

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Geobacillus stearothermophilus*'TAN EKSTRASELÜLER  $\alpha$ -AMİLAZ  
ENZİMİNİN İZOLASYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Barış ENEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran 2011

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Barış ENEZ tarafından yapılan “*Geobacillus Stearothermophilus*’tan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı            Adı Soyadı

Başkan    : Prof. Dr. Birol OTLUDİL

Üye        : Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye        : Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 23 / 06 / 2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ 06 / 2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana büyük emeği geçen ve her konuda beni yönlendiren çok değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Saflaştırma pompasını kullanmama izin veren hocam Prof. Dr. Kemal GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Elektroforez aletini kullandığım Doç. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım.

Spektrofotometresini kullanmama izin verdiği için hocam Yrd. Doç. Dr. Aysel BEKLEYEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgisini benden esirgemeyen hocam Arş. Gör. Fatma MATPAN BEKLER'e, çalışmalarım sırasında bana her türlü desteği veren arkadaşlarım Sedat KAYA ve İhsan REZZUKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sırasında bana her türlü desteği veren dostum Mehmet KAZAYLEK'e teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi olarak her türlü sıkıntıda yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destek gördüğüm Mehmet DENİZ'e ve dostlarım Ebubekir Sıddık MARANGOZ, Medeni AKGÜL ve Zafer BURAKMAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonununun 10-FF-121 numaralı projemize vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
KISALTMA VE SİMGELER.....	X
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>5</b>
2.1. Biyoteknoloji.....	5
2.2. Enzimler.....	6
2.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	8
2.3. Amilazlar.....	10
2.3.1. $\alpha$ -Amilazlar.....	11
2.3.2. $\beta$ -Amilazlar.....	11
2.3.3. $\gamma$ - Amilazlar.....	11
2.4. $\alpha$ - Amilaz Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları.....	12
2.5. Termofilik Mikroorganizmalar.....	15
2.6. Termostabil Enzimler.....	15
2.7. Termostabil Amilazlar.....	16
2.8. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	16
2.9. Enzim Saflaştırma.....	17
2.10. Elektrophorez.....	19
2.11. $\alpha$ -Amilazın'ın İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Üzerine Çalışmalar.....	20
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>29</b>
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Biyolojik Materyal.....	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.2.1. Azot Kaynakları.....	29
3.1.2.2. Karbon Kaynakları.....	29
3.1.2.3. Besiyeri Maddeleri.....	29
3.1.2.4. Elektrophoretik Maddeler.....	29

3.1.2.5. Kimyasallar.....	30
3.1.2.6. Deterjanlar.....	30
3.1.3. Kullanılan Aletler.....	30
3.1.4. Besi Yerleri.....	31
3.1.5. Tamponlar.....	31
3.2. Metot.....	31
3.2.1. Bakteri Üretimi.....	31
3.2.2. Enzim Eldesi.....	31
3.2.3. $\alpha$ -Amilaz Enzimi Aktivite Tayini.....	32
3.2.4. Protein Miktar Tayini.....	32
3.2.5. <i>G. stearothermophilus</i> Üretim Ortamının Optimizasyonu.....	33
3.2.5.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	33
3.2.5.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi.....	33
3.2.5.3. Mikroorganizma Gelişimi Üzerine pH'nın Etkisi.....	33
3.2.6. <i>G. stearothermophilus</i> 'tan Elde Edilen $\alpha$ -Amilazın Optimizasyonu.....	34
3.2.6.1. İnkübasyon Süresinin $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi.....	34
3.2.6.2. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	34
3.2.6.3. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	34
3.2.6.4. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	34
3.2.6.5. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi.....	35
3.2.6.6. Enzim Üretimi Üzerine CaCl <sub>2</sub> Etkisinin Araştırılması.....	35
3.2.7. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması.....	35
3.2.7.1. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	35
3.2.7.2. Diyaliz.....	36
3.2.7.3. Enzim Saflaştırması için Kolonun Hazırlanması.....	36
3.2.7.4. Sefadex G-100 kromatografisi.....	37
3.2.7.5. DEAE- selüloz kolon kromatografisi.....	37
3.2.8. Saflaştırılan $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi.....	37
3.2.9. Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal Maddelerin Etkisi.....	38
3.2.10. Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi.....	38
3.2.11. Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması.....	39
3.2.12. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması.....	39
3.2.13. Enzimin Kinetik Parametrelerin Hesaplanması.....	39
3.2.14. Elektroforez.....	40
3.2.14.1. Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	40

3.2.14.2. Jelin Hazırlanması.....	41
3.2.14.3. Elektroforez İşlemi.....	42
3.2.14.4. SDS-PAGE ile Amilazın Molekül Ağırlığının Hesaplanması.....	42
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>43</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>57</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>
ÖZGEÇMİŞ.....	74

## ÖZET

### *Geobacillus stearothermophilus* TAN EKSTRASELÜLER $\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Barış ENEZ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Bu çalışmada DSMZ'den alınan *Geobacillus stearothermophilus* suşu kullanılarak bu bakteriden elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Bakteri üremesinin optimum koşulları, 16.saat, 55 °C ve pH 7.0 olarak tespit edildi. Maksimum enzim üretim süresi 24.saat olarak belirlenerek bu koşullarda bakteri üretimi gerçekleştirildi. Üretilen bakteriden alınan üst sıvıda  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesine bakılarak enzimin optimum sıcaklığı 70 °C, pH'sı ise 7.0 olarak belirlendi. Enzim üretimi üzerine karbon ve azot kaynaklarının etkisi denendi. Karbon kaynaklarından sükröz ve laktozun enzim üretimini inhibe ettiği belirlendi. Azot kaynaklarının enzim üretimine etki etmedikleri gözlemlendi. Enzim üretimi üzerine çeşitli konsantrasyonlarda CaCl<sub>2</sub>'nin etkisi araştırıldı. CaCl<sub>2</sub> varlığında enzim üretiminin arttığı tespit edildi. Maksimum enzim üretimi 10 mM'da elde edildi.  $\alpha$ -Amilaz enzimi jel filtrasyon ve iyon değiştirici kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırma kat sayısı 65, verim % 46 olarak belirlendi. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 63 kDa olarak tespit edildi

Saf enzim üzerine EDTA, PMSF, DTT,  $\beta$ -mercaptoethanol ve Etanol gibi inhibitörlerin etkisi denendi. Yapılan çalışma sonunda en yüksek inhibisyon etkisi 1 mM'lık EDTA (% 65) ve 10 mM'lık EDTA (% 89) ile elde edildi. Konsantrasyon artışına paralel olarak enzim aktivitesi üzerine olan inhibisyon etkisinin arttığı tespit edildi. Saf enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini saptamak için 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> ve FeCl<sub>2</sub> test edildi. CaCl<sub>2</sub> (%123) ve MnCl<sub>2</sub>'ün (%122) aktiviteyi artırdığı; CuCl<sub>2</sub> (%81) ve HgCl<sub>2</sub>'ün (%83) ise enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi. Saflaştırılan enzimin 50°C ile 60°C'de ve pH 7.0'de stabil olduğu belirlendi. K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri Lineweaver-Burk plot'a göre sırasıyla 0,051 mM ve 1,424  $\mu$ mol/dk. olarak hesaplandı.

**Anahtar Kelimeler :**  $\alpha$ -Amilaz, *Geobacillus stearothermophilus*, thermostabil, saflaştırma

## ABSTRACT

### ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR $\alpha$ -AMYLASE FROM *Geobacillus stearothermophilus*

MSc THESIS

Bariş ENEZ

DICLE UNIVERSTY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

2011

In this study, production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from the strain *Geobacillus stearothermophilus* obtained from DSMZ were examined.

Optimal conditions of bacterial growth were determined at 16<sup>th</sup> hour, 55°C and pH 7.0, respectively. Maximum enzyme production time was determined as 24<sup>th</sup> hour and bacteria production was conducted in these conditions.  $\alpha$ -Amylase enzyme activity was tested in the supernatant from produced bacteria and optimum temperature of enzyme activity was determined as 70°C, and pH was 7.0. The effect of carbon and nitrogen sources on the production of enzyme was investigated. It was found that carbon sources, sucrose and lactose inhibited the enzyme production. It was observed that nitrogen sources did not influence the enzyme production. The effect of various concentration of CaCl<sub>2</sub> on the enzyme production were examined. The enzyme production was increased in the presence of CaCl<sub>2</sub>. Maximum enzyme production was achieved at the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub>.  $\alpha$ -Amylase was purified by gel filtration and ion exchange chromatography. Purification coefficient was determined to be 65, and yield as 46%. Molecular weight of the purified enzyme was found to be 63 kDa by SDS-PAGE.

The effect of some inhibitors such as EDTA, PMSF, DTT,  $\beta$ -mercaptoethanol, Etanol and on purified enzyme was studied. At the end of this study, the highest inhibitory effect 1 mM EDTA (65%) and 10 mM EDTA (89%) was obtained. It was determined that the inhibitory effect on enzyme activity increased in parallel with the increase in the concentration. To determine the effect of some metals on pure enzyme activity of pure enzyme, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, and FeCl<sub>2</sub> were tested. Enzyme activity was increased in presence of CaCl<sub>2</sub> (123%) and MnCl<sub>2</sub> (122%), while activity of the enzyme was inhibited in presence of CuCl<sub>2</sub> (81%) and HgCl<sub>2</sub> (83%). It was determined that the purified enzyme was stable at 50°C and 60°C, and pH 7.0.  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated as 0,051 mM and 1,424  $\mu$ mol/min respectively according to the Lineweaver-Burk plot.

**Key words :**  $\alpha$ -Amylase, *Geobacillus stearothermophilus*, thermostable, purification



## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2.1.</b>	Ticari olarak pazarda yer alan amilazlar	14
<b>Çizelge 4.1.</b>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> $\alpha$ -amilazının saflaştırma basamakları	50
<b>Çizelge 4.2.</b>	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitör Maddelerin Etkisi	51

## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil No</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Biyoteknolojinin kapsadığı alanlar	6
Şekil 2.2. Enzim substrat ilişkisi	8
Şekil 2.3. Amiloz ve Amilopektin glukoz polimerleri	12
Şekil 2.4. DEAE selülozun şematik yapısı	18
Şekil 4.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	43
Şekil 4.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	44
Şekil 4.3. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi	44
Şekil 4.4. Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi	45
Şekil 4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	46
Şekil 4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	47
Şekil 4.7. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	47
Şekil 4.8. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi	48
Şekil 4.9. Enzim Üretimi Üzerine CaCl <sub>2</sub> Etkisi	49
Şekil 4.10. Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal Maddelerin Etkisi	51
Şekil 4.11. Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Detarjanların Etkisi	52
Şekil 4.12. Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması	53
Şekil 4.13. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması	54
Şekil 4.14. Saf Enzimin Kinetik Parametrelerin Hesaplanması	54
Şekil 4.15. Standart proteinlerin MA değerlerinin Rf değerlerine göre değişimi	56
Şekil 4.16. SDS-PAGE ve nişastalı jel sonuçları	56

## KISALTMA VE SİMGELER

DEAE	: Dietilaminoetil
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
TEMED	: N,N,N',N'tetrametilenetilendiamin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
APS	: Amonyum persülfat
CBB	: Coomassie brilliant blue R-250
BFB	: Brom Fenol Blue
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
DTT	: Dithiothreitol
3, 5 DNS	: 3,5 Dinitro salisilik asit
FCR	: Folin reaktifi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
BSA	: Bovim serum albümin
NB	: Nutrient Broth
M	: Molarite
g	: Gram
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
L	: Litre
µl	: Mikrolitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
nm	: Nanometre
µmol	: Mikromol
U	: Ünite

$K_m$	: Michaelis-Menten hız sabiti
$V_{max}$	: Maksimum hız
Rf	: Alıkonma Faktörü
MA	: Molekül ağırlığı
OD	: Optik yoğunluk
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gama

## 1. GİRİŞ

1970’li yıllardan beri ortaya çıkan yeni teknolojiler arasında en ilgi çeken belki de biyoteknolojidir. Bitki, hayvan veya mikroorganizmaların tamamı ya da bir parçası kullanılarak yeni bir organizma (*bitki, hayvan ya da mikroorganizma*) elde etmek veya var olan bir organizmanın genetik yapısında arzu edilen yönde değişiklikler meydana getirmek amacı ile kullanılan yöntemlerin tamamına *biyoteknoloji* denilmektedir (Gavrilescu ve ark. 2005). Canlıların iyileştirilmesi ya da endüstriyel kullanımına yönelik ürünler geliştirilmesini, modern teknolojinin doğa bilimlerine uygulanmasını kapsar. Bu teknolojinin, sağlık hizmetlerinde, gıdaların üretimi ve işleme sürecinde, tarım ve ormancılıkta, çevrenin korunmasında, kimyasalların ve metallerin üretimi gibi daha birçok alanda etkili olduğu görülmektedir (Küçüködük ve ark. 2011).

Biyoteknolojideki gelişmeye paralel olarak endüstriyel enzim kullanımı giderek artmaktadır. Endüstriyel üretimde kimyasal katalizörler yerine, katalitik olarak daha etkili, ürün spesifikasyonu yüksek, istenmeyen ürün oluşumunu büyük ölçüde azaltan, enerji maliyeti düşük, çevre dostu enzimlerin kullanımı artmıştır. Bugün yazılı olarak 2500’den fazla enzim bilinmesine rağmen bunların sadece 150 kadarı ticari bakımdan önem taşımaktadır (Gözükara 1997).

Enzimler, ilk defa 1897’da Buncher kardeşler tarafından canlı hücrelerden ekstrakte edilmiştir. Doğal katalizörler olarak işlev görerek hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü belirleyen, büyük çoğunluğu protein yapısında olan ve bütün canlı organizmalarda bulunan makro moleküllerdir (Bahar 1996).

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alırken, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını inanılmaz boyutlarda hızlandırırlar. İşlem sonunda, tepkimeye girdikleri gibi tepkimeden çıkarlar. Bu nedenle, her enzim bir biyokatalizördür. Başka bir deyişle, enerji açısından normal koşullarda hiç gerçekleşemeyecek ya da çok yavaş gerçekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip, bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli olarak

## 1. GİRİŞ

---

aynı türden tepkimelere katılabilmelidir; ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır (Sağiroğlu 1999).

Bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması yani güvenilir olması gerekmektedir (Wiseman 1987).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre, enzim izolasyonunun kolaylığı, fermantasyonunun kısa sürmesi; fermantasyon ortamının ucuz olması, yüksek enzim aktiviteleri, eleme prosedürlerinin basitliği ve binlerce kültürün oldukça kısa zamanda test edilebilirliği, farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen farklı enzimleri üretmesi ve reaktörde istenen çalışma koşulları ile ilgili esnekliği sağlamasıdır (Telefoncu 1997).

Mikroorganizmalar optimum büyüme yaptıkları sıcaklıklara göre 4 grup altında incelenmektedir. Bunlar; düşük sıcaklık optimasına sahip olan psikofiller, orta sıcaklık optimasına sahip olan mezofiller, yüksek sıcaklık optimasına sahip olan termofiller ve çok yüksek sıcaklık optimasına sahip olan ekstra termofillerdir. Mikroorganizmaların metabolik aktivitesi, özellikle büyük ölçekteki fermantasyonlarda önemli bir problem olan sıcaklığın yükselmesi ile durmaktadır. Geleneksel mezofilik organizmaların kullandığı fermantasyon proseslerinde, sıcaklığı düşürmek için büyük çaba harcanır ve sistemin toplam enerji harcamasının %10 gibi bir kısmı ısı transferi için kullanılmaktadır. Termofilik fermantasyonlarda ise soğutmaya gerek olmadığı için %10 enerji tasarrufu sağlanmış olur (Demirjian ve ark. 2001).

Yüksek sıcaklıklara dayanıklılık birçok endüstriyel enzimlerde fazla istenen bir özelliktir, çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genelde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Bu nedenle, günümüzde termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı en fazla ticari kullanım alanı bulmuştur (Dönmez 1987).

Termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıkta yaşayabilme yeteneğine sahip, oksijen isteklerine göre anaerob veya fakültatif anaerob olabilen, çubuk, disk ya da eliptik morfolojilere sahip mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Termofilik mikroorganizmalar ısıya dayanıklı olduğu için bazı avantajlar meydana getirmektedirler. Mikrobiyolojik fermantasyonda daha yüksek sıcaklıklar birçok bileşiğin çözünürlüğünü, difüzyon kapasitesini artırır, ortamın vizkozitesini düşürür. Eğer sıcaklık yeteri kadar yüksekse hücre büyümesini engelleyen bazı uçucu ürünler de buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılmış olur (Stetter 1998).

Termostabil enzimler doğal yapılarından dolayı çok sayıda ticari alanlarda uygulanan termofilik organizmalardan temel olarak izole edilirler (Haki ve Rakshit 2003). Örneğin, termostabil enzimlerin bir çoğu deterjan, gıda, yem, nişasta, tekstil, deri, kağıt ve ilaç vb. endüstrilerde kullanılmaktadır. 1985 yılında yapılan bir değerlendirmede, dünyadaki enzim satışının 450 milyon doları bulunduğu belirtilmiştir. 2003 yılında ise bu değer 2-3 katı olduğu bilinmektedir (Kıran 2003).

Termostabil enzimler, değişik denatüre edici şartlara karşı yüksek tolerans gösterirler. Bu proteinler mezofilik proteinlere nazaran daha yüksek  $\alpha$  heliks ve  $\beta$  plaka tabakası içeriğine sahiptirler ve çok yavaş katlanma hızı gösterirler. Bu özelliğin değişik denatüre edici şartlara karşı doğal yapıyı korumada önemli olduğu sanılmaktadır. Termostabil enzimler, biyolojik olarak oldukça güç bir şekilde parçalanabilen ve çözünmeyen çevresel kirleticilerin oluşumunu da engellerler (Fujiwara 2002).

Termostabil enzimlerden bazılarının mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termostabilitelerinin bozulmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğu belirtilmiştir (Niehaus 1999). Termofillerden elde edilen termostabil enzimlerin, mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda bile stabil oldukları ve termofil enzimlerinin daha sağlam oldukları belirlenmiştir (Sabato 1999).

Endüstriyel olarak üretilen ilk enzim tedavi amaçlı kullanılan amilazdır. Şu an *Bacillus*, *Aspergillus* ve *Rhizopus* türleri en önemli endüstriyel amilaz kaynakları olarak bilinmektedir. Günümüzde endüstriyel üretimlerde en çok kullanılan termostabil enzimlerden olan  $\alpha$ -amilazlar endüstriyel enzimlerin %25'ini oluşturmaktadır (Sidhu ve

ark. 1997). Bakteriyel amilazların diğer alfa amilazlardan daha büyük sıcaklık stabilitesine sahip oldukları ortaya konmuştur. Termostabil  $\alpha$ -amilaz kullanımı ile işlemlerdeki yüksek sıcaklıklarda bakteriyel ve viral kontaminasyon riski en aza inmektedir (Fujiwara 2002, Matpan 2007).

$\alpha$ -Amilaz enzimi, nişasta molekülündeki  $\alpha$ -1,4 bağlarını parçalayarak glukoz, maltoz, maltotrioz ve  $\alpha$ -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Bu enzim kağıt, gıda, tekstil, eczacılık, şurup gibi bugün biyoteknoloji bakımından önemli endüstri alanlarında kullanılmaktadır (Agüloğlu ve ark.2000, Fengxie ve ark. 2001).

Termofillerin ürettiği enzimlerin, raf ömürlerinin diğerlerine göre oldukça uzun olması ve daha yüksek sıcaklıklarda biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilmesi gibi bazı özelliklerinden dolayı bu organizmaların kullanımını cazip hale getirmiştir. Çalışmamızda, endüstriyel alanda geniş bir uygulama alanına sahip olan  $\alpha$ -amilaz enziminin, termofilik özellikteki *Geobacillus stearothermophilus*'tan saflaştırılması ile bu önemin daha da artacağı düşünüldüğünden  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlandı.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Biyoteknoloji

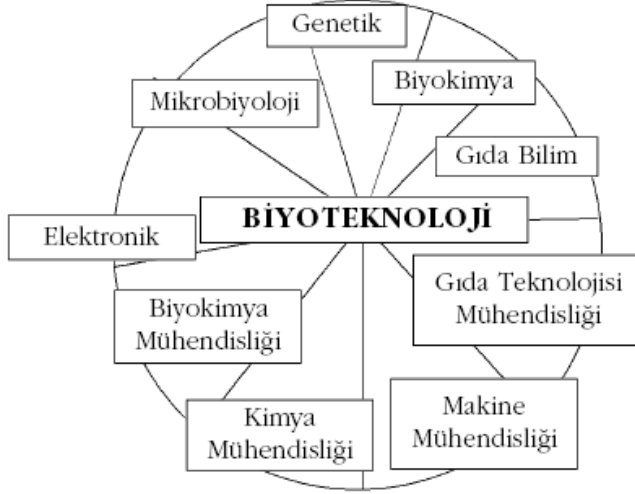
Biyoteknoloji terimi, ilk olarak 1919 yılında Macar mühendisi Karoly Ereky tarafından ucuz besin kaynağı olarak domuzların yiyeceği olan şeker pancarı üretim endüstrisi için kullanılmıştır. Daha sonra organizmalar aracılığıyla ham materyallerin üretilmesi, bu ticari ürünlerin de tüm endüstriyel alanlarda uygulanmasıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Shmaefsky 2006). Bu şekilde biyoloji ve teknoloji alanındaki gelişmelerle biyoteknoloji kavramının kapsamı genişlemiştir.

Biyoteknoloji tarihsel süreç içinde üç döneme ayrılmaktadır: 1919 ve 1939'lu yılları kapsayan “geleneksel dönem”deki bilgi birikimi ve teknolojiyle biyolojik sistemler (bakteri, maya, mantar), herhangi bir değişime tabi tutulmaksızın ekmek, peynir, yoğurt, alkol vb. maddelerin üretilmesinde kullanılmıştır. 1940'lı ve 1973'li yılları kapsayan “ara dönem” de genomların da köklü bir değişiklik yapılmaksızın, biyolojik sistemlerin endüstride kullanım alanları genişletilmiş, sınırlı tekniklerle fermantasyon teknolojisi kullanarak antibiyotik, enzim, protein ve organik asitler vb. maddelerin üretimi geliştirilmiştir.

1973 ve sonrası “modern biyoteknoloji dönemi” gelişmiş ve modern tekniklerin biyolojik sistemlere uygulanmasına ilişkin çalışmaları kapsamaktadır. Böylece, mutasyonlar ya da rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla oluşturulan mutantlar veya transgenik organizmalar, endüstride ve diğer alanlarda yoğun biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Bu bağlamda 20. yüzyılın son yıllarında biyoteknoloji, uygulamalı ve disiplinler arası bir alan olarak tanımlanmaktadır. Bu gelişmelere paralel olarak 1982 yılında OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) tarafından biyoteknolojinin tanımı yapılmıştır. Buna göre Biyoteknoloji; temel bilimlerin ve mühendislik ilkelerinin, hammaddelerin biyolojik araçlar yardımı ile ürünlere dönüştürüldüğü süreçlere uygulandığı bir teknolojidir. (Ekinci ve ark.2005).

Biyoteknoloji uygulamaları mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, immünoloji, protein mühendisliği ve enzimoloji gibi farklı alanları bünyesinde toplar (Şekil 2.1). Biyoteknoloji deneyim ve uzmanlıklarının biçimlenmesi ile iş birliği

projelerindeki iki veya daha fazla bilim adamının çalışma ilişkisi olarak da genelleştirilebilir.



Şekil 2.1. Biyoteknolojinin kapsadığı alanlar

Biyoteknoloji, bu temel bilim buluşlarını kısa sürede yararlı ticari ürünlere dönüştürebilmesiyle bir anlamda kendi talebini de yaratabilir. Bu yönüyle de öteki teknolojilerden ayrılır. Örneğin, sıcak su kaynaklarında yaşayan bakterilerin birinden elde edilen, yüksek sıcaklığa dayanıklı bir enzim, günümüzde uygulama ve temel bilim çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olan PCR'nin önemli bir girdisidir (Çapahan 2011).

Biyoteknolojik uygulamalarda çoğu kez çevreye zarar vermeyen teknikler kullanılır. Bu uygulamaların enerji ihtiyacı azdır, yüksek basınç gerektirmez ve oda sıcaklığı veya daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Çevreyi kirleten atıkların değerlendirilmesi ve mikroorganizmalar yardımı ile parçalanması da biyoteknolojik yöntemle mümkündür (Karaman 1998).

### 2.2. Enzimler

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında ya da bir kısmı protein olan biyo-moleküllerdir. Başlangıçta "E n z i m" terimi, sindirim

kanalında olduğu gibi bir çözelti ya da sıvı içerisinde etki ettiği durumlarda; buna karşın "Ferment = Maya" terimi çoğunluk hamur mayasında olduğu gibi, hücreye bağlı olduğu durumlarda kullanılmıştır. Fermentlerin de hücre dışında etki ettiğini bulunca iki terim arasındaki farklılık ortadan kalkmış oldu. Her iki terim arasında bugün herhangi bir fark olmamakla beraber, bakteri, mantar ve diğer hücreli enzimatik işlevler, mayalanma ve etki maddeleri de ferment olarak kullanılmaktadır (Smith 2003).

Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde, varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır. İlk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte ise Doğu ülkelerinde birçok gıda fermantasyonu için ipliksi mantarlar enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu Doğudan Batı toplumuna önemli bir teknolojik transferidir. Tarihsel gelişim açısından bakıldığında enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır.

Mikroorganizmalar biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermantasyonu ile üretilmektedir (Gupta ve ark. 2003).

Bitkisel kökenli enzimlerin artan talebe karşılık verebilmesi, toprak işleme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi birkaç faktöre bağlıdır. Ayrıca tarımsal etkinlikleri kontrol eden ulusal ve uluslararası politik kuruluşların çalışmaları da önemli bir faktör olarak görülmektedir (John 1987).

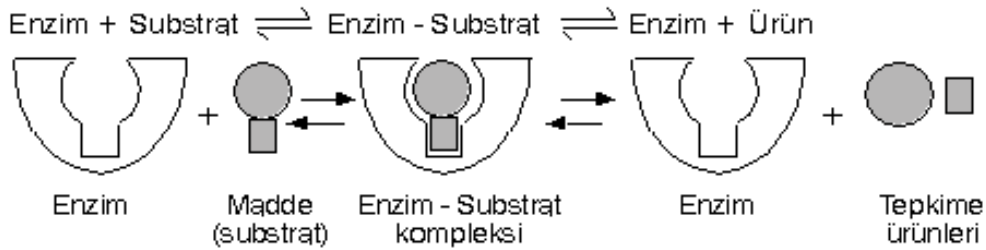
Bitkisel kökenli enzimlerin üretiminde olduğu gibi hayvansal kökenli enzimlerin üretiminde de, kesim için yetiştirilen hayvanları kontrol eden politik ve tarımsal kuruluşların izledikleri politikalar etkin rol oynamaktadır. Birçok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması, hayvanların ve hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınmasında katı kısıtlamaların uygulanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan hastalıkların (özellikle viral hastalıkların) hayvanlar ve hayvansal dokular vasıtasıyla bir ülkeden diğerine yayılması büyük endişelere sebep olmaktadır. Bütün bu sebepler hayvan ve hayvansal ürün ticaretini oldukça kısıtlamaktadır. Bitkisel ve

hayvansal kökenli enzimlerin üretilmesinde karşılaşılan bu sorunlar mikrobiyal kökenli enzimlere olan ilginin artırımını sağlamıştır.

Mikrobiyal hücreler enzim kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve birçok avantaj sağlarlar. Büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca mikroorganizmaların ikilenme süreleri çok kısa olduğundan üretim prosesleri kolaylıkla pazarlanabilmektedir (Woodley 2000).

Endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı *Bacillus* suşları tarafından üretilmektedir. *Bacillus* suşları endospor oluşturan, çomak şeklinde, patojen olmayan ve doğada hemen her yerde bulunan Gram (+) bakterilerdir. Patojen olmamaları ve çeşitli endüstriyel enzimleri üretmelerinden dolayı gen klonlama çalışmalarında önemli bir yere sahip olan *Bacillus* suşları, sentezledikleri enzimleri hücre dışına salgılama yeteneğindedirler. *Bacillus*'lar tarafından sentezlenen başlıca enzimler arasında  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, ksilanaz, alkalın fosfataz,  $\beta$ -glukanaz (sellülaz), glukoz izomeraz,  $\beta$ -laktamaz, nötral proteaz ve pullulanaz sayılabilir. Bu mikroorganizmalar sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilirler (Boyce ve ark. 2007).

Enzimlerin etki ettiği maddelere *substrat* denir. (Şekil 2.2). Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği bir merkez bulunur. Daima bir oluk ve ya yarıç şekline olan bu bölge aktif merkez olarak adlandırılır.



Şekil 2.2. Enzim substrat ilişkisi

### 2.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sistematik isimlendirilmesinde genel olarak şu sıra izlenir; dönüşüme uğratan substratın adı + katalizlenen reaksiyon tipi + az eki. Sistematik isimler çok uzun olduğundan çoğu kez geleneksel isimler tercih edilmektedir (Selen 2006).

1. **Oksidoreduktazlar:** Redoks reaksiyonları katalizleyen bu enzimler dehidrogenaz veya reduktaz çerçeve isimleriyle tanınırlar. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidaz adı ile anılırlar. Örnekler: Alkol dehidrogenaz, reduktaz, peroksidaz, glikoz oksidaz, sitokromoksidaz vb.

2. **Transferazlar:** Donör (verici) üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcısı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Örnekler: Formil-transferazlar (transaminazlar), fosfotransferanazlar (kinazlar), CoA transferazlar v.b

3. **Hidrolazlar:** Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, glikozid, peptid, C-N, asitanhidridi, C-C, C-X veya P-N bağlarını parçalarlar. Örnekler: lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar, vb.

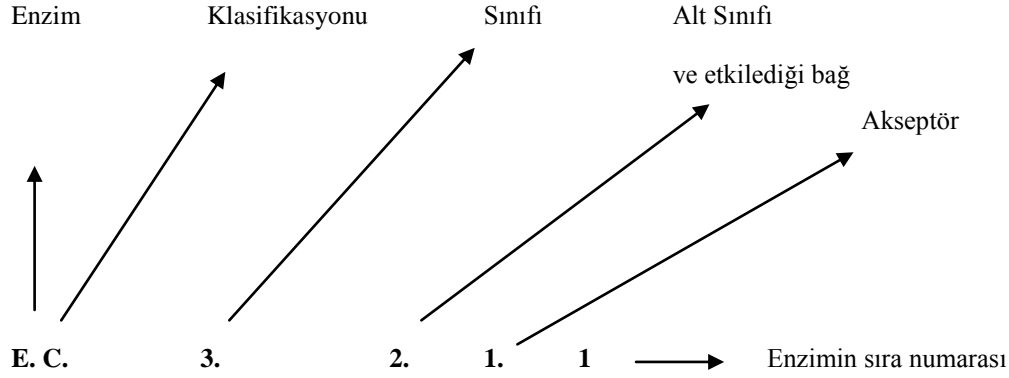
4. **Liyazlar:** Çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Etkiledikleri substrattan ya bir kimyasal bir grubu ayırır ya da ilave ederler. Önemli örnekler: dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar (fumaraz, akonitaz), karboksilazlar.

5. **İzomerazlar:** Molekül için düzenlenmeleri katalize ederler. Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizlerler. Bunlar, molekül içinde oksidoredüksiyonu, grup transferini ve çift bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (intramoleküler liyazlar, intramoleküler transferazlar).

6. **Ligazlar:** Enzimin etkilediği iki maddenin birleşmesini katalize ederler. Amino asitleri aktive eden enzimler, piruvat karboksilazlar, açılaz CoA sentazlar.

Her enzimin kod numarası 4 rakam ile tarif edilmektedir. 1. rakam grup no, 2. rakam sınıf no, 3. rakam alt sınıf no, 4. rakam enzim seri numarasını gösterir.

Örneğin; nişastanın hidrolizinde kullanılan  $\alpha$ -amilaz enzimi, 3 (hidrolaz), 2 (glikoz bileşiklerine etki yapan sınıf), 1 (glikozit hidrolaz), 1 (alt sınıftaki enzimlerin arasındaki yeri), 3.2.1.1. rakamları ile tarif edilir.



### 2.3. Amilazlar

Amilaz enziminin buğday nişastası üzerinde parçalayıcı bir etkisi olduğu 1811 yılında Kirchoff tarafından belirlenmiştir. Ancak parçalama etkeni amilaz tanımlanamamıştır (Gupta ve ark. 2003). Benzer etkinin insan tükürüğü ile elde edilebileceği 1831 yılında Leuch tarafından bulunmuştur. Bernfeld ise 1951’de tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğinin, 1833’de Payen ve Persoz’un ise malttan nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. Ancak günümüzde tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak bilinmektedir (Greenwood ve ark. 1970).

Amilazlar nişasta ve glikojen moleküllerini hidroliz ederek, glikoz ünitelerinden meydana gelen daha küçük polimerler ve dekstrinler gibi ürünleri oluşturan enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı biyoteknolojik olarak asıl kaynağı mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Chakraborty ve ark. 2011).

**2.3.1.  $\alpha$ -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1):**

Nişasta molekülündeki amiloz zincirinin  $\alpha$ -1,4 bağlarına rastgele etki ederek son ürün olarak 1/10'u glikoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışımı meydana getirir.  $\alpha$ -Amilazlar 1,6 glikozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki etmeden geçer. Amilopektin hidrolizi sonucunda glikoz ve maltoza ek olarak bir dizi dallı sınırlı dekstrinler oluşmaktadır (Ağuloğlu 1996). Dört veya daha fazla glikoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glikoz bağlarını içermektedir. Belirli sayıda glikoz ünitesi kalınca dallanma noktasına amilazlar etki edemediğinden bu dekstrinlere sınırlı dekstrin (limit dekstrin) denilmektedir.

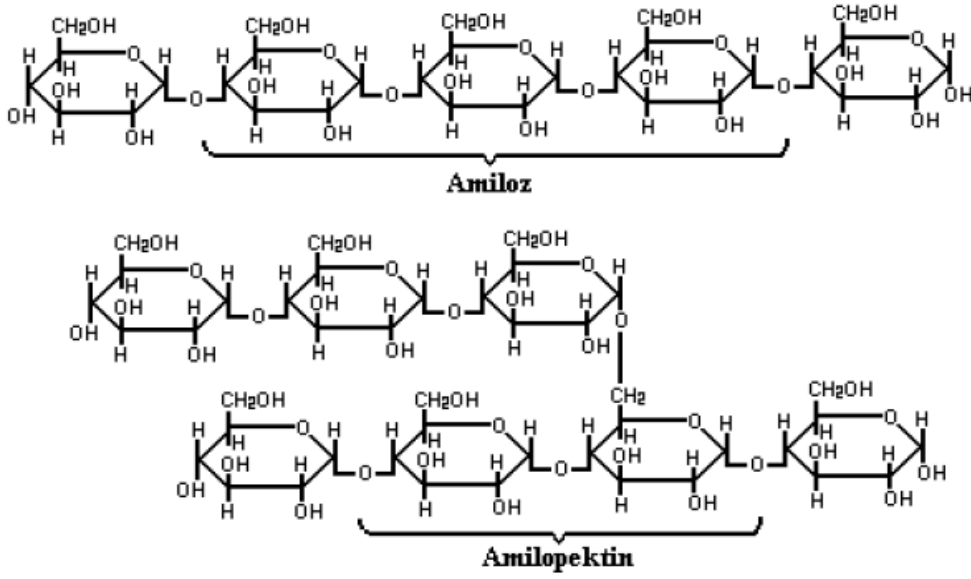
Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda oluşan ürünler  $\alpha$ -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere  $\alpha$ -amilazlar denilmektedir. Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarındaki  $\alpha$ -1,4 bağlarına etki yaptıkları için endoenzimlerdir (Ray ve ark. 2008).

**2.3.2.  $\beta$ -Amilazlar (E.C. 3.2.1.2):**

Nişasta molekülünün indirgen olmayan ucunda ardı ardına gelen maltoz birimlerini uzaklaştıran enzimlerdir. Etkileri,  $\alpha$ -1,6 bağlarına gelince durur. Böylece sınırlı dekstrinler meydana gelmektedir. Hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler  $\beta$ -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere de  $\beta$ -amilazlar adı verilmiştir (Gomes ve ark. 2003).

**2.3.3.  $\gamma$ - Amilazlar(E.C. 3.2.1.3):**

$\gamma$ -Amilazlar, amiloz ve amilopektin moleküllerini redükte olmayan uçlarından keserek glukoz, maltoz, maltotrioz ve oligomaltoz oluşumuna neden olurlar. Aynı zamanda bazı  $\gamma$ -amilazlar amilopektin moleküllerinin 1,6  $\alpha$ -glikozidik bağlarını da hidroliz edebilmektedir (Hsieh ve ark. 2008).



Şekil 2.3. Amiloz ve Amilopektin glukoz polimerleri

### 2.4. $\alpha$ - Amilaz Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları

Amilazlar biyoteknolojik öneme sahip çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar (Aygan 2008).

Yaklaşık on yıldır **unlu mamullerde** amilazlar yaygın bir şekilde yer bulmuştur. Özellikle ekmek ve unlu mamullerde daha iyi kabarma, renk ve daha yumuşak ürün elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Amilaz ilavesi ile fermantasyon oranı artmakta, hamur viskozitesi azaltmakta, ürün hacmi ve hamurda şeker miktarı yükseltilerek ekmek kalitesi artırılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda ürünlerde raf ömrünü uzatıcı olarak da değerlendirilmektedir.

$\alpha$ -Amilazların en büyük pazarı, glukoz ve fruktoz gibi nişastanın parçalanmasından açığa çıkan ürünlerin üretimin alanıdır. Tatlandırıcı özelliklerinden dolayı **alkolsüz içecek endüstrisinde** çok büyük oranlarda kullanılırlar. Aynı zamanda içecek endüstrisinde, alkol fermantasyonu için nişastanın sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesi için kullanılmaktadır.

**Tekstil endüstrisinde** nişasta, haşılama işleminde kullanılır. İpliğin kırılmasını önlemek amacı ile sonradan giderimi kolay koruyucu bir tabaka uygulaması yapılır. Bu amaçla nişasta ile muamele edilmesine 'sizing', nişastanın uzaklaştırılmasına ise



‘desizing’ (Haşılama) denir. Haşılama dokuma esnasında tekstile direnç kazandırır. Dokuma işleminden sonra nişastanın uzaklaştırılmasını takiben yumuşatma ve boyama işlemi başlar. Nişastanın giderilmesi ise genellikle  $\alpha$ -amilaz uygulaması ile gerçekleştirilir.

$\alpha$ -Amilazların **kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde** kullanımı, kağıt kaplamasında nişastanın modifikasyonu iledir. Tekstilde olduğu gibi, kağıdın nişasta ile kaplanması kağıdı mekanik hasarlara karşı korumaktadır. Aynı zamanda son ürün halindeki kağıdın sertliğini, direncini ve kalitesini de artırmaktadır. Doğal nişastanın viskozitesi kağıt işlemleri için çok yüksektir. Nişastanın istenilen yoğunluğa ulaşması, amilaz enzimi kullanılarak nişastanın belirli düzeyde hidrolizasyonu sonucu elde edilir.

**Deterjan endüstrisinde** ise, nişasta temelli kirliliklerin temizlenmesi amacı ile  $\alpha$ -amilaz enzimi deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle sıvı deterjanların %90’dan fazlasında amilaz enzimi vardır. Son yıllarda bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanlara her geçen gün daha fazla amilaz enzimi katılmaya başlanmıştır. Deterjanlardaki enzim ilavelerinin en büyük avantajı enzimsiz deterjanlara nazaran daha iyi temizleme sağlaması ve ortam koşullarını yumuşatmasıdır. Çizelge 2.1’de ticari alanlarda kullanılan amilazlar verilmiştir

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.1. Ticari olarak pazarda yer alan amilazlar

ADI	KULLANIM AMACI
<b>AMG(Amyloglucosidase Novo)</b>	Dekstrinleri glukoza çevirir
<b>BAN (Bakteriyel Amylase Novo)</b>	İki adımlı likitleştirmede da nişastayı dekstrine çevirir.
<b>DEXTRANASE</b>	Ham şekerli sudaki dextranları parçalar
<b>FİNİZYM</b>	Tahıl nişastasını hidroliz ederek filtrelenebilirliğini artırır.
<b>FRUCTOZYME-L</b>	İnulini fruktoza hidroliz eder
<b>FUNGAMYL</b>	Fungal alfa amilaz olup yüksek maltozlu dekstrin şurubu yapar ekmek yapımı ve ham nişastanın işlenmesinde kullanılır
<b>TERMAMYL,Type LS</b>	Geliştirilmiş termostabil tek adımlı likitleştirme işlemi için kullanılır
<b>TERMAMYL</b>	Tek adımlı likitleştirme için nişastanın dekstrine dönmesini sağlayan termostabil alfa amilazdır
<b>TRORUZYME</b>	Termostabil CGTase dir
<b>MALTOGENASE</b>	Özel glukoz şurupları ve yüksek maltoz içeren şurupların yapımında kullanılır
<b>AQUAZYME 240 L</b>	Kağıt yapımında nişastanın düşük saklıklarda modifikasyonu için kullanılır
<b>FUNGAMYL-800 L</b>	Kağıt yapımında nişastanın düşük saklıklarda modifikasyonu için kullanılır
<b>THERMOZYME</b>	Tekstil endüstrisinde haşılama işleminde kullanılır
<b>FUNGAMYL SUPER</b>	FUNGAMYL in geliştirilmiş şeklidir.
<b>NOVAMYL</b>	Ekmek yapımında kullanılan eşsiz bakteriyel maltogenik amilazdır
<b>FUNGAMYL 800</b>	Alkol yapımında fermantasyon zamanını kısaltmak için kullanılır
<b>LIQUOZYME</b>	Yüksek ısıda gerçekleşen likitleştirme işleminde alkol yapımında kullanılır.
<b>DURAMYL</b>	Protein mühendisliği ile geliştirilmiştir Termamyl varyantıdır. Çok yüksek ısılara dayanıklı olup ham nişasta işlenmesi prosesinde kullanılır

## 2.5. Termofilik Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, ekstremofil mikroorganizmalar içinde en çok termofilik bakteriler dikkat çekmektedir ve bunların biyokatalitik potansiyelleri ve enzimleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Termofilik mikroorganizmaların mezofilik mikroorganizmalara göre, yüksek üreme hızları, son ürünün kolay kazanılması, yüksek proses stabilitesi ve verimi, nişasta ve selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri gibi önemli avantajları vardır. Termofiller arasında *Bacillus*, *Clostridium*, *Fervidobacterium*, *Thermus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermotoga* ve *Aquifex* yer almaktadır (Kambourova ve ark 2009).

Termofilik basillerin 45°C ile 70°C sıcaklıkları arasında en iyi üreme sıcaklıkları olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre derin deniz hidrotermal alanlar, sıcak su kaynakları, petrol rezervleri, okyanus derinlikleri gibi farklı çevresel bölgelerden izole edilirler (Rahman ve ark 2004).

Son on yılda termofilik bakteriler biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı çoğu bilim adamının ilgisini çekmiştir. Bazı termofil aerobik ve anaerobik sporlu bakteriler, 1940'lardan önce sıcak karasal ortamlarından izole edilmişlerdir (Brock 1986). Yaklaşık 20 yıl önce de, termal kaynaklardan spor oluşturmeyen aerobik bakteriler elde edilmiştir. İlk izole edilen termofil organizma olan *Sulfolobus acidocaldarius* 80°C'de optimum gelişme göstermektedir (Brock ve ark. 1972).

Geniş sıcaklık aralıklarında üreyebilen termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıkta optimum fonksiyon göstermek için biyolojik membranlarında çeşitli adaptasyonlara ihtiyaç duyarlar. Genelde bakterilerin fosfolipit kompozisyonu gelişim sıcaklığı ile değişir. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden yapılmıştır. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik bir çevre sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi yeterince stabil tutar. Bu mikroorganizmalar diğer mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında, doğaları nedeniyle hücresel komponentleri, enzimleri ve proteinleri de oldukça termostabildir (Adıgüzel ve ark. 2009).

## 2.6. Termostabil Enzimler

Termostabil enzimler, protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılmalarının yanında çok önemli biyoteknolojik potansiyellere de sahiptirler. Bu

kadar önemli olmalarının diğere nedeni ise yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik proseslerin avantajlarıdır. Bu duruma örnek verilecek olursa, organik çözücü içerisindeki kimyasal reaksiyonların hızlarındaki artışın nedeninin yüksek sıcaklıklarda ortam viskozitesindeki azalma ve difüzyon katsayısındaki artıştan kaynaklandığı yapılan araştırmalarda gözlenmiştir (Becker ve ark. 1997).

Çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin olduğu çeşitli işlemlerde, sıcaklığın yükseltılarak çözünürlüğün artırılması ile reaksiyon hızının artması sağlanmaktadır. Ayrıca yüksek sıcaklık, biyolojik hidroliz reaksiyonlarının hızlarını arttırmakta ve kontaminasyon riskini de azaltmaktadır (Saboto ve ark. 1999).

### 2.7. Termostabil Amilazlar

Termofil özellikteki mikroorganizmalardan elde edilen termostabil enzimler kalıtsal stabilitelerinden dolayı birçok ticari uygulamada kullanılmaktadır. En geniş kullanım alanına sahip termostabil enzim  $\alpha$ -amilazdır. Amilolitik termostabil enzimler kullanılarak tek adımlı işlemler ile glukoz üretiminin maliyeti düşürülüp kaliteli ürün üretme oranı artırılması hedeflenmektedir (Haki ve Raksit 2003).

Termostabil amilazlar, çeşitli termofilik ve mezofilik bakterilerden ve funguslardan elde edilebilirler, ancak yüksek sıcaklıklardaki termostabiliteden, termofil mikroorganizmalar sorumludur.

$\alpha$ -Amilaz enziminin yüksek sıcaklıklara adapte olma özelliği genetik olarak kodlanmıştır. Biyofiziksel ve yapısal çalışmaların ortaya koyduğu modeller gösteriyor ki, bu adaptasyon bir dizi modifikasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda termal stabilite artmakla beraber proteinlerin rijit ve dayanıklı yapısı denaturasyona karşı dayanıklı hale gelir. Termostabil  $\alpha$ -amilazlar daha çok *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* gibi çeşitli *Bacillus* türlerinden izole edilmişlerdir. (Eichler 2001).

### 2.8. *Geobacillus stearothermophilus*

*Geobacillus stearothermophilus* kalın bir hücre duvarı ve iç hücre zarı tarafından karakterize olan çubuk şeklinde ki bir gram pozitif bakteridir. Bakteri sıcak su kaynaklarında, okyanus diplerinde ve toprak gibi alanlarda yaygın olarak bulunan termofilik bir bakteridir. Büyüme sıcaklığı 30–75°C arasında değişmektedir. *G.*

*stearothermophilus* sterilizasyon döngüsü başarı testi için bir ekipman olarak sürekli biyoteknoloji endüstrisinde kullanılır. Bakterinin yüksek ısıya dayanıklı olmasından dolayı sterilizasyon döngüsünden sonra bakteri yaşamının biyolojik indikatörü için uygundur. *G. stearothermophilus* türü şimdiye kadar patojen bir durum göstermemiştir. Bakteri, gıda endüstrisinde ve ticari enzim üretiminde de kullanılmaktadır (Timko 2011).

## 2.9. Enzim Saflaştırma

Saflaştırılacak olan enzimin bulunduğu kaynaktan çıkarılması gerekir. Bu işlem her kaynak için farklı şekillerde yapılabilir. Örnek olarak, bir bakterinin ekstraselüler bir enzimi saflaştırmak isteniyor ise santrifüj, intraselüler enzimi saflaştırılmak isteniyor ise sonikasyon kullanırken, bitki için ezme yöntemi kullanılabilir (Sinan 2011).

**Santrifüjleme:** Değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. 1. basamaktan sonra hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. Bunun yanı sıra amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra da yapılır. Çok defa başvurulabilecek bir işlemdir.

**Amonyum Sülfatla Çöktürme:** Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Çöktürme işlemlerindeki istediğimiz aralığı bulduğumuz zaman diğer proteinlerden kurtulmuş oluruz.

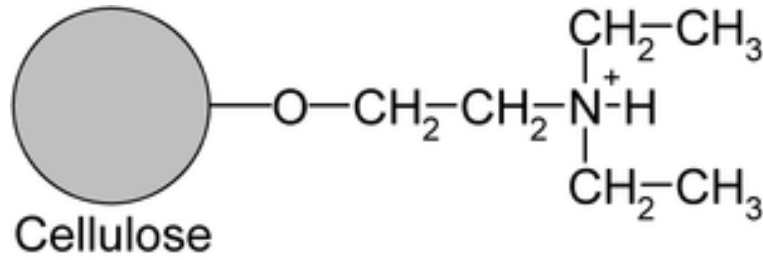
**Diyaliz:** İstenmeyen küçük maddelerden kurtulmak için yapılan bir işlemdir.

**Kolon:** Saflaştırma işlemlerinden en çok saflaştırma derecesi veren işlemdir. Molekül büyüklüğü, elektriksel yük, afinite gibi değişik özelliklerden yararlanılarak hazırlanan kolonlardan numune geçirildiği zaman yüksek bir saflaştırma yüzdesi elde edilir.

**Kromatografik Teknikler:** Jel, iyon-değiştirme, hidrofobik, affinite, immünoaffinite ve kovalent kromatografisi enzim saflaştırma amacıyla kullanılan en önemli kromatografik yöntemlerdir. En çok kullanılanlar;

**İyon Değişim Kromatografisi:** Bilindiği gibi yapı olarak protein olan enzimler amfoter karakterlidir, ortamın tuz konsantrasyonuna ve pH ya bağımlı olarak polianyonik veya polikasyonik yapıdadırlar. Dolayısıyla iyon değiştirici reçineler tarafından tutulabilirler. Enzimlerin çoğunun izoelektrik noktaları asidik bölgede yer

aldığından anyon değiştirici reçineler ile kromatografi daha uygun olmaktadır. Reğinelere örnek olarak selüloz bazlı iyon değiştirici reçineler, dekstran ve poliakrilamid jeller örnek olarak verilebilir (Kritiansen ve ark.1987).



şekil 2.4. DEAE selülozun (Diethylaminoethyl cellulose) şematik yapısı

**Jel Filtrasyonu:** Jel filtrasyonunda ayırmada etkili olan parametreler molekül şekli ve büyüklüğüdür. Sabit fazı oluşturan materyal gözenek boyutu belli olan çapraz bağlı hidrofilyk polimerlerdir. Gözeneklerden jel derinliklerine girebilen moleküller güçlü bir şekilde tutulabilirler. Jel filtrasyonunda kullanılan filtrasyon materyali poliakrilamid, agaroz, dekstran ve bunların kombinasyonu ile oluşturulan çapraz bağlı türevlerdir. (Aehle 2004).

**Affinite Kromatografisi:** Affinite kromatografisi enzim aktif merkezinin adsorbanta bağlanması esasına dayanır. Adsorban olarak kullanılan jel ve polimerlere enzimin substratının bir analogu, kompetitif inhibitörü veya enzim ile tersinir etkileşebilen bir ligand kovalent bağlanmıştıştır. Affinite reğinesi olarak adlandırılan böyle bir adsorban bir kolona doldurulur ve ham enzim ekstraktı kolondan uygun bir tampon ile geçirilirse ayrılacak enzim kolonda tutulur. Safsızlık oluşturan diğer maddeler kolonu terk ederler. Daha sonra kolon koşulları değiştirilerek tutulmuş olan enzimin elusyonu gerçekleştirilebilir. Ham ekstraktın hedeflenen enzimin tek adımda oldukça saf olarak elde edilmesine olanak veren bu teknik laboratuvar uygulamalarında çok başarılı bir şekilde uygulanmakla birlikte endüstriyel uygulamaları çok sınırlıdır (Godfrey ve West 1996).

## 2.10. Elektroforez

Arne Tiselius tarafından geliştirilmiş olan elektroforez, yüklü moleküllerin elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği bir tekniktir. Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kütlelerine oranıyla belirlenen hızlarda, elektriksel alanda hareket etme prensibine dayanır. Amino asitler, proteinler, nükleotitler ve nükleik asitler gibi önemli biyolojik moleküller iyonize olan gruplar içermektedirler ve böylece herhangi bir pH'da çözelti içinde elektrikçe yüklü katyonlar ve anyonlar şeklinde bulunurlar. Bu elektrik alan etkisi ile bu yüklü partiküller net yüklerine bağımlı olarak katoda veya anoda doğru göç ederler (Vesterberg 1993).

Elektriksel Alanda Göç Hızları; elektriksel alanın şiddetine, moleküllerin net yüküne, moleküllerin şekillerine, ortamın viskozitesine, hareket ettikleri ortamın iyonik şiddetine, moleküllerin büyüklüğüne ve sıcaklığa bağlıdır.

Elektroforez, protein ve nükleik asitlerin saflaştırılmasında kullanılan oldukça önemli bir metottur. Daha çok çalışılan moleküllerin özelliğine göre değişik destek matrisleri kullanılarak uygulanmaktadır. Bunların arasında kağıt, selüloz, asetat, nişasta, agaroz, poliakrilamid jel elektroforezleri sayılabilir

Proteinler için en iyi ayırma yöntem ise poliakrilamid jel elektroforezidir (PAGE). PAGE'de destek matris olan poliakrilamid, akrilamid monomerlerine çapraz bağlayıcı moleküller olan N, N'-metilen-bis akrilamidin kovalent olarak bağlanmasından oluşan bir polimerdir. Bu çapraz bağlar jelde polipeptidlerin geçeceği porlar oluşturmaktadır.

Akrilamid konsantrasyonu jelin yoğunluğunu ve dayanıklılığını belirlemektedir. Konsantrasyonun artmasıyla oluşan ağın sıklığı artar gözenek çapı azalır. Molekül ağırlığı 60-200 kDa olanlar için % 5'lik jel, 30-120 kDa için %7,5'luk jel, 16-70 kDa için % 10'luk jel, 12-45 kDa olanlar için ise % 15'lik jel kullanılmaktadır.

Jeldeki polimerizasyon ya kimyasal ya da fotokimyasal yolla gerçekleşmektedir. Kimyasal yöntemde APS (amonyum persülfat), fotokimyasal yöntemde ise riboflavin kullanılmaktadır. TEMED (N,N,N',N'tetrametilenetilendiamin) her iki uygulamada da katalizör olarak görev görür.

Proteinlerin birbirinden ayrılması amacıyla non-denatüre ve denatüre sistemler kullanılmaktadır. Non-denatüre (Doğal) PAGE; Proteinlerin doğal yani üç boyutlu yapılarını bozmadan koşturuldukları jel elektroforez tipidir. Proteinler jel içerisinde elektriksel alanda hem yüklerine, hem de molekül ağırlıklarına göre hareket ederler. Böylece elektroforez bitiminde aktivitelerini kaybetmemiş olurlar. Bu elektroforez tipinde dikkat edilecek en önemli hususlardan biri elektroforez esnasında elektrik akımından dolayı doğacak olan ısınmalardan proteinlerin etkilenmemesi için elektroforezin soğuk odada yapılması gereğidir. (Aygan 2008).

Denatüre (Doğal olmayan) Jel elektroforezi SDS-PAGE; Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi yani SDS-PAGE dediğimiz elektroforez, protein karışımlarının özelliklerini incelemek açısından önemlidir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu elektroforez tekniğinde etkin bir ayırımın yapılabilmesi için proteinler arasındaki elektriksel yük farkının ortadan kaldırılması ve proteinlerin denatüre edilip lineer hale getirilmesi gerekir ki etkin bir şekilde jel içerisinde koşturulsun. Elektriksel yük farkının ortadan kaldırılması ve proteinlerin denatüre etmek için; üre, 2-merkaptoetanol, SDS ve ısıdan yararlanılmaktadır (Temizkan ve Arda 2008).

### **2.11. $\alpha$ -Amilazın'ın İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Üzerine Çalışmalar**

Srivastava (1987) *Bacillus stearothermophilus*'tan üretilen amilazları saflaştırmıştır. Saflaştırdığı amilazları,  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -amilaz olarak belirleyip molekül ağırlıklarını sırasıyla 48 kDa ve 57 kDa olarak tespit etmiştir. Saflaştırılan amilazların optimum sıcaklık ve pH'sını 80 °C ve pH 6.9 olarak bulmuştur.  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Al^{+2}$  kısmen inhibitör iken  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Ag^{+1}$  enzimlerin aktivitesini inhibe ettiğini  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ , ve  $K^{+}$  iyonları amilaz aktivitesini artırdığını tespit etmiştir. GSH ve sisteinin enzim aktivitesine etki etmemesine rağmen PCMB, EDTA ve sodium iodoacetate'ın ise enzim aktivitesinde inhibitör etki yaptığını tespit etmiştir.  $\alpha$ -Amilaz ve  $\beta$ -amilaz'ın Km değerleri sırasıyla 1.05 ve 1.25 mg/ml olarak belirlemiştir.

Shaw ve ark. (1995) Ekstratermofilik *Thermus sp*'ten salgılanan  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması üzerine çalışma yapmışlardır. Saflaştırılan enzimin SDS-



PAGE ile molekül ağırlığını 59 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 70 °C ve optimum pH'sını 5.5-6.5 olarak belirlemişlerdir. EDTA'ya karşı enzimin duyarlılığı olduğunu,  $Ca^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmadığını ve  $Cu^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  metallerinin enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Hamilton ve ark. (1999) *Bacillus sp.* IMD 435  $\alpha$ -amilaz üretimi ile ilgili çalışmışlardır. Bakteri üretimi için inkübasyon süresi 41. saat sıcaklığı ise 40 °C olarak belirlemişlerdir. Azot kaynağı olarak %2'lik maya özütü ve karbon kaynağı olarak %4'lük laktoz içeren besi yerlerinde maksimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Laktozlu ortamda  $\alpha$ -amilaz üretimi fazla olmasına rağmen bakteri üretiminin az olduğunu ve kısmi saflaştırılan enzimde maksimum amilaz aktivitesinin pH 6.0 ve 65°C'de olduğunu tespit etmişlerdir.

Mamo ve Gessesse (1999) Termofilik *Bacillus sp.* WN11'den termostabil  $\alpha$ -amilazların saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. Bakteri üretimini 18 saatte ve 65°C sıcaklıkta gerçekleştirmişlerdir. Amilaz I ve amilaz II'nin molekül ağırlıklarını sırası ile 76 ve 53 kDa olarak bulmuşlardır. Her iki enzimin de optimum pH'sını 5.5, amilaz I'in optimum sıcaklığını 75 °C, amilaz II'nin optimum sıcaklığını ise 80 °C olarak tespit etmişlerdir. Enzimlerin 80 °C de 4 saat inkübasyon sonunda % 50 aktivitelerini koruduğunu ve pH 5.5 ile 9.0 da stabil olduklarını göstermişlerdir. Saf enzimlerin aktivitelerinin  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Hg^{+2}$  iyonları ile inhibe olduğunu,  $Zn^{+2}$  iyonunun ise enzim aktivitesine herhangi bir etki yapmadığını göstermişlerdir.

Sarıkaya ve Gürgün (2000) *Bacillus* suşlarından yüksek verimde  $\alpha$ -amilaz enzimi elde etmek için yeni bir ortam geliştirme üzerine çalışmıştır. Farklı karbon, azot ve metal kaynakları varlığında 3 *Bacillus* suşunun üretimini gerçekleştirmiştir. En yüksek  $\alpha$ -amilaz verimini *B. subtilis*'te Na-sitratlı, *B. amyloliquefaciens* I'de nişastalı ve *B. amyloliquefaciens* II'de ise sükrözlu ortamda elde etmiştir. Azot kaynağı olarak *B.*

*amyloliquefaciens* I için amonyum sülfat iyi bir kaynak iken maya özütünü *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* II için enzim bakımından verimli bulmuştur.  $Ag^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$ , nun bütün suşlarda güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini belirlemiştir.  $\alpha$ -Amilaz için tüm suşlarda optimum sıcaklığı  $55^{\circ}C$ , *B. subtilis* için optimum pH 7.0, *B. amyloliquefaciens*'in her iki suşu için ise pH 5.9 olarak bulmuştur.

Aguilar ve ark. (2000) *Lactobacillus manihotorans* LMG 18010'dan salgılanan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığını 135 kDa olarak ve optimum pH'sını 5.5, optimum sıcaklığını  $55^{\circ}C$  olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 5.0 ile pH 6.0'da iyi stabilite gösterdiğini,  $55^{\circ}C$  de 1 saat inkübasyon sonrasında aktivitesini kaybettiğini belirtmişlerdir. Enzimin  $K_m$  değerini 3.44 mg/ml olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisini denemişler ve  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Hg^{+2}$  (10 mM) iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin hemen hemen kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

Cordeiro ve ark. (2002) Termofilik *Bacillus sp* SMIA-2  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz üretimine çözünebilir nişasta içeren kültür ortamında ve 48. saatte ulaşmışlardır. Enzimin pH 7,5 ve  $70^{\circ}C$  sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.  $50^{\circ}C$ 'de 2 saat sonunda enzimin stabil kaldığını ve  $60^{\circ}C$ ,  $70^{\circ}C$  ve  $90^{\circ}C$ 'de sırasıyla % 4, % 13, % 38'ini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Enzimin  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Ba^{+2}$  tarafından orijinal aktivitesinin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Sr^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$ , dan daha az etkilendiğini saptamışlardır.

Gomes ve ark. (2003) Ekstrem termofilik *Rhodothermus marinus*'un 5 türü üzerinde yüksek termostabil  $\alpha$ -amilaz ve pullanaz enzimlerin üretimi ve kısmi karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Bakteri üretimini 15-16.saatlerde ve  $61^{\circ}C$  sıcaklıkta gerçekleştirmişlerdir. En iyi karbon kaynağı olarak maltozu, en iyi azot kaynağı olarak da maya özütünü belirleyip besi yerine ilave etmişlerdir.  $\alpha$ -Amilazın optimum sıcaklığını  $80^{\circ}C$  ve optimum pH'sını 6.5 olarak tespit etmişlerdir.

Burhan ve ark. (2003) Termotabil ve alkalın  $\alpha$ -amilaz üreten *Bacillus sp.* ANT-6Y'yı topraktan izole etmişlerdir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 80°C, optimum pH'yı da 10.5 olarak tespit etmişlerdir. Kısmi olarak saflaştırdıkları enzimin moleköl ağırlığını 94.5 kDa olarak bulmuşlardır. Enzimin alkalın pH değerinde (9.5-13.0) oldukça stabil olduğunu ve 100 °C'de aktivitesinin % 85.5 oranında korunduğunu tespit etmişlerdir. CaCl<sub>2</sub> ve PMSF'nin enzim aktivitesini arttırdığını Zn<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup>, Na-sülfid, EDTA, üre ve SDS'nin enzim aktivitesinde azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir.

Konsula ve ark. (2004) Ilımlı termofilik *Bacillus subtilis*'in ekstraselüler termotabil  $\alpha$ -amilazı ile ilgili çalışma yapmışlardır. Maksimum enzim üretimini nişasta ilaveli besi ortamında ve 40°C de bulmuşlardır. Enzimin 135°C ve pH 6.5'ta maksimum aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yang ve Liu (2004) *Thermobifida fusca*'tan elde edilen  $\alpha$ -amilazın maltotrioz üretim özellikleri ve saflaştırılması üzerine çalışma yapmışlardır. Bakteri üretimini 50°C sıcaklıkta ve 24 saatte gerçekleştirmişlerdir. Enzimin % 22 verimle ve 7.2 kez saflaştırmasını sağlamışlardır. Saflaştırılan enzimin moleköl ağırlığını SDS-PAGE ile 60 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 7.0 ve 60°C olarak belirleyerek 3 saat ve 60°C de kalan enzim miktarının yaklaşık olarak % 70 olduğunu tespit etmişlerdir.

Najafi ve ark. (2005) Topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* AX20'den ürettikleri ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Maksimum enzim üretim sıcaklığını 37°C olarak bulmuşlardır. Saflaştırılan enzimden % 24.2 verim elde edip spesifik aktiviteyi 4133U/mg olarak belirlemişlerdir. Saf enzimin optimum sıcaklığını 55°C, optimum pH'sını da 6.0 olarak tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin ve kimyasalların etkisini araştırmışlar, Hg<sup>+2</sup>, Ag<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> tarafından inhibe edildiğini, EDTA'dan etkilenmediğini belirlemişlerdir.

Noman ve ark. (2006) *Pachyrhizus erosus* L'den  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması üzerine çalışma yapmışlardır. Saflaştırılan enzimden % 22.8 verim elde edip saflaştırma kat sayısını 110 olarak bulmuşlardır. Saf enzimin molekül ağırlığını 40 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzimin optimum pH'sını 7.3, sıcaklığını ise 37°C olarak bulmuşlardır.  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi yüksek oranda inhibe ederken  $Li^{+2}$ ,  $Hg^{+}$  ve  $Cd^{+2}$  iyonlarının orta derecede etkilediği,  $Ag^{+}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $K^{+}$  iyonlarının ise aktiviteye daha az etki ettiğini tespit etmişlerdir.

Behal ve ark. (2006) *Bacillus sp.* AB 04'ten elde ettikleri alkali  $\alpha$ -amilaz enziminin karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Bakteri üretimini 24-36 saatlerinde ve 40°C sıcaklıkta gerçekleştirmişlerdir. Alkali  $\alpha$ -amilaz üretimini % 1 fruktoz ve % 1 et özütü içeren besi ortamında gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 40°C olarak belirleyip 50°C ile 80°C arasında stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim için optimum pH 8.0 olarak bulunmuş, pH 7.0 ile 10.0 arasında stabil olduğu belirlenmiştir.  $Ca^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini güçlü bir oranda arttığını tespit etmişlerdir.

Ezeji ve Bahl (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10'dan salgılanan  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzimlerini saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile  $\alpha$ -amilazın molekül ağırlığı 58 kDa olarak bulunmuş, optimal pH'sı 5.5 ve sıcaklığı 80°C olarak tespit edilmiştir. EDTA tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini tespit edip,  $Ca^{+2}$  varlığında 70 °C de 1 saat inkübasyondan sonra  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin % 92 den fazlasının kaldığını gözlemlemişlerdir. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 3.05 mg/ml ve 7.35 U/ml olarak belirlemişlerdir.

Asgher ve ark. (2007) Termofilik *Bacillus subtilis* JS-2004'ten temostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bakteri inkübasyon süresini 48 saat sıcaklığı 50°C ve pH 7.0 olarak tespit etmişlerdi. Bakterinin ürediği ortama  $Ca^{+2}$ , maya özütü ve glukoz ilave ederek bu maddelerin bakterinin üremesine ve enzim üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Maksimum enzim üretimini 72 U/ml olarak 48. saatte pH 7.0'de ve 50°C'de elde etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 8.0, optimum sıcaklığını da 70°C olarak belirlemişlerdir.  $Ca^{+2}$ 'nin

enzim aktivitesi üzerinde iyi bir aktivatör olduğunu,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ , ve  $\text{Hg}^{+2}$  tarafından enzimin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  iyonlarından enzimin daha az etkilendiğini bulmuşlardır.

Saxena ve ark. (2007) *Bacillus* sp. PN5'ten üretilen yüksek termostabil ve alkalın amilaz üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. 60 saat inkübasyon sonrasında  $60^{\circ}\text{C}$  pH 7.0 de (%) 0.6 nişasta (%) 0.5 pepton ve (%) 0.3 maya özütü içeren besi ortamında, pH 10.0'da ve  $90^{\circ}\text{C}$ 'de spesifik aktiviteyi 65.23 U/ml olarak bulmuşlardır. Enzim aktivitesinin, pH 10.0'da 1 saat ön inkübasyon sonrası % 80'inin korunduğunu,  $105^{\circ}\text{C}$ 'de % 65 oranında aktivite gösterdiğini ve  $80^{\circ}\text{C}$  ile  $100^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon sonrası ise % 100 stabil kaldığını belirlemişlerdir.

Agüloğlu (2008) Sıcak su kaynağından izole ettiği *Bacillus subtilis* 'tan  $\alpha$ -amilaz enziminin karakterizasyonu üzerine araştırma yapmıştır. Enzim için optimum sıcaklık  $65^{\circ}\text{C}$ , optimum pH 7.0 olarak belirlemiştir.  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini arttırdığını, artan glukoz ve EDTA konsantrasyonlarının ise enzim inhibisyonuna neden olduğunu gözlemlemiştir.

Arıkan (2008) Termofilik *Bacillus* sp. A3-15'ten üretilen alkalın ve termostabil  $\alpha$ -amilazı kısmi olarak saflaştırarak enzimin optimum sıcaklığını  $70^{\circ}\text{C}$ , optimum pH'sını da 11.0 olarak bulmuştur. Nişastalı SDS-PAGE elektroforez ile 86 kDa ve 60 kDa molekül ağırlıklarında bağımsız iki bant elde etmiştir. Enzimin pH 10.0 ile 11.5 alkalın pH aralıklarında %95 oranında aktif olduğunu ve  $100^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika öninkübasyon sonrası orijinal aktivitesini %96 oranında koruduğunu tespit etmiştir. Enzim aktivitesinde 5 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında %30 artış gözlemlemiştir, 5 mM EDTA,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NaCl}_2$ , Na-sülfid, 3 Mm PMSF, SDS ve üre tarafından inhibe edildiğini tespit etmiştir. pH 10.0 ile 11.0 aralığında,  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat sonunda yaklaşık %70 oranında stabil kaldığını belirlemiştir.

Carvalho ve ark. (2008) Termofilik *Bacillus sp.* SMIA-2'den  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. Maksimum enzim üretimine azot kaynağı olarak pepton, karbon kaynağı olarak ise çözüner nişastanın bulunduğu besi ortamında 32 saat inkübasyon sonrasında ulaşmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 8.5, optimum sıcaklığını ise 90°C olarak bulmuşlardır. Enzimin 90°C de aktivitesinin %66'sını kaybetmesine rağmen 40–50°C de enzimin 1 saat stabil kaldığını tespit etmişlerdir.  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Ba^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ederken  $Mg^{+2}$ ,  $Na^{+}$  ve  $K^{+}$  iyonlarının daha az etki ettiğini belirlemişlerdir.  $\alpha$ -Amilaz aktivitesine Omo, Campeiro ve Tide gibi ticari deterjanların uygulanması ile kalan enzim aktivitesini sırası ile % 86, % 85 ve % 75 olarak bulmuşlardır.

Hmidet ve ark. (2008) *Bacillus licheniformis* NH1 salgılanan termostabil  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. Bakteri üretilimini 48 saat, 37°C ve pH 7.0 de gerçekleştirmişlerdir.  $\alpha$ -Amilaz enzimini %15.9 verimle ve 3.08 kez saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığını 58 kDa olarak tespit etmişlerdir. Saf enzimin optimum sıcaklığını 90°C olarak, enzimin pH 5.0 ile pH 10.0 gibi geniş bir aralıkta yüksek aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. pH 5.0, pH 9.0 ve pH 10' da kalan enzim miktarlarını sırasıyla %89, %96.6 ve %90 olarak belirlemişlerdir.  $Ca^{2+}$  iyonun bulunduğu ortamda aktivitenin etkilenmediğini ancak EDTA'ya karşı duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Liu ve ark.(2008) *Bacillus sp.* YX-1'den  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. Enzimin pH 5.0'te maksimum aktivite gösterdiğini, pH 4.5 ile 11.0 arasında stabil kaldığını ve enzimin optimum sıcaklığını ise 40–50°C olarak tespit etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığını 56 kDa olarak hesaplamışlardır.

Prakash ve ark. (2009) Halofilik *Chromohalobacter sp.* TVSP 101 bakterisinden termostabil, halotolerant ve alkali-stabil olan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimini, saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum amilaz üretimini tripton ve %0,5 pirinç unun bulunduğu 37°C de, pH 9.0 da, %20 NaCl veya %15 KCl

içeren besi ortamında elde etmişlerdir. Ortama 50 mM CaCl<sub>2</sub> ilavesinin enzim üretimini %29 oranında arttırdığını belirlemişlerdir. Amilaz I ve amilaz II olarak adlandırılan iki enzimi saflaştırıldıktan sonra molekül ağırlıklarını sırasıyla 72 kDa ve 62 kDa olarak tespit etmişlerdir. Her iki enzimin de pH 9.0 da ve 60°C’de maksimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Shafiei ve ark. (2010) *Nesterenkonia sp.* F suşundan salgılanan amilaz enziminin saflaştırılmasını ve biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını yaklaşık olarak 100-106 kDa olarak, optimum sıcaklığını 45°C pH’sını 7.5 olarak tespit etmişlerdir. Zn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Al<sup>+3</sup> iyonlarının amilaz aktivitesini oldukça inhibe ettiğini fakat Ca<sup>+2</sup> enzim aktivitesini arttırıldığını saptamışlardır. EDTA’nın enzim üzerine inhibisyon etkisi oluştururken PMSF ve β-mercaptoethanol’un enzim üzerinde inhibisyon etkisi oluşturmadığını tespit etmişlerdir. %0.5 SDS, %0.2 Triton X-100, Tween 80, Tween 20 deterjanlarına karşı oldukça stabil olduğunu belirlemişlerdir. Çözünebilir nişasta kullanarak enzimin Km değerini 4.5 mg/ml olarak bulmuşlardır.

Mollania ve ark.(2010) Sıcak su kaynağından izole ettikleri *Geobacillus sp.* LH8’in α-amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığını 52 kDa, optimum pH’sını 5.0-7.0, optimum sıcaklığını ise 80°C olarak bulmuşlardır. Mg<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve EDTA ile aktivitede azalma, Mn<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Cr<sup>+3</sup> ve Al<sup>+3</sup> ile enzim aktivitesinde artış elde etmişlerdir. Enzimin Km değerini 3 mg/ml ve Vmax değerini ise 6.5 µmol/min olarak tespit etmişlerdir.

Asoodeh ve ark. (2010) Termofilik *Bacillus sp. Ferdowsicus*’tan asidofil ve termostabil amilazın saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 53 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerini 4.5 olarak belirleyip pH 3.5 ile 7.0 değerlerinde stabil olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 70°C olarak bulmuşlar ve 75°C’de 45 dakika sonunda aktivitesinin % 75’ini koruduğunu saptamışlardır. Enzim

aktivitesinde EDTA ve  $Zn^{+2}$  ile azalma,  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , PMSF, Triton X-100 ve  $\beta$ -mercaptoethanol ile de artış meydana geldiğini belirlemiştir.

Božić ve ark. (2011) *Bacillus licheniformis* ATCC 9945'ten  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimi ve saflaştırılması üzerine çalışma yapmışlardır. En yüksek enzim üretimini 24. saatte ve  $37^{\circ}C$ 'de elde etmişlerdir.  $\alpha$ -Amilaz enzimini % 38 verimle ve 6 kez saflaştırmışlardır. Saf enzimin SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlığını 31 kDa olarak belirleyip, optimum pH'sını 6.5, optimum sıcaklığını ise  $90^{\circ}C$  olarak tespit etmişlerdir.  $CaCl_2$  varlığında saf enzimin  $70^{\circ}C$  de 6 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin %55'ni koruduğunu belirlemiştir.  $Hg^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken,  $Ca^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  'ın aktiviteyi düşük oranda arttırdığını tespit etmişlerdir.

Wang ve ark. (2011) *Chryseobacterium taeanense* TKU001'den elde ettikleri alkali ve stabil amilazın saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. Saf  $\alpha$ -amilazın SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlığını 46 kDa veya 47 kDa olarak belirlemiştir. Enzimin optimum pH'sını 9.0, optimum sıcaklığını  $50^{\circ}C$ , pH stabilitesini 6.0–11.0 arasında ve sıcaklık stabilitesinin ise  $60^{\circ}C$ 'de daha düşük sıcaklıklarda olduğunu bulmuşlardır.



### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Biyolojik Materyal**

Bu çalışmada DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)'den alınan *Geobacillus stearothermophilus* suşu kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Kimyasal Maddeler**

###### **3.1.2.1. Azot Kaynakları**

Maya özütü, amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat, mısır özütü, üre Merck'ten, tripton Sigma'dan, pepton Oxoid'den ve et özütü Acumedia'dan temin edilmiştir.

###### **3.1.2.2. Karbon Kaynakları**

Nişasta, glukoz, sükroz ve galaktoz Merck'ten, maltoz, laktoz ve fruktoz Sigma'dan temin edilmiştir.

###### **3.1.2.3. Besiyeri Maddeleri**

Nutrient Broth ve Nutrient Agar Merck'ten temin edilmiştir.

###### **3.1.2.4. Elektroforetik Maddeler**

Tris-Base [Tris(hydroxymetyl) amino methane], akrilamid, N-N-Metilen bisakrilamid, TEMED (N-N-N'-N'-Tetrametiletlen diamin), APS (amonyum persülfat), Standart proteinler ( $\beta$ -Galaktosidase, Phosphorylase, Bovine serum albumin, Carbonic anhydrase, ticari  $\alpha$ -amilaz) ve Glisin Sigma Chemical Co., St. Louis 'den, Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad 'dan, BFB (Brom Fenol Blue), SDS (sodyum dodesil sülfat) ve Gliserol Merck'ten temin edildi.

#### 3.1.2.5. Kimyasallar

Phenylmethysulfonylfluoride (PMSF), Na-K-Tartarat Fluka Bichemica'dan;  $\beta$ -Mercaptoethanol Merck Schuchardt'dan; Dinitro salisilik asit (DNS), Dithiothreiol (DTT), Folin reaktifi (FCR) Sigma'dan; EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) Merck Darmstadt'dan temin edildi.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  Merck Darmstadt'dan;  $\text{MgCl}_2$  Kimetsan'dan;  $\text{ZnCl}_2$  Lachema'dan;  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  ve  $\text{CoCl}_2$  Sigma'dan temin edildi.

#### 3.1.2.6. Deterjanlar

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Tween 40, Tween 80 Merck'ten; TritonX-100 Sigma'dan ve Alo ticari olarak temin edildi.

#### 3.1.3. Kullanılan Aletler

İnkübatör	( Sanyo )
Steril Kabin	( Telstar AV-100 )
Spektrofotometre	( UV mini 1240 SHIMADZU )
Çalkalayıcı	( P SELECTA UNITRONIC OR )
Soğutmalı Santrifüj	( Sigma 2K-15 )
Vorteks	( VWR INTERNATIONAL )
Magnetik Karıştırıcı	( Stuart )
Etüv	( Heraus )
Dijital Göstergeli Hassas Terazi	( GEC, AVERY )
Otoklav	( HICLAVE HV )
Su Banyosu	( Grant 6G )
pH metre	( METLER TOLEDO MP220 )
Sterilizatör	( Heraus )
Deep-Freez	( Haris )
Mikropipet	( Eppendorf )
Fraksiyon kolektörü	( BioRad )
Güç Kaynağı	( BioRad )

### 3.1.4. Besi Yerleri

#### 3.1.4.1. Sıvı besi yeri

8 gr NB (Nutrient broth) distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

#### 3.1.4.2. Katı besi yeri

20 gr Nutrient agar distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

### 3.1.5. Tamponlar

- pH 4.0, pH 5.0 ve pH 6.0 tamponlarını hazırlamak için; 0.1 M Sitrik Asit hazırlandı.

- pH 7.0, pH 8.0 ve pH 9.0 tamponlarını hazırlamak için; 0.1 M. Tris- HCl hazırlandı.

- pH 10.0, pH 11.0 tamponlarını hazırlamak için; 0.1 M Karbonat / Bikarbonat tamponu hazırlandı.

-0.1 M Fosfat tamponu pH 8.0 hazırlandı.

-0.05 M Tris Asetat Tamponu pH 7.0 (0.1 M NaCl içerecek) hazırlandı.

-Diyaliz Tamponu;

14 gr  $K_2HPO_4$ , 6 gr  $KH_2PO_4$ , 1 gr  $Na_3.citrate.2H_2O$ , 100 mM  $MgSO_4.7H_2O$  1 lt saf suda çözülerek hazırlandı.

## 3.2. METOT

### 3.2.1. Bakteri Üretimi

NB sıvı besi yerine, katı besi yerinden steril plastik öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalamalı su banyosunda 120 rpm'de, 55°C 'de, 24 saat inkübe edildi.

### 3.2.2. Enzim Eldesi

Saf su ile hazırlanmış NB besi yerinde 24 saat inkübasyon sonunda besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen üst sıvı, enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

#### 3.2.3. $\alpha$ -Amilaz Enzimi Aktivite Tayini

$\alpha$ -Amilaz Enzimi aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre belirlendi (Bernfeld, 1955). Bu yöntemine göre 100  $\mu$ l enzim çözeltisi (üst sıvı) ile 200  $\mu$ l %0.5'lik nişasta çözeltisi (0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmüş olarak hazırlandı) 70°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400  $\mu$ l 3,5 DNS (3,5 dinitro salisilik asit) ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. 3,5 Dinitro salisilik asit sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonun durdurduğu gibi aynı zamanda renk oluşumunu da sağlamaktadır. Daha sonra 3 ml distile su ile seyreltme yapılarak 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Ünite: 1  $\mu$ mol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak hesaplanır (U/mg).

#### Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması

20 g 3,5 dinitro salisilik asit 400 ml saf su içinde magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Başka bir beherde 32 g NaOH 300 ml saf suda çözülerek yavaş yavaş 3,5 dinitro salisilik asit (DNS) üzerine eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Sonra 600 g Na-K Tartarat azar azar ilave edildi. Hacim saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı (Bernfeld 1955).

#### 3.2.4. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry 1951). Tüplere 5 ml alkalin çözeltisi konulduktan sonra üzerine 50  $\mu$ l enzim ve 450  $\mu$ l saf su ilave edildi. Örnekler 15 dk 40°C'de su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş 500  $\mu$ l Folin Reaktifi (FCR, Sigma) ilave edilerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda 660 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

### **Alkalin Çözeltisinin Hazırlanışı**

% 4 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

% 4 Na-K tartarat

% 2 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

Bir beherde 100 ml için % 4 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hazırlandı. Daha sonra % 4 Na-K tartarat ve % 2 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O'dan 1'er ml eklenerek karıştırıcıda karışımları sağlandı. Alkalin çözeltisi protein miktar tayini için kullanıldı.

### **3.2.5. *G. stearothermophilus* Üretim Ortamının Optimizasyonu**

#### **3.2.5.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi**

İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi için, NB besi yerinde (pH 7.0) ve 55°C'de üretilen bakteri 4–48 saatleri arasında her 4 saatte bir örnek alınıp bakteri üretimine bakılarak 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı.

#### **3.2.5.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi**

100 ml'lik erlenlerde 25 ml NB sıvı besi yerlerine (pH 7.0) 2 ml ayrı ayrı bakteri ekimi yapıldı ve 25-30-35-40-45-50-55-60-65-70-75-80°C'de bakteri için optimum üreme zamanında, 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bekletildi ve 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı

#### **3.2.5.3. Mikroorganizma Gelişimi Üzerine pH'nın Etkisi**

100 ml'lik erlenlerde 25 ml NB sıvı besi yerleri pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5,10.0 olacak şekilde ayarlanarak otoklavlandı ve 2 ml ayrı ayrı bakteri ekimi yapıldı. Bakteri için optimum üreme zamanı ve sıcaklığında 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakıldı ve 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı.

#### **3.2.6. *G. stearothermophilus*'tan Elde Edilen $\alpha$ -Amilazın Optimizasyonu**

##### **3.2.6.1. İnkübasyon Süresinin $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi**

100 ml'lik erlenlerde 25 ml sıvı besi yerleri (pH 7.0) hazırlanarak her birine 2 ml bakteri ekimi yapıldı ve bakterinin ürettiği optimum sıcaklık olan 55°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonra 48.saaate kadar her 4 saatlik süre sonunda  $\alpha$ -amilaz aktivite ve protein miktar tayini yapıldı.

##### **3.2.6.2. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Enzim olarak; NB besi ortamında üretilen bakterilerin bulunduğu besi ortamının santrifüj edilmesiyle elde edilen üst sıvı kullanıldı. Daha sonra elde edilen sıvı kullanılarak 35°C'den 5°C artan sıcaklık aralıklarıyla 90°C'ye kadar  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçüldü. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edilerek, diğer sıcaklık değerleri buna göre oranları yapıldı ve rölatif enzim aktivitesi saptandı.

##### **3.2.6.3. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Enzim olarak NB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Substrat olarak kullandığımız nişasta % 0,5 'lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit (0.1 M pH 4.0, 5.0 ve 6.0), Tris-HCl (0.1 M pH 7.0, 8.0 ve 9.0) ve karbonat/bikarbonat (0.1 M pH 10.0, 11.0) tamponları içerisinde ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini yapıldı. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 olarak kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranları yapıldı ve rölatif enzim aktivitesi saptandı.

##### **3.2.6.4. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi**

100 ml'lik erlenlerde 25 ml NB besi yerleri hazırlanıp otoklavlandı. NB besi yerlerinde %1 konsantrasyonda olacak şekilde karbon kaynaklarından glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, çözünebilir nişasta, maltoz ve sükroz tartılarak steril kabinde NB besi yerlerine tek tek ilave edildi, 2 ml bakteri ekim yapıldı. 24 saat ve 55°C de inkübasyona bırakılan örneklerin 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Bu örneklerin üst sıvısında  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

### 3.2.6.5. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

100 ml'lik erlenlerde 25 ml NB besi yerlerine besi yeri hacminin %1'ini oluşturacak şekilde azot kaynaklarından pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat, et özütü, maya özütü ve mısır özütü eklendikten sonra otoklavlandı. Daha sonra 2 ml'lik her erlene bakteri ekimi yapıp örnekler 24 saat ve 55°C de inkübasyona bırakıldı. Sonra 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Bu örneklerin üst sıvısında  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

### 3.2.6.6. Enzim Üretimi Üzerine $\text{CaCl}_2$ Etkisinin Araştırılması

Kalsiyumun etkisinin enzim üretimine etkisini tespiti için saf suyla hazırlanan NB besi yerlerine toplam hacimde 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM ve 60 mM olacak şekilde  $\text{CaCl}_2$  eklenerek otoklavlandı. Daha sonra bakteri ekimi yapıp 24 saat inkübasyon sonrasında örneklerin üst sıvıları alınarak  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçüldü.

### 3.2.7. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması

1000 ml'lik erlen içerisinde 350 ml NB besi yeri (pH 7.0) hazırlanarak otoklavlandı. Sonra bakteri ekimi yapılarak bakterinin ürediği optimum sıcaklıkta (55°C) inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonunda besi yeri soğutmalı santrifüjde 10 000 rpm 'de 15 dakika santrifüj edildi. Enzim saflaştırmada birbirini takip eden dört işlem uygulandı. Bu işlemler; amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz, jel filtrasyonu ve iyon değiştirici kromatografisidir.

#### 3.2.7.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Steril bir beherde toplanan süpernatant üzerine sırasıyla % 40, %50, % 60, % 70 ve % 80'lik doygunluk seviyelerinde olacak şekilde amonyum sülfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  ilave edildi. Daha sonra karışım soğutmalı santrifüjde 10 000 rpm 'de 15 dakika santrifüj edildi.

#### 3.2.7.2. Diyaliz

Pelet 0,1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözülerek 12 000 ve daha büyük molekül ağırlığındaki maddeleri tutan diyaliz hortumu içerisine aktarıldı. Diyaliz hortumu içerisindeki enzim solüsyonu saf suya karşı +4°C'de magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak 1 gece bekletildi. Elde edilen diyalizatta protein ve enzim aktivite tayinleri yapıldı.

#### 3.2.7.3. Enzim Saflaştırması için Kolonun Hazırlanması

Kolon dökmeden önce kolon dolgu maddeleri asit ve baz tamponlarında şu sıraya göre yıkandı.

##### G 100 (Baz tamponu)

0.5 N NAOH

15-30 dakika bekletilir. pH 5.0 oluncaya kadar saf su ile yıkanır.

0.5 N HCl

15 dakika bekletilir. pH 5.0 oluncaya kadar saf su ile yıkanır.

0.5 N NAOH

15 dakika bekletilir. pH 5.0 oluncaya kadar saf su ile yıkanır.

0.05 M Tris asetat tamponuna alınır.

##### DE-32 (Asit Tamponu)

0.5 N HCl

0.5 N NAOH

0.5 N HCl

0.01 M Fosfat tamponuna alınır



#### 3.2.7.4. Sefadex G-100 kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi için 20 cm uzunluğunda, 1.5 cm çapında kolon kullanıldı. Kolon 0.05 M Tris.asetat tamponu (pH 7.0) içinde hazırlanan Sephadex G-100 kolon dolgu maddesiyle dolduruldu. 0.1 M NaCl içeren 0.05 M Tris Asetat Tamponu pH 7.0 ile dengelendi. Diyalizat kolona yavaş yavaş verilerek üzerine uygun tampon bırakıldı. Kolondaki akış hızı saatte 20 ml ve tüpler 3 ml olacak şekilde ayarlandı. Toplanan tüm örneklerin protein ve enzim aktivite tayinleri yapıldı. En yüksek aktivitenin görüldüğü örnekler birleştirildi ve DEAE-sellüloz DE-32 kolonuna verilmek üzere +4 °C 'ta bekletildi.

#### 3.2.7.5. DEAE- selüloz kolon kromatografisi

Dietil aminoetil (DEAE) selüloz kolon kromatografisi için 1.5-20 cm ebadında cam kolon kullanıldı. Kolon 0.01 M fosfat tamponu (pH 8.0) içinde hazırlanan Whatman'ın DEAE-sellüloz kolon dolgu maddesiyle dolduruldu. Kolon 0.1 M potasyum fosfat tamponuyla (pH 8.0) dengelendi. Sephadex G-100 kolonundan toplanan enzim solüsyonu DEAE-sellüloz DE-32 kolonuna verildi. 0.1-1 M NaCl içeren 0.1 M fosfat tamponu (pH 8.0) kullanılarak linear gradient hazırlandı. Fraksiyon kolektörü, akış hızı saatte 20 ml ve her tüp 3 ml olacak şekilde ayarlandı. Kolon, 0.1-1 M NaCl gradienti ile yıkanarak fraksiyonlar toplandı. 280 nm de absorbans ölçüldü.

Örneklerde  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Yüksek aktivitenin tespit edildiği örnekler birleştirildi, liyofilize edildi. Elektroforez ile saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimin molekül ağırlığı tespit edildi. Saf enzim, karakterizasyon işlemlerini yapmak üzere -70°C'de saklandı.

#### 3.2.8. Saflaştırılan $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine bazı inhibitör maddelerin etkisini araştırmak için kimyasal olarak PMSF (1-10 mM),  $\beta$ -Merkaptoehtanol (1-10 mM), DTT (1-10mM), EDTA (1-10 mM) ve Etanol (!-10 mM) kullanıldı. Bu kimyasallardan PMSF etanolde (Ayrıca bu maddeler etanolde hazırlandığı için aynı orandaki etanolun

enzim aktivitesine olan etkisi araştırıldı).  $\beta$ -Merkaptoehtanol, DTT ve EDTA 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda çözüldü.

Deney tüplerine 25  $\mu$ l enzim ile uygun konsantrasyonlarda inhibitör madde ilave edilerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası substrat eklenerek  $\alpha$ -amilaz aktivitesine bakıldı.

#### **3.2.9. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal Maddelerin Etkisi**

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini saptamak için  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{FeCl}_2$  dan 50 mM'lık stok çözeltilerinden toplam hacimde (150  $\mu$ l) 1.5 mM konsantrasyonu olacak şekilde 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlandı.

Deney tüplerine 50  $\mu$ l enzim ile 5  $\mu$ l metaller bırakılarak 30 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyon sonrası 100  $\mu$ l substrat eklenerek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi test edildi.

#### **3.2.10. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi**

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini araştırmak için %0.5 oranında SDS, Tween-40, Tween-80, TritonX-100 ve içeriğinde enzim ihtiva etmeyen ticari olarak temin edilen Alo matik kullanıldı. Bu deterjanlar 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlandı.

Tüplere 50  $\mu$ l enzim ile 100  $\mu$ l deterjanlar konup 30 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon sonrası 100  $\mu$ l substrat eklenerek  $\alpha$ -amilaz aktivitesine bakıldı.

### 3.2.11. Saf Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması

Saflaştırma sonucu elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin pH stabilitesinin saptanması için 0.1 M Sitrik Asit ( pH 4.0, 5.0 ve 6.0), 0.1 M. Tris- HCl (pH 7.0, 8.0 ve 9.0), 0.1 M karbonat / bikarbonat (10.0 ve 11.0) hazırlandı.

Deney tüplerine 25  $\mu$ l enzim ile 50  $\mu$ l hazırlanan farklı tamponlardan bırakılarak 60 dakika ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyondan sonra saf su ile hazırlanan nişastadan 50  $\mu$ l ilave edilerek Bernfeld yöntemine göre  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini yapıldı. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 olarak kabul edildi. Diğer pH değerlerinin buna göre oranları yapıldı ve rölatif enzim aktivitesi saptandı.

### 3.2.12. Saf Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

Saflaştırılmış olan  $\alpha$ -amilaz enziminin sıcaklık stabilitesinin (termal stabilite) saptanması için 50°C, 60°C ve 70°C sıcaklık değerlerinde sadece enzim kullanılarak 15, 30, 45, 60 ve 120 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyon sonrası 25  $\mu$ l enzim ile 100  $\mu$ l nişasta karışımı kalan enzim aktivitesini saptamak için enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon yapılmadan hazırlanmış enzim ve substrat karışımı başlangıç enzim aktivitesinin saptanması için optimum aktivitenin elde edildiği sıcaklıkta analiz edildi ve spektrofotometrede elde edilen değer 100 olarak (orijinal aktivite) kabul edildi. Ön inkübasyon sonucu elde edilen değerler (kalan enzim aktivitesi), orijinal aktivite ile karşılaştırılarak kalan rölatif enzim aktivitesi bulundu.

### 3.2.13. Saf Enzimin Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Km ve Vmax kinetik parametreleri için 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda %1, % 2 ve % 3 oranlarında çözünebilir nişasta hazırlandı.

Tüplere 50 µl enzim ile hazırlanan konsantrasyonlardaki 100 µl nişasta solüsyonu ile karıştırılarak optimum aktivitenin elde edildiği sıcaklıkta 30 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi ve α-amilaz aktivite tayini yapıldı. Km ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre hesaplandı.

#### 3.2.14. Elektroforez

##### 3.2.14.1. Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Elektroforez işlemi Laemmli'ye göre yapıldı (Laemmli 1970).

#### Çözeltiler

%30 akrilamid / %0.8 bis akrilamid: 30 g akrilamid, 0.8 g bis akrilamid saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edildi. Koyu renkli şişede 4°C 'de saklandı.

1.5 M Tris.HCl pH 8.8 (% 0.4 SDS içeren): 18.2 g Tris-base 80 ml saf suda çözüldü, pH 8.8'e ayarlandı, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Filtre edildikten sonra 0.4 g SDS ilave edilerek 4°C'de saklandı.

0.5 M Tris. HCl pH 6,8: 6 g Tris-base 80 ml saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 6.8'e getirildi, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edilerek 0.4 g SDS ilave edilir, 4 °C'de saklanır.

%10'luk APS ( amonyum per sülfat ) : 0.1 g APS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. APS taze olarak hazırlandı.

Elektroforez tamponu: 3 g Tris, 14.4 g glisin, 0.1 g SDS, 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı ve 4 °C'de saklandı.

İz boya ( örnek boya ) : 7 ml 0,1 M Tris. HCl pH 6,8, 3.6 ml gliserol, 0.2 ml 2-ME, 1.2 mg BFB ile 10 ml saf su ilavesi ile hazırlandı. 1'er ml olacak şekilde, ependorflara konarak -20°C'de saklandı.

%10'luk SDS: 0.1 g SDS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

%3'lük nişasta: 0.3 g nişasta 0.1 M Tris. HCl pH 8.0 ile 10 ml'ye tamamlandı

Boya çözeltisi: (%0.025 CBB, %40 Metanol, %7 Asetik asit) 0.5 g Coomassie brilliant blue R-250, 800 ml metanol içinde çözüldü. 140 ml asetik asit ilave edilip hacim, su ile 2 litreye tamamlandı.

Boya çıkarma çözeltisi: 430 ml metanol ile 70 ml asetik asit karıştırılarak hacim 1 litreye tamamlandı.

### **3.2.14.2. Jelin Hazırlanması**

Elektroforez uygulamasında kullanılan jel, genellikle stacking (dengeleme) ve separating (ayırma) jeli olarak iki kısımdan oluşur. Her iki jel de içerdikleri akrilamid konsantrasyonları bakımından birbirlerinden farklılık gösterir. Bu iki jeldeki pH ve konsantrasyon farklılığı sayesinde, protein karışımlarının birbirlerinden ayrılması ve belirgin bantlar oluşması sağlanır.

Çalışmalarımızda %10'luk jel kullanıldı. Ayırma jeli için, 2.5 ml akrilamid/bisakrilamid, 1.87 ml 0.1 M Tris. HCl (pH 8.8 ), 3 ml saf su, 37.5 µl %10'luk APS (Amonyum per sülfat), 7.5 µl % 10'luk SDS, 4 µl TEMED kullanıldı.

Nişastalı jel için, 2.5 ml akrilamid / bis akrilamid, 1.87 ml 0.1 M Tris. HCl (pH 8.8 ), 3 ml saf su, 37.5 µl 1 %10'luk APS, 7.5 µl %10'luk SDS, 4 µl TEMED, 330 µl % 3'lük nişasta alındı.

Yükleme jeli için, 520 µl akrilamid/bis akrilamid, 1 ml 0.1 M Tris. HCl (pH 6.8), 20 µl %10 'luk APS, 4.8 µl TEMED, 4µl %10'luk SDS ve 2.44 ml saf sudan oluşan karışım hazırlandı. İşlemler buz içersinde ve karıştırılarak yapıldı.

İki cam levha arasına 6 cm yükseklikte ayırma jeli döküldü, üzerine pastör pipetiyle, su ile doyurulmuş n-bütanol konarak hava ile teması kesildi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra n-bütanol saf su ile birkaç kez yıkanarak jelden uzaklaştırıldı. Yükleme jeli hazırlanarak ayırma jelinin üzerine döküldü. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi, hava ile temasını kesmek için üzerine saf su ilave edildi ve jel polimerleşmeye bırakıldı. Nişastalı jel de aynı şekilde hazırlandı, ilave olarak %3'lük nişasta kullanıldı.

#### **3.2.14.3. Elektroforez İşlemi**

Elektroforez yapılacağı zaman jelin kuyucuklarına elektroforez tamponu bırakıldı. SDS-PAGE için standart proteinler olarak  $\beta$ -galaktosidaz, fosforilaz, BSA (sığır serum albümin) ve karbonik anhidraz içeren protein mix kullanıldı. Örnekler, standart protein karışımı ve ticari amilaz ependorflara 10<sup>3</sup>ar  $\mu$ l bırakılarak üzerlerine 10<sup>3</sup>ar  $\mu$ l iz boya eklendi ve 60 sn kaynar su banyosunda bekletilerek denatüre edildi. Hazırlanan örnekler, kuyucuklara otomatik pipet ile uygulandı. Kuyucuk başına 3 mA sabit akım verilerek elektroforez başlatıldı. İz boya bandı jelden çıkmadan elektroforez işlemi durduruldu.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra camlar arasındaki jel çıkarıldı. Nişastalı jel, üzerine lugol çözeltisi eklenip yarım saat sonra incelemeye alındı. Nişastasız jel, boya solüsyonuna alındı ve 2 saat bekletildi. Boya çıkarma çözeltisine alınan jeller 3-4 saat bekletildikten sonra protein bantları incelendi.

#### **3.2.14.4. SDS-PAGE ile Amilazın Molekül Ağırlığının Hesaplanması**

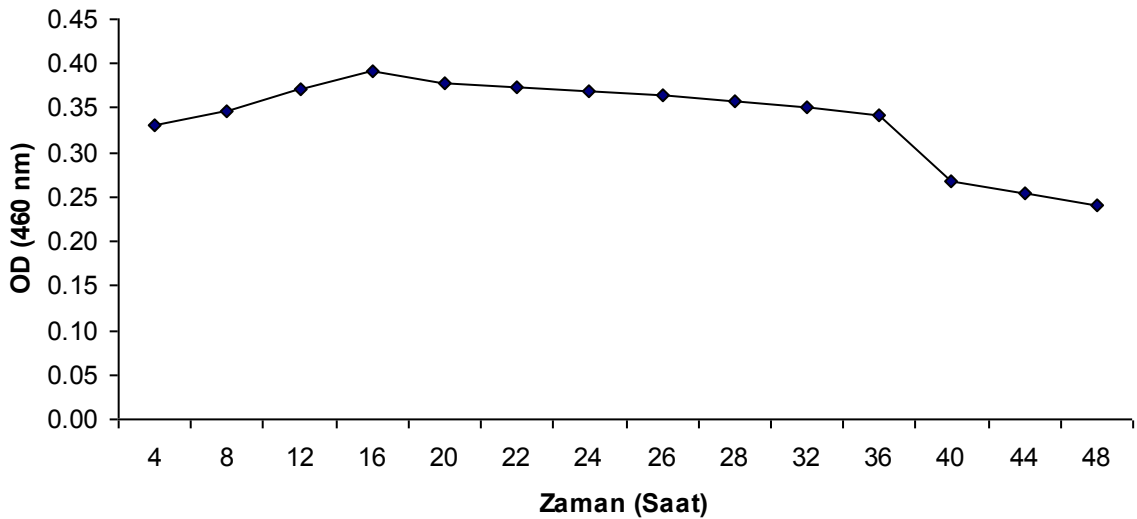
Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonucu elde edilen jel üzerinde iz boyanın aldığı yol ve protein bantların yürüdüğü mesafe ölçülerek, Rf değerleri hesaplandı. Standart proteinlerin molekül ağırlığı değerlerine karşı, Rf değerleri grafiklendi. Bu grafik yardımı ile saflaştırdığımız  $\alpha$ -amilazın molekül ağırlığı hesaplandı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. *G. stearothermophilus* Üretim Ortamının Optimizasyonu

#### 4.1.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

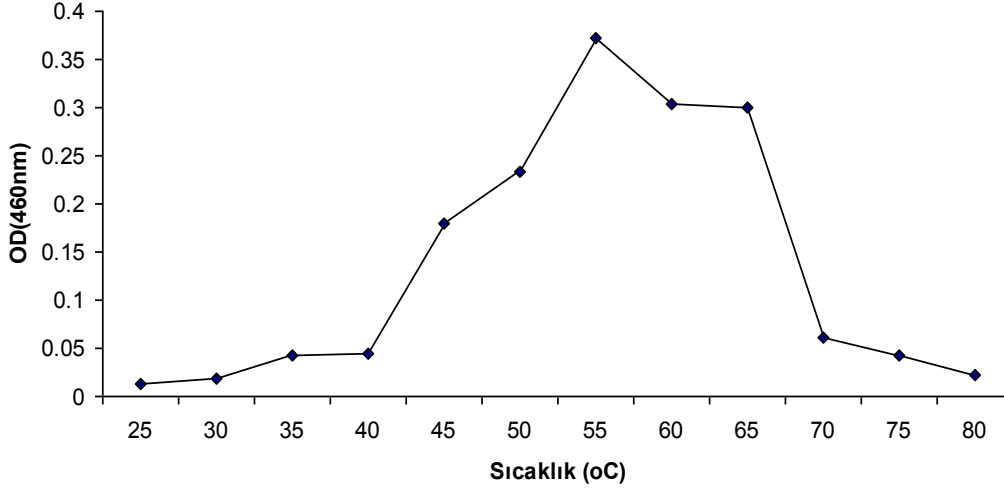
İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi için, NB besi yerinde (pH 7.0) üretilen bakteri 4–48 saatleri arasında her 4 saatte bir örnek alınarak bakteri üretimine bakıldı. Yapılan ölçüm sonrasında bakterinin 36. saatten sonra üremesinin azaldığı tespit edildi. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi *G. stearothermophilus* için optimum üreme zamanı 16. saat olarak tespit edildi.



Şekil 4.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

#### 4.1.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

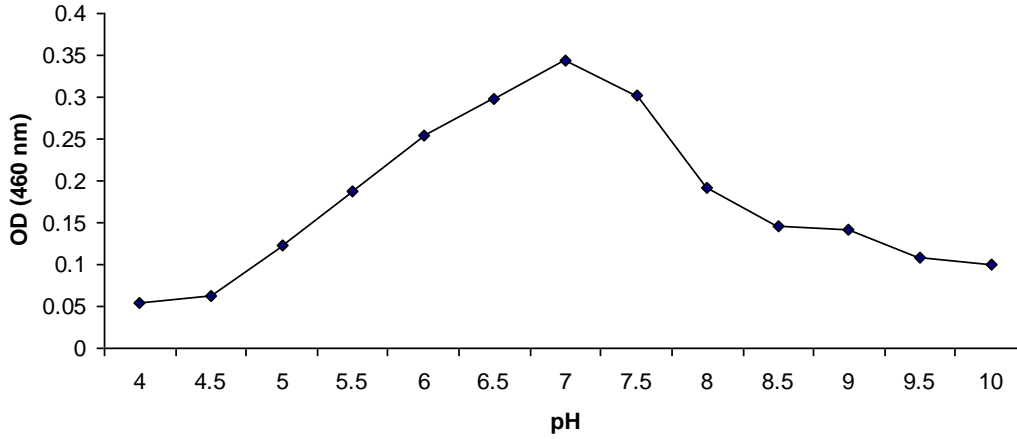
Bakteri üremesine sıcaklığın etkisini belirlemek için; 5°C’lik artışla 25°C’den 80°C’ye kadar NB besi yerinde (pH 7.0) 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bakterinin 40°C ile 70°C sıcaklıklarında ürediği tespit edildi. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi 40°C’den sonra bakteri üremesinin arttığı ve 65°C’den sonra ise bakteri üremesinde hızla azalma gözlemlendi. Bakterinin optimum üreme sıcaklığı 55°C olarak bulunup bakterinin termofilik olduğu tespit edildi.



Şekil 4.2. Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

#### 4.1.3. Mikroorganizma Gelişimi Üzerine pH'nın Etkisi

*G. stearothermophilus*'un üremesine pH'nın etkisini bulmak için; 0,5'lik artışlarla değişik pH'larda NB besi yeri hazırlandı. pH 4.0'dan pH 10.0'a kadar 55°C'de NB besi ortamında optimum üreme zamanı olan 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda pH 5.0 ile pH 10.0 arasında üreme gözlemlendi. Şekil 4.3'te pH 6.0'da üremede artış, pH 7.5'tan sonra ise üremede azalma ve bu bakteri için optimum üreme pH'sının 7.0 olduğu görülmektedir.



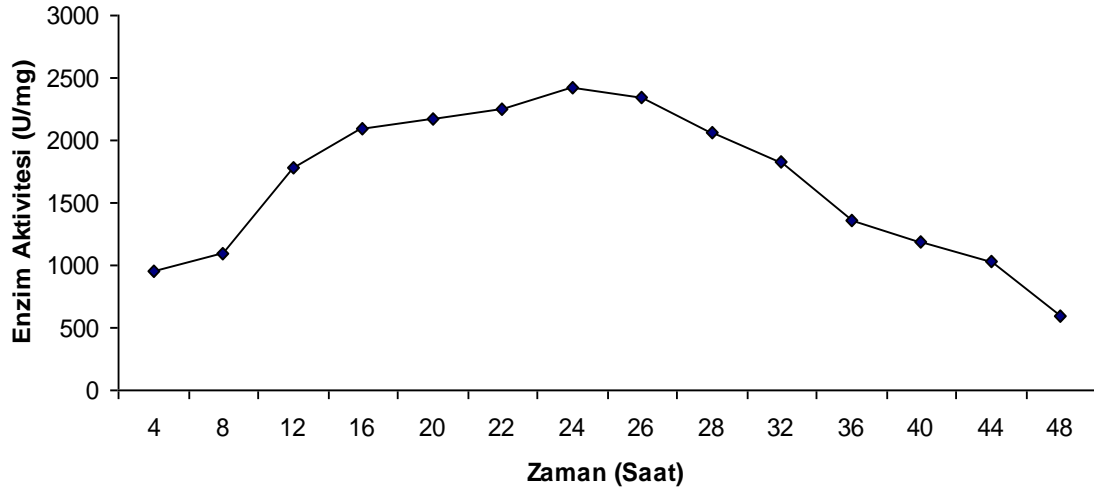
Şekil 4.3. pH'nın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi



## 4.2. *G. stearothermophilus*'tan Elde Edilen $\alpha$ -Amilazın Optimizasyonu

### 4.2.1. İnkübasyon Süresinin $\alpha$ -Amilaz Üretimine Etkisi

NB besi yerlerine ekilen bakteri 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyona bırakılan bakteriden her 4 saatte bir örnek alınarak 10 000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen üst sıvılarda  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) hesaplandı. Bakterinin 4–48. saatleri arasında enzim salgıladığı tespit edilip özellikle 8.saat sonrasında enzim aktivitesinde artış, 24.saatten sonra ise aktivitede giderek bir azalma olduğu Şekil 4.4'de görülmektedir. En yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi 24. saatte (2429 U/mg) tespit edildi.



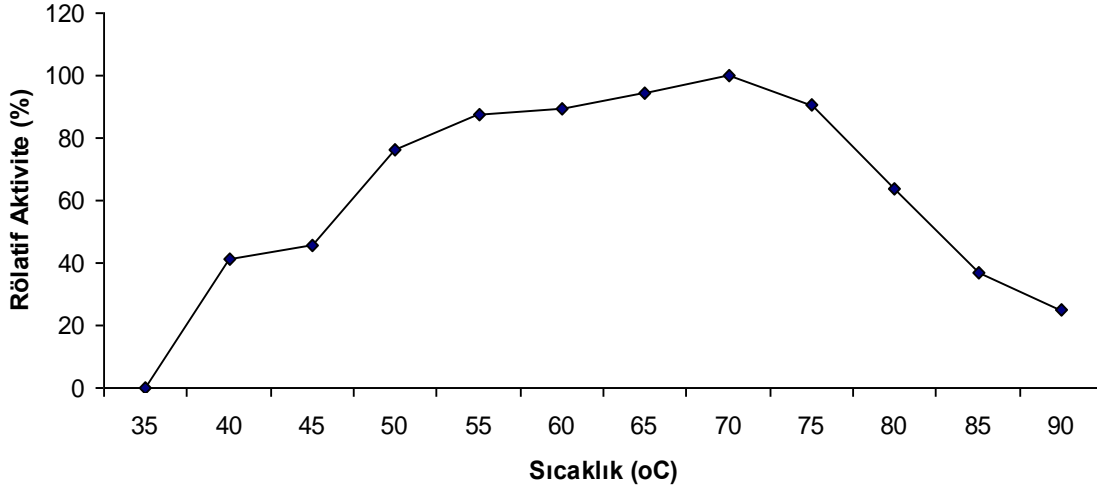
Şekil 4.4. Enzim Üretimi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi

### 4.2.2. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

*G. stearothermophilus*'un salgıladığı  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için; bakteri NB besi yerinde (pH 7.0) optimum inkübasyon süresi olan 24.saatte ve optimum sıcaklığı olan 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 1 ml örnek alınarak 10 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvı 35 °C'den 5°C artan sıcaklık aralıklarıyla 90°C'ye kadar Bernfeld yöntemine göre  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçüldü. *G. stearothermophilus*'un 40°C ile 90°C sıcaklıkları

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

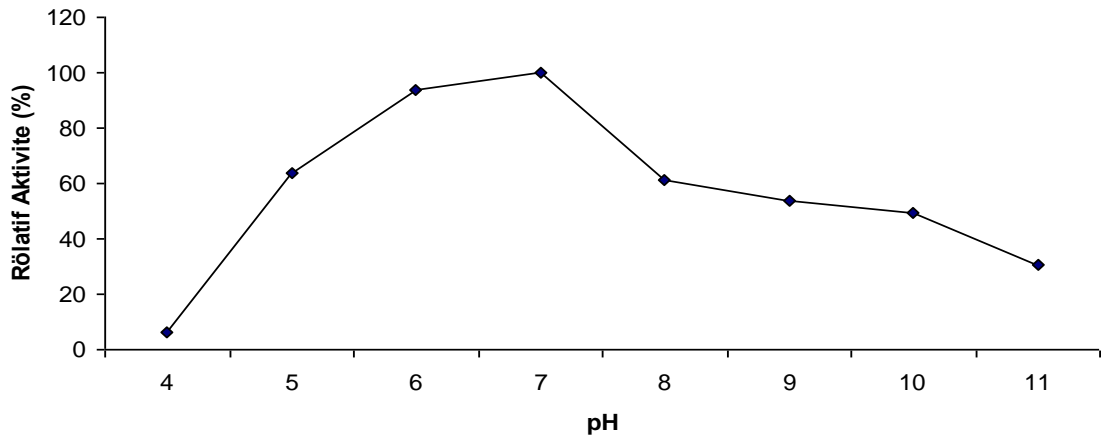
arasında  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin olduğu belirlendi. 45°C sıcaklıktan itibaren enzim aktivitesinde artış gözlenirken, 70°C 'den sonra enzim aktivitesinde azalma olduğu görüldü. Enzimin optimum sıcaklığı 70°C olarak tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

#### 4.2.3. $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

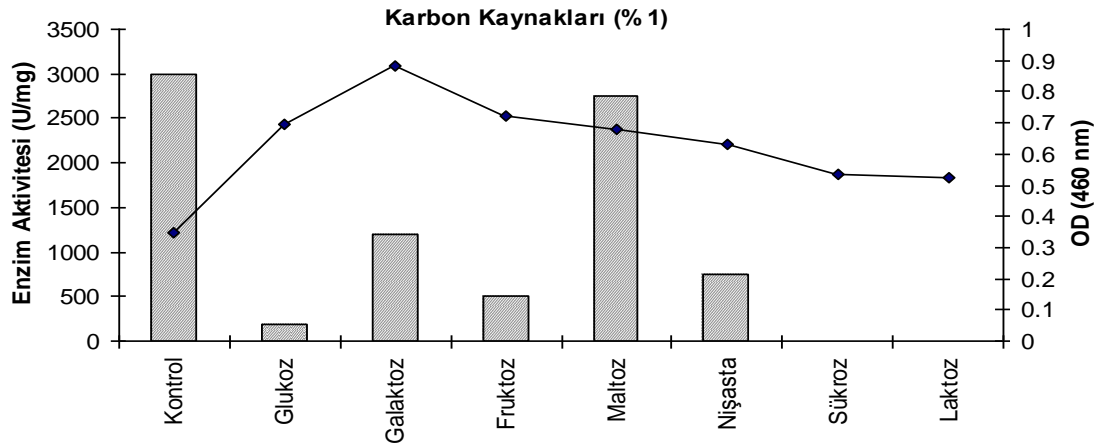
*G. stearothermophilus* NB besi yerinde (pH 7.0), optimum sıcaklığı olan 55°C'de, optimum inkübasyon süresi olan 24. saate kadar inkübasyona bırakıldı. Daha sonra alınan örnek 10 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvıda *G. stearothermophilus*'un salgıladığı  $\alpha$ -amilaz'ın optimum pH'sını belirlemek için; 0.1 M sitrik asit tamponu (pH 4.0-6.0), 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 7.0-9.0) ve 0.1 M karbonat/bikarbonat (pH 10.0-11.0) tamponunda hazırlanan substrat kullanılarak enzim aktivitesi ölçüldü. Enzimin pH 5.0 ile pH 11.0 arasında aktivite gösterdiği belirlendi. pH 5.0'ten itibaren enzim aktivitesinde artış gözlenirken pH 8.0'den itibaren ise enzim aktivitesinde azalma olduğu tespit edildi. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH'sı 7.0 olarak bulundu.



Şekil 4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

#### 4.2.4. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

NB besi yerleri hazırlanarak %1'lik karbon kaynaklarından glukoz, galaktoz, fruktoz, laktöz, çözünebilir nişasta, maltoz ve süktroz eklendi. Bu besi yerlerine bakteri ekimi yapılarak 24 saat ve 55°C'de inkübasyona bırakıldı ve üst sıvılardan  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) hesaplandı.



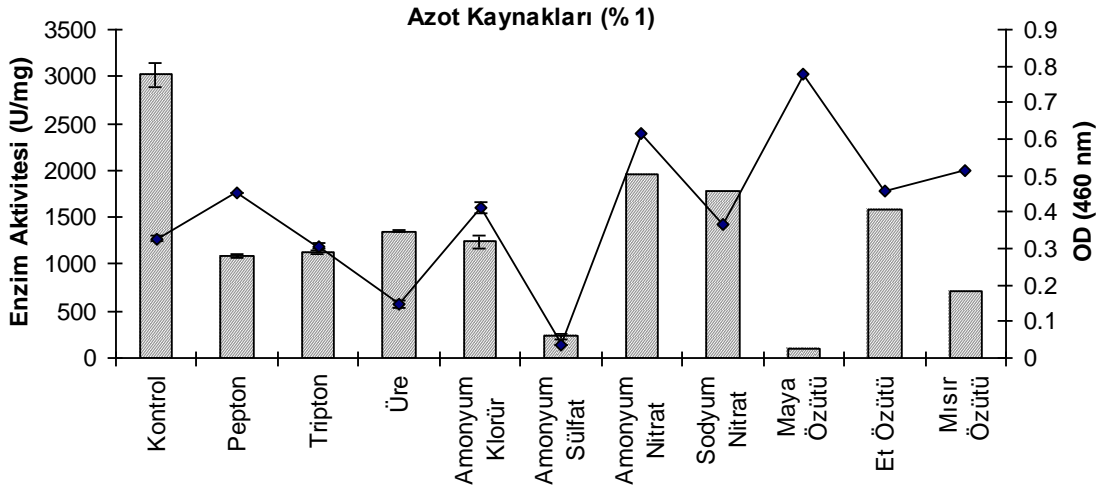
Şekil 4.7. Enzim Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Yapılan araştırmada kontrol (3004 U/mg) ile diğer karbon kaynakları karşılaştırıldığında maltozun (2750,62 U/mg) kontrole yakın değer gösterdiği, diğer karbon kaynaklarında ise aktivitenin önemli ölçüde azaldığı, süktroz ve laktözde ise

aktivitenin tamamen kaybolduğu tespit edildi. Bakteri üremesi için, kontrol ile karbon kaynakları karşılaştırıldığında bütün karbon kaynaklarında üremenin kontrolden yüksek olduğu belirlendi. Karbon kaynakları ile ilgili sonuçlar Şekil 4.7’de görülmektedir.

#### 4.2.5. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

100 ml’lik erlenlerde 25 ml NB besi yerlerine %1’lik olacak şekilde azot kaynaklarından pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat, sodyum nitrat, et özütü, maya özütü ve mısır özütü eklendikten sonra otoklavlandı. Daha sonra bakteri ekimi yapıp 24 saat ve 55°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üst sıvılardan  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapılarak spesifik aktivite (U/mg) tespit edildi.

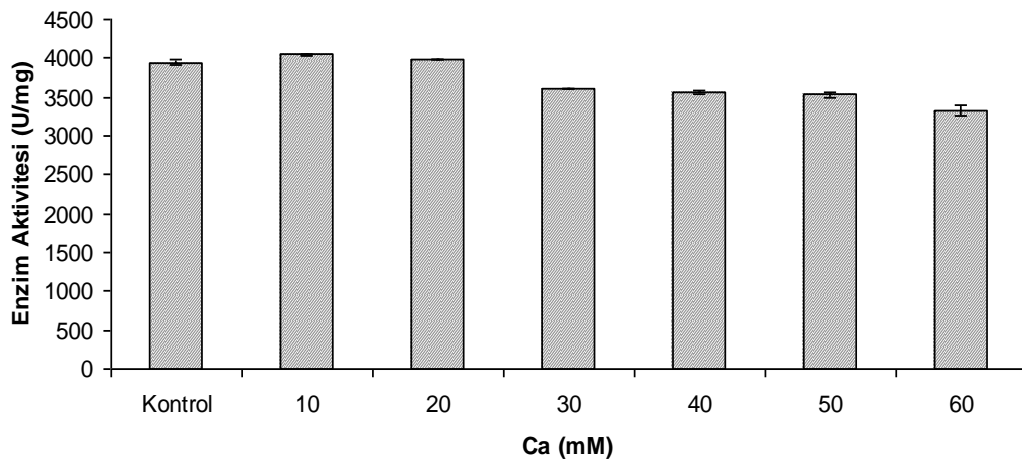


Şekil 4.8. Enzim Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi kontrol (3020,46 U/mg) ile diğer azot kaynakları karşılaştırıldığında, bütün azot kaynaklarında kontrol göre daha düşük amilaz aktivitesi elde edildi. Azot kaynakları içinde en yüksek spesifik aktivite, amonyum nitrat (1949,30 U/mg) ilaveli kültür ortamında elde edildi. Bakteri OD’lerine bakıldığında ise bütün azot kaynaklarında kontrole göre daha fazla üreme olduğu belirlendi.

#### 4.2.6. Enzim Üretimi Üzerine CaCl<sub>2</sub> Etkisi

NB besi yerlerine toplam hacimde 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM ve 60 mM olacak şekilde CaCl<sub>2</sub> eklenerek otoklavlandı. Bakteri ekimi yapıp 24 saat ve 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örneklerin üst sıvıları alınarak  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini ve protein miktar tayini yapıldı. Kontrole (3946 U/mg) göre 10 mM ve 20 mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ile daha yüksek amilaz aktivitesi gözlenirken, konsantrasyonun artması durumunda aktivitenin azaldığı tespit edildi. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi en yüksek aktivite 10 mM CaCl<sub>2</sub> (4043 U/mg) eklenmesiyle elde edildi.



Şekil 4.9. Enzim Üretimi Üzerine CaCl<sub>2</sub> Etkisinin Araştırılması

#### 4.3. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması

*G. stearothermophilus*'un  $\alpha$ -amilaz enzimini en yüksek oranda ürettiği koşullar belirlendikten sonra enzim saflaştırmaya geçildi. Optimum koşullarda üretilen bakteriden üst sıvı elde etmek için kültür 10 000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edildi. Steril bir beherde toplanan süpernatant üzerine sırasıyla %40, %50, %60, %70 ve %80'lik doygunluk seviyelerinde olacak şekilde amonyum sülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] karıştırmalı olarak ilave edildi. Daha sonra karışım 10 000 rpm 'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponu içerisinde çözülerek diyaliz hortumuna aktarıldı ve gece boyunca diyaliz edildi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Diyaliz edilen ham özüt Sephadex G-100 kolonuna uygulandı. Jel filtrasyondan elde edilen yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar bir araya getirilerek DEAE-sellüloz DE-32 kolonuna verildi. İyon değiştirici kromatografisi sonrasında elde edilen yüksek aktivite gösteren örnekler bir araya getirildi. Saflaştırmanın her basamağından ayrılan örnekler için amilaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Bununla ilgili sonuçlar çizelge 4.1. de görölmektedir.

**Çizelge 4.1.** *G. stearothermophilus*  $\alpha$ -amilazının saflaştırma basamakları

<b>Saflaştırma Basamaklar</b>	<b>Spesifik Aktivite U/mg</b>	<b>Total aktivite</b>	<b>Total protein mg/ml</b>	<b>Verim (%)</b>	<b>Saflaştırma Katsayısı</b>
<b>Supernatant</b>	2396	209991	87.651	100	1
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi&amp; Diyaliz</b>	6914	110238	15.944	52	3
<b>Sephadex (G-100)</b>	45199	106944	2.366	51	19
<b>DEAE selüloz</b>	154947	96510	0.623	46	65

#### 4.4. Saflaştırılan $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine EDTA, PMSF, DTT ve  $\beta$ -mercaptoethanol gibi bazı inhibitörlerin etkisinin araştırılması için stok çözeltiler hazırlandı. EDTA (1-10 mM), PMSF (1-10 mM), DTT (1-10 mM),  $\beta$ -mercaptoethanol (1-10 mM) kullanılarak enzim aktivitesine etkisi araştırıldı. PMSF etanolde, diğer kimyasallar 0.1 M pH 7 Tris-HCl tamponu içerisinde çözüldü. Enzim bu kimyasallarla 30 dk. muamele edildikten sonra substrat eklenerek  $\alpha$ -amilaz aktivitesine bakıldı.

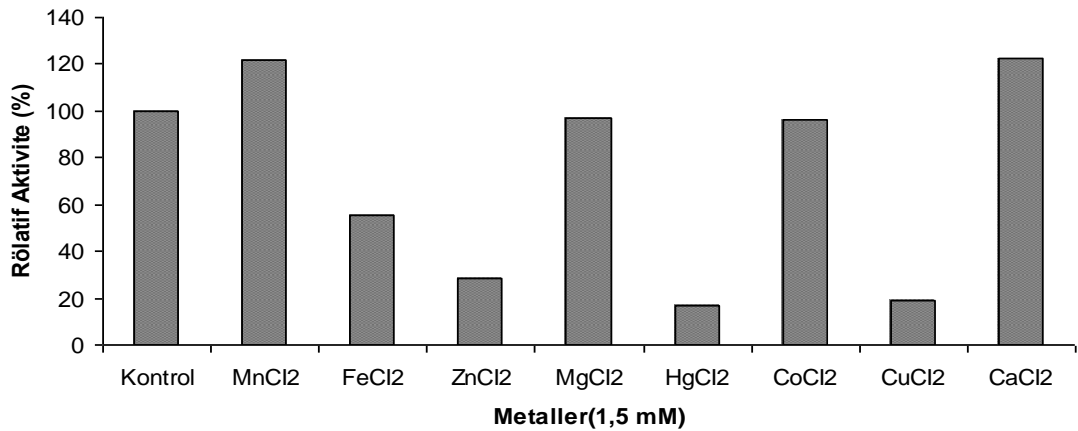
Çizelge 4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İnhibitör Maddelerin Etkisi

İnhibitörler	Rölatif (%)			
	1 mM	2mM	4mM	10mM
PMSF	93	85	67	23
DTT	96	83	73	41
$\beta$ -mercaptoethanol	86	81	67	61
EDTA	35	28	21	11
Etanol	96	92	79	65

Bu sonuçlara göre kalan enzim miktarları 1 mM'lık EDTA, PMSF, DTT,  $\beta$ -mercaptoethanol ve Etanol'de sırasıyla %35, %93, %96, %86 ve %96 olarak belirlendi. Konsantrasyon artışına paralel olarak enzim aktivitesi üzerine olan inhibisyon etkilerinin de arttığı tespit edildi. 10 mM'lık EDTA, PMSF, DTT,  $\beta$ -mercaptoethanol ve Etanol sırasıyla %11, %23, %41, %61 ve %65'lik etkisi olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.2).

#### 4.5. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal Maddelerin Etkisi

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini saptamak için  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{FeCl}_2$ 'ün 50 mM'lık stok çözeltileri 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlandı. Enzim üzerine etkisine bakmak için toplam hacimde 1.5 mM konsantrasyonda olacak şekilde metallerden eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra  $\alpha$ -amilaz aktivitesine bakıldı.



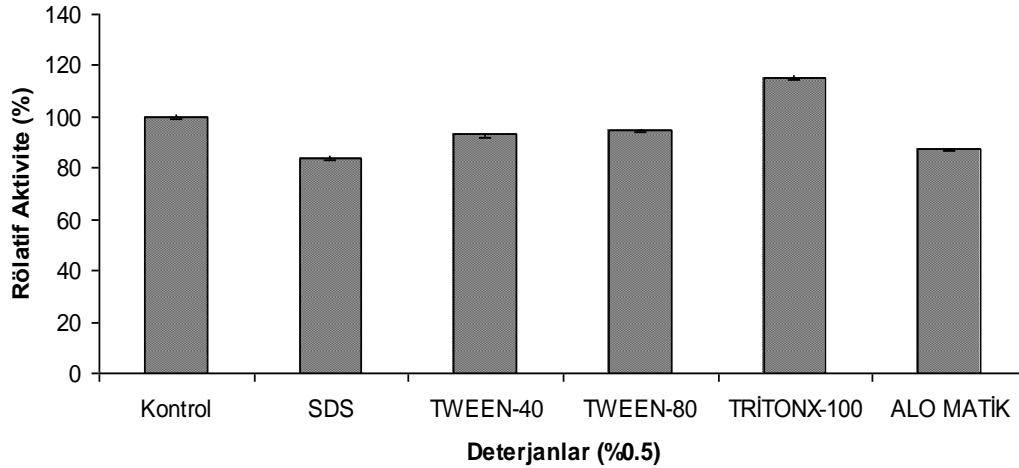
Şekil 4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal Maddelerin Etkisinin Araştırılması

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Şekil 4.10'a göre,  $\text{CaCl}_2$  (%123) ve  $\text{MnCl}_2$ 'ün (%122) aktiviteyi artırdığı;  $\text{MgCl}_2$  (%97) ve  $\text{CoCl}_2$  (%96) ilavesi ile değişiklik gözlenmediği;  $\text{CuCl}_2$  (%19),  $\text{ZnCl}_2$  (%29),  $\text{FeCl}_2$  (%55) ve  $\text{HgCl}_2$  (%17)'ün ise enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi.

#### 4.6. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi

Saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini araştırmak için 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlanan % 0.5'lik SDS, Tween-40, Tween-80, TritonX-100 ve içeriğinde enzim ihtiva etmeyen ticari olarak temin edilen Alo matik kullanıldı. Tüplere enzim ile deterjanlar konup 30 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon sonrası substrat eklenerek  $\alpha$ -amilaz aktivitesine bakıldı. Kalan enzim miktarları kontrol ile karşılaştırılarak rölatif aktivite hesaplandı.



Şekil 4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Deterjanların Etkisi

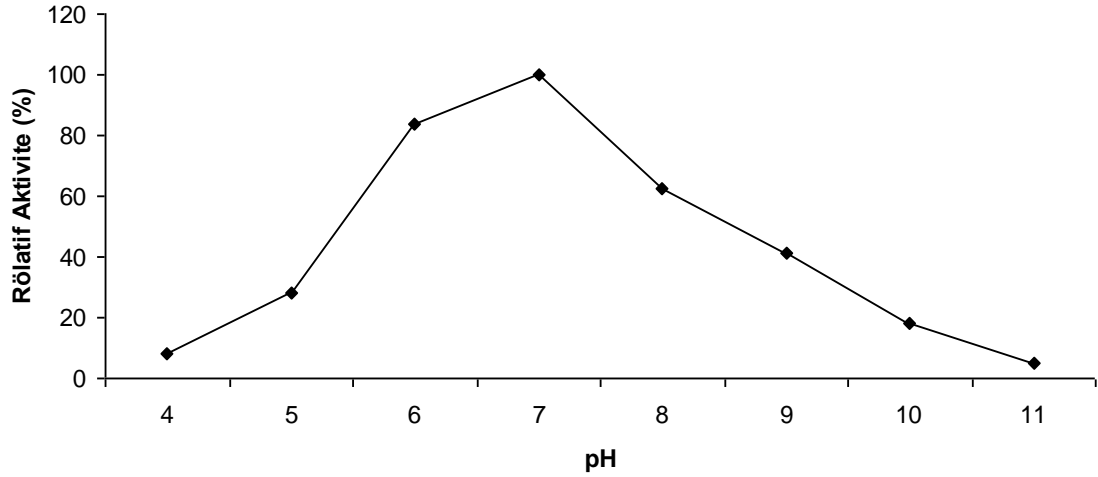
Kontrole göre kalan enzim miktarları; SDS %84, Tween-40 %93, Tween-80% 95, TritonX-100 %115 ve Alo matik %87 olarak tespit edildi. Deterjanların  $\alpha$ -amilaz üzerine olan etkisi şekil 4.11'de verilmiştir.

#### 4.7. Saf Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması

$\alpha$ -Amilaz enziminin saflaştırması gerçekleştirildikten sonra, saf enziminin pH stabilitesinin saptanması için 0.1 M Sitrik Asit ( pH 4.0, 5.0 ve 6.0), 0.1 M. Tris- HCl (pH 7.0, 8.0 ve 9.0), 0.1 M karbonat / bikarbonat ( pH 10.0 ve 11.0) hazırlandı.



Daha sonra 25 µl enzim ile 50 µl hazırlanan farklı tamponlardan bırakılarak 60 dakika ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyon sonrasında substrat eklenerek  $\alpha$ -amilaz aktivite tayini yapıldı.

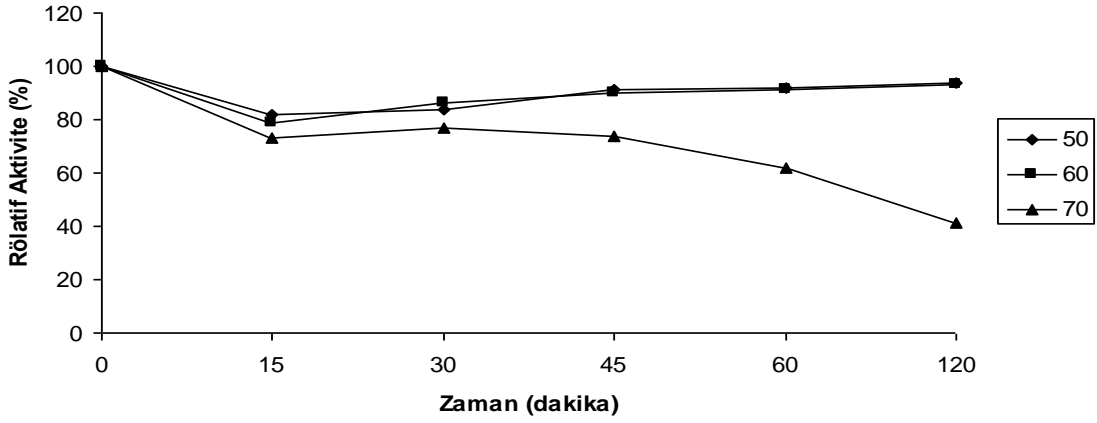


Şekil 4.12. Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması

Enzim aktivitesinin pH 5.0'ten sonra arttığı, pH 7.0'den sonra ise aktivitenin azalmaya başladığı görüldü. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi pH stabilitesi 7.0 olarak bulundu.

#### 4.8. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

Saf enziminin sıcaklık stabilitesinin (termal stabilite) saptanması için 50°C, 60°C ve 70°C sıcaklık değerlerinde yalnızca enzim kullanılarak 15, 30, 45, 60 ve 120 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ön inkübasyon sonra enzim aktivite tayini yapıldı.

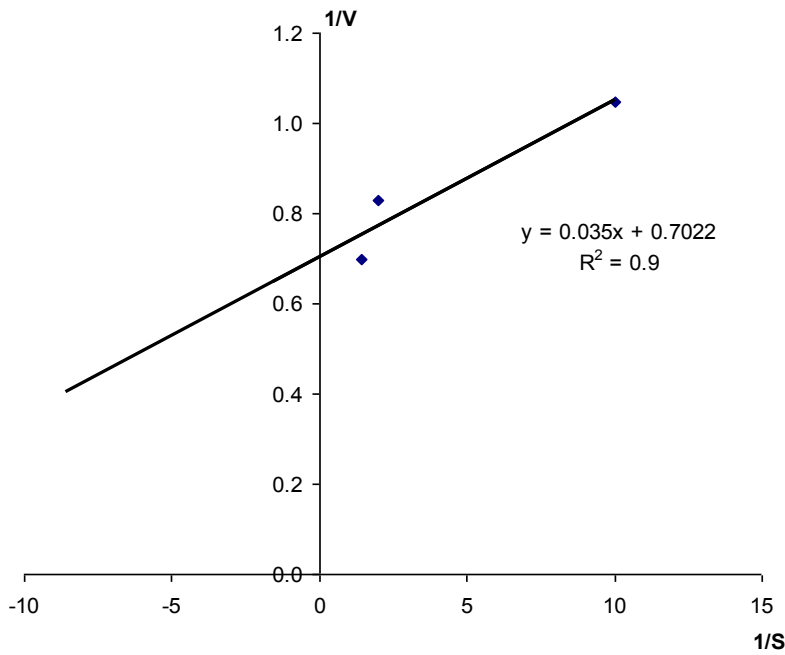


Şekil 4.13. Enzimin Sıcaklık Stabilitésinin Saptanması

Enzimin 50°C ile 60°C’de stabil olduğu, 70°C’de ise enzim aktivitesinin azaldığı ve stabil olmadığı belirlendi (Şekil 13).

#### 4.9. Saf Enzimin Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Bu çalışmada saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması için %0.1-0.7 oranlarında hazırlanan çözünebilir nişastalar aktivite tayininde substrat olarak kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver–Burk plot’a göre hesaplandı.



Şekil 4.14. Saf Enzimin Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Şekil 4.14.'te Lineweaver–Burk plot'a göre  $\alpha$ -amilaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,051 mM ve 1,424  $\mu\text{mol/dk.}$  olarak bulundu.

#### 4.10. Elektroforez İşlemi

$\alpha$ -Amilazın saflaştırılması için kullanılan basamaklardan ayrılan örnekler %10'luk SDS-PAGE ve %3'lük nişastalı jel elektroforezine tabii tutuldu. SDS-PAGE için sırası ile standart proteinler ( $\beta$ -galaktozidaz, fosforilaz, BSA (sığır serum albümin), karbonik anhidraz içeren protein mix), ticari amilaz, Sefadex G-75 ve DEAE selüloz kolonu saflaştırma basamaklarından elde edilen örneklerin yüklemesi yapılarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Nişastalı jel için ticari amilaz, Sefadex G-75 ve DEAE selüloz kolon uygulaması sonrasında elde edilen saflaştırma örnekleri elektroforetik işleme tabii tutularak saf enzimin varlığı belirlendi. SDS-PAGE elektroforezi ile saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimin molekül ağırlığı tespit edildi.

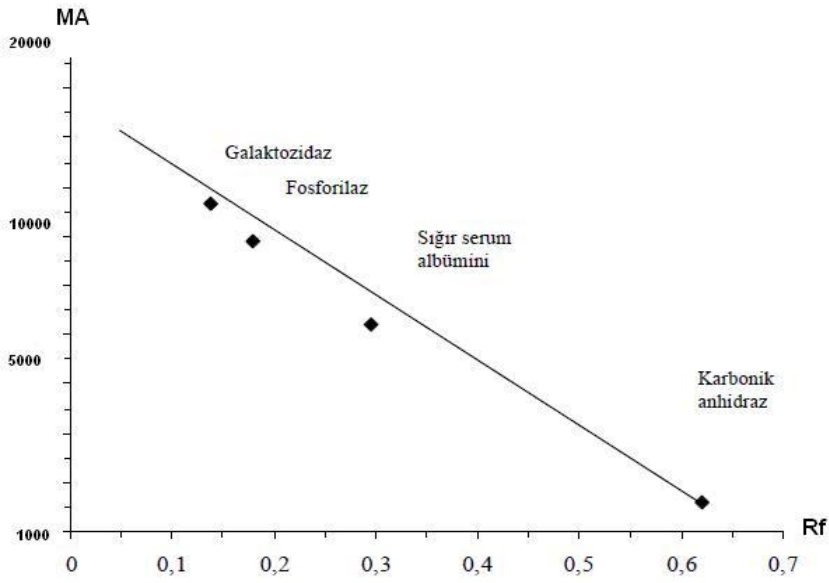
##### 4.10.1. *G. stearothermophilus* $\alpha$ -Amilazının Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Bunun için SDS-PAGE sonucu jel üzerindeki her bir protein bandı için  $R_f$  değerleri ölçüldü.

$$R_f = \frac{\text{Proteinin aldığı yol}}{\text{İz boyanın aldığı yol}}$$

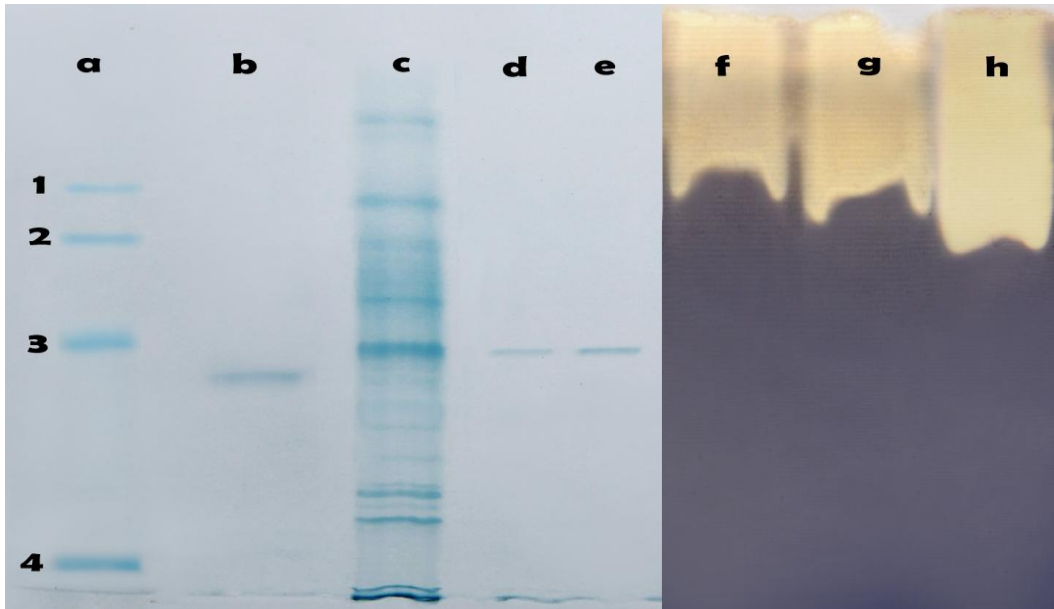
Her bir standart proteinin molekül ağırlığı, hesaplanan  $R_f$  değerlerine karşı grafikleildi (Şekil 4.15).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.15. Standart proteinlerin MA değerlerinin Rf değerlerine göre değişimi

Bu grafik yardımı ile *G. stearothermophilus*  $\alpha$ -amilazının molekül ağırlığı 63 kDa olarak bulundu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. SDS-PAGE ve nişastalı jel sonuçları: a) Standart proteinler;  $\beta$ -Galaktozidaz (116 kDa); Fosforilaz (97 kDa); Bovin serum albümini (66 kDa); Karbonik anhidraz (29 kDa); b) Ticari amilaz (58 kDa); c) Diyaliz; d) Sefadex G-100 kolonu; e) DEAE selüloz kolonu; f) Sefadex G-100 kolonu (nişastalı jel); g) DEAE selüloz kolonu (Nişastalı jel); h) Ticari amilaz (nişastalı jel)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

Karakteristik özellikleri; bazı indirgen grupları serbest bırakmak, çeşitli uzunluktaki dekstrinleri oluşturmak ve nişasta solüsyonunun viskozitesini hızla indirmek şeklinde özetlenebilen ve tamamen tavsiye edilebilen enzimlerden olan  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin günümüzde ticari boyutta yaygın olarak kullanılması, enzim endüstrisinde bu enzimlere olan ilgiyi iyice artırmıştır (Baran 2001).

Çalışmamızda *G. stearothermophilus*'un üremesi üzerine, inkübasyon süresinin, sıcaklığın ve pH'nın etkisi araştırıldı. Bakterinin optimum üreme zamanı 16. saat, optimum üreme pH'sı 7.0 ve optimum üreme sıcaklığı 55°C olarak belirlenerek bakterinin termofilik olduğu tespit edildi. Termofilik mikroorganizmalar ısıya dayanıklı olduğu için bazı avantajlar meydana getirmektedir. Mikrobiyolojik fermantasyonda daha yüksek sıcaklıklar, birçok bileşiğin çözünürlüğünü, diffüzyon kapasitesini artırır, ortamın viskozitesini düşürür ki, bu da hücrenin stabil kalması açısından önemlidir.

Hamilton ve ark. (1999) *Bacillus sp.* IMD 435'in üretimi için optimum inkübasyon süresini 41. saat, sıcaklığı ise 40°C olarak belirlemişlerdir. Mamo ve Gessesse (1999) Termofilik *Bacillus sp.* WN11 üretimini 18. saatte ve 65°C sıcaklıkta gerçekleştirmişlerdir. Gomes ve ark. (2003) Ekstrem termofilik *Rhodothermus marinus*'un üretimini 15-16. saatlerde, 61°C sıcaklıkta gerçekleştirmişlerdir. Yang ve Liu (2004) *Thermobifida fusca*'nın üretimini 50°C sıcaklıkta ve 24. saatte gerçekleştirmişlerdir. Behal ve ark. (2006) *Bacillus sp.* AB 04'ün 24-36 saatlerinde ve 40 °C sıcaklıkta üretimini yapmışlardır. Asgher ve ark. (2007) Termofilik *Bacillus subtilis* JS-2004'ün inkübasyon süresini 48 saat, sıcaklığı 50 °C ve pH'yı 7.0 olarak tespit etmişlerdir. Saxena ve ark. (2007) *Bacillus sp.* PN5'in 60 saat inkübasyon sonrasında 60°C pH 7.0' de üretimini gerçekleştirmişlerdir. Hmidet ve ark. (2008) *Bacillus licheniformis* NH1'i 48 saat, 37°C ve pH 7.0 de üretmişlerdir.

Çalışmamızda *G. stearothermophilus*'ta en yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesine 24. saatte (2429 U/mg) ulaşıldı.

Cordeiro ve ark. (2002) maksimum  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimini 48. saatte çözünebilir nişasta içeren kültür ortamında elde etmişlerdir. Asgher ve ark. (2007) en iyi amilaz üretiminin 48. saatte olduğunu belirlemişlerdir. Saxena ve ark. (2007) maksimum amilaz üretimini 60. saatte tespit etmişlerdir. Carvalho ve ark. (2008) maksimum  $\alpha$ -amilaz enzim üretimine 32 saat inkübasyon sonrasında ulaşmışlardır. Liu ve ark. (2008) maksimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesine 44. saatte elde etmişlerdir. En yüksek  $\alpha$ -amilaz üretimini 24. saat sonunda elde etmişlerdir.

Ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz salgılanma süresinin kısa olması ekonomik yönden büyük bir avantaj sağlamaktadır. Yukarıda belirtilen çalışmalarda termofilik bakterilerden elde edilen  $\alpha$ -amilazların salgılanma sürelerine bakıldığında, *G. stearothermophilus*'tan elde ettiğimiz en yüksek  $\alpha$ -amilaz üretimine daha kısa sürede ulaşılması ekonomik yönden daha büyük avantaj oluşturmaktadır. Çalışmamız, bu yönüyle Božić ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışma ile uyum içindedir.

*G. stearothermophilus*'tan elde edilen ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığı 70 °C olarak tespit edildi. Enzim sıcaklığının yüksek olması endüstriyel açıdan önemlidir; çünkü endüstriyel enzimlerin kullanıldığı işlemler genellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Enzimin pH 5.0 ile pH 11.0 arasında aktivite gösterdiği belirlendi. pH 5.0'ten itibaren enzim aktivitesinde artış gözlenirken pH 8.0'den itibaren ise enzim aktivitesinde azalma olduğu tespit edildi. Enzimin optimum pH'sı 7.0 olarak bulundu. pH'nın nötral olması gerek nişastanın sıvılaştırılması gerekse gıda endüstrisi gibi önemli alanlarda kullanımı yönünden önem arz etmektedir.

Cordeiro ve ark. (2002)  $\alpha$ -amilaz enziminin pH 7.5 ve 70°C'de maksimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Burhan ve ark. (2003) Termotabil ve alkalın olan  $\alpha$ -amilazı üreten *Bacillus sp.* ANT 6Y'yı topraktan izole etmişlerdir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 80°C, pH'yı da 10.5 olarak tespit etmişlerdir. Konsula ve ark. (2004)  $\alpha$ -amilaz enziminin maksimum aktivitesini 135°C ve pH 6.5'ta olduğunu tespit etmişlerdir. Behal ve ark. (2006) alkalın  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığını 40°C, optimum pH'sını 8.0 olarak belirlemişlerdir. Asgher ve ark. (2007)  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH'sını 8.0, optimum sıcaklığını da 70°C olarak belirlemişlerdir.

Saxena ve ark. (2007) maksimum alkalın amilaz aktivitesini pH 10.0 da ve 90°C'de tespit etmişlerdir. Ağuloğlu (2008)  $\alpha$ -amilaz için optimum sıcaklığı 65°C, optimum pH'yı 7.0 olarak belirlemiştir.

Çalışmamızda enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının ve azot kaynaklarının etkilerine bakıldı. Kontrol ile diğer karbon kaynakları karşılaştırıldığında maltozun kontrole yakın değer gösterdiği, diğer karbon kaynaklarında ise aktivitenin önemli ölçüde azaldığı, sükröz ve laktozda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu tespit edildi. Kontrol ile diğer azot kaynakları karşılaştırıldığında, bütün azot kaynaklarında kontrol göre daha düşük amilaz aktivitesi elde edildi. Azot kaynakları içinde en yüksek spesifik aktivite ise amonyum nitrat eklenmesiyle elde edildi. Karbon ve azot kaynaklarının enzim üretimine arttırıcı etki göstermemesi, besi yerine ekstra bir madde ilavesi olmadan enzim üretiminin daha ekonomik elde edilmesi bakımından önemlilik arz etmektedir.

Hamilton ve ark. (1999) *Bacillus sp.* IMD 435 azot kaynağı olarak %2'lik maya özütü ve karbon kaynağı olarak ta %4'lük laktoz içeren besi yerlerinde maksimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Laktozlu ortamda  $\alpha$ -amilaz üretimi fazla olmasına rağmen bakteri üretiminin az olduğu belirlemiştir. Behal ve ark. (2006) *Bacillus sp.* AB 04'ten. alkali  $\alpha$ -amilaz üretimini %1 karbon kaynaklarından fruktoz ve %1 azot kaynaklarından et özütü içeren besi ortamında gerçekleştirmişlerdir. Saxena ve ark. (2007) *Bacillus sp.* PN5'ten üretilen yüksek termostabil ve alkalın amilaz için (%) 0.6 nişasta, 0.5 pepton ve 0.3 maya özütü içeren besi ortamında maksimum spesifik aktivite elde etmişlerdir. Carvalho ve ark. (2008) Termofilik *Bacillus sp.* SMIA-2'den maksimum üretimi azot kaynağı olarak pepton, karbon kaynağı olarak ise çözünür nişastanın bulunduğu besi ortamında gerçekleştirmişlerdir. Prakash ve ark. (2009) Halofilik *Chromohalobacter sp.* TVSP 101 bakterisinden en iyi  $\alpha$ -amilaz üretimini azot kaynağı olarak triptonun bulunduğu ortamda tespit etmişlerdir.

Kalsiyumun enzim üretimine etkisinin tespiti için toplam hacimde 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM ve 60 mM CaCl<sub>2</sub> besi yerlerine eklenerek bakıldı. Yapılan aktivite sonuçlarına bakıldığında kontrole göre 10 mM ve 20 mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ile daha yüksek  $\alpha$ -amilaz üretimi gözlenirken konsantrasyonun artması durumunda amilaz üretiminin azaldığı tespit edildi. En yüksek aktivite 10 mM

CaCl<sub>2</sub> besisi yerine eklenmesiyle elde edildi. Bu sonuca göre CaCl<sub>2</sub>'ün enzim üretimini arttırdığı hemen düşünülemez; çünkü Ca<sup>+2</sup> iyonun α-amilazın aktivitesi üzerine stabil bir durum sağladığı bundan dolayı artışın olabileceği veya hücre içerisinde salgılanıp hücre dışına verdiğinden dolayı ortamda enzimin fazla olduğu düşünülebilir.

Prakash ve ark. (2009) Halofilik *Chromohalobacter sp.* TVSP 101 bakterisinden α-amilaz enzimi üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirirken, ortama ilave edilen 50 mM CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile enzim üretiminin %29 oranında arttığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda *G. stearothermophilus*'dan α-amilaz enzimi üretimi için optimum koşullar belirlendikten sonra enzim saflaştırmaya geçildi. α-Amilaz %46 verim ile ve 65 kez saflaştırılarak elde edildi. α-Amilazın yüksek saflıkta ve yüksek verimde elde edilmesi, endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

Najafi ve ark. (2005) α-amilaz enzimini %24.2 verimle saflaştırmışlardır. Noman ve ark. (2006) α-amilaz enzimini %22.8 verimle elde edip saflaştırma kat sayısını 110 olarak bulmuşlardır. Ezeji ve Bahl (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10'dan α-amilaz enzimini %11.5 verimle ve 13.6 kez saflaştırmışlardır. Liu ve ark. (2008) *Bacillus sp.* YX-1'den α-amilaz enzimini %34 verimle ve 6.6 kez saflaştırmışlardır. Hmidet ve ark. (2008) *Bacillus licheniformis* NH1'den elde edilen termostabil α-amilaz enzimini %15.9 verimle ve 3.08 kez saflaştırmışlardır. Mollania ve ark. (2010) Sıcak su kaynağından izole ettikleri *Geobacillus sp.* LH8 'in α-amilaz enzimini %10 verimle ve 13.6 kez, Božić ve ark. (2011) *Bacillus licheniformis* ATCC 9945'ten elde edilen α-amilaz enzimini %38 verimle ve 6 kez, Wang ve ark. (2011) *Chryseobacterium taeanense* TKU001'den elde ettikleri alkali ve stabil amilaz enzimini % 11 verimle ve 5 kez saflaştırmışlardır.

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine EDTA, PMSF, DTT ve β-mercaptoethanol gibi bazı inhibitörlerin etkisi araştırıldı. Bu sonuçlara göre kalan enzim miktarları 1 mM'lık EDTA, PMSF, DTT, β-mercaptoethanol ve Etanol'de sırasıyla %35, %93, %96, %86 ve %96 olarak belirlendi. Konsantrasyon artışına paralel olarak enzim aktivitesi üzerine olan inhibisyon etkilerinin de arttığı tespit edildi. 10 mM'lık EDTA, PMSF, DTT, β-mercaptoethanol ve Etanol sırasıyla %11, %23, %41, %61 ve %65'lik etkisi olduğu gözlemlendi gözlemlendi.



Burhan ve ark. (2003) PMSF'nin enzim aktivitesini arttırdığını, EDTA'nın ise enzim aktivitesini azalttığını bulmuşlardır. Arıkan (2008)  $\alpha$ -amilazın 5 mM EDTA, 3 mM PMSF tarafından inhibe edildiğini tespit etmiştir. Asoodeh ve ark. (2010)  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde EDTA ilavesiyle azalma; PMSF ve  $\beta$ -mercaptoethanol ile artma meydana geldiğini belirlemişlerdir. Shafiei ve ark. (2010) saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine EDTA'nın inhibisyon etkisi yaptığını, PMSF ve  $\beta$ -mercaptoethanol'un ise enzim üzerinde herhangi bir etki yapmadığını tespit etmişlerdir. İnhibitörlerle ilgili yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgular diğer araştırmacıların sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini saptamak için  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{FeCl}_2$  eklenerek yapılan aktivite sonuçlarına göre,  $\text{CaCl}_2$  (%123) ve  $\text{MnCl}_2$ 'ün (%122) aktiviteyi artırdığı;  $\text{MgCl}_2$  (%97) ve  $\text{CoCl}_2$  (%96) ilavesi ile değişiklik gözlenmediği;  $\text{CuCl}_2$  (%19),  $\text{ZnCl}_2$  (%29),  $\text{FeCl}_2$  (%55) ve  $\text{HgCl}_2$  (%17)'ün ise enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi.

Srivastava (1987) saflaştırdığı amilazların üzerine  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Al}^{2+}$  iyonlarının kısmen,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Ag}^{+1}$  iyonlarının tamamen enzim aktivitesini inhibe ettiğini, ancak  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  ve  $\text{K}^{+}$  iyonlarının  $\alpha$ -amilaz aktivitesini artırdığını tespit etmiştir. Mamo ve Gessesse (1999) saflaştırdıkları termostabil  $\alpha$ -amilazların  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  ve  $\text{Hg}^{+2}$  iyonları tarafından aktivitelerinin inhibe olduklarını,  $\text{Zn}^{2+}$  iyonunun ise inhibe etmediğini göstermişlerdir. Sarıkaya ve Gürgün (2000) amilaz enzimi üzerine  $\text{Ag}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  gibi metallerin güçlü bir inhibitör etki yaptığını bulmuşlardır. Cordeiro ve ark. (2002) Termofilik *Bacillus sp* SMIA-2'den saflaştırdığı  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Ba}^{+2}$  tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$ , dan daha az etkilediğini saptamışlardır. Najafi ve ark. (2005) *Bacillus subtilis* AX20'den saflaştırdıkları ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  tarafından inhibe edildiğini bulmuşlardır. Behal ve ark. (2006) *Bacillus sp.* AB 04'ten elde ettikleri alkali  $\alpha$ -amilaz enzimi aktivitesinin  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Co}^{+2}$  iyonları etkisi ile arttığını tespit etmişlerdir. Asgher ve ark. (2007) *Bacillus subtilis* JS-2004'ten saflaştırdıkları termostabil  $\alpha$ -amilaz için  $\text{Ca}^{+2}$ 'un iyi bir aktivatör olduğunu belirlemiş,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Hg}^{+2}$  tarafından enzim aktivitesinin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  iyonlarından ise daha az etkilendiğini bulmuşlardır. Shafiei ve ark. (2010) *Nesterenkonia sp.* F suşundan saflaştırdığı  $\alpha$ -amilaz

enziminin aktivitesinin  $Ca^{+2}$  ile arttığını ve  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  iyonları ile inhibe edildiğini saptamışlardır. Mollania ve ark.(2010) *Geobacillus sp.* LH8'in  $\alpha$ -amilaz aktivitesi  $Mg^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Cu^{+2}$  ile  $\alpha$ -amilaz aktivitesi azalırken,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $K^{+}$ ,  $Cr^{+3}$  ve  $Al^{+3}$  ile enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Božić ve ark. (2011)  $Hg^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken  $Ca^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  az bir oranda aktiviteyi arttırdığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

Saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini araştırmak için %0.5'lik SDS, Tween-40, Tween-80, TritonX-100 ve içeriğinde enzim ihtiva etmeyen ticari olarak temin edilen Alo matik kullanıldı. Kalan enzim miktarları kontrol ile karşılaştırılarak rölatif aktiviteleri hesaplandı. Kontrole göre kalan enzim miktarları; SDS %84, Tween-40 %93, Tween-80 %95, TritonX-100 %115 ve Alo matik %87 olarak tespit edildi. SDS gibi ajanlarla kısmi inhibisyon gerçekleşmiştir. Bu özellik deterjanlara karşı dirençliliği göstermektedir. Literatürlerde enzimde disülfid bağlarının bulunması ve aminoasitlerin okside olmalarıyla değişikliğe uğramasından dolayı oksidasyona dayanıksız hale gelmeleri enzimde termostabiliteyi arttırdığı, ve böylelikle enzimin okside edici ajanlardan etkilenmediği belirtilmektedir (Barnet ve ark., 1998; Redy ve ark., 2003). Elde edilen bu sonuç enzimin okside edici ajanlarla etkilenmediğini ısıyla birlikte amino asitlerin değişikliğe uğradığı ve dirençliliğe yol açtığını düşündürmektedir.

Asoodeh ve ark. (2010) Termofilik *Bacillus sp. Ferdowsicous*'tan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin Triton X-100 ile arttığını tespit etmişlerdir. Shafiei ve ark. (2010) *Nesterenkonia sp.* F suşundan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin %0.5 SDS, %0.2 Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 deterjanlarına karşı oldukça stabil olduğunu belirlemişlerdir.

Saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin pH ve sıcaklık stabilitesi belirlendi. Yapılan araştırma sonucunda enzim aktivitesinin pH 5.0'ten sonra arttığı, pH 7.0'den sonra ise aktivitenin azalmaya başladığı görüldü. pH stabilitesi 7.0 olarak bulundu. Enzimin 50°C ile 60°C'de stabil olduğu, 70°C'de ise enzim aktivitesinin azaldığı belirlendi. Enzimin termostabil olması biyolojik olarak oldukça güç bir şekilde parçalanabilen ve çözünmeyen çevresel kirleticilerin oluşumunu da engellemesi gibi bazı olaylarda oldukça önemlidir. Nötrofilik özelliğe sahip  $\alpha$ -amilaz enzimi genel olarak pH 5-7.5

aralığında aktivite göstermektedir. Son yıllarda özellikle kuru temizleme gibi yeni alanlarda da giderek artan şekilde kullanım alanı bulmuştur.

Mamo ve Gessesse (1999) saflaştırdıkları termostabil  $\alpha$ -amilazların 80°C de 4 saat inkübasyon sonunda %50 aktivitelerini koruduğunu ve pH 5.5 ile 9.0'da stabil olduklarını göstermişlerdir.

Cordeiro ve ark. (2002)  $\alpha$ -amilaz enziminin 50°C'de 2 saat sonunda enzimin stabil kaldığını ve 60°C, 70°C ve 90°C'de sırasıyla %4, %13, %38'ini kaybettiğini tespit etmişlerdir.

Burhan ve ark. (2003)  $\alpha$ -amilazın alkalın pH değerinde (9.5-13.0) oldukça stabil olduğunu ve 100°C'de aktivitesinin %85.5 oranında korunduğunu tespit etmişlerdir.

Behal ve ark. (2006) *Bacillus sp.* AB 04'ten elde ettikleri alkali  $\alpha$ -amilaz enziminin 50°C ile 80°C, pH 7.0 ile 10.0 arasında stabil olduğu tespit etmişlerdir.

Saxena ve ark. (2007) *Bacillus sp.* PN5  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin pH 10.0'da 1 saat ön inkübasyon sonrası %80'inin korunduğunu, 105°C'de %65 oranında aktivite gösterdiğini ve 80°C ile 100°C arasındaki sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon sonrasında %100 stabil kaldığını belirlemişlerdir.

Liu ve ark.(2008) *Bacillus sp.* YX-1'den saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enzimin pH 4.5 ile 11.0 arasında stabil kaldığı bulmuşlardır.

Asodeh ve ark. (2010) Termofilik *Bacillus sp. Ferdowsicous*'tan saflaştırdıkları asidofil ve termostabil amilazın pH 3.5 ile 7.0 değerlerinde stabil olduğunu 75°C'de 45 dakika sonunda aktivitesinin %75'ini koruduğunu belirtmişlerdir.

Wang ve ark. (2011) *Chryseobacterium taeanense* TKU001'den saflaştırdıkları alkali ve stabil amilazın pH stabilitesini 6.0–11.0 arasında ve sıcaklık stabilitesini ise 60°C'den daha düşük sıcaklıklarda olduğunu tespit etmişlerdir.

Saflaştırdığımız  $\alpha$ -amilazın Km değeri 0,051 mM, Vmax değerleri 1,424  $\mu$ mol/dk. olarak bulundu.

Srivastava (1987) *Bacillus stearothermophilus*'tan saflaştırdığı  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -amilaz'ın Km değerlerini sırasıyla 1.05 ve 1.25 mg/ml olarak belirlemiştir.

Aguilar ve ark. (2000) saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin Km değerini 3.44 mg/ml olarak tespit etmişlerdir.

Ezeji ve Bahl (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10  $\alpha$ -amilaz enzimin Km ve Vmax değerlerini sırasıyla 3.05 mg/ml ve 7.35 U/ml olarak belirlemişlerdir.

Shafiei ve ark. (2010) *Nesterenkonia sp.* F suşundan saflaştırdığı  $\alpha$ -amilaz enziminin Km değerini 4.5 mg/ml olarak bulmuşlardır. Mollania ve ark.(2010) Sıcak su kaynağından izole ettikleri *Geobacillus sp.* LH8 'in  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin Km değerini 3 mg/ml ve Vmax değerini ise 6.5  $\mu$ mol/dk. olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda *G. stearothermophilus*'dan saflaştırdığımız  $\alpha$ -amilaz enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 63 kDa olarak hesaplandı.  $\alpha$ -Amilaz enzimlerinin çoğunun molekül ağırlığı yaklaşık olarak 45-70 kDa arasındadır ve genellikle enzim proteinin amino asit kompozisyonunda büyük farklılık yoktur. Bunun yanı sıra farklı molekül ağırlığına sahip  $\alpha$ -amilazlar da mevcuttur.

Srivastava (1987) saflaştırdığı amilazların,  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -amilaz olarak belirleyip molekül ağırlıklarını sırasıyla 48 kDa ve 57 kDa olarak tespit etmiştir. Shaw ve ark. (1995) Ekstratermofilik *Thermus sp*'ten saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 59 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Mamo ve Gessesse (1999) Termofilik *Bacillus sp.* WN11'den saflaştırdıkları termostabil amilaz I ve amilaz II'nin molekül ağırlıklarını sırası ile 76 ve 53 kDa olarak bulmuşlardır. Aguilar ve ark. (2000) *Lactobacillus manihotivorans* LMG'tan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 135 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Burhan ve ark. (2003) Toprakten izole ettikleri *Bacillus sp.* ANT-6Y'den saflaştırdıkları termostabil ve alkalın  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığını 94.5 kDa olarak bulmuşlardır.

Yang ve Liu (2004) *Thermobifida fusca*'tan saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilazın molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 60 kDa olarak tespit etmişlerdir. Noman ve ark. (2006) *Pachyrhizus erosus* L'den  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ile saf enzimin molekül ağırlığını 40 kDa olarak hesaplamışlardır.

Ezeji ve Bahl (2006) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10'dan salgılanan  $\alpha$ -amilazın molekül ağırlığını 58 kDa olarak bulmuşlardır.

Arıkan (2008) Termofilik *Bacillus sp.* A3-15'ten üretilen alkalın ve termostabil  $\alpha$ -amilazı kısmi olarak saflaştırarak enzimi nişastalı SDS-PAGE elektroforez ile 86 kDa ve 60 kDa molekül ağırlıklarında bağımsız iki band elde etmiştir.

Hmidet ve ark. (2008) *Bacillus licheniformis* NH1'den saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığını 58 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Liu ve ark.(2008) *Bacillus sp.* YX-1'den saflaştırdıkları  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığını 56 kDa olarak hesaplamışlardır.

Shafiei ve ark. (2010) *Nesterenkonia sp.* F suşundan amilaz enzimi saflaştırılmasını gerçekleştirerek, enzimin molekül ağırlığını yaklaşık olarak 100-106 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Mollania ve ark.(2010) Sıcak su kaynağından izole ettikleri *Geobacillus sp.* LH8 'in  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları enzimin moleküler ağırlığını 52 kDa olarak hesaplamışlardır.

Božić ve ark. (2011) *Bacillus licheniformis* ATCC 9945'ten izole ettikleri  $\alpha$ -amilaz enzimini saflaştırmışlar ve saf enzimin SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlığını 31 kDa olarak belirlemişlerdir.

Wang ve ark. (2011) *Chryseobacterium taeanense* TKU001'den saflaştırdıkları alkali ve stabil  $\alpha$ -amilazın SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlığını 46 kDa veya 47 kDa olarak belirlemişlerdir.

Enzimlerin kullanıldığı işlemler genelde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği için, enzim sıcaklığının yüksek olması endüstriyel enzimlerde istenen bir özelliktir. Enzimin nötral pH'da olması ise nişastanın sıvılaştırılması gibi işlemlerde kullanımı açısından önemlidir. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlerin, ekonomik açıdan kısa sürede ve daha düşük maliyetle maksimum verim göstermesi, farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması gerekir.

Çalışmamızda, maksimum  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin kısa sürede, yüksek sıcaklıkta ve nötral pH'da elde edilmesi nedeniyle *G. stearothermophilus*'tan  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi. Az kayıpla ve yüksek saflıkta endüstriyel kullanıma

uygun  $\alpha$ -amilaz elde edildi. Safılaştırılan enzimin termostabil olması, ortamda bulunan değişik denatüre edici şartlara karşı yüksek tolerans göstermesi nedeniyle enzim teknolojisi ve özellikle biyoteknolojik açıdan kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Agüloğlu, S. 1996. Değişik amino asit ve antibiyotiklerin *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilazın membrandaki sentezi ve salgılanması üzerine etkileri ve tripsinin  $\alpha$ -amilaz üzerine olan proteolitik etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Agüloğlu, S., Ensari, N.Y., Uyar, F., Otludil, B. 2000. The effects of  $\alpha$ -amylase through bacterial amino acids on production and transport of membranes. Starch/Starke, 52: 290-295.

Agüloğlu, S. 2008. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase isolated from Çermik hot water springs. 11th&33rd FEBS Congress IUBMB Conference p.275. 28 June-3 July 2008, Athens, GREECE.

Aguilar, G., Guyot, J.M., Aguilar, B.T., Guyot, J.P. 2000. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. Enzyme and Microbial Technology, 27: 406–413.

Arikan, B., Unaldi, N., Çoral, G., Çolak, Ö., Aygan, A., Gülnaz, O. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38: 1397-1403.

Arikan, B. 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. Bioresource Technology, 99: 3071–3076.

Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S.U., Legge, R.L. 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering, 79: 950–955.

Asoodeh, A., Chamani, J., Lagzian, M. 2010. A novel thermostable, acidophilic  $\alpha$ -amylase from a new thermophilic “*Bacillus sp. Ferdowsicus*” isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 46: 289–297.

Aygan, A. 2008. Haloalkalofil *Bacillus sp.* izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 7-8.

Adiguzel, A., Ozkan, Hakan., Baris, O., Inan, K., Güllüce, M., Şahin, F. 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*,79: 321–328.

Bahar, T. 1996. Enzim immobilizasyonu için manyetik polistiren partiküllerin hazırlanması ve bu partiküllerdeki immobilize edilmiş glukoamilazın manyetik olarak stabilize edilmiş akışkan yatak reaktör (MSAYR)'de kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 3-17.

Baran, M. 2001. Mikrobakterilerden  $\alpha$ -amilaz enziminin ayırımı ve saflaştırılması. . Yüksek Lisans Tezi Isparta Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Barnett, C.C., Mitshinson, C., Power, S.D., And Roquadt, C.A. 1998). Oxidatively stable alpha-amylase. Patent Application US. 5:824-832.

Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G., Markl, H. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus sp. IHI-91* on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 184–90.

Behal, A., Singhj, J., Sharma, M.K., Puri P., Batra, N. 2006. Characterization of Alkaline  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus sp.* AB 04. *International Journal of Agriculture Biology*, 8: 80-83.

Bernfeld P. 1955. Enzymes carbohydrate metabolism, In *Methods In Enzymology*, Academic Press, 17: 149-158.

Boyce, A. Walsh, G. 2007. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,2 (4)- $\beta$ -glucanase from *Rhizomucor miegei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76: 835 841.

Božić, N., Ruiz, J., Santín, J.L., Vujčić, Z. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 53: 203–209.

Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss, R.L. 1972. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archives of Microbiology*, 84: 54-68.

Brock, T.D. 1986. Introduction: an overview of the thermophiles, In T.D. Brock (ed.), *Thermophiles: general, molecular and applied microbiology*. John Wiley and Sons. New York. 1-16.



Carvalho, R.V., C rrea, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. 2008. properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology 39: 102-107.

Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B. 2002. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology, 33: 57-61.

Chakraborty, S., Khopade, A., Biao, R., Jian, W., Liu, X.Y., Mahadik, K., Chopade, B., Zhang, L., Kokare, C. 2011. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable  $\alpha$ -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora sp.* A9. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68: 52–58.

Çaphan, A.İ. 2011. Biyoteknoloji ve biyoinformatik Erişim: [<http://biyoinformatik.wordpress.com.tr> ]. Erişim Tarihi: 11.04.2011

Demirjian, D.C., Moris, F.V., Cassidy, C.S. 2001. Enzymes from extremophiles. Current Opinion in Chemical Biology. 5: 144-151.

Dönmez, S. 1987. Ekstrem termofil mikroorganizmalar ve biyoteknoloji de uygulama olanakları. Gıda Dergisi, 6: 401-405.

Ekinci, S.M., Akyol İ., Karaman, M., Özköse, Emin. 2005. Hayvansal Biyoteknoloji Uygulamalarında Güncel Gelişmeler. KS . Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2).

Eichler, J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extramozyme. Biotechnology Advances, 19: 261-278.

Ezeji, T.C., Bahl, H. 2006. Purification, characterization and synergistic action of phytate resistant  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. Journal of Biotechnology, 125: 27–38.

Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94: 518-525.

Fengxie, J., Yao, L., Chunzhi Z., Hongshan, Y. 2001. Thermostable  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus sp.*JF strain. Process Biochemistry, 36: 559–564.

Gavrilescu, M., Chisti, Y. 2005. Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry. Biotechnology Advances, 23: 471–499.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. 2003. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology*, 90: 207–214.

Gözükara, E.M. 1997. Enzimler. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri*, 572-573. İstanbul.

Gupta, R., Gıgras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 1-18.

Greenwood, C.T. 1970. *Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, Vol II, second edition, Academic Press, New York. 471-514.

Haki, G.D., Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review *Bioresource Technology*, 89:17–34.

Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1999. Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*, 35: 27–31.

Hmidet, N., Bayouhd, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. 2008. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43: 499–510.

Hsieh, M.S., Yin, L.J., Jiang, S.T. 2008. Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*. *Fisheries Science*, 74: 425-432.

John, F.K. 1987. *Enzyme Technology* (H.J.Rehm ve G.Reed editör). *Biotechnology*. New York. 7: 37-62.

Karaman, S. 1998. Endüstriyel ve Tarımsal Atıkların Biyoteknolojik Olarak Değerlendirilmesinde Yeni Yaklaşım. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., Tommonaro, G. 2009. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers*, 77(2): 338-343.

Küçüköçük, M., Ertuğrul, K., Dural, H., Ertugay, O., Uysal, T. 2011. *Biyoteknoloji*. Erişim: [<http://www.biyoteknoloji.gen.tr/biyoteknoloji.htm>]. Erişim Tarihi: 25.04.2011.

Kıran, E.Ö. 2003. Çömlekçiöğlü U. Zeytin Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan termofil alkalifilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot

kaynaklarının etkisi. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 6(2): 41-48 Sağıroğlu, A.K. 1999. Bilim ve Teknik, 383: 74-80.

Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2004. Thermostable  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. Enzyme and Microbial Technology, 39: 690–696.

Laemmli U.K. 1977. Nature, 227: 680–685.

Liu, X.D., Xu, Y. 2008. A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. Bioresource Technology, 99: 4315–4320.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193: 265- 275.

Mamo, G., Gessesse, A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylases from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 433–438.

Matpan, F. 2007. Diyadin (Ağrı) sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu ve bazı enzimleri üzerinde çalışmalar. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Mollania, N., Khajeh, K., Hosseinkhani, S., Dabirmanesh, B. 2010. Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. LH8. International Journal of Biological Macromolecules, 46: 27–36.

Najafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D. 2005. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Protein Expression and Purification, 41: 349–354.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology, 51: 711-729.

Noman, A.S.M., Hoque, M.A., Sen, P.K., Karim, M.R. 2006. Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L. tuber. Food Chemistry, 99: 444–449.

Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G., Sreeramulu, K. 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. Process Biochemistry, 44: 210–215.

Rahman, T.J., Marchant, R., Banat, I.M. 2004. Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions*, 32: 209–213.

Ray, R.C., Kar, S., Nayak, S., Swain, M.R. 2008. Extracellular  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, 234-246.

Redy, N.S., Nimmagadda, A., Rao, K.R.S.S. 2003. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12):645-648.

Sabato, D., Nucci, R., Rossi, M., Gorczynski, I., Gorczynski, Z., Lakowicz, J. 1999. The  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. *Biophysical Chemistry*, 81: 23–31.

Sarıkaya, E., Gürgün, V. 2000. Increase of the  $\alpha$ -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turkish Journal of Biology*, 24: 299–308.

Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98: 260–265.

Selen, V. 2006. *Bacillus amyloliquefaciens* ile  $\alpha$ -amilaz üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.16.

Shafiei, M., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A. 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting and halophilic  $\alpha$ -amylase from a moderately halophilic bacterium *Nesterenkonia* sp strain F. *Process Biochemistry*, 45: 694-699.

Shaw, J.F., Lin, F.P., Chen, S.C., Chen, H.C. 1995. Purification and properties of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus* sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 36: 195-200.

Shmaefsky, R.B. 2011. *Biotechnology 101*. Erişim: [<http://books.google.com.tr>]. Erişim Tarihi: 10.04.2011

Sidhu, G.S., Chakbarti, T., Gupta, J.K. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 525-530.

Smith, J.E. 1996. *Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge, 233.

Srivastava, R.A.K. 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 749-755.

Stetter, K. O. 2011. University of Regensburg, Department of Microbiology. Erişim: [http://ucmp.berkeley.edu/archaea]. Erişim Tarihi: 28.04.2011

Telefoncu, A. 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi, İzmir.

Temizkan, G. Ve Arda, N. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul

Vesterberg, O. 1993. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 14: 1243-1249.

Yang, C.H., Liu, W.H. 2004. Purification and properties of a maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 254–260.

Wang, S.L., Liang, Y.C., Liang, T.W. 2011. Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. *Process Biochemistry*, 46: 745–750.

Wiseman, A. 1987. The Application of Enzyme in Industry. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 3: 275-373.

Woodley, J. M. 2000. *Advances in Enzyme Technology-UK Contributions*. (Th.scheperi editör). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 94.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** :Barış ENEZ  
**Doğum Yeri** :Diyarbakır  
**Doğum Tarihi** :12.12.1985  
**Yabancı Dili** :İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

**Lise** :Fatih Lisesi (Süper Lise) 1999–2003  
**Lisans** :Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü  
2004–2008  
**Yüksek Lisans** :Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim  
Dalı 2009- 2011