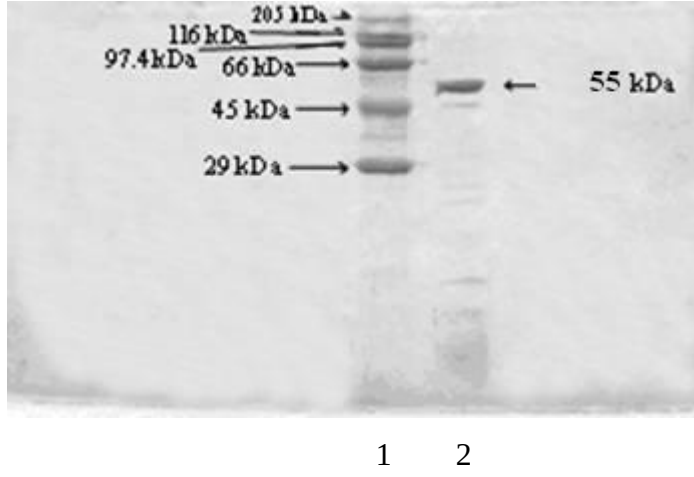


Jel C

Şekil 3.5. Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografisinin ardından seçilen fraksiyonlarla yapılan SDS-PAGE analizi. **Jel A: Kuyular, 1:** Kolon öncesi, **2:** frk. 14, **3:** frk. 16, **4:** Protein belirteci, **5:** frk. 18, **6:** frk. 20, **7:** frk. 22, **8:** 24. **9:** frk. 26, **10:** frk. 28. **Jel B: Kuyular, 1:** frk. 30, **2:** frk. 32, **3:** frk. 34, **4:** frk. 36, **5:** frk. 38, **6:** Protein belirteci, **7:** frk. 40, **8:** 42. **9:** frk. 44, **10:** frk. 46. **Jel C: Kuyular, 1:** frk. 48, **2:** frk. 50, **3:** frk. 52, **4:** 54, **5:** frk. 56, **6:** frk. 58, **7:** Protein belirteci (karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa)

3.1.4. SDS-PAGE Analizi ile Moleküler Ağırlık Tayini

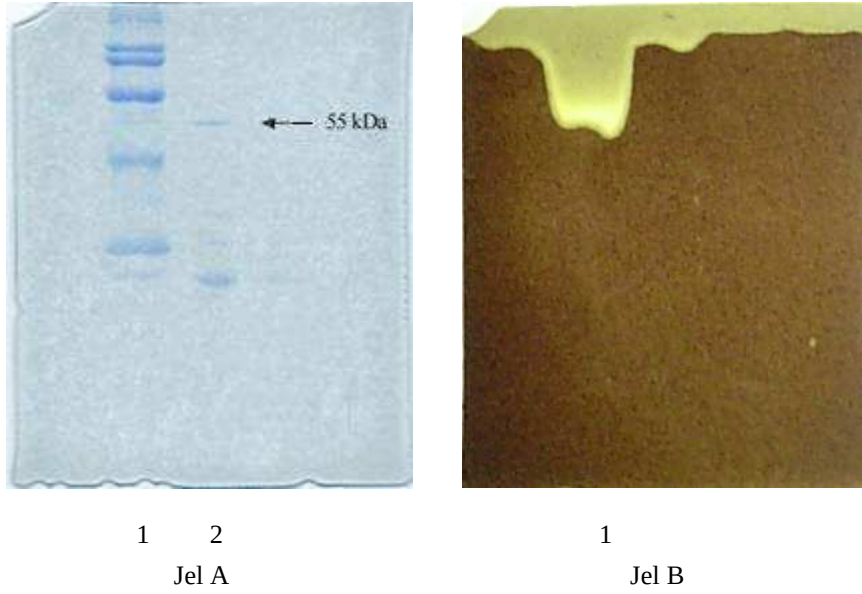
Kısmen saflaştırılan rekombinant α -amilazın moleküler ağırlığı, SDS-PAGE analizi ile ve protein belirteçler kullanılarak, yaklaşık 55 kDa olarak tahmin edildi.



Şekil 3.6. Rekombinant α -amilazın moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi. Kuyu 1: Protein belirteci (karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa), Kuyu 2: Sefakril jel B, fraksiyon 40

3.1.5. Zimogram Analizi ile Rekombinant α -Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

% 0.2 oranında nişasta içeren SDS-PAGE analizi (Zimogram) ile elde edilen sonuçlar şekil 3.7.'de verildi. Zimogram analizinde (Jel B), rekombinant α -amilazın nişastayı hidroliz ederek bir yol oluşturduğu gözlemlendi. Enzimatik aktivite sonucu nişastanın hidroliz edildiği bölge, jelin lügol ile boyanmasının ardından sarı renkte gözlemlendi (Şekil 3.7. Jel B, Kuyu 1).

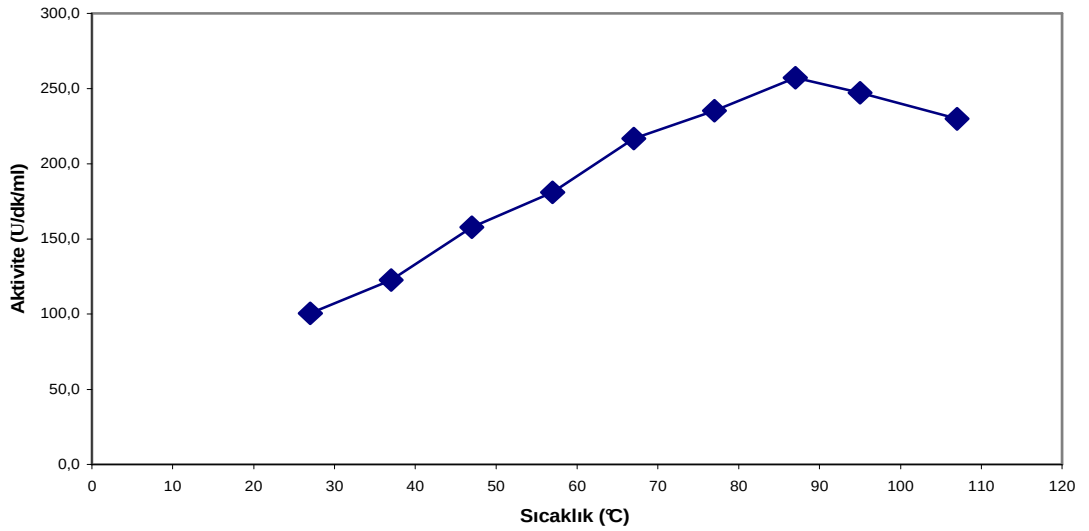


Şekil 3.7. Rekombinant α -amilazın zimogram analizi. Jel A, Kuyu 1: Moleküler ağırlık belirteçleri (karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa). Kuyu 2: Sekfakril S-200 HR Kolon Kromatografisi, havuz 2, Jel B, Kuyu 1: Sekfakril Kolon Kromatografisi, havuz 2.

3.2. Rekombinant α -Amilazın Nitelendirilmesi

3.2.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığı

Kısmen saflaştırılan rekombinant α -amilazın optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 95 ve 107 °C’larda aktivite testleri yapıldı. Enzimin optimum aktivite sıcaklığı 87°C olarak belirlendi ve diğer nitelendirme çalışmalarındaki aktivite testleri için bu değer kullanıldı. 27 - 87 °C aralığında artış gösteren enzim aktivitesi, 87 – 107 °C aralığında düşmektedir. Rekombinant α -amilazın 27 °C’taki aktivitesi 100,5 U, 87 °C’ ta için 257,2 U ve 107 °C’ta 229,9 U olarak bulundu (Şekil 3.8).

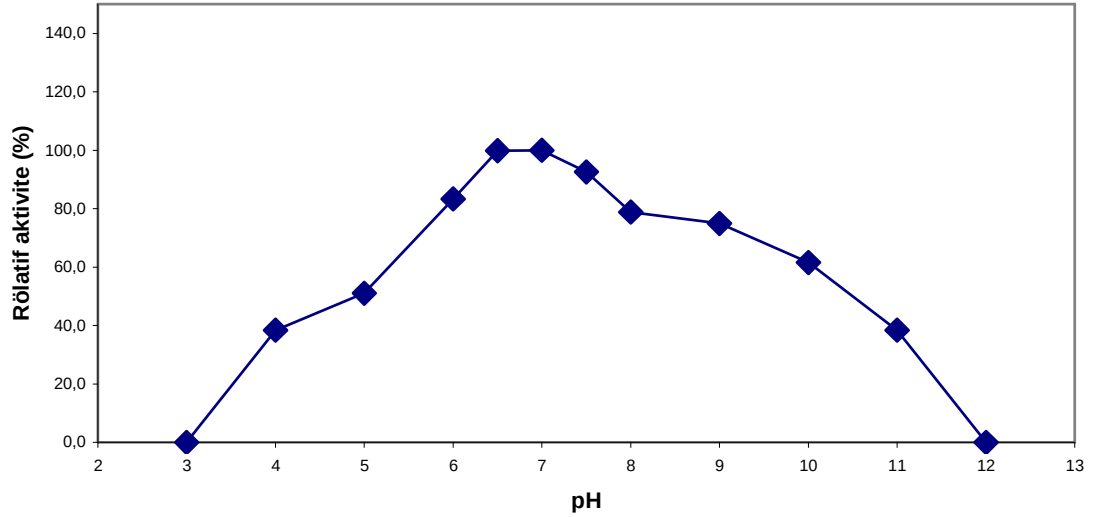


Şekil 3.8. Rekombinant α -amilazın optimum sıcaklık grafiği. y eksen: Enzim aktivitesi (U/dakika/ml), x eksen: Reaksiyon sıcaklıkları.

3.2.2 Optimum Reaksiyon pH’sı

Rekombinant α -amilazın farklı pH değerlerinde gösterdiği aktivite değerlerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi aktivite çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışmalar ışığında, saflaştırılan rekombinant α -amilazın optimum reaksiyon pH değerinin 6.5-7.0 aralığında olduğu saptandı. Enzim aktiviteleri, pH 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11 ve 12 değerlerinde irdelendi. pH 3’te hiçbir enzim aktivitesi gözlenmezken, en iyi aktivite değerlerine pH 6.5-7.0 aralığında ulaşıldı. pH 7.0’ dan sonra azalan enzim aktivitesi, pH 12’de 0 olarak belirlendi. Optimum pH grafiği, pH

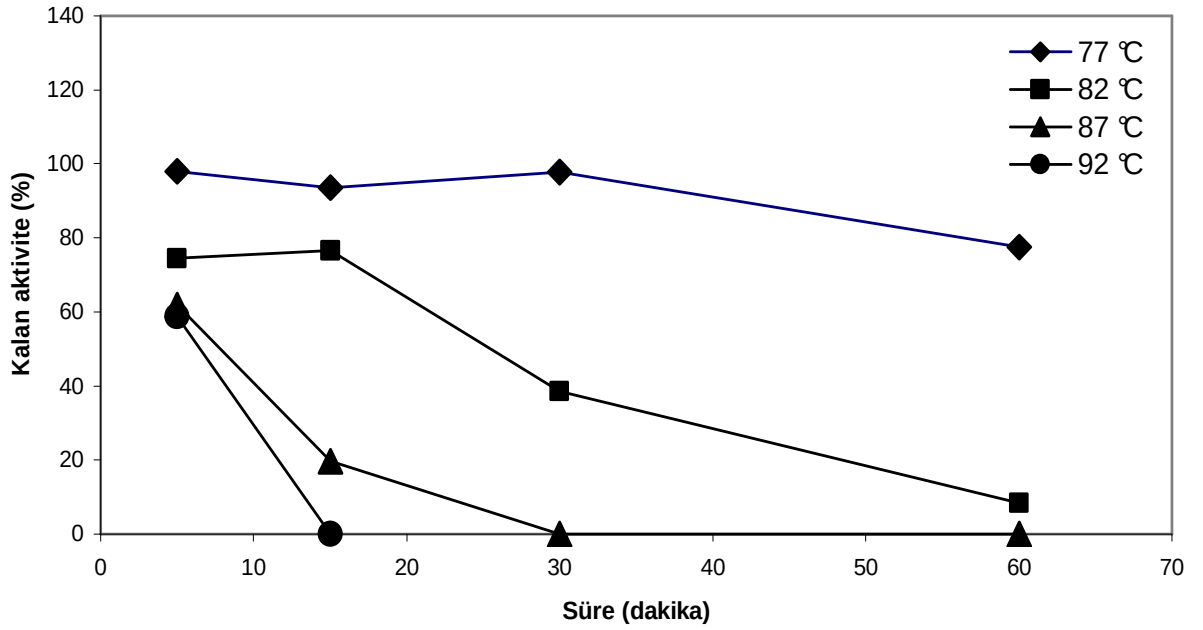
7.0'daki değer % 100 kabul edilerek ve diğer sonuçların göreceli değerleri kullanılarak çizildi (ekil 3.9).



Şekil 3.9. Rekombinant α -amilazın optimum pH grafiği. y eksenini: Rölatif aktivite (%), x eksenini: Reaksiyon pH'ları.

3.2.3. Sıcaklık Kararlılığı

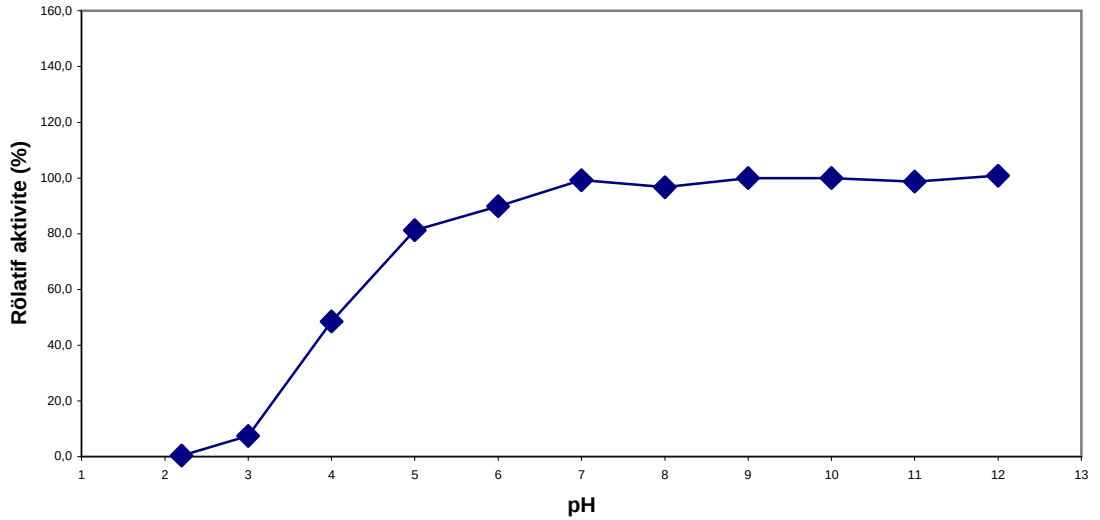
Rekombinant α -amilazın farklı sıcaklık değerlerindeki kararlılığı gözlendi. 60 dakika boyunca 77, 82, 87 ve 92 $^{\circ}\text{C}$ 'ta bekletilen örnek tüplerinden, 5, 15, 30 ve 60'ıncı dakikalarda alınan örneklerle aktivite testi yapıldı. Elde edilen sonuçların 4 $^{\circ}\text{C}$ 'ta bekletilen kontrol örneğinden aynı sürelerde elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması ile (%) kalan aktivite değerleri hesaplandı. Buna göre, 5, 15, 30 ve 60'ıncı dakikalar için elde edilen (%) kalan aktivite değerleri sırasıyla; 77 $^{\circ}\text{C}$ için, % 98, 93.6, 97.8 ve 97.8; 82 $^{\circ}\text{C}$ için, % 74.5, 76.5, 38.55 ve 8.5; 87 $^{\circ}\text{C}$ için, 5, 15 ve 30. dakikalarda % 61.9, 19.7 ve 0; 92 $^{\circ}\text{C}$ için ise, 5 ve 15. dakikalarda % 59 ve 0 olarak belirlendi.



Şekil 3.10. Rekombinant α -amilazın sıcaklık kararlılığı grafiği. y eksen: Kalan aktivite (%), x eksen: Süre (dakika).

3.2.4. pH Kararlılığı

Rekombinant α -amilazın farklı pH değerlerindeki kararlılığı test edildi. Bu amaçla, yöntem kısmında anlatıldığı şekliyle; pH 2.2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 değerlerinde bekletilen rekombinant α -amilaz enziminin 18. saat sonundaki pH kararlılıkları yapılan aktivite testi ile belirlendi. Rekombinant α -amilazın, pH 7-12 aralığında kararlı olduğu gözlemlendi. pH 7.0' de elde edilen değer % 100 kabul edilerek, rölatif aktivite değerleri hesaplandı. Buna göre rekombinant α -amilazın pH 7.0 – 12 aralığındaki rölatif aktivitesi % 96 – 100, pH 5.0 ve 6.0'daki rölatif aktivitesi sırasıyla; % 81.3 ve % 90 olarak belirlendi. pH 4.0 değerinde % 48.5 olan rölatif aktivite, pH 2.2 ve 3.0 değerlerinde sırasıyla, % 0.4 ve 7.5 bulundu (Şekil 3.11).



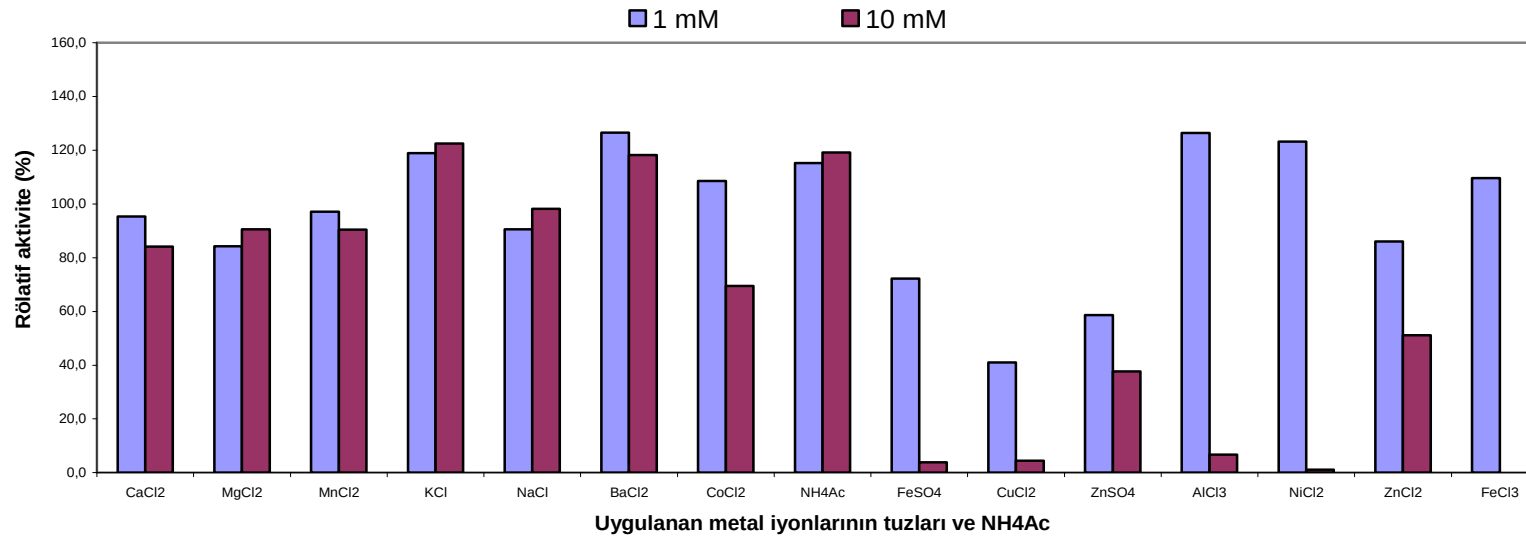
Şekil 3.11. Rekombinant α -amilazın pH kararlılığı grafiği. y eksen: Rölatif aktivite (%), x eksen: pH.

3.2.5. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tablo 3.2.'de belirtilen tek, iki ve üç değerlikli metal iyonlarının klor ve sülfat tuzları ile amonyum asetatın rekombinant α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi test edildi. Rekombinant α -amilazın adı geçen iyonlar ile muamele edilmesinin ardından, yalnızca enzim içeren kontrol çözeltisine göreceli kalan aktivite değerleri (%) hesaplandı. Bu sonuçlar ışığında çizilen grafik değerlendirilerek, inhibitör/aktivatör etkisi olan veya herhangi bir etki göstermeyen metal iyonları belirlendi. 1 ve 10 mM derişimlerinde K^+ , Ba^{+2} ve NH_4Ac 'ın, α -amilaz aktivitesini hafifçe arttırdıkları gözlemlendi. Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Na^+ 'un 1 ve 10 mM derişimlerde rekombinant α -amilaz aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Ağır metallerden Al^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} ($FeCl_3$)'in 1 mM derişimde enzim aktivitesini hafifçe arttırdığı gözlenirken, 10 mM'de aktiviteyi düşürdüğü belirlendi. Fe^{+3} 'ün sülfat tuzu, Cu^{+2} ve Zn^{+2} 'nin enzim aktivitesini 1 mM derişimde etkili bir şekilde, 10 mM'da ise kuvvetle düşürdüğü saptandı. Metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi; Tablo 3.2 ve Şekil 3.12'de sunuldu.

Tablo 3.2. Çeşitli metal iyonları ve NH_4Ac 'ın rekombinant α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi. Belirtilen sülfat tuzlarının dışında, diğer metallerin klor tuzları kullanılmıştır. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

	Ca^{+2}	Mg^{+2}	Mn^{+2}	K^{+1}	Na^{+1}	Ba^{+2}	Co^{+2}	NH_4Ac	FeCl_3	Cu^{+2}	Zn^{+2} (ZnSO_4)	Al^{+3}	Ni^{+2}	Zn^{+2}	Fe^{+3} (FeSO_4)
1mM	95,2	84,2	97,1	118,9	90,6	126,5	108,5	115,2	109,6	41,0	58,7	126,4	123,2	86,1	72,2
10 mM	84,1	90,6	90,4	122,5	98,2	118,1	69,4	119,1	0	4,4	37,7	6,7	1,1	51,1	4,7



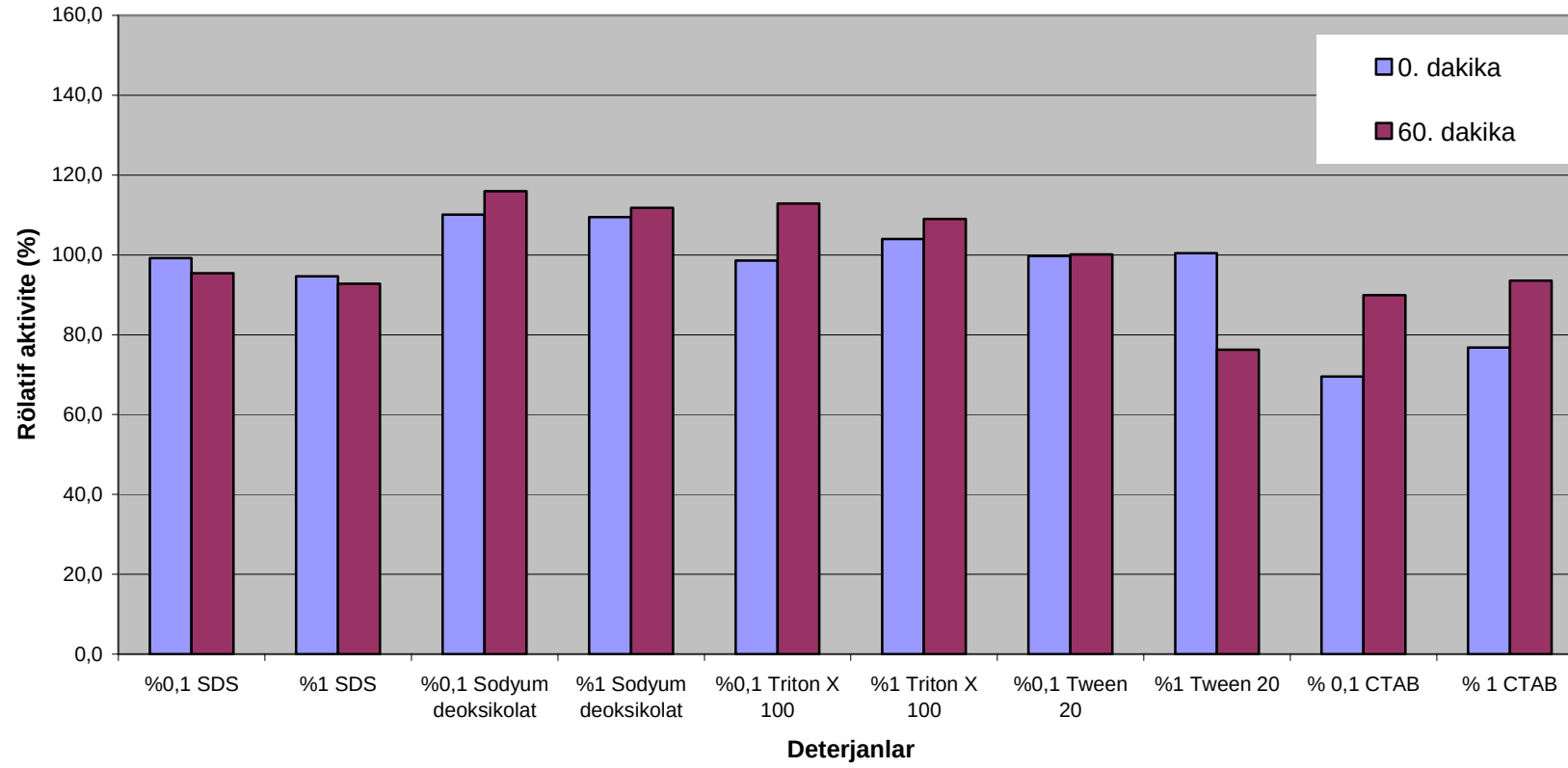
Şekil 3.12. Çeşitli metal iyonları ve NH_4Ac 'ın rekombinant α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi. Belirtilen sülfat tuzlarının dışında, diğer metallerin klor tuzları kullanılmıştır. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

3.2.6. Deterjanların Enzim Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi

Yüzey aktif özelliği bilinen çeşitli deterjanlar ile enzim kararlılığı ve aktivite çalışması yapıldı. Tüm deterjanların, % 0.1 ve % 1'lik konsantrasyonlarının kullanıldığı ve 37 °C'ta gerçekleştirilen çalışmada, 0. ve 60. dakikalarda alınan örneklerle α -amilaz aktivite testi uygulandı ve yalnızca enzim içeren kontrol örneğinin aktivitesine göreceli, % kalan aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre; SDS'in rekombinant α -amilaz kararlılığında kayda değer bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Sodyum deoksikolatın her iki derişimde rekombinant α -amilaz enzim aktivitesini hafifçe arttırdığı gözlemlendi. Triton X 100'ün (izooktilfenoksi-polietoksietanol) % 0.1'lik konsantrasyonunun kararlılıkta önemli bir etkiye sahip olmamasına karşın, % 1'lik konsantrasyonunun enzim kararlılığını hafifçe arttırdığı belirlendi. Tween 20'nin (Polioksietilen sorbitan monolaurat) % 0.1'lik konsantrasyonunun enzim kararlılığında etkili olmamasına karşın, % 1'lik konsantrasyonunun bir saat sonra alınan örnekte kararlılığı, % 76.2'ye düşürdüğü gözlemlendi. Son olarak, CTAB (setil trimetil amonyum bromid)'in ilk dakikalarda gözlenen etkisinin enzim kararlılığını azaltma yönünde olduğu, ancak bir saatlik inkübasyonun sonunda bu etkinin aynı güçte olmadığı belirlendi.

Tablo 3.3. Çeşitli deterjanların enzim kararlılığı ve aktivitesi üzerine etkisi ((%) kalan aktivite).

	0. dakika	60. dakika
% 0,1 SDS	99,2	95,4
% 1 SDS	94,6	92,8
% 0,1 Sodyum deoksikolat	110,1	115,9
% 1 Sodyum deoksikolat	109,4	111,8
% 0,1 Triton X 100	98,6	112,9
% 1 Triton X 100	104,0	109,0
% 0,1 Tween 20	99,7	100,2
% 1 Tween 20	100,4	76,2
% 0,1 CTAB	69,5	90,0
% 1 CTAB	76,8	93,6



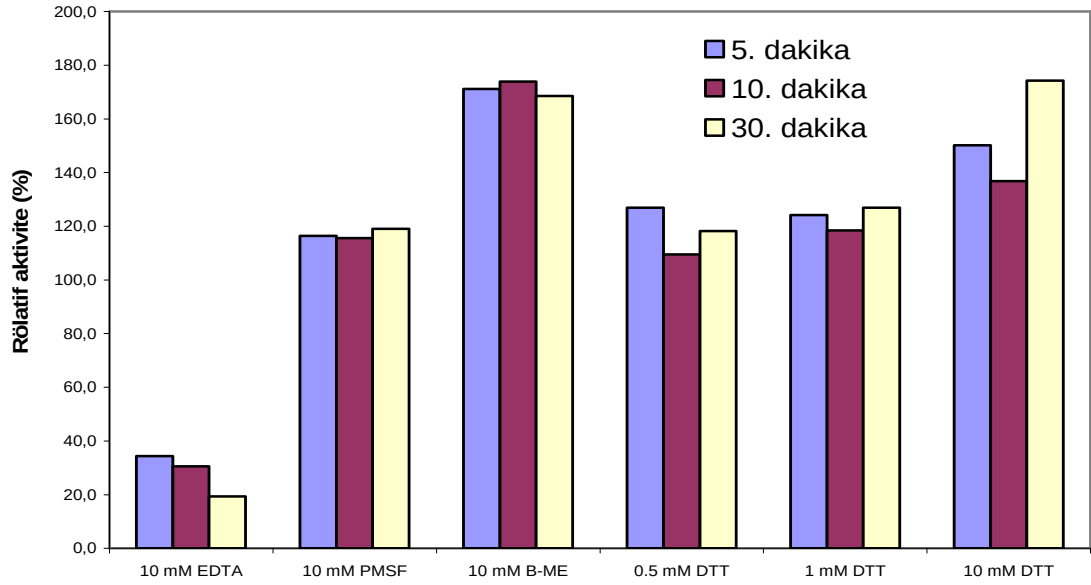
Şekil 3.13. Çeşitli deterjanların enzim kararlılığı ve aktivitesi üzerine etkisi. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

3.2.7. Bazı Efektör Maddelerin Rekombinant α -Amilaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi

Çeşitli kimyasal maddelerin rekombinant α -amilaz üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test yapıldı. 37°C'ta Tablo 3.5.'de belirtilen maddelerin varlığında gerçekleştirilen çalışmada, 5, 15. ve 30'uncu dakikalarda alınan örneklerde, 87 °C'taki enzim aktivitesi değerlendirildi. Yalnızca enzim içeren kontrol örneğine göreceli % kalan aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre, 10 mM EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)'nin, enzim aktivitesi ve kararlılığını irdelenen tüm sürelerde düşürdüğü (5, 15 ve 30'uncu dakikalar için sırasıyla, % 34,4, 30,6, 19,3) gözlemlendi. PMSF (Fenil metil sülfonil florid)'in 10 mM'lık konsantrasyonunun, enzim kararlılığı ve aktivitesini hafifçe arttırdığı (tüm sürelerde ~ % 119) ve β -ME (Beta merkapt etanol)'ün enzim aktivitesini, yine tüm sürelerde, birbirine yakın değerlerde (~ % 170) arttırdığı belirlendi. 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlardaki DTT (Ditiotreitol)'nin, enzim aktivitesini benzer oranlarda arttırdığı gözlenirken, 10 mM DTT'nin aktiviteyi, 30. dakika sonunda % 170 arttırdığı saptandı.

Tablo 3.4. Bazı efektör maddelerin rekombinant α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

	5. dakika	10. dakika	30. dakika
10 mM EDTA	34,4	30,6	19,3
10 mM PMSF	116,4	115,6	119,0
10 mM B-ME	171,2	173,9	168,5
0,5 mM DTT	127,0	109,5	118,2
1 mM DTT	124,2	118,4	126,9
10 mM DTT	150,2	136,9	174,2



Şekil 3.14. Bazı efektör maddelerin rekombinant α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

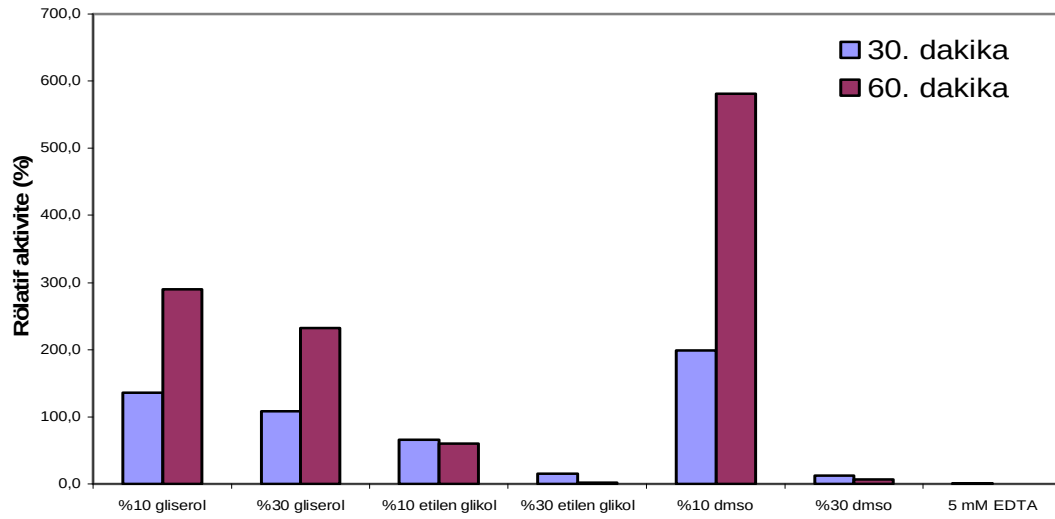
3.2.8. Çeşitli Kimyasal Maddelerin Enzim Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi

Bazı kimyasal maddelerin rekombinant α -amilazın sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi test edildi. Tablo 3.5' te belirtilen kimyasalların varlığında 82 °C' ta bekletilen örneklerle, 30. ve 60. dakikalarda aktivite testi uygulandı. % 10 Gliserol varlığında yapılan testlerde enzim aktivitesi (% kalan aktivite), 30. dakika için % 136 ve 60. dakika için % 290 oranında; % 30 gliserol için ise; 30. ve 60. dakikalarda sırasıyla, % 108.8 ve 232.3 oranında arttı. % 30 Etilen Glikol varlığındaki, aktivite % 10 derişimde olana göreceli çok daha belirgin bir azalma gösterdi. DMSO (Dimetil sülfoksit) ile yapılan çalışmalarda oldukça ilginç sonuçlar elde edildi. % 10 DMSO, enzim kararlılığını 60. dakikanın sonunda, % 581.2 ye çıkartırken, % 30 DMSO enzim kararlılığını yine aynı sürenin sonunda % 7'lere kadar düşürdü. 5 mM EDTA varlığında 30 ve 60 dakika bekletilen örneklerde enzim aktivitesi hemen bütünüyle kaybedildi.

Yapılan testlerde, 10 mM'lık derişimdeki Ca^{+2} , un α -amilaz aktivite testinde kullanılan 6,7 mM NaCl, 20mM sodyum fosfat tamponunda çökelti oluşturduğu gözlemlendi. Elde edilen verilerin sağlıklı olmayacağı düşünülerek değerlendirilmeye alınmadı.

Tablo 3.5. Çeşitli kimyasal maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

	30. dakika	60. dakika
% 10 Gliserol	136,1	289,9
% 30 Gliserol	108,8	232,3
% 10 Etilen Glukol	65,7	60,4
% 30 Etilen Glukol	15,4	1,7
% 10 DMSO	198,8	581,2
% 30 DMSO	12,7	7,0
5 mM EDTA	0,9	0,0



Şekil 3.15. Çeşitli kimyasal maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi. Değerler (%) kalan aktivite cinsindendir.

3.2.9. Poligluteraldehit Polistirendivinil Benzen Matriksi İçine Rekombinant α -Amilaz İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon diski içinden geçirilen örnekler ile Bradford ve alfa-amilaz aktivite testi yapıldı.

Elde edilen toplam protein miktarları değerlendirildi. İmmobilizasyon ncesi örneğin toplam protein miktarı, 3.16 mg olarak belirlendi. 1. ve 2. aşamalarda elde edilen çözeltelerde yapılan Bradford analizleri sonucu hesaplanan toplam protein miktarları sırasıyla, 1.26 ve 1.28 mg bulundu. Buna göre diske bağlanan protein miktarının başlangıçta var olanın yaklaşık % 19'u olduğu sonucuna varıldı.

İmmobilizasyon ncesi örnek ile 1. ve 2. kuvvetlendirme örneklerine, çözeltelerde kalan rekombinant alfa-amilaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, standart α -amilaz aktivite testi uygulandı. İmmobilizasyon ncesi örneğin aktivitesi ~10 μmol maltoz/ml/dk. olarak belirlenirken, 1. ve 2. kuvvetlendirme örneklerinin aktivite değerleri sırasıyla, 1.1 ve 0.41 μmol maltoz/ml/dk bulundu.

Matriks içinden geçirilen % 1 nişasta örneğine önce doğrudan, ve çözeltiye geçebilecek rekombinant α -amilazın aktivitesini belirlemek amacıyla ayrıca inkübe edildikten sonra standart α -amilaz aktivite testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar bu iki değerin çok yakın olduğunu gösterdi (sırasıyla 12.7 ve 12.3 μmol maltoz/ml/dakika).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

α -Amilazlar (α -1,4-glukan-4-glukanhidrolaz; EC 3.2.1.1) kalsiyum taşıyan ve endo-amilazlar enzim ailesine üye bir enzim grubudur. Endo-amilazlar nişasta ve benzer yapıdaki karbohidratlardaki α -D-(1-4) glikozidik bağlarını kırarak α -anomerik konfigürasyona sahip ürünler oluşturan enzimlerdir (Kandra, 2003). α -Amilazların ana substratını nişasta ve benzer yapıdaki polisakkaritler oluşturmaktadır (van der Maarel et al., 2002).

α -Amilazlar, birçok canlı türünden elde edilebildikleri halde, en verimli olarak kullanılabilen α -amilaz kaynaklarını, bakteriler ve arkea oluşturmaktadır. Enzimlerin daha çok mikrobiyal kaynaklardan elde edilmesinin temel nedeni; kolay, hızlı ve ekonomik olarak üretilmeleri, enzimlerin mikroorganizmalardan kolaylıkla elde edilmesi ve çeşitli uygulama ve değişikliklerle, istenen özelliklere sahip enzimlerin üretilmesidir (Gupta et al., 2003; Kwak et al., 1998). α -Amilazların kullanıldığı birçok endüstriyel süreçte sıcaklığa dayanıklı enzimler gereksinilmekte, enzim kaynağı olarak daha çok, 80 °C ve üstü sıcaklıklarda yaşayan, sıcak sever organizmalar tercih edilmektedir (Kwak et al., 1998). α -Amilazların kullanıldıkları başlıca endüstriyel süreçlerden biri olan glukoz ve fruktoz şurupları üretiminde, jelatinizasyon (100-110 °C) ve sıvılaştırma (80-90 °C) aşamaları, yüksek sıcaklık gerektiren uygulamalardır. Geçmiş yıllarda, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus acidocaldarius*, *Thermus* spp., *Pyrococcus furiosus* ve *Pyrococcus woesei* gibi, 100 °C ve üstü sıcaklıklarda çalışan α -amilazları üreten organizmaların izolasyonu ve üretimi gerçekleştirildi (Sidhu et al., 1998). Doğal sıcak sever olan bu mikroorganizmaların enzim üretkenliklerinin düşük olması ve büyüme / enzim üretimi için daha fazla enerji kullanımına neden olan yüksek sıcaklıklarda üretilmeleri gerektiğinden, günümüzde bu mikroorganizmaların sahip oldukları genler; ılımlı sıcaklıklarda yaşayan ve kolay üretilen organizmalara aktarılmakta, α -amilaz enzimi bu organizmalarda üretilerek saflaştırılmaktadır (Sidhu et al., 1998). Bu tür klonlama ve ekspresyon çalışmalarında daha çok, genetik ve fizyolojik özellikleri bilinen organizmalar kullanılmakta ve sıklıkla tercih edilen organizmalar arasında *B. subtilis* ve *E. coli* yer almaktadır (Jorgensen et al., 1997; Huang et al., 2002; Sidhu et al., 1998). Genetik mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte, *Bacillus subtilis*, enzim genetiği ve moleküler biyoloji çalışmaları için vazgeçilmez bir konak halini almıştır. *B. subtilis*'in avantajları arasında, hızlı ve kolay büyümesi, yüksek

enzim üretim kapasitesi, patojen olmaması (GRAS: Generally Regarded As Safe) sayılabilir (Huang et al., 2002).

B. licheniformis α -amilaz geni öncelikle Ortlepp ve ark. tarafından FDO2 soyundan hareket edilerek, pSA33 vektörü üzerine klonlanmış (Ortlepp ve ark., 1983), 5' nükleotid dizisi Stephens ve ark. tarafından, *B. amyloliquefaciens* geni ile karşılaştırılarak irdelenmiştir (Stephens ve ark., 1984).

Bu tez çalışmasında, İşsever-Öztürk ve ark. (2002) tarafından *B. licheniformis* ATCC 27811 soyunun genomik DNA'sı üzerinden PCR aracılığı ile klonlanan α -amilaz genini taşıyan amy-pUC 19-*B. subtilis* hücreleri biyolojik kaynak olarak kullanılmıştır. *B. licheniformis* ATCC 27811 soyu α -amilaz geni daha sonra Rivera ve ark. (2003) tarafından PCR ile çoğaltılarak, pET3a vektörü üzerine klonlanmış ve gerçekleştirilen yönlendirilmiş mutagenез çalışması ile elde edilen mutantların sıcaklık kararlılığı ve transglikozilasyon testleri, yaban tipi rekombinant enzime paralel olarak yapılmıştır (Rivera ve ark., 2003).

Konak organizmaların ve α -amilazların üretim verimlilikleri, besi yeri içeriği ve çevresel unsurlar ile doğrudan bağlantılıdır. Besi yeri bileşimi, pH, osmotik basınç, havalandırma oranı, sıcaklık ve bulaş kontrolü, optimum hücre büyümesi ve enzim üretimini sağlayan başlıca etkenler arasındadır (Pandey et al., 2000).

α -Amilaz üretmek amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, besi yerlerinde organik azot kaynakları kullanılmaktadır (Gupta et al., 2003). Tez çalışmasında, kullanılan besi yeri içinde 10 g/l oranında bulunan Maya özütü, *Bacillus* sp. IMD 435 ve *Bacillus* sp. 434 soylarının üretiminde de kullanılmıştır (Hamilton et al., 1999; Hamilton et al. 1999). Tez çalışmasında kullanılan besi yerinin diğer bileşenlerinden olan, beef özütü ve peptonun, birçok bakteri soyunun üretiminde kullanıldığı rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003).

Sıcaklık ve çalkalama, hücre büyümesi ve α -amilaz üretimini doğrudan etkileyen etmenler arasındadır. (Gupta et al., 2003). Tez çalışması kapsamında yapılan ön analizlerden sonra, rekombinant amy-pUC19-*Bacillus subtilis* hücreleri IPTG ile uyarımın ardından 26 saat boyunca ve 30 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. Uguru ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen ve sıcaklık kararlılığı olan α -amilazın, *Bacillus subtilis*'ten saflaştırıldığı benzer bir çalışmada, hücreler, 18 saat boyunca, 30 °C'ta, 220 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür (Uguru et al., 1997).

Mamo ve Gessesse'nin, Etiyopya'daki bir sıcak su kaynağından izole edilen *Bacillus* sp. WN11 soyu ile gerçekleştirdiği bir çalışmada, hücreler 65 °C'ta 18 saat boyunca çalkalanarak büyütülmüştür (Mamo and Gessesse, 1999). Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda, α -amilaz üretiminde, 300 rpm'e kadar olan çalkalama hızlarının kullanıldığı rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003).

amy-pUC19-*Bacillus subtilis* hücreleri, rekombinant α -amilazı hücre içi enzim olarak ürettikleri için enzim saflaştırma sürecinin ilk aşamasında sonikasyon kullanılmıştır. Branson Dijital sonikatör ile yapılan kırma işlemi sonucunda 4.85 mg/ml protein elde edilmiştir. Sonikasyon sonrasında enzimatik aktivitenin ~900 kat arttığı bulunmuştur.

Hücre içi proteinlerin, *amy*-pUC19-*Bacillus subtilis* hücrelerinin sonikasyonu ile çözeltiye alınmalarının ardından, amonyum sülfat ile seçici çöktürme yapılmış, % 40 ve 70 olarak iki farklı konsantrasyonda uygulanan amonyum sülfat çöktürmesi ile rekombinant α -amilaz, 3.1 ve 4 kat saflaştırılmış ve bu aşamalarda sırasıyla % 88.9 ve % 38.4 verim elde edilmiştir. Rekombinant α -amilazın spesifik aktivitesi, % 70 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından 11 U/mg olarak belirlenmiştir. Birçok saflaştırma çalışmasında amonyum sülfatın değişik konsantrasyonlarının kullanıldığı bilinmektedir. Kullanılan amonyum sülfatın oranı ve çöktürmenin kaç aşamada yapılacağı, elde edilmek istenen proteinin yüzeyine yerleşmiş hidrofobik yan zincirler taşıyan amino asitlerin miktarına, çözelti pH'sına ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çünkü, bu özelliklerin hepsi proteinlerin çözünürlüklerini etkileyen etkenler arasında yer alır. Bununla birlikte, çözelti içerisindeki diğer proteinlerin de bu oranı etkilediği bilinmektedir (Scopes, 1994). Mitsuiki ve arkadaşları tarafından iki farklı α -amilazın *Bacillus subtilis* IFO 3108 hücrelerinden saflaştırıldığı çalışmada, yalnızca % 80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır (Mitsuiki et al., 2005). Aksine, Uguru ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, sıcaklığa dayanıklı α -amilazın, *B. subtilis*'ten saflaştırılma sürecinde iki aşamalı (% 20 ve % 60) amonyum sülfat çöktürmesi kullanılmıştır. % 60 amonyum sülfat ve diyalizin ardından elde edilen saflaştırma oranı, 2.9 ve verim, % 56.9 olarak rapor edilmiştir (Uguru et al., 1997). Hücre dışı α -amilazın, *Thermus* sp.'den saflaştırılmasının amaçlandığı bir diğer çalışmada ise, % 50 ve % 80 amonyum sülfat kullanılmış ve bu aşamadaki verim % 23 olarak belirlenmiştir.

Proteinler etanol ve aseton gibi organik çözücüler kullanılarak da çöktürülebilir. Ancak, organik çözücüler eliyle protein çöktürmesi daha az kullanılan bir yöntemdir (Scopes, 1994).

Bu tez çalışmasında, rekombinant enzimi saflaştırma sürecinde, amonyum sülfat çöktürmesini takiben, Q-sefaroze anyon değiştirici kolon kromatografisi uygulanmış, % 70 amonyum sülfat ve diyaliz aşamaları ile elde edilen özüt, Q-sefaroze kolonunun hacmi gözetilerek, kolona üç defada yüklenmiştir. Q-sefaroze anyon değiştirici kolon kromatografisi sonunda, rekombinant α -amilazın spesifik aktivitesinin, Q-sefaroze öncesine oranla ~ 37 kez arttığı belirlenmiştir.

Q-sefaroze kolon kromatografisinin ardından, Sefakril S-200 HR moleküler elek kromatografisi yapılmış ve elde edilen protein fraksiyonları, çok saftan az safa doğru, üç ayrı havuzda toplanmıştır. Havuz 1 ile yapılan aktivite ve Bradford testleri sonucunda, elde edilen değerlerin, sefakril kolonu öncesi değerlerle karşılaştırılmış, rekombinant α -amilazın sefakril kolon kromatografisi ile, 7.8 kere daha saflaştığı belirlenmiştir. Saflaştırma işleminin son basamağı olan, sefakril moleküler elek kolon kromatografisinin ardından rekombinant α -amilazın başlangıç basamağına oranla ~653 kez saflaştığı, saflaşma veriminin % 13.4 ve spesifik aktivitesinin, 1808 U/mg olduğu bulunmuştur.

Tez çalışmasında, saflaştırma basamaklarında uygulanan teknikler ve yapılış sıraları, diğer çalışmalar ile bazı farklılıklar gösterse de, genel anlamda benzer bir akış şeması ve materyal kullanımı söz konusudur. Tez çalışmasında iyon değiştirici olarak kullanılan Q-sefaroze FF, anyon değiştirici bir rezindir. Q-sefarozenin materyali, çapraz bağlı agaroz birimleridir ve fonksiyonel grup olarak da kuaterner amonyum ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) içermektedir. Tez çalışmasında moleküler elek rezini olarak uygulanan Sefakril S-200 HR, 25 – 75 μm çapındaki boncuklardan oluşmaktadır. Bu boncuklar, allil dekstran / N,N'- metilenbisakrilamid birimlerinin çapraz bağlanması ile elde edilirler.

Literatürde, iki farklı α -amilazın saflaştırılmasının amaçlandığı bir çalışmada amonyum sülfat çöktürmesinin ardından, bir anyon değiştirici olan DEAE-Sefaroze, iyon değiştirme kromatografisinin ardından da, bir moleküler elek rezini olan Sefadeks G-75 kullanılmıştır. Her bir kromatografinin ikişer defa gerçekleştirildiği çalışmada, Amy 1 α -amilazı % 13 ve Amy 2 α -amilazı % 9.5 verimle saflaştırılmıştır.

(Mamo and Gessesse, 1999). Mamo ve Gessesse'nin iyon değiştirici olarak kullandıkları DEAE (Dietilaminoetil) fonksiyonel grubu, 6-10 pH aralığında tam olarak yüklü kalabilirken, tez çalışmasında kullanılan kuaterner amonyum çok yüksek ve çok dūřuk pH değerlerinde de yüklü kalabilmektedir (pH 2-12) (Scopes, 1994). Das ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, sıcaklığa dayanıklı ve alkali sever α -amilaz, *Bacillus subtilis* DM-03 soyundan, DEAE sefadeks A-50 anyon değiştirme kolonu, Sefadeks G-50 moleküler elek kolonu ve HPLC (High Performance Liquid Chromatography)'nin kullanıldığı bir sistemle saflaştırılmıştır. % 2.9 verimle saflaştırılan α -amilazın 80.5 kez saflaştırıldığı rapor edilmiştir (Das et al., 2004).

Tez alışmasında, Q-sefaroze ve Sefakril kromatografileri ile elde edilen protein fraksiyonları ile yapılan SDS-PAGE analizleri ile, rekombinant α -amilazı içeren fraksiyonların, diğer proteinlerce zengin fraksiyonlardan ayırdedilemesi sağlanmışır. Q-sefaroze kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar incelendiğinde, 25 ve 35. fraksiyonlar arasında kalan kısmın rekombinant α -amilazca zengin olduğu görülmektedir. Ancak, yapılan aktivite testleri sonucunda 20 ile 41. fraksiyonlar arasında kalan bölgenin, yüksek rekombinant α -amilaz aktivitesi gösterdiği belirlenerek, Sefakril kolon kromatografisi için bu aralığta kalan fraksiyonlar seçilmiştir. Aynı işlemler Q-sefaroze 2 ve 3 kolonları için de yapılmış, sefakril kolon kromatografisinin ardından elde edilen fraksiyonların seçiminde de aynı yol izlenmiştir. Yapılan aktivite testleri ve SDS-PAGE profilleri incelenerek, yüksek α -amilaz aktivitesi taşıyan ve görece daha saf fraksiyonlar birleştirilmiş, havuz 1 (39 – 45. fraksiyonlar) oluşturulmuştur. Aynı şekilde, aktivite/saflık oranı gözetilerek havuz 2 (28 – 38. fraksiyonlar) ve 3 (46 – 48. fraksiyonlar) oluşturulmuştur (şekil. 3-4 ve 3-5).

Tez çalışmasında, rekombinant α -amilazın moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla, protein belirteçlerinin de kullanıldığı bir SDS-PAGE analizi yapılmış ve rekombinant α -amilazın moleküler ağırlığının yaklaşık 55 kDa olduğu tahmin edilmiştir. Literatürde, α -amilazların moleküler ağırlığının 10 ile 210 kDa arasında olabildiği rapor edilmiştir. (Gupta et al., 2003). Uyar ve arkadaşlarının sıcaklığa dayanıklı bir *Bacillus subtilis* soyu ile yaptığı çalışmada, saflaştırılan α -amilazın moleküler ağırlığının 48 kDa olduğu belirlenmiştir. (Uyar et al., 2003). Bir arkea bakteri olan *Pyrococcus furiosus* ile yapılan bir çalışmada, sıcak sever α -amilazın

moleküler ağırlığı 66 kDa bulunmuştur (Laderman et al., 1993). Dimerik, maltogenik bir α -amilazın moleküler ağırlığı ise 64 kDa olarak belirlenmiştir (Cho et al., 2000).

Tez çalışmasında rekombinant α -amilaz aktivitesinin, % 0.2 oranında, çapraz bağlı nişasta içeren SDS-PAGE jelinde gözlenmesi amacıyla zimogram analizi yapılmıştır. Nişasta-SDS-PAGE jelinin lügol ile boyanması sonucunda elde edilen rekombinant α -amilaz bandı, paralel yürütülen (aynı jel ikiye bölünmüştür), SDS-PAGE jeline uygulanan protein belirteçleri ve rekombinant α -amilaz ile karşılaştırılmış ve aktif bandın, SDS-PAGE ile gözlenen kısmen saf rekombinant α -amilaz bandına karşı geldiği sonucuna varılmıştır.

α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan çeşitli yöntemler arasında en yaygın olanları; indirgen şeker miktarındaki artış ve nişasta-iyot yöntemidir (Gupta et al., 2003). Nişastanın parçalanması ile oluşan indirgen şekerlerin kolorimetrik olarak belirlenmesini esas alan indirgen şeker miktarındaki artış yöntemi, kullanılan etken maddelere göre farklılık göstermektedir. Tez çalışmasında rekombinant α -amilaz aktivite testinde, indirgen şeker miktarındaki artış yöntemi kullanılmıştır. Aktif madde olan 3-5, Dinitrosalisilik asitten dolayı DNS olarak isimlendirilen bu yöntem birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Messaoud et al., 2004; Mijts and Patel, 2002). Öte yandan, nişasta-iyot kompleksinin renk yoğunluğundaki azalmayı temel alan nişasta-iyot yönteminin kullanıldığı çeşitli araştırmalar rapor edilmiştir (Zhi et al., 2004; Marco et al., 1996).

Tez çalışmasında, toplam protein miktarının belirlenmesi amacıyla Bradford yöntemi kullanılmıştır. Coomassie Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntem, hızlı ve doğru sonuçlar vermesinden dolayı çok tercih edilmektedir (Scopes, 1994). Bradford ile birlikte, Lowry (Uyar et al., 2003) ve BCA (Bis-sinconik asit) (Scopes, 1994) yöntemleri de birçok araştırmacı tarafından uygulanmaktadır.

α -Amilazların, nişasta ile ilgili pek çok ve farklı endüstride kullanımı, farklı gereksinimleri de beraberinde getirmektedir. Nişastanın işlenmesi, yüksek sıcaklıklar gerektirdiğinden ve nişastanın sahip olduğu doğal pH aralığına uygun enzimler tercih edildiğinden α -amilazların sıcaklık ve pH ile ilgili özellikleri büyük önem taşımakta; çeşitli kararlılık artırıcı maddeler aracılığı ile özellikle sıcaklık ve pH kararlılığının artırılması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Farklı endüstrilerde kullanılan α -amilazların, endüstriyel süreçlerde karşılaştıkları birçok etken (metal iyonları,

deterjanlar, yüzey aktif maddeler, organik çözücüler ve bazı efektör moleküller) rekombinant α -amilaz için yapılan nitelendirme çalışmalarında test edilmiştir.

Nişastanın kullanıldığı çoğu endüstriyel süreçte, nişastanın, glukoz, maltoz ve oligosakkarit şuruplarına dönüştürülmesi amaçlanmaktadır. Bu ara ürünler daha sonra, örneğin, etanol, lizin ve sitrik asit gibi çeşitli kimyasallara dönüştürülmekte, ya da yüksek fruktoz şurubu üretiminde kullanılmaktadırlar. Nişastanın işlenmesi genel olarak iki aşamada olmakta (sıvılaştırma ve jelatinizasyon) ve yüksek sıcaklıklar gerektirmektedir. Bu sorun, yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebilen α -amilaz gibi enzimler eliyle aşılmaktadır. Yüksek işleme sıcaklıkları birçok avantajı da beraberinde getirmektedir, Bunlar arasında: (i). yüksek substrat konsantrasyonlarının kullanımı, (ii). akışkanlığın artması ve böylece, pompalama masraflarının azalması (iii). bakteriyel bulaşların azaltılması, (iv). reaksiyon oranının artması ve uygulama zamanının azalması, (v). enzim saflaştırma masraflarının azaltılması sayılabilir (Vieille and Zeikus, 2001).

Tez çalışması kapsamında saflaştırılan rekombinant α -amilazın, optimum reaksiyon sıcaklığı ve sıcaklık kararlılığı belirlenmiş, en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 87 °C bulunmuştur. Yapılan kararlılık çalışmaları ile rekombinant α -amilazın 77 °C'ta, 1 saat sonunda, aktivitesinin % 97.8'ini koruduğu ancak 92 °C'ta gerçekleştirilen çalışmalarda, 5. dakikanın sonunda enzim aktivitesinin ancak % 59'unun korunabildiği, 15. dakikanın sonunda ise aktivitenin kaybedildiği gözlenmiştir. Mikrobiyal kaynaklı α -amilazlar incelendiğinde, optimum sıcaklıkların 25 – 130 °C arasında değiştiği göze çarpmaktadır (Gupta et al., 2003). Çeşitli mikroorganizmalara ait α -amilazlar ile, tez çalışması kapsamında saflaştırılan rekombinant α -amilaz karşılaştırıldığında; rekombinant α -amilazın, 80 – 90 °C'ta optimum aktivite gösteren *Thermococcus profundus*, *Dictyoglomus thermophilum* ve *Thermotoga maritima* α -amilazları ile benzeştiği görülmektedir (Vieille and Zeikus, 2001). Rekombinant α -amilazın, 40 °C'ın üzerinde kararsız olan *B. circulans* MG-4 α -amilazından, 65 °C'ta 60 dakika boyunca kararlı olduğu bildirilen *Bacillus* sp. MD 124 α -amilazından ve 70 °C'ta 30 dakika sonunda, başlangıç aktivitesinin yarısını koruyan *Bacillus circulans* GRS 313 α -amilazından (Dey et al., 2002) daha kararlı olduğu belirlenmiştir.

Literatürde *B. licheniformis* α -amilazlarının oligosakkaritleri maltoheksos ya da maltotriozlara indirgediğini belirten raporlar mevcuttur. Ürün farklılığının en

temel gerekçesi, hidroliz sıcaklığındaki farklılıklardır. Marchal ve ark. (1999), *B. licheniformis*'ten elde edilen ticari α -amilazı (Maxamyl, Genencor), daha ileri bir saflaştırma sürecinden geçirmeksizin kullandıkları çalışmalarında, hidroliz sıcaklığının artırılmasının ürün özgülüğünü azalttığını ve buna bağlı olarak oluşan ürünler arasında daha dengeli bir dağılım olduğunu rapor etmişlerdir (Marchal ve ark., 1999). Araştırmacılar yaban tipi ticari enzim ile yaptıkları çalışmalarını pH, 6.5-6.9 aralığında ve 90°C'ta gerçekleştirmişlerdir. Bu bilgi, tez çalışmasında kullanılan rekombinant amilaz için elde edilen optimal reaksiyon sıcaklığı ve pH değerlerinin, yaban tipi enzimin optimallerine oldukça yakın bulunduğuna işaret etmektedir. Esasen rekombinant enzimin yaban tipine benzer biyokimyasal özellikler göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Igarashi ve ark. (1998), *B. firmus*'a akraba alkali-sever bir *Bacillus* izolatından (KSM-1378) elde ederek saflaştırdıkları alfa amilazın spesifik aktivitesinin, endüstriyel olarak kullanılan ve sıcaklığa dayanıklı *B. licheniformis* amilazından 2-5 kez daha yüksek olduğunu ve endüstriyel amilaza ancak % 68.9 oranında bir benzerlik taşıdığını bildirmişlerdir. Yaklaşık 53 kDa büyüklüğünde olan enzimin optimal pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla, 8.0-8.5 ve 55°C bulunmuştur. Saflaştırılan enzim LAMY olarak adlandırılmış, bu enzimin *B. licheniformis* amilazı (BLA) ile karşılaştırıldığı çalışmada; optimal pH, LAMY için 7.5-8.0, BLA için 5.0-6.0 dolaylarında bulunmuştur. LAMY pH, 6.0-10.0 aralığında kararlılık göstermiştir. LAMY'nin optimal sıcaklığı 55 °C iken, BLA için bu değer 80 °C civarında bulunmuştur. LAMY 70 °C'ta 0.1 mM CaCl_2 varlığında bile 60 dk sonunda aktivitesini kaybederken, BLA CaCl_2 varlığından bağımsız olarak kararlılık göstermiştir.

B. licheniformis α -amilazının sıcaklık ile geri dönüşsüz şekilde inaktivasyonu Declerck ve ark. (2000) tarafından ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Bu amaçla yönlendirilmiş mutagenез ile mutantlar geliştiren araştırmacılar, kararlılık yönünden önemi olan tuz köprüleri, Ca^{2+} bağlanması veya potansiyel deaminasyon süreçleri için gereksinilen yapısal özellikleri irdelleyerek, sıcaklık kararlılığında payı olan rezidülerin, daha çok enzimin B "domain"inde ve onun, katalitik A "domain"i ile ara yüzeyinde yer aldığını göstermişlerdir (Declerck ve ark. 2000). Rivera ve ark. (2003) ise, aktif merkeze yakın amino asit rezidülerini değiştirerek, yaban tip rekombinant enzime göreceli 5 kez daha aktif, ancak sıcaklık kararlılığı ve nişastaya olan

özgüllüğü aynı kalan bir mutant elde etmiştir. Bu ve benzeri (Saab-Rincon ve ark., 1999) literatür çalışmalarının da ışığında, tez çalışmasının biyolojik materyalini oluşturan amy-pUC 19 klonu potansiyel yapı-işlev çalışmalarına katkıda bulunmak üzere de kullanılabilecektir.

B. licheniformis α -amilazı sıcaklık kararlılığı ile dikkat çeken ve nişasta hidrolizine dayalı endüstriyel süreçlerde yaygın şekilde kullanılan bir enzimdir. *B. licheniformis*'in kendisinin, sıcaklığa dirençli enzimlerin oluşumunu koşullayan seçici bir baskının bulunmadığı ılımlı topraklarda yaşayan ve daha çok mezofilik kabul edilen bir organizma olmasına karşın, ürettiği alfa amilaz (BLA), diğer *Bacillus* türleri tarafından üretilen alfa amilazlardan çok daha yüksek bir sıcaklık kararlılığına sahiptir (Declerck ve ark., 2000). Tomazic ve Klivanov tarafından (1988), 90 °C'ta, 1 mM CaCl₂ varlığında ve pH, 6.5'de gerçekleştirilen çalışmada; *B. amyloliquefaciens* enziminin (BAA), 2 dk ve *B. stearothermophilus* amilazının 50 dakikalık bir yarı ömüre sahip olmalarına karşın, BLA için bu sürenin 4 saatten fazla (270 dk) olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada Sigma tarafından sağlanan ticari bir amilaz, saflaştırıldıktan sonra kullanılmış, belirtilen üç soy arasında sıcaklık kararlılığı yönünden belirgin bir fark bulunmuştur. Sıcaklık kararlılığı 135 kez farklı olan *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* amilazları % 82 oranında homoloji göstermektedir (Tomazic ve Klivanov, 1988). Bu çalışmada optimal sıcaklık; *B. amyloliquefaciens* amilazı için 60°C dolaylarında, buna karşın *B. licheniformis* enzimi için yaklaşık 95 °C bulunmuştur. 35 °C dolaylarındaki bu optimal sıcaklık farklılığı, sıcak sever enzimin 90-100 °C sıcaklıklarda daha iyi katladığına işaret etmektedir. Öte yandan *B. licheniformis* amilazına 1 M KCl eklenmesi, enzimi ciddi şekilde kararsız kılmakta ve 90 °C'taki (pH, 6.5) yarı ömrünü 270 dk. dan 7 dk.'ya indirmektedir.

Literatür bilgileri gözetilerek, rekombinant α -amilazın, deterjan, kağıt, tekstil gibi endüstrilerde herhangi bir kararlılık artırıcı ajan olmaksızın kullanılabileceği anlaşılmaktadır (Gupta et al., 2003; Shaw et al., 1995; Ito and Horikoshi, 2004).

Nişastanın sulu çözeltisinin pH değeri 4.5'dir. Bu nedenle, düşük pH değerlerinde aktif olan α -amilazlar, nişasta hidrolizi için elverişlidirler (Vieille and Zeikus, 2001). Buna karşın, deterjan endüstrisinde kullanılan α -amilazlar için yüksek pH değerleri tercih edilmektedir. Çeşitli endüstriyel uygulamalar için değişik pH

değerlerinin gerektiği gözetilerek, geniş bir pH aralığına sahip α -amilazlar öne çıkmaktadır (Gupta et al., 2003).

Tez çalışması kapsamında yapılan optimum pH ve pH kararlılığı çalışmaları ile, rekombinant α -amilazın değişik pH değerlerindeki kararlılığı test edilmiştir. Rekombinant α -amilazın en iyi aktivite gösterdiği pH değerinin 6.5-7.0 aralığında olduğu, pH 5.5-8.0 aralığında, aktivitesinin % 80'ini ve pH 4.5'ta ise aktivitesinin % 50'sini koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca, rekombinant α -amilazın pH 7.0-12 gibi geniş bir pH aralığında kararlı olduğu belirlenmiştir.

Gupta ve arkadaşlarının yaptıkları kapsamlı bir incelemede, α -amilazların optimum reaksiyon pH'sının 2.0-8.0 arasında değiştiği ve α -amilazların genel olarak pH 4.0 ile 11.0 arasında kararlı oldukları ifade edilmektedir (Gupta et al., 2003). Çeşitli *B. licheniformis* soylarından üretilen α -amilazlar incelendiğinde farklı pH optimumlarının bulunduğu ve farklı pH aralıklarında kararlılık gösterdikleri görülmektedir. Bir *B. licheniformis* soyundan üretilen, 22.5 kDa ağırlığındaki α -amilaz için optimum pH değeri 9.0 ve kararlılık aralığı 6.0 – 11.0 iken, 28 kDa ağırlığındaki bir diğer α -amilaz için optimum pH değeri 9.0, kararlılık aralığı ise 7.0 – 9.0 olarak bildirilmiştir (Gupta et al., 2003).

Nişasta sulu çözeltisinin pH değerinin 4.5 olduğu göz önünde bulundurularak; pH 5.5-8.0 aralığında, aktivitesinin % 80'ini, pH 4.5'ta ise aktivitesinin % 50'sini koruduğu belirlenen rekombinant α -amilazın, nişastanın işlendiği, tekstil, dokumacılık, kağıt ve yüksek glukoz/fruktoz üretimi endüstrilerinde kullanılabileceği öngörülmüştür.

Tez çalışmasının bulguları, kararlılık artııcı etkisi bilinen Ca^{+2} 'un, 1 ve 10 mM'lık derişimlerinin (kalan aktivite, sırasıyla, % 95 ve % 94), rekombinant α -amilazın aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. *Thermus* sp.'den saflaştırılan hücre dışı α -amilaz ile yapılan bir çalışmada, Ca^{+2} 'un benzer bir etki gösterdiği (1 mM için % 91 ve 10 mM için % 92) rapor edilmiştir (Shaw et al., 1995). 4 mM Ca^{+2} ile yapılan bir diğer çalışmada, α -amilaz aktivitesinin % 92'sinin korunduğu saptanmıştır (Marco et al., 1996). Mamo ve Gessesse'nin iki farklı α -amilazı (AmyI ve AmyII) saflaştırdığı çalışmada ise, Ca^{+2} 'un, α -amilaz aktivitesini hafifçe arttırdığı belirtilmektedir (sırasıyla, % 108 ve % 105) (Mamo and Gessesse., 1999). Öte yandan Aguilar ve arkadaşları (2000), 10 mM derişimdeki Ca^{+2} 'un, bir

laktik asit bakterisinden saflaştırdıkları α -amilaz üzerinde herhangi bir etki yapmadığını rapor etmişlerdir.

Rivera ve ark. tarafından *B. licheniformis* ATCC 27811 soyundan hareketle geliştirilen rekombinant enzimin, 10 mM Ca^{2+} içeren tamponda, 80°C'ta 6 saat süre ile bekletilmesi, herhangi bir aktivite kaybına neden olmamıştır. Bu süre, nişastanın endüstriyel likefaksiyonu için gereken sürenin üç katı daha uzun bir zamandır. Araştırmacılar geliştirdikleri yaban tipi ve mutant enzimlerin sıcaklık ile inaktivasyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında, Ca^{2+} konsantrasyonunu, enzimlerin kararlılığını bozmak üzere 1 mM'a indirgeyerek, 80°C'ta bekletilen saf enzimlerin, çeşitli süreler sonundaki kararlılığını irdelemişlerdir. Verilmiş sürelerde alınan örnekler önce buzda 15 dk bekletildikten sonra, kalan aktiviteleri, 80°C'ta test edilmiştir. Buna göre yaban tipi rekombinant enzim için yarı ömür 10 dk bulunmuştur (Rivera ve ark., 2003).

Tez çalışması kapsamında, rekombinant α -amilazın endüstriyel süreçlerde kullanılan ya da α -amilazlar üzerindeki etkisi rapor edilmiş çeşitli metal iyonları varlığındaki davranışını belirlemek üzere nitelendirme çalışmaları yapılmıştır. Ağır metal iyonlarının α -amilaz aktivitesini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Gupta et al., 2003). Buna karşın, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na^{+} , K^{+} ve Ba^{+2} gibi metal iyonlarının enzim kararlılığını koruyucu etkisi birçok α -amilaz için rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003).

Rekombinant α -amilaz üzerinde denenen metal iyonları arasında, 1 ve 10 mM konsantrasyonlardaki Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Na^{+} 'un enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etki yapmadıkları gözlenmiştir. Benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Aguilar et al., 2000; Shaw et al., 1995).

1 ve 10 mM konsantrasyonlardaki K^{+} ve Ba^{+2} 'un, tez çalışmasında kullanılan rekombinant α -amilazın aktivitesini ~% 120 oranında arttırdığı belirlenmiştir. Birçok α -amilaz için K^{+} ve Ba^{+2} iyonlarının benzer etki yaptığı rapor edilmiştir (Nirmala and Muralikrishna., 2003; Mamo and Gessesse., 1999; Aguilar et al., 2000).

Ağır metallere Al^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} (FeCl_3)'in 1 mM derişimde enzim aktivitesini hafifçe arttırdığı gözlenirken, 10 mM derişimde azalttığı ve Co^{+2} 'ın diğer metallere oranla daha ılımlı bir inhibisyon yaptığı belirlenmiştir. Yine ağır metaller olan, Fe^{+3} (FeSO_4 tuzu), Cu^{+2} ve Zn^{+2} nun (ZnCl_2 ve ZnSO_4 tuzları), enzim

aktivitesini 1 mM derişimde belirgin bir şekilde, 10 mM’da ise kuvvetle inhibe ettiği saptanmıştır. Ağır metallerin α -amilaz aktivitesini inhibe ettiği biręok ęalıřmada gösterilmiştir (Dey et al., 2002; Gupta et al., 2003). Test edilen metallerin, 1 mM derişimde, rekombinant α -amilaz aktivitesini ęok fazla etkilemediği, buna karşın ağır metallerin, 10 mM derişimde inhibisyon yaptığı gözlenmiştir.

Igarashi ve ark. (1998) tarafından *B. firmus*’a akraba alkali-sever bir *Bacillus* izolatından (KSM-1378) saflaştırılan alfa amilazın (LAMY), Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Hg^{2+} ile kuvvetle inhibe olduğu ve EDTA ile n inkubasyona alındığı koşullarda aktivitesinin, başlangıç aktivitesinin % 10’una düştüğü gözlenmiştir. LAMY 40°C’ta bir saatlik inkubasyonun sonunda SDS’e direnęli bulunmuştur (Igarashi ve ark., 1998).

Deterjan endüstrisinde kullanılan α -amilazların, alkali pH değerlerinde aktivite göstermeleri ve deterjanların içinde bulunan, yüzey aktif maddelere, kelatrlere ve oksidasyona neden olan ajanlara dayanıklı olmaları gerekmektedir (Ito and Horikoshi, 2004). Yüzey aktif maddelerin α -amilazlar için önemli olmasının başlıca nedenlerinden birisi de, günümüzde yaygınlaşan gıda emülsiyonlarının ve köpük oluşumunun, protein-yüzey aktif madde kompleksleri ile sağlanmasıdır (Bordbar et al., 2004).

Tez ęalıřması kapsamında ęeřitli deterjanların rekombinant α -amilazın aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi test edilmiştir. % 0.1 ve % 1’lik konsantrasyonlarda uygulanan ve iyonik bir yüzey aktif madde olan SDS’in, enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığı ve 37 °C’ta 60 dakika süren uygulamanın ardından kalan enzim aktivitesinin verilen derişimler için, sırasıyla, % 95 ve 92 olduğu belirlenmiştir. Lo ve arkadaşlarının, *Bacillus* sp. TS-23 soyu α -amilazı ile yaptıkları ęalıřmada, enzimin % 8 SDS konsantrasyonunda bile aktif olduğu rapor edilmiştir (Lo et al., 2001). Hashim ve arkadaşlarının (2004), *Bacillus halodurans* LBK 34 soyu α -amilazı ile yaptıkları ęalıřmada, % 1 SDS varlığında enzim aktivitesinin % 80’inin korunduğu bildirilmiştir.

İyonik özelliğiyle bilinen sodyum deoksikolat’ın rekombinant α -amilaz aktivitesini her iki konsantrasyonda da hafifęe arttırdığı gözlenmiş, enzim aktivitesi, diğer bir yüzey aktif madde olan iyonik deterjan CTAB ile test edilmiştir. % 0.1 CTAB varlığında, enzim aktivitesinin, ilk muamelenin ardından % 67’ye düştüğü,

ancak 60. dakikanın sonunda tekrar % 90'a çıktığı belirlenmiştir. Benzer bir etki % 1'lik derişimde de gözlenmiş olup, 60. dakikanın sonunda enzim aktivitesinin tekrar kazanılması; CTAB'ın ve benzer sonuçlar veren SDS ve sodyum deoksikolatın, rekombinant α -amilaz üzerinde kuvvetli bir denatüran etkiye sahip olmayabileceğini düşündürmüştür. İyonik yüzey aktif maddelerin proteinlere iyonik ve hidrofobik etkileşimlerle bağlandığı, bu bağlanmanın birçok globüler proteinin doğal yapısını bozduğu ve çökmesine neden olduğu bilinmektedir (Bordbar et al., 2004). Elde edilen sonuçlar ışığında, CTAB, sodyum deoksikolat ve SDS'in rekombinant α -amilaz üzerinde kuvvetli bir iyonik etkiye sahip olmadığı görülmektedir. Rekombinant α -amilaz deterjan ve gıda endüstrisinde kullanılabilecek nitelikte görünmektedir. İki iyonik olmayan deterjan (Tween 20 ve Triton X-100) ile yapılan testlerde, rekombinant α -amilaz aktivitesinde her hangi bir azalma gözlenmemiş, yalnızca tween 20'nin % 1'lik derişiminin, 60. dakikanın sonunda enzim aktivitesini % 76'ya düşürdüğü saptanmıştır.

α -Amilazlar ve diğer enzimlerin sahip oldukları bazı karakteristik özelliklerin test edilmesinde kullanılan çeşitli kimyasalların, bu tez çalışmasında saflaştırılan rekombinant enzim üzerindeki etkilerini gözlemek üzere; enzim, ilgili maddeler ile 5, 10 ve 30 dakikalık sürelerde, 37 °C'ta inkübe edilmiş ve aktivitesi değerlendirilmiştir. Rekombinant α -amilazın 10 mM EDTA ile inhibe olduğu gözlenmiş. 5, 10 ve 30'uncu dakikalarda enzim aktivitesinin sırasıyla, % 66, 70 ve 81'inin kaybolduğu belirlenmiştir. Kelatör özelliği ile bilinen EDTA'nın kuvvetli bir α -amilaz inhibitörü olduğu birçok yayında rapor edilmiştir (Gupta et al., 2003, Nirmala and Muralikrishna., 2003; Mamo and Gessesse., 1999; Aguilar et al., 2000)). EDTA'nın etkisini Ca^{+2} ve diğer iki değerlikli iyonlar üzerinde gösterdiği bilinmektedir. Bu bilgiden yola çıkılarak, rekombinant α -amilazın Ca^{+2} ve/veya diğer iki değerlikli iyonlara bağımlı olduğu anlaşılmakta, esasen alfa amilazların Ca^{+2} taşıdığı bilinmektedir (Kandra, 2003).

10 mM PMSF ile yapılan testlerde, rekombinant α -amilazın PMSF tarafından inhibe edilmediği ve enzim aktivitesinin çalışılan tüm sürelerde % 115 – 119 aralığında olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar rekombinant α -amilazın aktif bölgesinde işlevsel bir serin rezidüsü içermediğine işaret etmektedir.

10 mM β -merkaptöetanol ile yapılan testlerde, rekombinant α -amilazın aktivitesinin tüm sürelerde % 170 oranında arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, 0.5,

1 ve 10 mM konsantrasyonlarda denenilen DTT'nin enzim aktivitesini, 0.5 ve 1 mM aralığında ~% 120 oranında, 10 mM konsantrasyonda ise ~% 130 - 170 oranında arttırdığı saptanmıştır. Egas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1997), *Thermus filiformis* Ork A2 soyundan elde edilen α -amilazın aktivitesinin β -merkaptoetanol (5 mM) ve DTT (5 mM) ile azalmadığı rapor edilmiştir. Hashim ve ark. (2004) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, benzer olarak, DTT'nin enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir inhibitör etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Disülfid bağlarını indirgeyici özellikleri ile bilinen β -mercaptoetanol ve DTT'nin herhangi bir inhibisyona neden olmaması, rekombinant α -amilazın aktif bölgesinde ve/veya herhangi bir kritik noktada disülfid bağlarının bulunmadığına işaret edebilir.

Tez çalışması kapsamında, rekombinant α -amilazın sıcaklığa bağlı kararlılığının artırılması amacıyla bir dizi deneme yapılmıştır. Öncelikle, enzimlerin uzun süre saklanması için kullanılan bir poliol olan gliserolün sıcaklık kararlılığına olan etkisi test edilmiştir. % 10 ve 30 gliserol ile 82 °C'ta, 30 ve 60 dakika boyunca gerçekleştirilen çalışmada, % 10 gliserolün 30 ve 60'ıncı dakikadaki enzim kararlılığını sırasıyla, % 136 ve % 289 oranında arttırdığı saptanmıştır. % 30 gliserolün ise 30 ve 60'ıncı dakikadaki enzim kararlılığını, sırasıyla, % 108 ve % 232 oranında arttırdığı belirlenmiştir. Poliollerin enzimleri yüksek sıcaklıklarda kararlı kıldığı ve ayrıca saklama süresini de arttırdığı rapor edilmiştir (Fagain, 2003; Scopes, 1994). Gliserolün enzim kararlılığını nasıl arttırdığı tam bilinmemekle birlikte, enzim yüzeyinde bulunan su moleküllerini kopararak, enzim çevresinde görece hidrofobik bir yüzey oluşturduğu düşünülmektedir. Bu etkinin enzim çevresindeki kinetik enerjinin azalmasına neden olduğu ve enzimin sıcaklık kararlılığını arttırdığı belirtilmektedir (Fagain, 2003; Scopes, 1994). Buna karşın diğer bir poliol olan etilen glikolün; enzim kararlılığını, % 10'luk derişimde ~% 65'e ve % 30'luk derişimde ise % 1'e kadar azalttığı belirlenmiştir.

DMSO ile yapılan testlerde oldukça ilginç sonuçlar alınmış olup, % 10 DMSO'nun, 30 dakikanın sonunda enzim aktivitesini ~ % 198, 60'ıncı dakikada ise ~ % 580 oranında arttırdığı gözlenmiştir. % 30 DMSO ile yapılan denemelerde, rekombinant α -amilazın aktivitesinin verilen her iki süre için de ~ % 10'a düştüğü saptanmıştır. DMSO, su ile karışabilen bir organik çözücüdür. Hidrofobik akrabalarının aksine, enzimlerin yüzeylerinde bağlı olarak bulunan su moleküllerini

koparabilir. Suyun uzaklaştırılması ile, rekombinant α -amilazın sıcaklık kararlılığının artabileceği, Fagain tarafından önerilmiştir (Fagain, 2003).

Niştastanın doğal pH'sı (pH 4.5), niştasta işleme süreçlerindeki önemli etkenlerden birisidir. Rekombinant α -amilazın özellikleri enzimin bu pH değerinde çalıştığına işaret etmektedir. Niştastanın doğal pH'sının, α -amilazın optimum pH değerlerinden çok uzak olmaması, niştastanın işlendiği ortamın pH'sının, rekombinant α -amilaza göre ayarlanabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan bazı metal iyonlarının rekombinant α -amilazın aktivitesi üzerindeki olumlu etkisi, bu iyonların, özellikle deterjan, kağıt ve tekstil endüstrilerinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Rekombinant α -amilazın yüzey aktif maddeler varlığındaki olan kararlılığı, deterjan ve gıda sektöründe kullanılabilir olduğunun bir göstergesidir.

Tez çalışmasının bulguları, rekombinant α -amilazın sıcaklık kararlılığının, uygun ajanlar kullanılarak daha da arttırılabileceğine işaret etmiştir. Tomazic ve Klivanov tarafından, *B. licheniformis* kökenli alfa amilazın sıcaklık kararlılığını sağlayan elektrostatik etkileşimlerde rolü olabilecek amino asit rezidülerinin araştırıldığı çalışmada, pozitif yüklü NH_2 grupları taşıyan rezidüler öne çıkmıştır. Sıcak-sever enzimde, mezofilik eşleniğinde yer almayan 2 veya 3 lizin rezidüsünün yaptığı tuz köprülerinin önem taşıdığı öngörülmüştür. Sonuçlar lizin rezidülerinin önem taşıdığı elektrostatik etkileşimlerin, termofilik alfa amilazlardaki belirgin sıcaklık kararlılığı üzerinde, enzimi yüksek sıcaklıklarda daha iyi katlanmış halde ve geri dönüşsüz inaktivasyonun konformasyonel mekanizmalarından uzak tutarak, etkin olduğunu düşündürmektedir (Tomazic ve Klivanov, 1988).

Akademik ve endüstriyel çok sayıdaki laboratuvarlarda yapılan çeşitli çalışmalara karşın, *B. licheniformis* alfa amilazına (BLA) yüksek sıcaklık kararlılığı sağlayan özellikler henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Yapısı çok yüksek sıcaklıklarda geri dönüşsüz şekilde bozulan enzimin, yalnızca inaktivasyon kinetikleri çalışılabilmektedir. Sıcaklığa bağlı inaktivasyonda çözülen enzim moleküllerinin daha sonra doğru olmayan bir şekilde yeniden katlandığı öngörülmüştür (Declerck ve ark., 2000). BLA'nın yüksek sıcaklıklarda uzun süreli inkübasyonlarında Asn/Gln rezidülerinin deamidasyonu; enzimi geri dönüşsüz şekilde değiştiren bir başka mekanizma olabilir. BLA'nın açıkça gözlenebilen özelliği; sıcaklık kararlılığı daha düşük olan α -amilazlarda bulunmayan, çok sayıdaki iyonik etkileşimlerin varlığıdır. 483 amino asitten oluşan enzimin kristal

yapısı, yalnızca Ca^{2+} taşımayan formunda ve 1998 yılında çözülmüştür. Declerck ve ark (2000), *B. licheniformis* amilaz genini ATCC 6598 soyundan hareketle klonlayarak, dizisini belirlemiş ve *E. coli*'de etkin şekilde eksprese ettirmişlerdir. Sıcaklık kararlılığı, 0.1 mM CaCl_2 varlığında, pH, 5.6'da çalışılmış olup, örnekler 80°C'ta, 15 dk inkübe edildikten sonra buza alınmıştır. Buzda en az 30 dk bekletilerek, geri dönüşebilecek nitelikteki enzim moleküllerinin renatürasyonuna olanak sağlanmıştır. Geri dönüşsüz şekilde inaktive olan moleküllerin oranı, 80°C'ta, inkübasyondan önceki ve sonraki amilaz aktiviteleri karşılaştırılarak, bulunmuştur. İki basamaklı, geri dönüşü olmayan inaktivasyon sürecinde enzimin 80°C'taki yarı ömrü (enzim moleküllerinin % 50'sinin geri dönüşsüz olarak inaktivasyonu için gereken süre) hesaplanmıştır. 80'ta 15 dk inkübasyon ve buzda soğutmayı takiben aktivitesi 37'ta ölçülen BLA'nın yarı ömrü verilmiş koşullarda 12 dk. ya düşmüştür. Buna karşın bu tez çalışmasında nitelendirilen rekombinant alfa amilazın 82 °C'ta 5, 15, 30 ve 60 dk boyunca inkübasyonu takiben kalan aktivitesi, standart test uygulanarak, sırasıyla, % 74.5, 76.5, 38.55 ve 8.5 bulunmuştur.

Declerck ve ark. (2000) tarafından sıcaklığa bağlı inaktivasyonun irdelendiği çalışma kapsamında alfa amilazda yer alan ve mutasyona uğratılan 7 Asp rezidüsü arasından, Asp190 mutantları bu bağlamda belirgin bir farklılık göstermiş olup, 80 °C'ta, Asp190Leu mutantlarının yarı ömrü 28 dk ve Asp190Phe mutantlarının yarı ömrü 72 dk (yaban tip enzime görece 6 kez daha uzun) bulunmuştur. Değiştirilen rezidünün; geri dönüşsüz deamidasyonu mu, yoksa protein çözülmesini mi, ya da her ikisini birden mi etkilediğini anlayabilmek üzere daha ileri biyokimyasal ve termodinamik çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır ((Declerck ve ark., 2000).

α -Amilazların çeşitli endüstrilerde, etkin bir şekilde kullanıldıkları bilinmektedir. Her bir endüstriyel sürecin gereksinimlerini karşılayabilecek farklı α -amilazların üretimi, sürekli gelişen moleküler biyolojik ve biyoteknolojik yöntemlerin yanı sıra, yeni fermentasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle sağlanabilir. Bunun yanında, immobilizasyon tekniklerinin ve daha verimli enzim saflaştırma yöntemlerinin kullanılmasının da önemi büyüktür. Endüstriyel süreçlerde karşılaşılan yüksek / düşük sıcaklık ve pH gereksinimleri, gerek enzimlerin yapısal özelliklerinin iyileştirilmesi ve gerekse çeşitli katkı maddelerinin kullanılması ile karşılanabilir.

Rekombinant enzim ile tez kapsamında gerçekleştirilen immobilizasyon denemesi, GYTE’de geliştirilen matriksin bu enzimin etkin şekilde immobilize edilmesinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Serbest ve immobilize enzimin kinetiklerinin çalışılması ve *amy*-pUC 19 klonunun, ilgili literatür bilgilerinin ışığında *B. licheniformis* amilazının yapı-işlev ilişkilerinin anlaşılmasına katkıda bulunmak üzere kullanılması, Ca^{+2} ’un enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine olan etkisinin belirlenmesi; GYTE Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarında bir sonraki aşamada yapılması planlanan çalışmalar arasında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

1. Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J.P., Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010(T), an amylolytic lactic acid bacterium, *Enzyme and Microbial Technology* 27 (6) , 406-413, 2000
2. Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; and Stryer, Lubert., *Biochemistry* 5th Edition, New York: W. H. Freeman and Co., 2002
3. Bertoldo, C., Antranikian, G., Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (2) , 151-160, 2002
4. Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V., Molecular and industrial aspects of glucose isomerase, *Microbiological Reviews* 60 (2) , 280-300, 1996
5. Bolton, D.J., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*, *Enzyme and Microbial Technology* 20 (5) , 340-343, 1997
6. Bordbar, A.-K., Omidian, K., Hosseinzadeh, R., Study on interaction of α -amylase from *Bacillus subtilis* with cetyl trimethylammonium bromide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 40 (1) , 67-71, 2005
7. Cho, H.-Y., Kim, Y.-W., Kim, T.-J., Lee, H.-S., Kim, D.-Y., Kim, J.-W., Lee, Y.-W., (...), Park, K.-H., Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1478 (2) , 333-340, 2000
8. Chung, H.-J., Yoon, S.-H., Lee, M.-J., Kim, M.-J., Kweon, K.-S., Lee, I.-W., Kim, J.-W., (...), Park, K.-H., Characterization of a Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase Isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3) , 952-959, 1998
9. Coutinho, P.M., Stam, M., Blanc, E., Henrissat, B., Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants?, *Trends in Plant Science* 8 (12) , 563-565, 2003
10. Crabb, W.D., Mitchinson, C., Enzymes involved in the processing of starch

to sugars, Trends in Biotechnology 15 (9) , 349-352, 1997

11. Crabb, W.D., Shetty, J.K., Commodity scale production of sugars from starches, Current Opinion in Microbiology 2 (3) , 252-256, 1999
12. Das, K., Doley, R., Mukherjee, A.K., Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India, Biotechnology and Applied Biochemistry 40 (3) , 291-298, 2004
13. Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R ve Gaillardin, C. Probing structural determinants specifying high thermostability in *B. licheniformis* α -amylase., JMB, 301, 1041-1057, 2000.
14. Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., Utsumi, S., α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: Purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. Coli*, Process Biochemistry 40 (8) , 2629-2636, 2005
15. Dennison C., A guide to protein isolation, USA: Kluwer Academic Publishers, 2002
16. Dey, G., Palit, S., Banerjee, R., Maiti, B.R., Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28 (4) , 193-200, 2002
17. Egas, M.C.V., Da Costa, M.S., Cowan, D.A., Pires, E.M.V., Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: Purification and biochemical characterization , *Extremophiles* 2 (1) , 23-32, 1998
18. Fágáin, C., Enzyme stabilization - Recent experimental progress, Enzyme and Microbial Technology 33 (2-3) , 137-149, 2003
19. Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R., Statistical media optimization and production of ITS alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor, Current Microbiology 45 (3) , 203-208, 2002
20. Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: Production and partial characterization, Bioresource Technology 90 (2) , 207-214,

2003

21. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., Microbial α -amylases: A biotechnological perspective, *Process Biochemistry* 38 (11) , 1599-1616, 2003
22. Haki, G.D., Rakshit, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: A review, *Bioresource Technology* 89 (1) , 17-34, 2003
23. Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435, *Process Biochemistry* 35 (1-2) , 27-31, 1999
24. Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., Purification and properties of the raw starch-degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434, *Biotechnology Letters* 21 (2) , 111-115, 1999
25. Harwood, R., C., *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, *TIBTECH* July, V 10, 1992
26. Hashim, S.O., Delgado, O.D., Martínez, M.A., Kaul, R.-H., Mulaa, F.J., Mattiasson, B., Alkaline active maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34, *Enzyme and Microbial Technology* 36 (1) , 139-146, 2005
27. Huang, H., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M., A segregated model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*, *Enzyme and Microbial Technology* 32 (3-4) , 407-413, 2003
28. Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Seki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T ve Ito, S., Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences, *Appl. Environ. Mic.*, 64 (9), 3282-3289, 1998.
29. Ito, S., Horikoshi, K., Promising α -Amylases for Modern Detergents, *J. Biol. Macromol.*, 4(1) 3-11, 2004
30. İşsever Öztürk, S., Kızılocak, H., Gökmen, F. ve Gümüsel, F. *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 Alfa amilaz Geninin (amy) Klonlanması ve Rekombinant Enzim Sentezi, XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, İnönü Üniv., Malatya,

4-7 Eylül, 2002

31. Jørgensen, S., Vorgias, C.E., Antranikian, G., Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *Journal of Biological Chemistry* 272 (26) , 16335-16342, 1997
32. Kandra, L., α -Amylases of medical and industrial importance, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 666-667 , 487-498, 2003
33. Katoh, S., Terashima, M., Miyaoku, K., Purification of α -amylase by specific elution from anti-peptide antibodies, *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 (5) , 521-524, 1997
34. Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4) , 345-351, 2002
35. Kusuda, M., Nagai, M., Hur, T.-C., Ueda, M., Terashita, T., Purification and some properties of α -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*, *Mycoscience* 44 (4) , 311-317, 2003
36. Kwak, Y.S., Akiba, T., Kudo, T., Purification and characterization of α -amylase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyzes both α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkages, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (4) , 363-367, 1998
37. Laderman, K.A., Davis, B.R., Krutzsch, H.C., Lewis, M.S., Griko, Y.V., Privalov, P.L., Anfinsen, C.B., The purification and characterization of an extremely thermostable α - amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*, *Journal of Biological Chemistry* 268 (32) , 24394-24401, 1993
38. Lo, H.-F., Lin, L.-L., Chen, H.-L., Hsu, W.-H., Chang, C.-T., Enzymic properties of a SDS-resistant *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*, *Process Biochemistry* 36 (8-9) , 743-750, 2001
39. Mamo, G., Gessesse, A., Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology* 25 (3-5) , 433-438, 1999

40. Manning, G.B, Campbell, L.L., Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*, I. Crystallization and some general properties, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 238, No. 11, 1961
41. Marchal, L.M., van der Laar, A.M.J., Goetheer, E., Schimmelpennink, E.B., Bersma, J., Beeftink, H.H. ve Tramper, J., Effect of temperature on the saccharide composition obtained after α -amylolysis of starch, Biotech. and Bioeng., 63 (3), 344-355, 1999
42. Marco, J.L., Bataus, L.A., Valência, F.F., Ulhoa, C.J., Astolfi-Filho, S., Felix, C.R., Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* α -amylase produced by *Escherichia coli*, Applied Microbiology and Biotechnology 44 (6) , 746-752, 1996
43. Martinez, T.F., Alarcon, F.J., Diaz-Lopez, M., Moyano, F.J., Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch, Electrophoresis 21 (14) , 2940-2943, 2000.
44. Messaoud, E.B., Ali, M.B., Elleuch, N., Masmoudi, N.F., Bejar, S., Purification and properties of a maltoheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116, Enzyme and Microbial Technology 34 (7) , 662-666, 2004
45. Mijts, B.N., Patel, B.K.C., Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme, Microbiology 148 (8) , 2343-2349, 2002
46. Mitsuiki, S., Mukae, K., Sakai, M., Goto, M., Hayashida, S., Furukawa, K., Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various *Bacillus* strains, Enzyme and Microbial Technology 37 (4) , 410-416, 2005-08-11
47. Muralikrishna, G., Nirmala, M., Cereal α -amylases - An overview, Carbohydrate Polymers 60 (2) , 163-173, 2005-06-14
48. Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, Á., Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus

Thermomyces lanuginosus strain ATCC 34626, *Enzyme and Microbial Technology* 31 (3) , 345-352, 2002

49. Nielsen, B.R., Lehmbeck, J., Frandsen, T.P., Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of a thermostable glucoamylase from *Talaromyces emersonii*, *Protein expression and purification* 26 (1) , 1-8, 2002

50. Nielsen, J.E., Borchert, T.V., Protein engineering of bacterial α -amylases, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1543 (2) , 253-274, 2000

51. Nirmala, M., Muralikrishna, G., Three α -amylases from malted finger millet (ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) - Purification and partial characterization, *Phytochemistry* 62 (1) , 21-30, 2003

52. Ortlepp, S.A., Ollington, J.F. ve McConnel, D.J., Molecular cloning in *Bacillus subtilis* of a *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable alpha-amylase, *Gene*, 23, 267-276, 1983

53. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., Advances in microbial amylases, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31 (2) , 135-152, 2000

54. Ragunath, C., Sundar, K., Ramasubbu, N., Expression, characterization, and biochemical properties of recombinant human salivary amylase, *Protein expression and purification* 24 (2) , 202-211, 2002

55. Reardon, D., Farber, G.K., The structure and evolution of α/β barrel proteins, *FASEB Journal* 9 (7) , 497-503, 1995

56. Rivera, M.H., Lopez-Munguia, A., Soberon, X. Ve Saab-Rincon, G., α -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity, *Prot. Eng.*, 16 (7), 505-514, 2003

57. Saab-Rincon, G., del-Rio, G., Santamaria, R.I., Lopez-Munguia, A ve Soberon, X., Introducing transglycosylation activity in a liquefying α -amylase, *FEBS Letters*, 453, 100-106, 1999

58. Scopes, K.R, *Protein Purification, Principles and Practise* 3rd Edition, New

York: Springer-Verlag New York Inc. 1994

59. Shaw, A., Bott, R., Day, A.G., Protein engineering of α -amylase for low pH performance, *Current Opinion in Biotechnology* 10 (4) , 349-352, 1999
60. Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K., Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase, *Enzyme and Microbial Technology* 21 (7) , 525-530, 1997
61. Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C., Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnology Advances* 20 (5-6) , 341-359, 2002
62. Stephens, M.A., Ortlepp, S.A., Ollington, J.F. ve McConnel, D.J., Nucleotide sequence of the 5' region of the *Bacillus licheniformis* α -amylase gene: comparison with the *B. amyloliquefaciens* gene, *J of Bacteriol.*, 158 (1), 369-372, 1984
63. Sutthirak, P., Dharmsthiti, S., Lertsiri, S., Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry* 40 (8) , 2821-2826, 2005
64. Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N., Imanaka, T., Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1 $\rightarrow$ 4)- and α -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosidic linkages, *Journal of Biological Chemistry* 267 (26) , 18447-18452, 1992
65. Tomazic, S.J. ve Klivanov, A.M., Why is one *Bacillus* α -amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another?, *JBC*, 363 (7), 3092-3096, 1988
66. Uguru, G.C., Robb, D.A., Akinyanju, J.A., Sani, A., Purification, characterisation and mutagenic enhancement of a thermoactive α -amylase from *Bacillus subtilis*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19 (4) , 273-279, 1997
67. Uyar, F., Baysal, Z., Doğru, M., Purification and some characterization of an extracellular α -amylase from a thermotolerant *Bacillus subtilis*, *Annals of Microbiology* 53 (3) , 315-322, 2003

68. Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology* 94 (2) , 137-155, 2002
69. Vieille, C., Zeikus, G.J., Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (1) , 1-43, 2001
70. Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P., Ulhoa, C.J., Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*, *FEMS Microbiology Letters* 231 (2) , 165-169, 2004
71. . Watson, J. D., Hopkins, N.H. Roberts, J.W., Steitz J.A. and Weiner, A. M. *Molecular Biology of The Gene*, 4th edition, Benjamin/ Cummings, Menlo Park, CA, USA, 1987
72. Wind, R.D., Uitdehaag, J.C.M., Buitelaar, R.M., Dijkstra, B.W., Dijkhuizen, L., Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, *Journal of Biological Chemistry* 273 (10) , 5771-5779, 1998
73. Young Chul Chung, Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T., Kudo, T., Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432, *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4) , 1502-1506, 1995
74. Zhi, W., Deng, Q., Song, J., Gu, M., Ouyang, F., One-step purification of α -amylase from the cultivation supernatant of recombinant *Bacillus subtilis* by high-speed counter-current chromatography with aqueous polymer two-phase systems, *Journal of Chromatography A* 1070 (1-2) , 215-219, 2005

ÖZGEÇMİŞ

13 Haziran 1980’de İstanbul’da doğdu. İlk ve orta okulu İstanbul’da okudu. 2001 yılında, Erzurum, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı ve halen eğitimine devam etmektedir.