

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALFA AMİLAZ-DEKSTRAN KONJUGATLARININ
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Özlem ÖZTOLAN

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. α -AMİLAZ	2
2.1 α -Amilazın Özellikleri	2
2.2 α -Amilazın Sanayide Kullanım Alanları	5
2.3 α -Amilazın Etkilediği Substratlar	6
2.3.1 Nişasta	6
2.3.2 Glikojen	7
2.4 Dekstran	8
2.4.1 Dekstranın Kullanım Alanları	9
2.4.2 Dekstran-Protein, Dekstran-Enzim Kovalent Konjugatları	10
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	12
3.1 Materyaller	12
3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	12
3.1.1.1 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	13
3.1.1.2 Kullanılan Viscotek Marka GPC sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	13
3.1.1.3 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometrenin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	14
3.1.1.4 Kullanılan Protein Saflaştırma Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	15
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
3.2 Satın Alınan α -Amilazın Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması	17
3.3 α -Amilazın İzoelektrik Noktasının Tayini	17
3.4 Dekstranın Aldehid Türevinin Eldesi	17
3.5 α -Amilazın Aktivite Tayini	18
3.5.1 Çözeltilerin Hazırlanması	18
3.5.2 α -Amilaz Aktivitesinin Tayini	19
3.6 Alfa Amilaz-Dekstran Kovalent Konjugatlarının Sentezi	24
3.7 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının Aktivitelerinin Tayini	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27

4.1	Satın Alınan Alfa Amilazın saflaştırılması.....	27
4.2	Alfa-Amilazın İzoelektrik Noktasının Tayini.....	28
4.3	Satın Alınan ve Saf Alfa-Amilazın HPLC ve GPC Kromatogramları	29
4.3.1	HPLC Sonuçları.....	29
4.3.2	GPC Sonuçları	30
4.4	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının ve Saf enzimin HPLC Yöntemi ile İncelenmesi.....	34
4.5	$M_w \sim 75\ 000$ olan Dekstranla Sentezlenen Alfa Amilaz Dekstran Konjugatlarının Dört Dedektörlü GPC Sistemi ile İncelenmesi.....	36
4.6	Satın Alınan ve Saf Alfa Amilazın Aktivite Değerleri.....	44
4.7	$M_w \sim 75\ 000$ olan Dekstran ile Sentezlenen Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının Aktivite Değerleri	46
4.7.1	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 0 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	46
4.7.2	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 15 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	48
4.7.3	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 30 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	50
4.7.4	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 60 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	52
4.8	$M_w = 188\ 000$ olan Dekstran ile Sentezlenen Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının Aktivite Değerleri.....	54
4.8.1	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 0 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	54
4.8.2	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 15 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	56
4.8.3	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 30 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	58
4.8.4	Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 60 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri.....	60
4.9	$M_w \sim 75\ 000$ ve $M_w = 188\ 000$ olan Dekstran ve Aldehid Türevlerinin FTIR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	62
KAYNAKLAR.....		65
ÖZGEÇMİŞ.....		70

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
M	Molar
nm	nanometre
A	Absorbans
U	Ünite
mg	miligram
R ²	Regrasyon katsayısı
C	Konsantrasyon
n	mol
α	Alfa

KISALTMA LİSTESİ

NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
K-Na tartarat	Potasyum-Sodyum Tartarat
3,5-DNS	3,5-Dinitrosalisilik asid
D	Dekstran
DCHO	Dekstran aldehid türevi
NaOH	Sodyum hidroksid
NaIO ₄	Sodyum periyodat
NaBH ₄	Sodyum borhidrür

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Alfa amilaz molekülünün şematik diyagramı.....	3
Şekil 2.2	Alfa amilazın aktif bölgesi.....	4
Şekil 2.3	α -Amilazın amino asid bileşimi.	5
Şekil 2.4	Amilozun açık formülü.....	6
Şekil 2.5	Amilopektinin açık formülü.....	7
Şekil 2.6	Glikojen.....	8
Şekil 2.7	Dekstranın açık formülü.	9
Şekil 3.1	Dekstranın sodyum periyodat ile aldehit türevine yükseltgenmesi.	18
Şekil 3.2	Maltoz kalibrasyon eğrisi.....	22
Şekil 4.1	α -Amilaz enziminin protein saflaştırma sisteminde fraksiyonlara ayrılması sırasında UV dedektör ile alınan kromatogram	27
Şekil 4.2	Satın alınan ve saflaştırılan α -Amilaz çözeltilerinin pH değerlerinin NaOH sarfiyatına göre değişmesi.....	28
Şekil 4.3	Saflaştırılan ve satın alınan α -amilazın HPLC kromatogramları.....	29
Şekil 4.4a	Satın alınan ve saflaştırılan α -amilazın Viscotek cihazında RI dedektöründen alınan kromatogramları.....	30
Şekil 4.4b	Satın alınan ve saflaştırılan α -amilazın Viscotek cihazında UV dedektöründen alınan kromatogramları.....	31
Şekil 4.4c	Satın alınan ve saflaştırılan α -amilazın Viscotek cihazında LS dedektöründen alınan kromatogramları.....	32
Şekil 4.4d	Saflaştırılan ve satın alınan α -amilazın Viscotek cihazında viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları.....	33
Şekil 4.5a	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının HPLC kromatogramları	34
Şekil 4.5b	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının HPLC kromatogramları	35
Şekil 4.6a	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında RI dedektöründen alınan kromatogramları.....	36
Şekil 4.6b	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında UV dedektörü ile alınan kromatogramları.....	37
Şekil 4.6c	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında LS dedektörü ile alınan kromatogramları.....	38
Şekil 4.6d	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-DCHO konjugatlarının Viscotek cihazında viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları.....	39
Şekil 4.6e	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında RI dedektörü ile alınan kromatogramları	40
Şekil 4.6f	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında UV dedektörü ile alınan kromatogramları.....	41
Şekil 4.6g	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında LS dedektörü ile alınan kromatogramları.....	42
Şekil 4.6h	α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları.....	43
Şekil 4.7	Satın alınan alfa amilazın pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklardaki aktivite değerleri.....	44
Şekil 4.8	Saflaştırılan alfa amilazın pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklardaki aktivite değerleri.....	45
Şekil 4.9	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran	

	konjugatlarının 0 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	47
Şekil 4.10	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 15 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	49
Şekil 4.11	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 30 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	51
Şekil 4.12	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 60 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	53
Şekil 4.13	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 0 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	55
Şekil 4.14	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 15 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	57
Şekil 4.15	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 30 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	59
Şekil 4.16	Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 60 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.	61
Şekil 4.17	$M_w \sim 75\ 000$ olan Dekstran ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.	62
Şekil 4.18	$M_w = 188\ 000$ olan Dekstran ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.	63

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1	Maltoz standartlarının hazırlanması.....	20
Çizelge 3.2	Maltoz standartları.....	22
Çizelge 3.3	Satın alınan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda aktiviteleri. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.4	Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 0 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.5	Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 15 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.6	Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 30 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.7	Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 60 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.8	C _{protein} : 5 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan polimer (Dekstran)(M _w ~75000) konsantrasyonları.....	25
Çizelge 3.9	C _{protein} : 5 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan polimer (Dekstran)(M _w =188000) konsantrasyonları.....	25
Çizelge 3.10	M _w ~75000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (0. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.11	M _w ~75000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (15. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.12	M _w ~75000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (30. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.13	M _w ~75000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (60. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.14	M _w =188000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (0. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.15	M _w =188000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (15. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.16	M _w =188000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (30. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 3.17	M _w =188000 olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (60. dakika)..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	

ÖNSÖZ

Engin tecrübesi ve yapmış olduğu değerlendirmeler ile tez çalışmam sırasında Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her türlü yardım ve imkanı sağlayan; önerileriyle bana yol gösteren tez yöneticim değerli hocam Prof. Dr. Huriye KUZU'ya;

Biyomühendislik laboratuvarlarında her türlü imkanı bize sunarak bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. M. Mustafa AKDESTE'ye;

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü'ndeki çalışma arkadaşlarım Aslı ARSLAN'a, Yunus SARIÇAY'a Murat TOPUZOGULLARI'na, Namık AKKILIÇ'a, Eray DALGAKIRAN'a, Kadriye KIZILBEY'e, Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular Laboratuvarı çalışanlarından Mithat ÇELEBİ'ye;

Y.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli Arş. Gör. Melda ALTIKATOĞLU'na;

Ayrıca tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman yanımda olan sevgili aileme;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amilazlar endüstride nişastadaki glikozid bağlarının hidrolizinde yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Alfa amilazlar (1,4- α -D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1) nişastadaki amiloz ve amilopektinin α -1,4 bağlarının hidrolizinden sorumlu endohidrolazlardır. β -Amilaz nişastanın sadece indirgenmeyen uçlarındaki α -1,4 bağlarına saldırabilir. Alfa amilazlar yapılarında 5 alt ünite bulundurulur ve 478 amino asit artığı içermektedirler. Molekül ağırlıkları 50 000 dolayındadır.

Özellikle *Aspergillus oryzae*'den elde edilen alfa amilaz (TAKA-amilaz), başlıca gıda, tekstil, deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır. Bu gibi endüstriyel uygulamalarda çalışma ortamlarının sıcaklık, pH v.b. değerleri ya da mevcut kimyasallar enzimin aktivitesini olumsuz etkileyebilir. Endüstriyel proseslerde enzimlerin çalışma ortamının olumsuzluklarına karşı dirençli kılınması önemli araştırma alanlarını oluşturmaktadır. Bu maksatla uygulanan genetik çalışmalar ve kimyasal modifikasyonlar enzimlerin stabilitelerini arttırmaktadır.

Bu çalışmada, *Aspergillus oryzae* alfa amilaz (TAKA) "Sephadex G 50" kolon dolgu maddesi kullanılarak jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırıldı. 75 000 ve 188 000 mol ağırlıklı dekstranlar sodyum periyodat ile aldehit türevlerine yükseltgendikten sonra saf enzime kovalent olarak bağlandı. Sentezlenen konjugatlar ultrafiltrasyon sisteminde konsantre edildi ve yıkandı. Elde edilen konjugatlar HPLC ve GPC cihazlarında incelendi. Enzim ve konjugatların pH 7 ve farklı sıcaklıklarda aktiviteleri tayin edildi ve alınan sonuçlar kıyaslandı.

Sonuç olarak, pH 7'de konjugatlar saf enzime kıyasla daha geniş bir sıcaklık aralığı ve yüksek termal stabilite gösterdiler.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus oryzae* α -Amilaz, Dekstran, α -Amilaz-Dekstran konjugatları, aktivite, enzim stabilitesi, GPC, HPLC.

ABSTRACT

Amylases are extensively applied enzymes in industry which can hydrolyze the glycosidic bonds in starch. Alpha amylases (1,4- α -D-glucan glucanohydrolases; EC 3.2.1.1) are endo-enzymes responsible for the hydrolysis of internal α -1,4 linkages of amylose and amylopectin in starch. β -amylase can attack starch α -1,4 bonds only on nonreducing ends of polymer. Alpha amylases are composed of about 478 amino acid residues and contained five subunits. Their molecular weights are about 50 000.

Especially alpha amylase from *Aspergillus oryzae* (TAKA-amylase), is widely used in food, textile and detergent industries. It is known that many factors in industrial processes can influence the catalytic activity of enzymes negatively by affecting the enzyme's structural state. Thus, chemical and genetic modification of enzymes has been used to improve their stability.

In this study, α -Amylase from *Aspergillus oryzae* (TAKA) is purified by gel filtration chromatography using "Sephadex G-50". Dextran which molecular weights are 75 000 and 188 000, are oxidated to their aldehyde derivatives with NaIO_4 , and attached to the purified enzyme covalently. Conjugates are concentrated and washed by ultrafiltration system. The obtained conjugates were examined using GPC and HPLC. Activities of enzyme and conjugates are determined at different temperatures, at pH 7 and results are compared.

It was observed that conjugates showed larger temperature range and higher thermal stability than purified enzyme at pH 7.

Key words: *Aspergillus Oryzae* α -Amylase, Dextran, α -Amylase-Dextran conjugates, activity, enzyme stability, GPC, HPLC.

1. GİRİŞ

Amilazlar nişastada bulunan glikozid bağlarını hidroliz yoluyla parçalayan enzimlerdir. Bunlar nişastada α -1,4 glikozid bağlarını kıran alfa amilazlar ve indirgenmeyen uçlarındaki α -1,4 bağlarını kıran β -amilazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Alfa amilaz ve glukoamilazın nişastaya ardarda etkisiyle veya bu enzimlerin karışımı kullanılarak glukoz şurubu elde edilmektedir. Çok kullanılan bu işlem, belirtilen enzimleri ticari anlamda önemli bir yere getirmektedir. (Gupta vd., 2003) Amilazlar günümüzde biyoteknolojide, gıda, tekstil ve kağıt endüstrilerindeki uygulamalarda büyük önem taşımaktadırlar. Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilmekle birlikte endüstride genellikle mikrobiyal kaynaklı enzimler talep edilmektedir (Bailey ve Ollis, 1986).

Amilazlar, ilk defa Kirschhoff'un nişastayı parçalayan bu enzimleri keşfetmesi ile 1811'de kullanılmaya başlanmışlardır. Bunu, nişasta parçalayıcı amilazlar ve malt amilazları takip etti. 1930'un sonlarına doğru, Ohlsson, nişasta parçalayıcı enzimleri, enzim reaksiyonları ile üretilen şekerlerin anomerik tiplerine göre, malttaki α - ve β -amilazlar olarak sınıflandırmayı önermiştir. α -Amilaz (1,4- α -D-glukan-glukanhidrolaz, EC. 3.2.1.1) doğada yaygın olarak bulunan bir salgı enzimidir (Kadziola vd., 1998; Gupta vd., 2003).

Bu çalışmada, *Aspergillus oryzae* α -amilaza aldehid türevine yükseltgenmiş 75 000 ve 188 000 mol ağırlıklı dekstranlar kovalent olarak bağlandı. Sentezlenen konjugatlar dört dedektörlü GPC ve UV dedektörlü HPLC sistemlerinde incelendi. Farklı sıcaklıklarda pH 7'de konjugatların ve enzimin aktiviteleri tayin edildi ve alınan sonuçlar kıyaslandı.

2. α -AMİLAZ

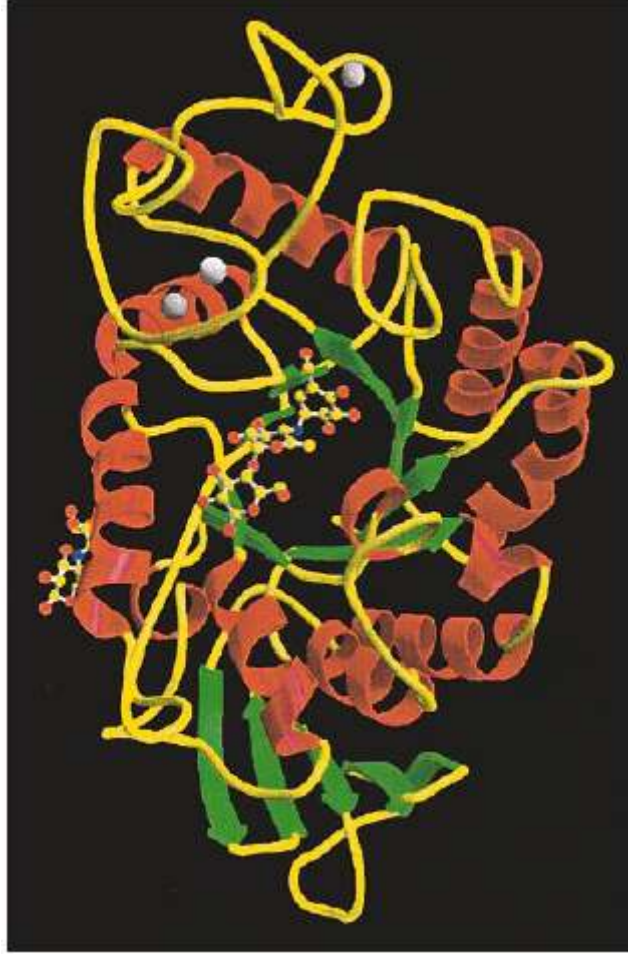
2.1 α -Amilazın Özellikleri

Endo-amilazlar ailesinden olan α -amilazlar (1,4- α -D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1) hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan monomerik enzimlerdir. Nişasta (amiloze ve amilopektin), glikojen ve buna bağılı oligo ve polisakkaridlerdeki α -D-(1,4)-glukozidik bağlarının hidrolizlerini maltodekstrin, malto-oligosakkaridler ve glukoz üretmek için katalizlerler (Machius vd., 1996; Brzozowski vd., 2000; Robert vd., 2003).

Birçok mantar türünden α -amilaz üretilmekle birlikte en çok incelenen ve genellikle ticari olarak kullanılan *Aspergillus oryzae* α -amilaz (TAKA)'dır. Bu enzim nişastanın α -(1,4) bağlarına saldıran fakat α -(1,6) bağlarına saldırmayan bir endohidrolazdır. Belirtilen enzim ile nişasta %60 oranında maltoza dönüştürülebilmektedir (Gary vd., 1995).

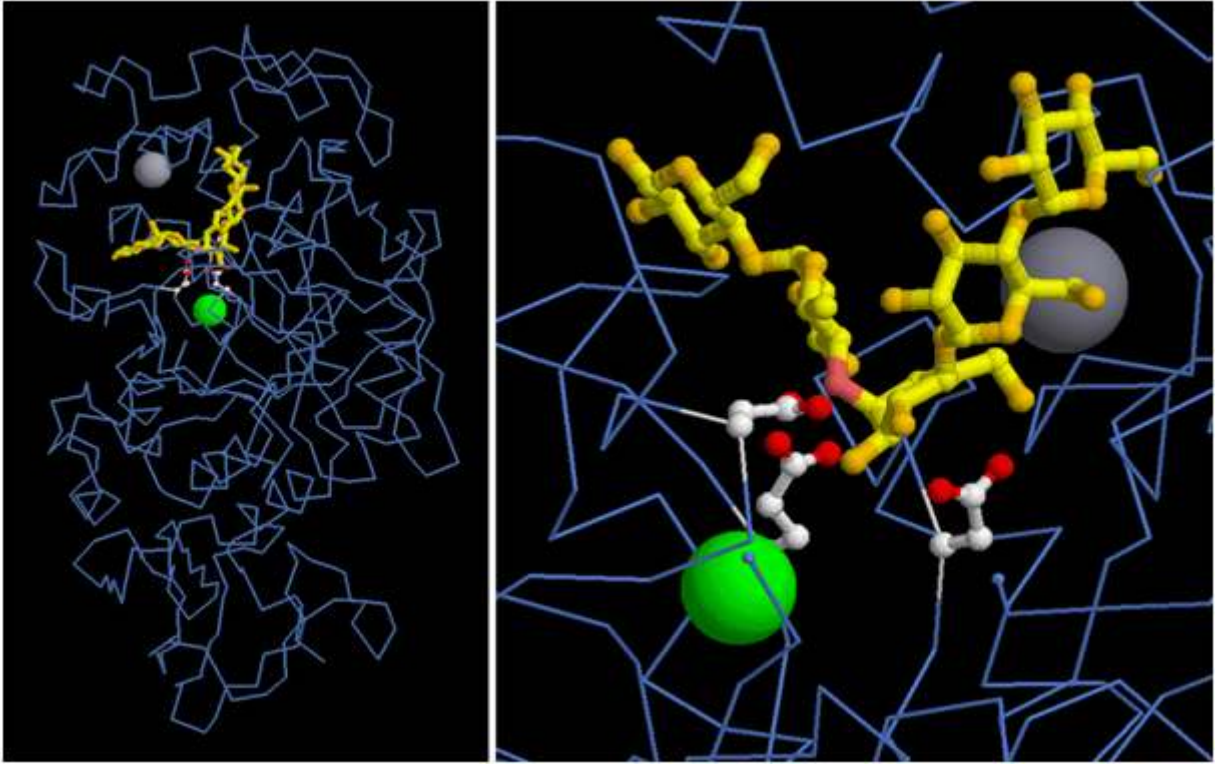
α -Amilazın molekül ağırlığı 55200 Da dolayındadır ve sıcaklığa karşı önemli ölçüde direnç göstermektedir. Bu enzimin dikkate değer termostabilite özelliği, artan iyonik etkileşimler, azalan yüzey alanı ve iç kısımdaki artan paketlenme sağlayıcı etkileşimlerden ileri gelebilir.

α -Amilaz molekülü 478 amino asit artığı (9 adet triptofan) ve 294 su molekülü bulundurmaktadır (Swift vd., 1991). Ayrıca α -amilazın Ca^{2+} ve Cl^- iyonlarını bağlama özelliği vardır. α -Amilazların aktif formda olmaları için mutlaka kalsiyum iyonu gereklidir. α -Amilaz, en az bir Ca^{2+} içeren bir metaloenzimdir. Ca^{2+} iyonunun afinitesi, diğer iyonlardan daha kuvvetlidir. Kalsiyum bağlarının sayısı 1–10 arasında değişir. Taka-Amilaz (TAA) 10 Ca^{2+} iyonu içerir ancak Taka-amilazda sadece bir sıkı bağ vardır. Diğer sistemlerde Ca^{2+} iyonunun enzimi stabilize edici etkisi vardır. Ca^{2+} iyonu amilazlardan diyaliz yöntemi ile uzaklaştırılabilir. Kalsiyumun uzaklaştırıldığı enzimler Ca^{2+} iyonunun ilavesi ile tekrar aktif hale getirilebilir. Ca^{2+} nın varlığında, α -amilazlar Ca^{2+} nın bulunmadığı α -amilazlara göre daha termostabildir. (Quian vd., 1994; Declerck vd., 2000; Gupta vd., 2003). α -Amilazlar, bir enzim molekülü başına en az bir atom kalsiyuma sahip metaloenzimlerdir. Ca^{2+} iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş ve Ca^{2+} iyonunun mikromolar seviyelerinin, α -amilazın yapısını stabilize etmeye yaradığı görülmüştür (Bush vd., 1989).



Şekil 2.1 Alfa amilaz molekülünün şematik diyagramı.

Amilazdaki glutamat 233, aspartat 197 ve aspartat 300 birlikte çalışarak iki şeker molekülü arasındaki glikozid bağını kırmaktadır. Kalsiyum iyonu enzimde protein yapının yakınında saptanmıştır ve enzimin yapısını stabilize etmektedir. Klor iyonu ise, çoğu amilazda aktif bölgenin altından bağlanmıştır ve bu iyon reaksiyonun oluşmasına yardımcı olmaktadır.



Şekil 2.2 Alfa amilazın aktif bölgesi.

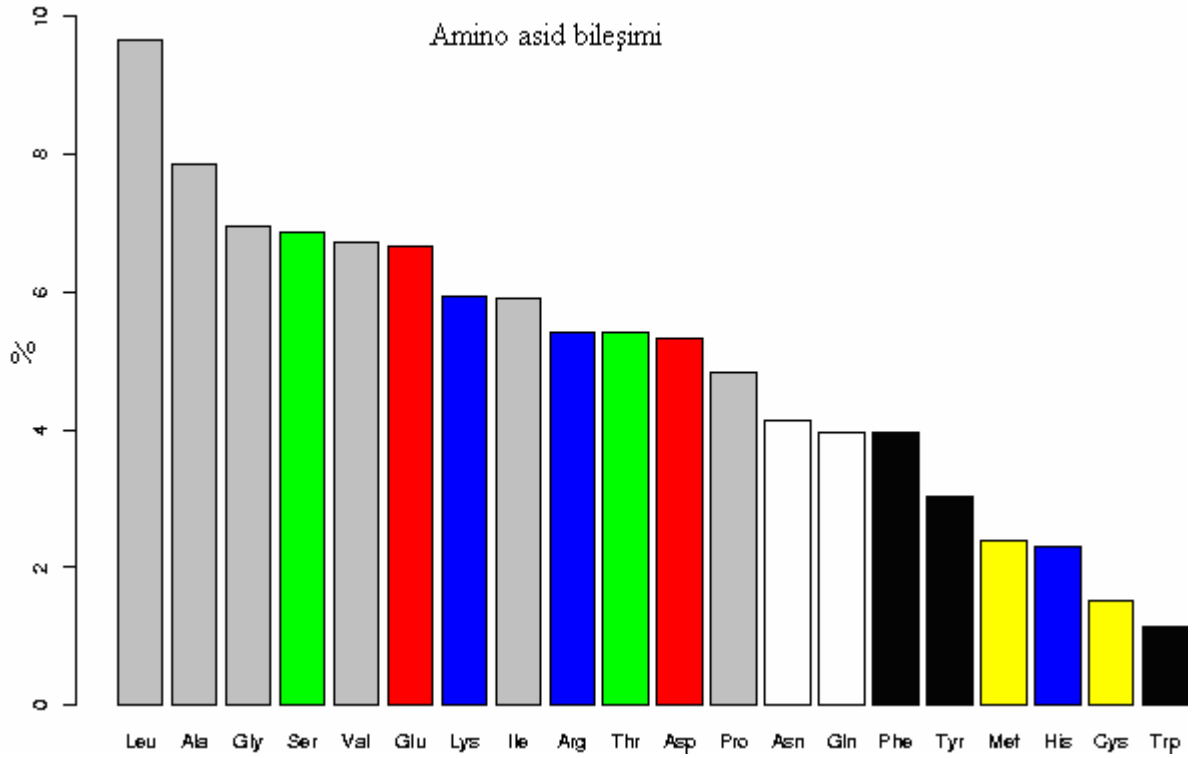
(Üçlü asidik grup (kırmızı), beş şeker biriminden oluşan zincir (sarı ve turuncu), kalsiyum iyonu (gri küre), klor iyonu (yeşil küre)).

α -Amilazların optimum pH değerleri genellikle 4–7 arasında bulunmaktadır. Optimum pH aralığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Saflaştırılmış α -amilazlar 50°C'nin üzerinde aktivitelerini hızla kaybetmektedirler. Bu inaktivasyon işlemi kalsiyum ve substrat etkisiyle azaltılabilir. Etkili oldukları sıcaklık aralığı ise 20–40 °C'dır.

α -Amilazın 5 alt ünitesi yani substrat bağlama bölgesi vardır. α -Amilazın bu bölgelerine substratın yerleşmesi işleminde maksimum katalitik aktivitenin, nötralden daha çok asidik pH'da olduğu görülmüştür (Ishikava vd.,1990; Kazuhiko vd., 1993).

α -Amilazın amino asit bileşim yüzdesi aşağıdaki gibidir:

Ala (A) 7.85	Gln (Q) 3.96	Leu (L) 9.66	Ser (S) 6.87
Arg (R) 5.42	Glu (E) 6.66	Lys (K) 5.93	Thr (T) 5.40
Asn (N) 4.13	Gly (G) 6.94	Met (M) 2.39	Trp (W) 1.13
Asp (D) 5.34	His (H) 2.29	Phe (F) 3.95	Tyr (Y) 3.01
Cys (C) 1.50	Ile (I) 5.89	Pro (P) 4.84	Val (V) 6.72
Asx (B) 0.00	Glx (Z) 0.00	Xaa (X) 0.00	



Şekil 2.3 α -Amilazın amino asit bileşimi.

2.2 α -Amilazın Sanayide Kullanım Alanları

Enzimatik hidroliz, kimyasal hidrolizden daha etkili ve daha spesifik olduğu için uygulamalarda tercih edilmektedir. α -Amilazın kapsamlı kullanım alanlarından biri, nişasta

endüstrisidir. Nişastayı hidroliz yoluyla parçalayan amilazlar, eczacılıkta siklo dekstrinlerinlerden çeşitli uygulamalarda yer alan glukoz şuruplarına kadar birçok üretim dalında yer almaktadır (Nielsen ve Borchert, 2000).

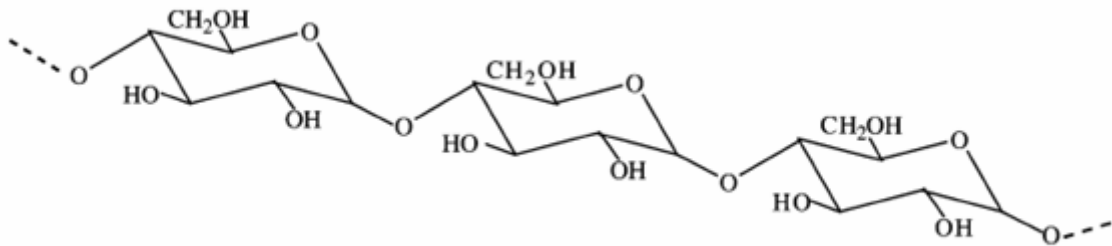
Nişasta enzimatik hidroliz ile glukoz şuruplarına dönüştürülebilir ve bu şuruplar gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılırlar. Bazı bira türlerinin üretiminde, (light bira gibi) daha düşük karbonhidrat ve daha yüksek alkol içeriğine sahip bir ürün elde etmek için enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. α -Amilazlar kağıt, tekstil, deterjan sanayilerinde ve meyva suyu üretiminde kapsamlı boyutta kullanılmaktadırlar (Brzozowski ve Davies, 1997).

2.3 α -Amilazın Etkilediği Substratlar

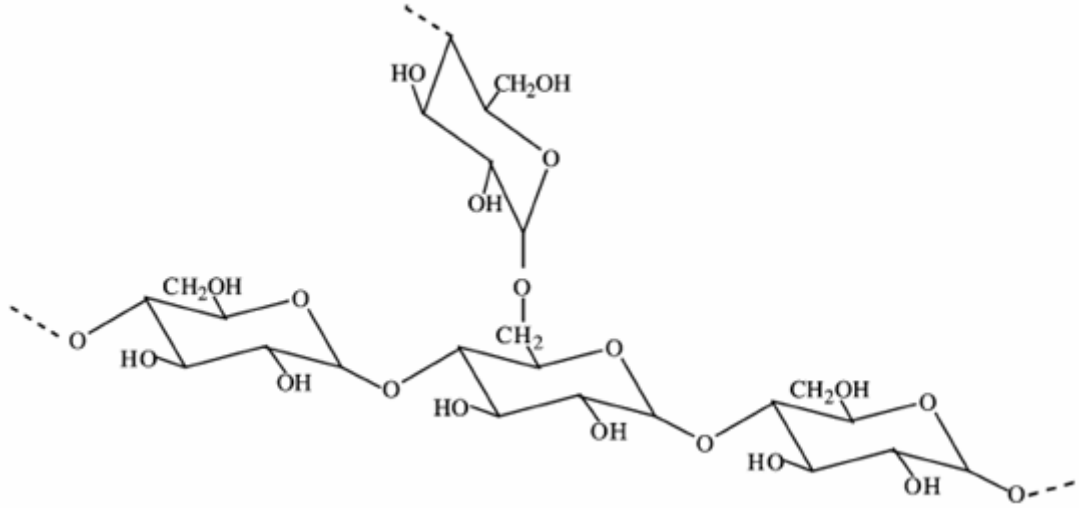
2.3.1 Nişasta

Nişasta daha çok patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasulye, buğday, pirinç gibi tahıllarda bulunmakla birlikte, bütün bitki hücreleri nişasta yapma yeteneğine sahiptirler. Nişasta α -1,4 bağları içeren lineer glukoz polimeri olan amiloz (Şekil 2.3), ve α -1,6 bağları ile α -1,4 glukoz kalıntıların birbirine bağlandığı dallanmış yapıda polimer amilopektinden (Şekil 2.4) oluşmaktadır (Muralikrishna ve Nirmala, 2005).

Amiloz, nişastanın lineer fraksiyonu olup α -(1,4) glikozid bağları ile bağlanmış durumda 1100 ile 4400 glukoz ünitesi içermektedir. Nişastanın dallanmış fraksiyonu olan amilopektin ise; α -(1,4) bağları yanında dallanma yerlerinde α (1,6) bağları da bulundurmaktadır.(Beazell, 1941).



Şekil 2.4 Amilozun açık formülü.

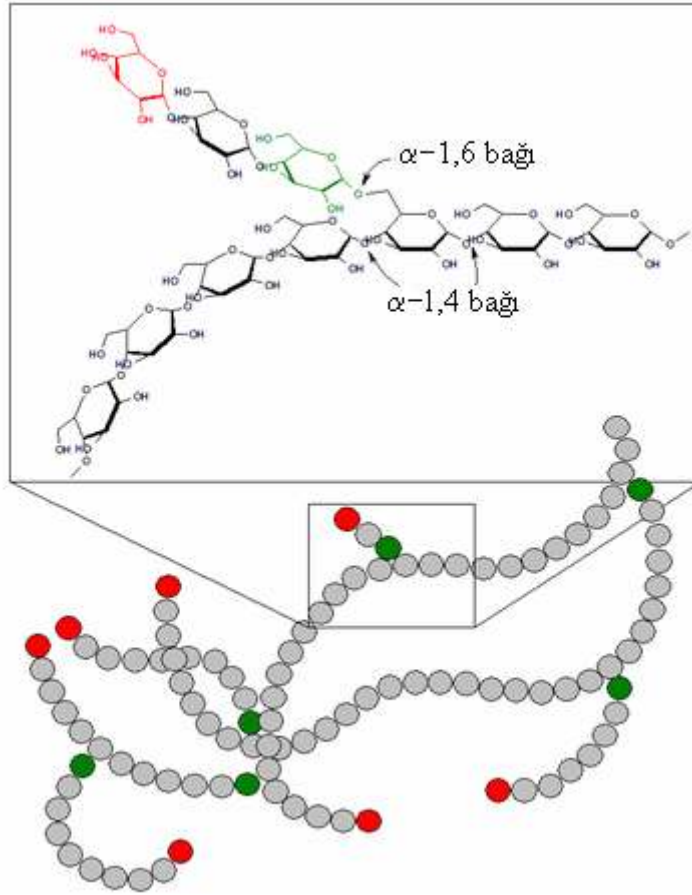


Şekil 2.5 Amilopektinin açık formülü.

Ekmek yapımı ve un sanayisi gibi çeşitli endüstriyel gıda proseslerinde amilolitik enzimler ile nişastanın (amiloz ve amilopektin) depolimerizasyonu anahtar rol oynamaktadır. Bunun gibi işlemlerde nişasta; amilolitik aktiviteler ile dekstrin, maltoz ve glukozu parçalanmaktadır (Battle vd., 2000).

2.3.2 Glikojen

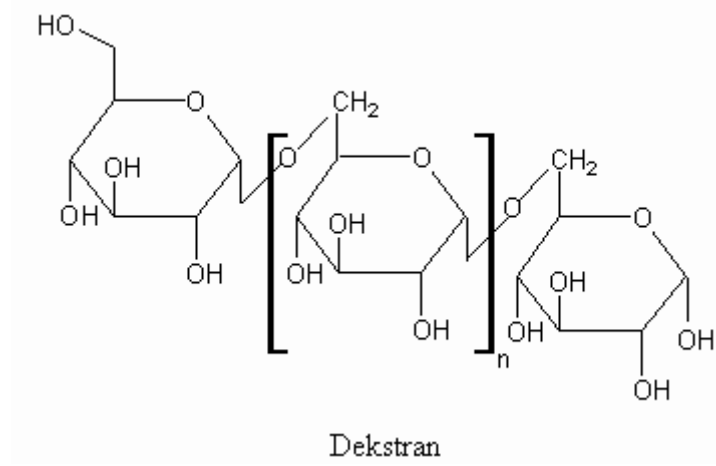
Glikojen hayvanlarda ve insanlarda bitkilerdeki nişastanın analogu olan glukoz şeklinde bulunmaktadır. Glikojen başlıca karaciğer ve kaslarda sentezlenip depolanmaktadır. Yapı olarak glikojen amilopektine benzemekle birlikte daha sık dallanma görülmektedir. Çeşitli glikojen örneklerinde 1700–600 000 arası glukoz birimi ölçülmüştür. Glikojenin yapısında glukoz üniteleri düz zincirlerde α -(1,4) bağları ile, dallanma noktalarında ise α -(1,6) bağları ile bağlanmış durumdadır (Buryan, 1991; Dordick vd., 1991).



Şekil 2.6 Glikojen

2.4 Dekstran

Dekstran mikrobiyal sentez ile elde edilen polisakkaridlerin genel adıdır. Doğada bol miktarda bulunan biyobozunur, inert ve toksik olmayan bir polimerdir. Dekstran molekülü anhidro-D-glukopiranoz birimlerinin başlıca α -1,6-glikozid bağı ile bağlanması sonucu meydana gelmiştir. Her glukoz halkasında üç adet hidroksil grubu bulunmaktadır. Dekstran tıbbi uygulamalarda uzun zamandan beri yer almaktadır (Taylor, 1991; Collen vd., 2001; Gladysheva vd., 2001; Zhang, vd., 2004).



Şekil 2.7 Dekstranın açık formülü.

2.4.1 Dekstranın Kullanım Alanları

Dekstran biyoyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. Bu özelliğinden dolayı dekstran ve türevleri yapay kan ve ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır. Polimerik ilaç taşıyıcıları ve hidrojeller gibi spesifik uygulama alanlarında, çeşitli kimyasal modifikasyonlardan da faydalanarak dekstrandan yararlanılmaktadır. Çapraz-bağlı dekstrandan geliştirilerek elde edilen çözünmeyen ve poröz destekler (Sephadex vb.) ticari olarak satılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı dekstranlar enzim ve protein immobilizasyonunda önemli bir yere sahiptir. (Taylor, 1991; Zhang, 2005).

Hidrofilik polimer ile enzim yüzeyinin minimum modifikasyonu, enzim yüzeyi etrafında kılıf oluşturmak için ve hidrofobik arayüzeylerle etkileşime karşı korumak için oldukça iyi bir stratejidir. Modifikasyon sonrası, bu polimer sadece küçük substratlarla enzimin etkileşimine izin vermekle kalmaz, aynı zamanda hidrofobik arayüzeylerle enzimin etkileşiminden kaçınmak için hidrofilik özellik kazanır. Ek olarak, seçilen polimer enzim yüzeyindeki gruplarla etkileşim oluşturmaktadır.

Dekstran aldehyd esnek bir polimerdir ve çapraz bağlı immobilize enzimlerde, hidrofilik ortamların oluşturulmasında, ve makromoleküllerle desteklerin etkileşimlerini azaltmada kullanılmaktadır (Betancor vd., 2004). Ayrıca α -1,6 glikozidik bağlar ile bağlı glukoz birimlerinin tekrarlanması ile oluşmuş olması dekstranın birçok uygulamada kullanılmasının nedenlerinin başında gelmektedir (Srisawat, vd., 2001).

2.4.2 Dekstran-Protein, Dekstran-Enzim Kovalent Konjugatları

Endüstriyel enzimlerin uygulamalardaki stabilitesi biyoteknolojide kritik bir sorundur. Protein stabilizasyonunda, protein mühendisliğinden, immobilizasyon tekniklerinden veya kimyasal modifikasyondan yararlanılmaktadır.

Endüstriyel uygulamalar sırasında enzimler çeşitli inaktivasyon faktörlerinden olumsuz etkilenmektedir. Bunlardan iki fazlı sistemlerde çözünebilen enzim ve organik çözücü damlalarının arayüzeyleri veya karışmış sistemlerdeki çözünebilen enzim ile gaz kabarcıkları arasındaki etkileşimler oldukça önemli olabilir. Bu arayüzeyler, proteinin elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağları etkileşimlerini destabilize ederek enzimin geri dönüşümsüz denatürasyonuna neden olurlar.

Taşıyıcı olarak çözünmeyen materyaller kullanılarak elde edilen immobilize enzimlerin ise serbest enzimlere göre çeşitli avantajları vardır. Bu avantajlar stabiliteyi arttırmak, kolayca tekrar kullanılır durumda olmak ve sürekliliği olan işlemler için uygun olmak şeklinde sıralanabilir. Belirtilen sistemler endüstriyel işlemlerde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ancak substratın katı yüzey üzerinde diffüzyona uğraması, büyük bir sorun oluşturmakta ve enzim aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. Bu problemleri ortadan kaldırmak için çözünen polimer-enzim konjugatları hazırlanmaktadır. Kitinaz, selüloz ve amilaz gibi enzimler immobilize edilmekte ve bu yolla etkili olarak kullanılmaktadır (Chen vd., 1997; Betancor vd., 2004).

Birçok peptid ve proteinlerin klinik etkileri, preteolitik enzimlerle parçalanmaları, termal kararsızlık veya immünojen özelliklerinden dolayı sınırlanmıştır. Son birkaç yıldır, proteinlerin polivinil alkol, karboksimetilselüloz, dekstran gibi çözünen polimerlere kovalent bağlanması yoluyla yeni protein taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır (Herman vd., 1993).

Polimerlerin proteinlere kovalent bağlanması için birçok metod mevcuttur, ancak amino gruplarındaki lizin artıklarının akrilasyonu bu tüm metodların temelini oluşturmaktadır. Protein-polimer konjugatlarının hazırlanması konusunda farklı stratejiler araştırılmaktadır. Modifikasyon işlemlerinde proteinin aktif bölgesinin etkilenmesi, dolayısıyla aktivitesinin azalması da mümkündür (Herman vd., 1993).

Yüksek basınç altında, yüksek veya düşük sıcaklıkta fizyolojik pH dışında pH değerine sahip ortamlarda, yüksek tuz konsantrasyonunda sonuç olarak normal dışı koşullarda yaşayan

organizmalar ve bulundurdıkları proteinlerin bu koşullarda stabil olması insanların dikkatini çekmiştir. Özellikle termofilik proteinler, bu proteinlerde katlanma ve buna dayalı fizikokimyasal özellikler, stabilite ve yüksek sıcaklıkta çalışan enzimleri dizayn etmede önemli olmuştur. Yüksek sıcaklıkta çalışan enzimler deterjan, gıda v.b., endüstrinin çeşitli alanlarında çok yararlı olmaktadır. Termofilik enzimlerin mezofilik homologlarına göre proteolize daha dayanıklı olduğu da belirlenmiştir (Balabuchevich vd., 2004; Kamalakkannan vd., 2004; Roy vd., 2005).

Suda çözünen globular proteinler sıkıca paketlenmiş gibi bir yapı göstermektedirler ve bunların iç kısmı çoğunlukla katıya benzer bir hal almıştır. Proteinlerde sıkıştırılmış gibi bir yapı bulunması stabilite açısından önemlidir. Bu nedenle, doğal olarak amino asit dizilimi ile protein üç boyutlu yapısı arasındaki bağlantı önem taşımaktadır. Genetik mühendisliği tekniklerinden faydalanarak amino asit dizilimi değiştirilmiş, dolayısıyla fizikokimyasal özellikleri farklı modifiye enzimler elde edilmektedir (Vogt vd., 1997; Collen vd., 2001; Hakamada vd., 2001; Balabuchevich vd., 2004; Kamalakkannan vd., 2004; Roy vd., 2005).

Ufak moleküllü kimyasal maddeler veya suda çözünen polimerler kullanılarak yapılan kimyasal modifikasyon işlemleri ile özellikleri değiştirilmiş enzimler elde edilebilmektedir (Abian vd., 2002; Fuentes vd., 2004). Bu şekilde üretilen, optimum sıcaklığı ve pH aralığı farklı, ortamda bulunan kimyasal maddelere dirençli enzimler çeşitli uygulamalar için yararlı olmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu da genel olarak stabilitelerinde artma sağlamaktadır. Doğal ve sentetik makromoleküllerin antijenler, antikorlar, ilaç aktif maddeleri ve enzimler ile oluşturduğu konjugatlar tıpta ve biyoteknolojinin çeşitli dallarında kapsamlı uygulama alanları bulmaktadır. Ancak α -Amilazların kimyasal modifikasyonu, substrat spesifikliğinin değişmesine neden olabilir (Ueyama vd., 1995; Mustafaev vd., 1996; Mustafaev vd., 1996; Karşıl原因 vd., 1997; Mustafaev vd., 1998; Dilgimen, 2001).

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- Precisa BJ 6100D, Kaba terazi
- Precisa XB 220A, Hassas terazi
- Millipore F4SN77678, Saf su cihazı
- Heidolph MR 3001, Manyetik karıştırıcı
- Inolab, pH metre cihazı
- BioRad, Protein saflaştırma cihazı
- JASCO V-530, UV-Visible Spektrofotometre
- Millipore Stirred Ultrafiltration Cell Model 8010, Ultrafiltrasyon Sistemi
- GFL 1086, Çalkalamalı su banyosu
- Telstar Cryodos, Liyofilizatör
- Shimadzu Program Class VP, HPLC sistemi
- Viscotek 4 detektörlü SEC-HPLC-GPC, GPC sistemi
- Scotssman AF-100, Kar makinesi
- Perkin Elmer, FTIR
- Perkin Elmer, Universal ATR Sampling Accessory

Kullanılan malzemeler:

- Otomatik pipet: Finn timer 0-50 µl, 100-1000 µl, 1-10 ml
- Beher: 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
- Schlifli erlen: 50 ml
- Penisilin şişeleri

3.1.1.1 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde sabit faz olarak belli büyüklükte gözenekleri olan çapraz bağlı polimerler kullanılır. Polimerler farklı boylardaki moleküllerin bir karışımıdır. Ufak moleküller gözeneklerde daha uzun süre kalacakları için kolonu geç terk edeceklerdir. Molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi kısalacak ve sistemden daha çabuk ayrılacaklardır. Detektör de farklı zamanlarda çıkan molekülleri saptayıp kromatograma dönüştürecektir. Bu yöntemin en önemli özelliği ayırmanın tamamen fiziksel olarak yapılmasıdır

Kolon: Silika jel kolon (LC column Shim Pack Diol-300)

Boyut: 7,9mm x 50cm

Akış hızı: 1 ml/dak

Dedektör: UV-VIS detektör (SPD-10AV)

Mobil faz: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN₃

Kolon sıcaklığı: 25 °C

Dalga boyu: 280 nm

3.1.1.2 Kullanılan Viscotek Marka GPC sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Viscotek cihazı dolgu kolon kullanılan bir kolon sıvı kromatografisi yöntemidir. Viscotek cihazında sıvı hareketli faz yüksek basınçta ufak tanecikli hareketli faz üzerinde hareket ettirilmektedir. Bu tekniğe yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmektedir.

Viscotek cihazı üç bölümden oluşur:

1. Numune hazırlama ve pompa bölümü

Viscotek GPCmax VE2001 GPC SOLVENT / SAMPLE MODULE

2. Kolon ve dedektör kısmı

Viscotek TDA 302 Triple Detector Array (RI, LS, VIS), UV.

3. Bilgisayar kısmı

Yazılım adı: Omnisec 3.1 programı.

Viscotek cihazında poröz tipli kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Poröz kolonlar içindeki dolgu maddesinin taneciklerinin çapı 3–10 µm arasında değişmektedir.

Kolon 1: Shim-Pack Diol 300 (Silika dolgulu kolon)

Akış hızı: 1ml/dak

Boyut: 7,9mm x 50 cm

Kolon 2: TOSOH G 3000 SWXL (Silika dolgulu kolon)

Akış hızı: 0,8ml/dak

Boyut: 7,8 mm x 30cm

Mobil faz: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN₃

Kolon sıcaklığı: 25 °C

Dalga boyu: 280 nm

3.1.1.3 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometrenin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Protein ve nükleik asitlerin konsantrasyonlarının hesaplanmasında UV-VIS spektroskopisinin kullanımı oldukça bilinen bir yöntemdir.

Tek renkli ve I_0 şiddetindeki ışık demeti kalınlığı 1 cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki moleküller tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Bu azalma Lambert-Beer eşitliği ile ifade edilir.

$$\log I_0 / I = \epsilon bc = A \quad (2.1)$$

Burada c mol/lt cinsinden derişimi, ϵ lt/mol.cm cinsinden molar sönümlenme katsayısını ve b de cm cinsinden örnek kabının kalınlığını temsil etmektedir. A'ya ise absorbans denir.

Optik Sistem: Monokromatör

Dedektör: Silikon fotodiod (S1337)

Işık kaynağı: Döteryum lamba: 190–390 nm

Halojen lamba: 390–1100 nm.

3.1.1.4 Kullanılan Protein Saflaştırma Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Proteinler “fraksiyonlara ayırma” prosedürleriyle saflaştırılmaktadırlar. Bir dizi bağımsız basamaklarla, proteinlerin çeşitli fizikokimyasal özelliklerinden yararlanılarak, proteinler diğer maddelerden ayrılabilir. Burda önemli olan ayrılması istenen protein kaybını minimuma indirmekten çok, karışımın diğer bileşenlerinden seçici olarak ayırmaktır.

Maddeyi tamamen saf olarak elde etmek mümkün olmayabilir. Bununla beraber, saflığın kanıtlanması için bazı metotlar gerekir: bütün uygun yöntemlerle, sadece bir bileşen içeren örneğin açıklanması. Ancak yeni ayırma tekniklerinin tasarlanmasıyla, saflık standartlarının değiştirilmesi gerekebilir. Bir maddenin örneği saflaştırılıp yeni ayırma tekniği olarak düşünüldüğünde, bunun birçok bileşeninin karışımı olduğu bulunabilir. Proteinler ve diğer biyomoleküllerin karakteristikleri, çeşitli ayırma tekniklerinin varolmasını sağlamaktadır. Bunlar: çözünürlük, iyonik yük, molekül boyutu, adsorpsiyon özellikleri ve afinitedir.

UV monitör: Biorad Econo (model EM-1)

Fraksiyon toplayıcı: Biorad model 2110 fraction collector

Yazıcı: Biorad chart recorder model 1327

Pompa: Biorad Econo pump (model EP-1)

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
<i>Aspergillus oryzae</i> α -Amilaz	Fluka	10065
Nişasta	Fluka	85643
3,5-DNS	Fluka	42260
Na-K Tartarat	Fluka	60413
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haen	04269
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Fluka	71647
NaCl	Riedel-de Haen	13423
Dekstran (Leuconostoc mesenteroides' den elde edilen) M _w ~60.000-90.000	Sigma	D3759
Dekstran M _w =188.000	Sigma	D-4876
“Sephadex G-50”	Fluka	84946
NaOH	Riedel-de Haen	06203
NaIO ₄	Fluka	71862
NaBH ₄	Merck	S3912873 403
Diyaliz Tüpü Selülozik Membran	Sigma	D9777-BULK

3.2 Satın Alınan α -Amilazın Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Satın alınan α -Amilaz enzimi (protein içeriği % 16,5) jel filtrasyon kromatografisi ile BioRad marka protein saflaştırma sisteminde saflaştırıldı. Safsızlık içeren 1.2 g α -Amilaz 10 ml 0.01 M, pH 7 tuzsuz fosfat tamponunda çözündü. α -Amilaz boyutları 2,5 cm $\times$ 40 cm olan Sephadex G-50 dolgu maddesi içeren jel filtrasyon kolonuna verildi ve UV monitör ile 280 nm’de izlenerek fraksiyonlara ayrıldı (Şekil 4.1). Saf α -amilaz bulunduran fraksiyonlardan elde edilen havuz ultrafiltrasyon sistemi ile konsantre edildi.

3.3 α -Amilazın İzoelektrik Noktasının Tayini

Satın alınan α -amilaz enziminden 5 mg tartıldı ve 5 ml PBS tamponunda çözöldü. Bu enzim çözeltisine HCl ilave ederek pH 2’ye ayarlandı. 0,1N NaOH çözeltisinden 25’er μ l eklenerek titre edildi. Damlatılan her NaOH sarfiyatında çözeltinin pH değeri okundu. pH ile ilave edilen NaOH sarfiyatı arasında çizilen grafikten α -amilazın izoelektrik noktası belirlendi (Şekil 4.2).

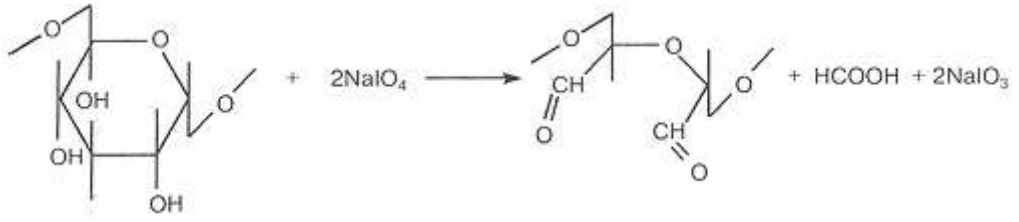
3.4 Dekstranın Aldehid Türevinin Eldesi

Kullanılan Çözeltiler

- 1) Dekstran çözeltisi: 3,33 g Dekstran 30ml destile suda çözölerek hazırlandı.
- 2) Sodyum periyodat çözeltisi: 8.00 g NaIO₄ 70ml destile suda çözölerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

- 1) Dekstran çözeltisinin üzerine NaIO₄ çözeltisi yavaş olarak ve karıştırılarak eklendi.
- 2) Elde edilen bu çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı.
- 3) Oluşan dekstranın aldehit türevi ile birlikte ortamda bulunan iyonları uzaklaştırmak için reaksiyon çözeltisi 24 saat oda sıcaklığında, karanlıkta destile suya karşı diyalize bırakıldı.
- 4) Soğutarak kurutma ile (liyofilizatörde) katı dekstran aldehit türevi elde edildi (Sacco, 1988; Betancor, 2004; Dobrenchenko, 1993).



Şekil 3.1 Dekstranın sodyum periyodat ile aldehit türevine yükseltgenmesi.

3.5 α-Amilazın Aktivite Tayini

3.5.1 Çözeltilerin Hazırlanması

A) Tampon Çözeltiler:

- 1) 0,1N Sitrat tamponu (pH 2).
- 2) 0,05N Asetat tamponu (pH 3; pH 4 ve pH 5 olan tampon çözeltiler hazırlandı).
- 3) 0,05N Fosfat tamponu (pH 6; pH 7 ve pH 8 olan çözeltiler hazırlandı).

B) 1.0%(W/V) Nişasta çözeltisi:

0.25 g/ 25 ml nişasta yukarıda verilen tampon çözeltilerde, bir beherde karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtıldı. Kaynama noktasında 15 dakika süreyle ısıtmaya devam edildi.

C) 5.3 M Sodyum-Potasyum Tartarat:

11,965 g Na-K tartarat, 8 ml 2M NaOH'de yavaş olarak sürekli karıştırma ve hafifçe ısıtarak çözüldü. Literatürde bu çözeltinin kaynama noktasına kadar kesinlikle ısıtılmaması konusunda uyarı bulunmaktadır (Gonzalez vd., 2002).

D) 9.6mM 3,5-Dinitrosalisilikasid:

0.4379 g 3,5-dinitrosalisilikasid 20ml destile suda çözüldü. Çözünmeyi kolaylaştırmak için yavaş ve sürekli karıştırma ile birlikte ısıtma yapıldı. Literatürde bu çözeltinin kaynama noktasına kadar kesinlikle ısıtılmaması konusunda uyarı bulunmaktadır (Gonzalez vd., 2002).

E) Renk Reaktif Çözeltisi:

20ml D çözeltisine 8ml C çözeltisinin yavaş olarak ve karıştırılarak eklenmesi ile hazırlandı. Bu çözelti renkli şişede saklanmalıdır. Çözeltinin kullanılma süresi 6 aydır.

F) 0.2% (W/V) Maltoz Standard Çözeltisi:

0.02 g Maltoz 10ml destile suda çözünerek hazırlandı.

G) α -Amilaz Çözeltisi:

1 ünite(0,00025g) amilaz 100ml destile suda çözüldü.

3.5.2 α -Amilaz Aktivitesinin Tayini**Deneyin Yapılışı**

	TEST	BLANK
1.A) Nişasta çözeltisi	1ml.	1ml.
25°C'deki banyonun içine yerleştirilmiş 50ml'lik iki erlene alındı.		
B) α -Amilaz enzim çözeltisi	1ml.	
A' da belirtilen erlenlere ilave edildi, karıştırıldı ve tam 3 dakika süreyle 25°C'lik su banyosunda bekletildi.		
C) Daha sonra renk reaktif çözeltisinden	1ml.	1ml.
eklendi.		
D) α -Amilaz enzim çözeltisinden de aynı erlenlere		1ml.
Eklendi, çözeltilerin bulunduğu erlenler kapaklarıyla kapatıldı ve tam 15 dakika kaynama noktasındaki su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda çözeltiler oda sıcaklığına kadar soğutuldu.		
E) İşlemin devamında erlenlere destile su	9ml.	9ml.
eklendi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra UV-VIS Spektrofotometre ile test çözeltisinin		

540 nm'deki absorbansı köre(blank'e) karşı okundu (Gonzalez, vd., 2002).

2.A) Aşağıdaki tabloda verilen çözeltiler ve kör(blank) uygun erlenlere alındı.

Çizelge 3.1 Maltoz standartlarının hazırlanması

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
Maltoz çöz F	0,2 ml.	0,4 ml.	0,6 ml.	0,8 ml.
Deiyonize su	1,8 ml.	1,6 ml.	1,4 ml.	1,2 ml.
Renk reak. E	1 ml.	1 ml.	1 ml.	1 ml.

	Std 5	Std Blank		
Maltoz çöz F	1 ml.	0		
Deiyonize su	1 ml.	2 ml.		
Renk reak. E	1 ml.	1 ml.		

B) Bu çözeltiler tam 15 dakika kaynama noktasındaki su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda çözeltiler buz banyosu kullanılarak oda sıcaklığına kadar hızla soğutuldu.

C) Çözeltiler soğutulduktan sonra her birine 9 ml. destile su ilave edildi.

D) Her bir çözeltinin blank'e karşı absorbansı okundu ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

Hesaplamalar:

Çözelti F:

0,2 gr. 100 ml.

X 1 ml.

 $X = 0,002 \text{ g/ml}$ maltoz

Std. 1

1 ml'de 0,002 gr maltoz

0,2 ml'de y

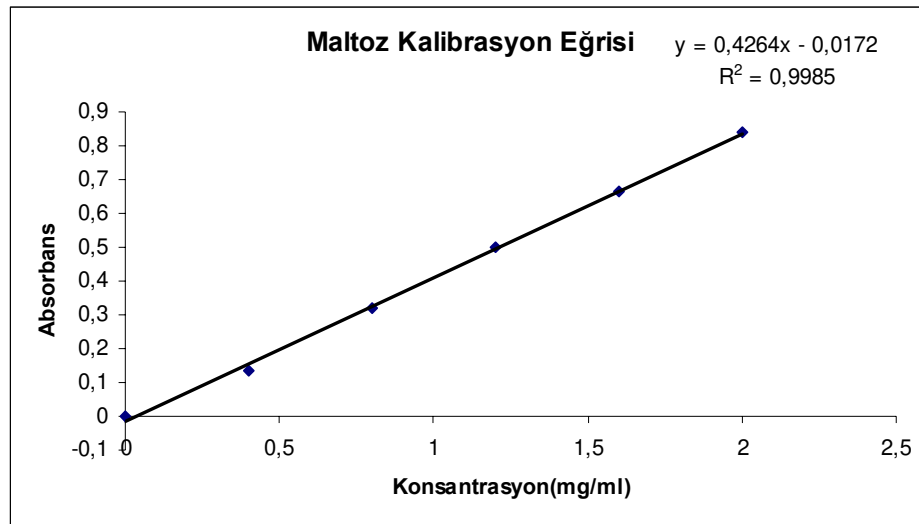
 $y = 0,0004 \text{ g}$ Std. 2 $y = 0,0008 \text{ g} \rightarrow 0,8 \text{ mg.}$ Std. 3 $y = 0,0012 \text{ g} \rightarrow 1,2 \text{ mg.}$ Std. 4 $y = 0,0016 \text{ g} \rightarrow 1,6 \text{ mg.}$ Std. 5 $y = 0,002 \text{ g} \rightarrow 2,0 \text{ mg.}$

Uygulanan yöntem ile ilgili literatürde verildiğine göre, 1 mg maltozu açığa çıkaracak amilaz miktarı 1 ünite'dir (1 ünite/ml). Ayrıca bu işlemde,

1 mg maltozu açığa çıkaracak α -amilaz miktarı std 2 ile std 3 arasında olmalıdır.

Çizelge 3.2 Maltoz standartları.

STANDARTLAR	ABSORBANS
Std. 1	0,1339
Std. 2	0,3177
Std. 3	0,4991
Std. 4	0,666
Std. 5	0,8383



Şekil 3.2 Maltoz kalibrasyon eğrisi

Regresyon Katsayısı: 0,9985

Eğri denklemleri:

$$y = 0,4264x - 0,0172$$

$x = 1$ mg maltoz için; $y = 0,4092 = A$ (1 ünite enzimin absorbansı)

İşlem görmemiş ve saflaştırılmış enzimın aktivitesi pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C’de zamana karşı tayin edildi.

pH 2 olan 0,1N Sitrik asit tamponu içinde hazırlanan 0,00025 g/25 ml amilaz enzim çözeltisi ve %1'lik nişasta çözeltisi ile yapılan denemede, 540nm'deki absorbans 0.1367 olarak okundu.

1 ünite enzim absorbansı 0,4092

x	0,1367
---	--------

$x = 0,334$ unite

Denemelerde 0,00025g/25 ml enzim çözeltisi kullanıldı.

0,25mg enzim 25 ml

x 1 ml

x = 0,01 mg enzim

0,01 mg 0,334 unite

1 mg x

$$x = 33,4 \text{ ünite/mg}$$

Aktivite: 33,4 U/mg olarak hesaplandı

3.6 Alfa Amilaz-Dekstran Kovalent Konjugatlarının Sentezi

Gerekli miktarda dekstranın aldehid türevini bulunduran çözeltiye yeterli miktar saflaştırılıp konsantre edilen alfa-amilaz çözeltisi eklendi ve 25 °C'deki su banyosunda 16 saat süreyle bekletildi. Bu süre sonunda oluşan Schiff bazı NaBH₄ eklenerek indirgendi. Çalışmada M_w~ 75000 ve M_w= 188 000 olan dekstranlar kullanılarak farklı mol oranlarında konjugatların sentezi gerçekleştirildi.

Bu işlemler için gerekli polimer miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{C_{\text{prot}} \times M_{A \text{ pol}}}{C_{\text{pol}} \times M_{A \text{ prot}}}$$

$$C_{\text{prot}} = (10/5) \text{ mg/mL}$$

$$M_{w \text{ pol}} \sim 75000$$

$$M_{w \text{ prot}} = 51000$$

Oran 1/1 için;

$$\frac{1}{1} = \frac{(10/5) \times 75000}{C_{\text{pol}} \times 51000}$$

$$C_{\text{polimer}} = 2,94 \text{ mg/ml}$$

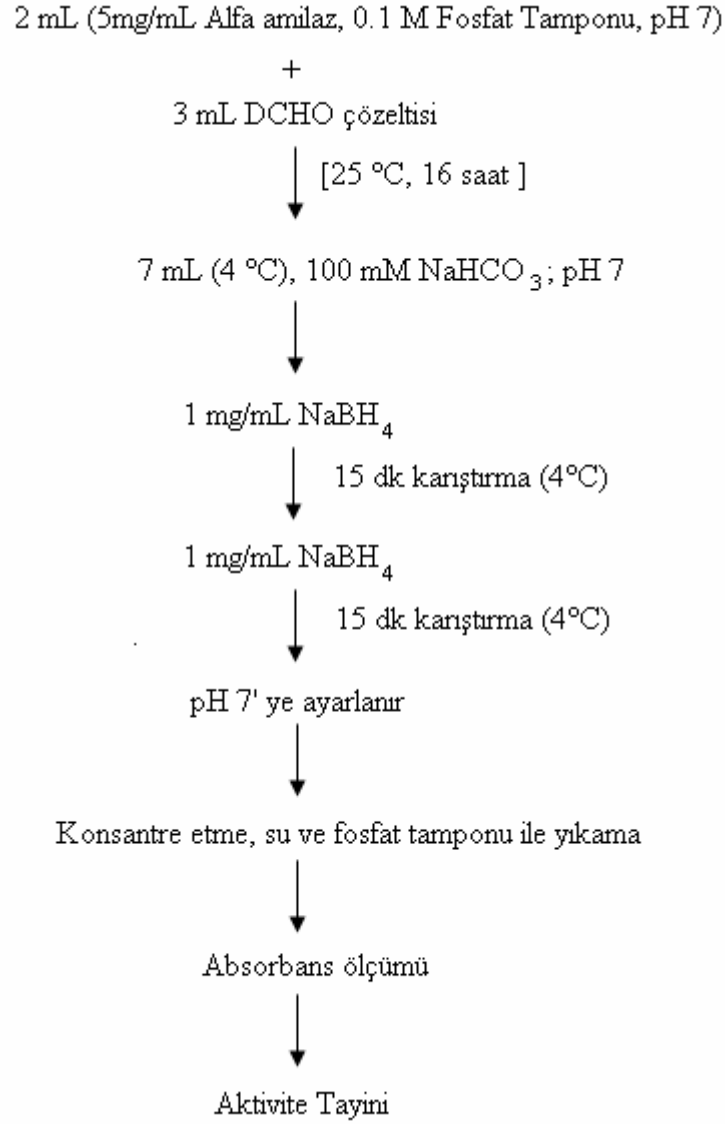
Çizelge 3.8 C_{protein} : 2 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan polimer (Dekstran)($M_w \sim 75000$) konsantrasyonları

$n_{\alpha\text{-amilaz}}/n_{\text{DCHO}}$	C_{polimer} (Dekstran) (mg/ml)
1/1	2,94
1/10	29,4
1/20	58,8
1/30	88,2
10/1	0,294
20/1	0,147
30/1	0,098

Çizelge 3.9 C_{protein} : 2 mg/ml konsantrasyonu sabit alınarak hesaplanan polimer (Dekstran)($M_w=188000$) konsantrasyonları

$n_{\alpha\text{-amilaz}}/n_{\text{DCHO}}$	C_{polimer} (Dekstran) (mg/ml)
1/1	7,37
1/10	73,7
1/20	147,45
1/30	221,18
10/1	0,737
20/1	0,37
30/1	0,246

Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatları Elde Edilmesi için Uygulanan Çalışma Şeması:



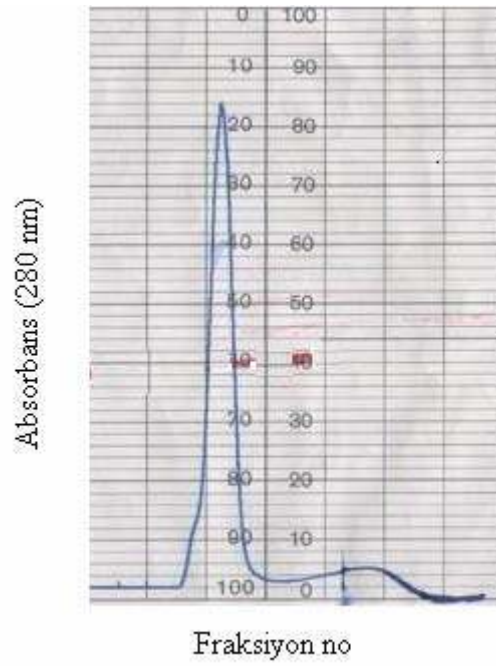
3.7 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının Aktivitelerinin Tayini

Farklı oranlı Alfa Amilaz-Dekstran kovalent konjugatlarının, daha önce satın alınan enzim için uygulanan yöntemde olduğu gibi, pH 7'de sıcaklığa göre zamana bağlı olarak aktiviteleri tayin edildi (Çizelge 4.4, 4.6, 4.8, 4.10, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Satın Alınan Alfa Amilazın saflaştırılması

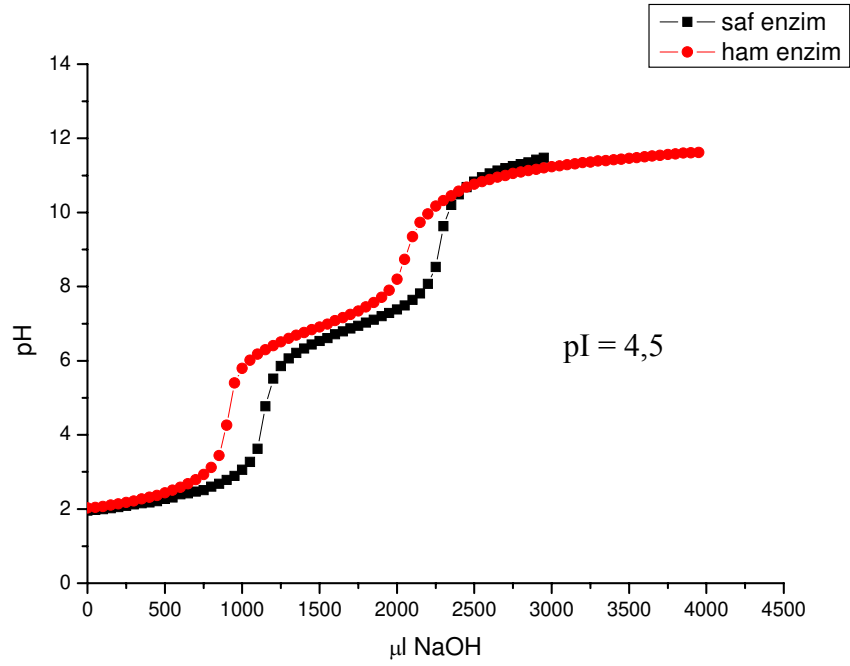
Satın alınan α -amilaz, 5 cm x 40 cm boyutlarındaki kolona Sephadex G-50 dolgu maddesi doldurularak, jel filtrasyon kromatografisi yöntemine göre UV monitörlü protein saflaştırma sisteminde saflaştırıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 α -Amilaz enziminin protein saflaştırma sisteminde fraksiyonlara ayrılması sırasında UV dedektör ile alınan kromatogram

4.2 Alfa-Amilazın İzoelektrik Noktasının Tayini

Satın alınan ve saflaştırılan *Aspergillus oryzae* α -amilazının izoelektrik noktası tayin edildi. Bunun için enzim çözeltileri 0,1 N NaOH ile titre edilirken pH değerleri okundu. Çizilen grafikten enzim örneklerinin pI değeri yaklaşık 4.5 olarak belirlendi (Şekil 4.2).

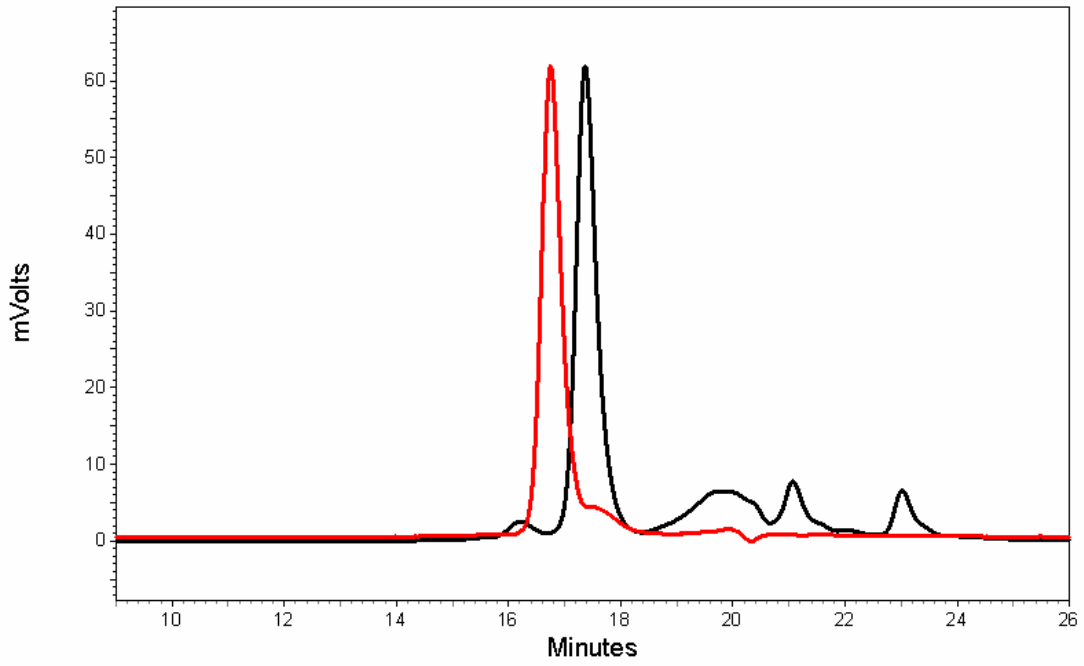


Şekil 4.2 Satın alınan ve saflaştırılan α -Amilaz çözeltilerinin pH değerlerinin NaOH sarfiyatına göre değişmesi.

4.3 Satın Alınan ve Saf Alfa-Amilazın HPLC ve GPC Kromatogramları

Satın alınan enzimin HPLC ve GPC kromatogramlarında safsızlıklar gözlemlendi. Saflaştırma işleminden sonra alınan kromatogram daha öncekinden farklı olarak dar bir pik şeklinde elde edildi. Kolondan farklı sürelerde gelen ve pikler oluşturan diğer maddeler olmaması enzimin uygulanan işlem ile saflaştırıldığını gösterdi (Şekil 4.3, 4.4a, 4.4b, 4.4c.4.4d).

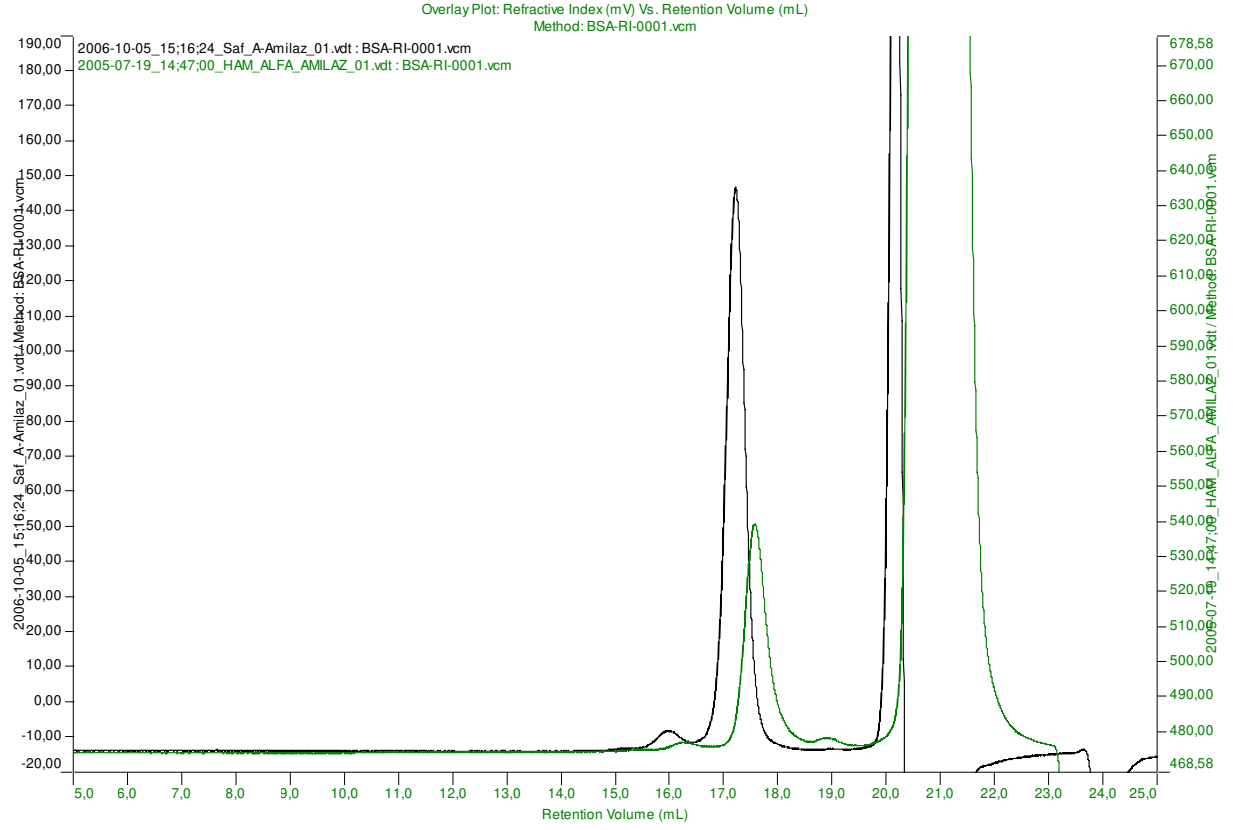
4.3.1 HPLC Sonuçları



Şekil 4.3 Saflaştırılan ve satın alınan α -amilazın HPLC kromatogramları

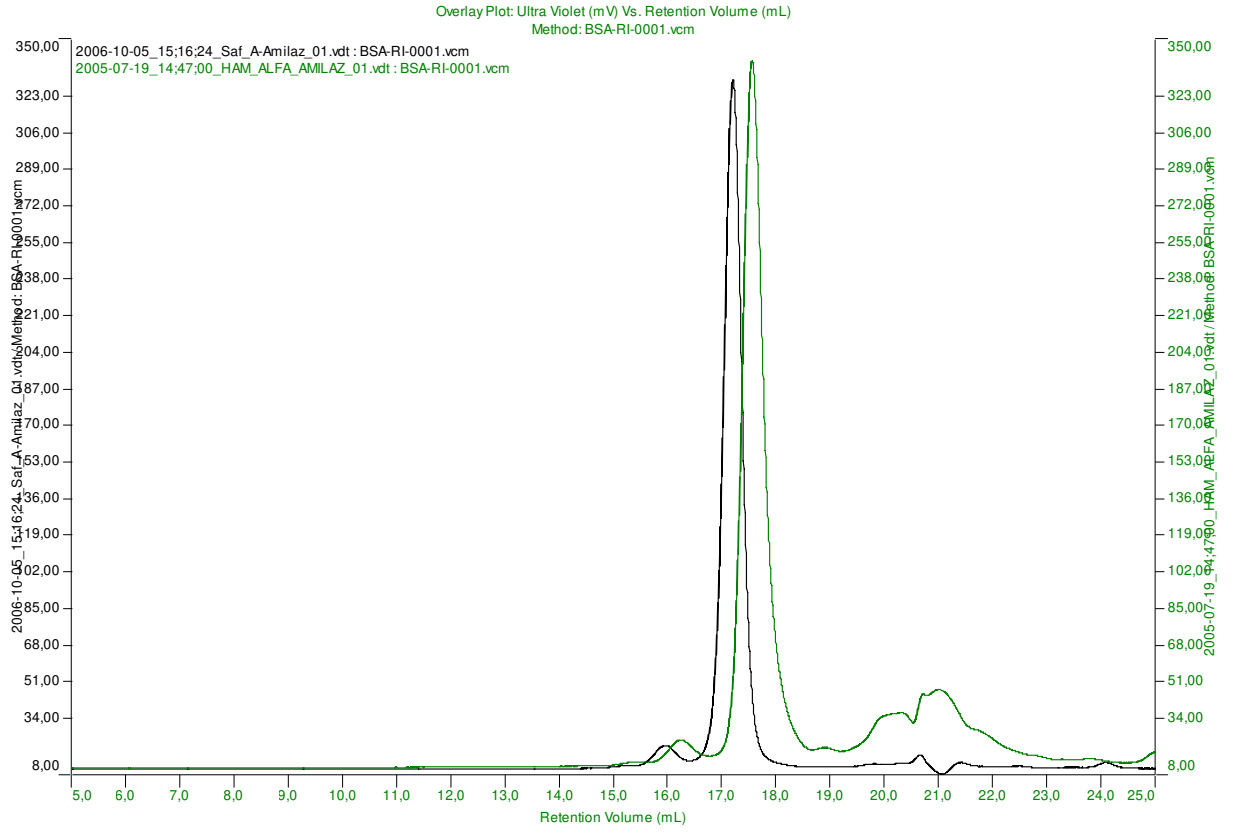
— Satın alınan Alfa Amilaz , — Saf Alfa Amilaz

4.3.2 GPC Sonuçları



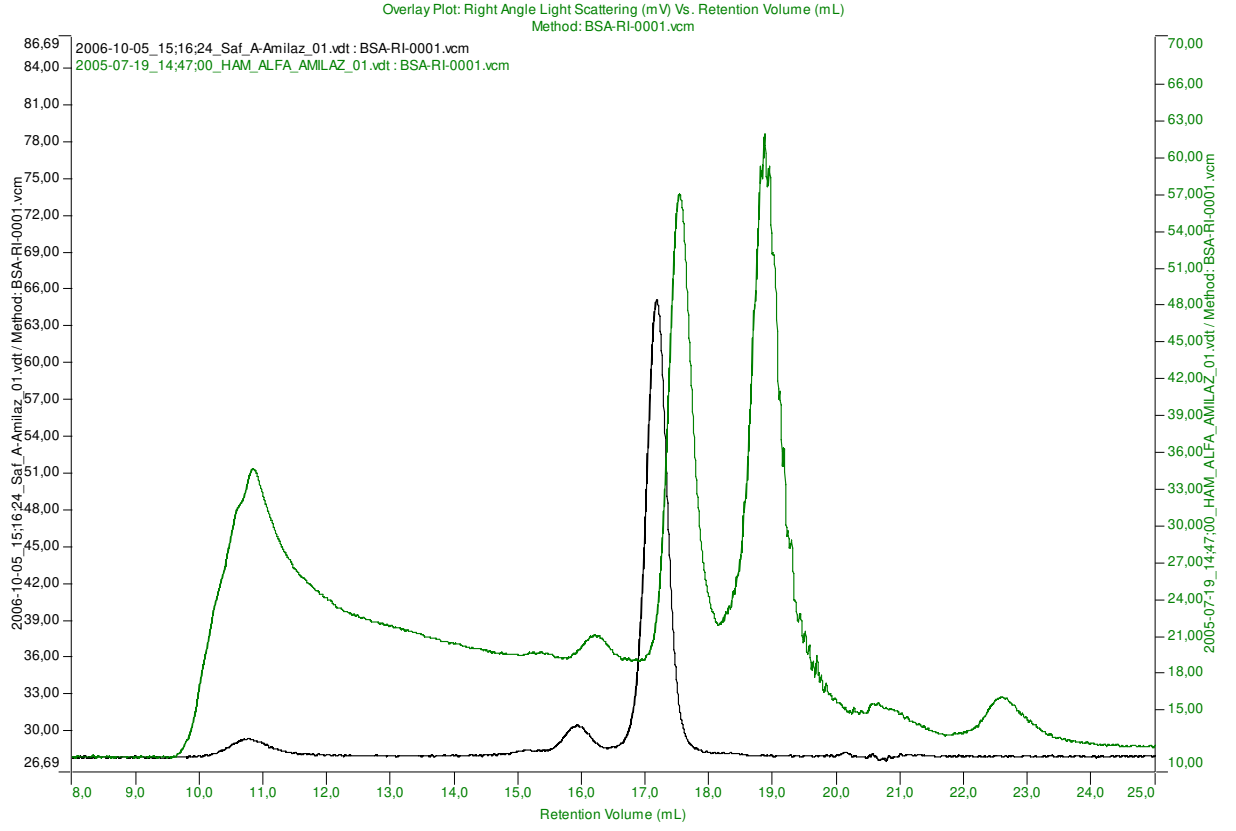
Şekil 4.4a Satın alınan ve saflaştırılan α -amilazın Viscotek cihazında RI dedektöründen alınan kromatogramları.

— Saf Alfa Amilaz, — Satın alınan Alfa Amilaz



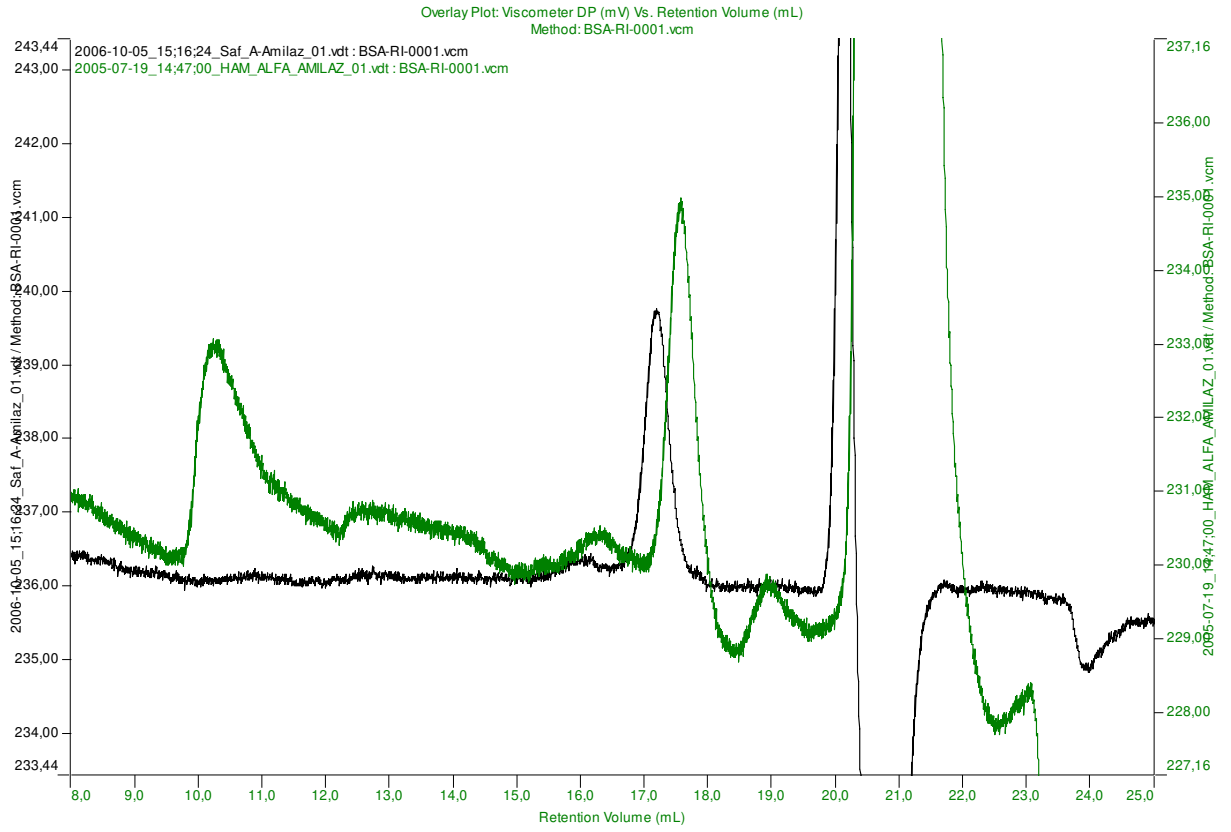
Şekil 4.4b Satın alınan ve saflaştırılan α -amilazın Viscotek cihazında UV dedektöründen alınan kromatogramları.

— Saf Alfa Amilaz, — Satın alınan Alfa Amilaz



Şekil 4.4c Satın alınan ve saflaştırılan α -amilazın Viscotek cihazında LS dedektöründen alınan kromatogramları

— Saf Alfa Amilaz, — Satın alınan Alfa Amilaz

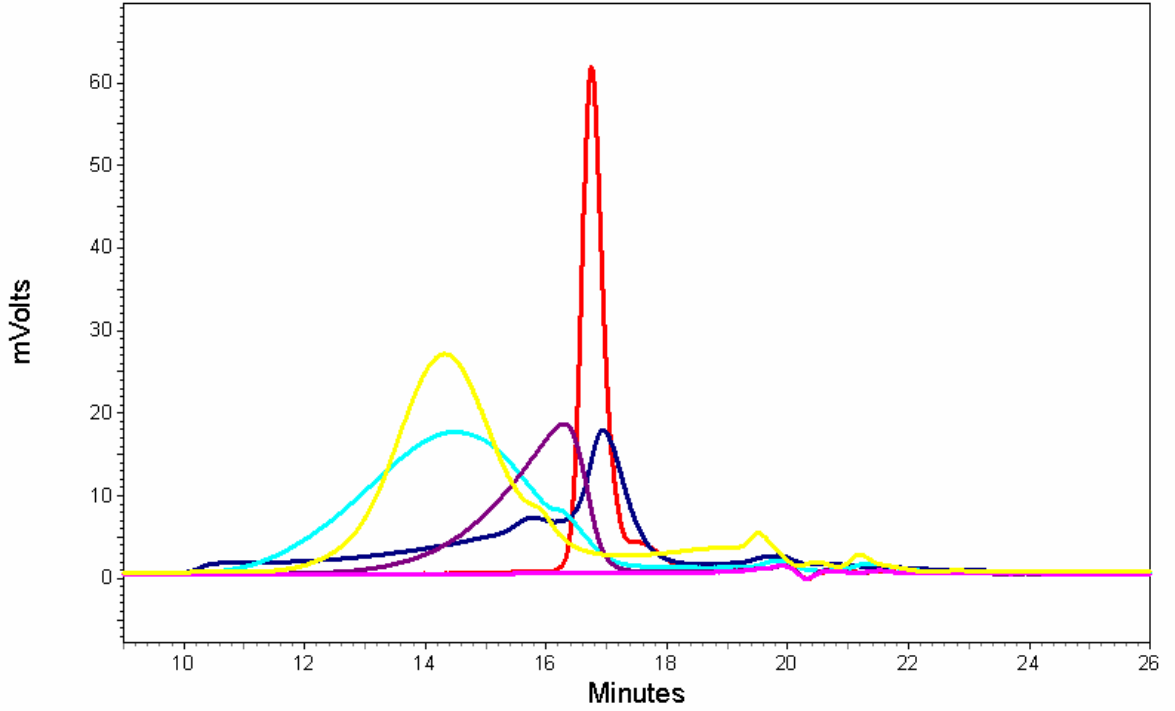


Şekil 4.4d Saflaştırılan ve satın alınan α -amilazın Viscotek cihazında viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları

— Saf Alfa Amilaz, — Satın alınan Alfa Amilaz

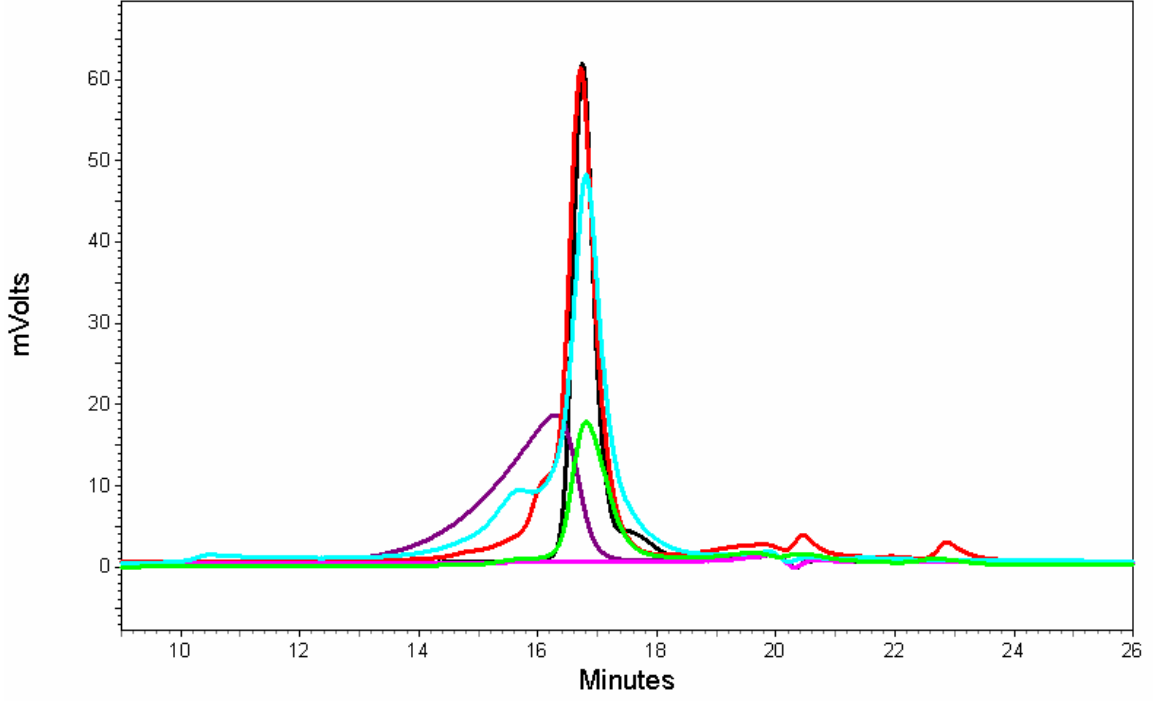
4.4 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının ve Saf enzimin HPLC Yöntemi ile İncelenmesi

$M_w \sim 75000$ olan dekstran ile Farklı mol oranlarında sentezlenen alfa amilaz-dekstran konjugatları HPLC yöntemi ile alınmış ve kıyaslanmıştır (Şekil 4.5a ve 4.5b).



Şekil 4.5a α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının HPLC kromatogramları

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/10$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/20$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/30$, — DCHO

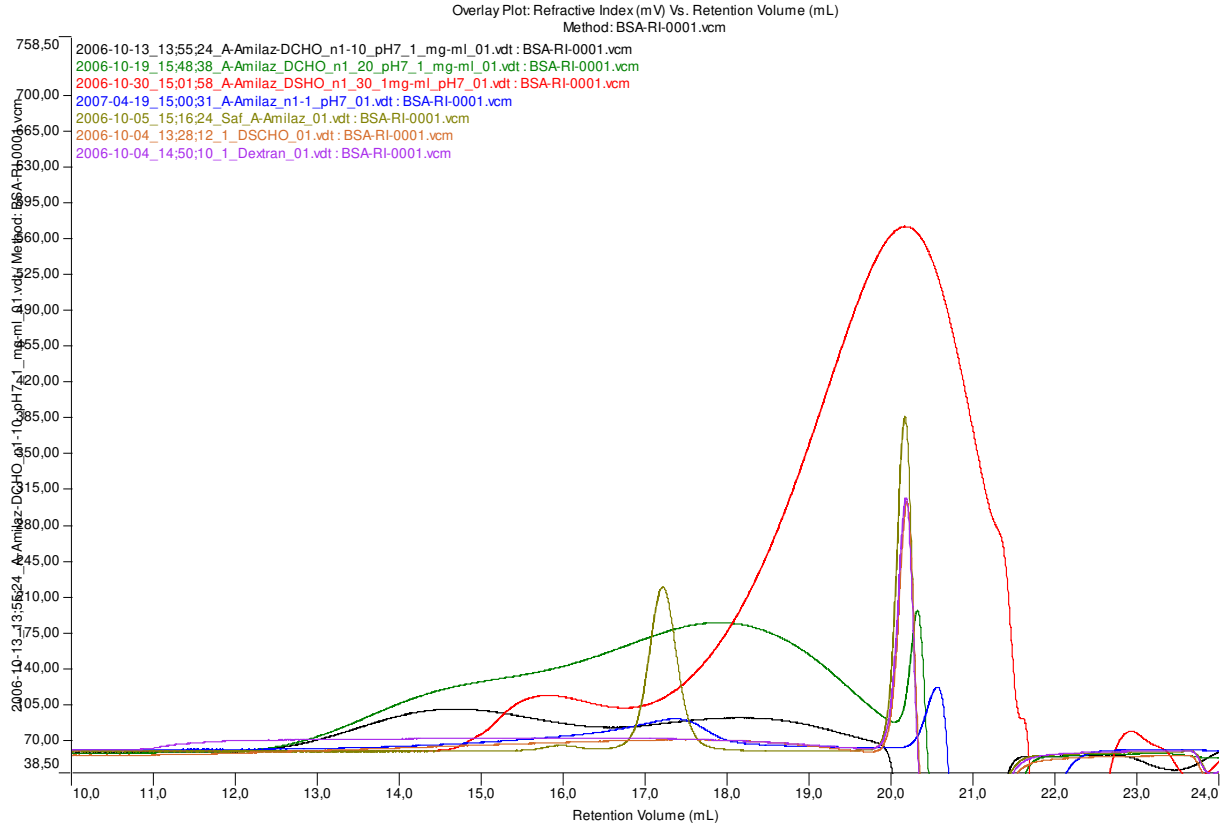


Şekil 4.5b α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının HPLC kromatogramları

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 10/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 20/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 30/1$, — DCHO.

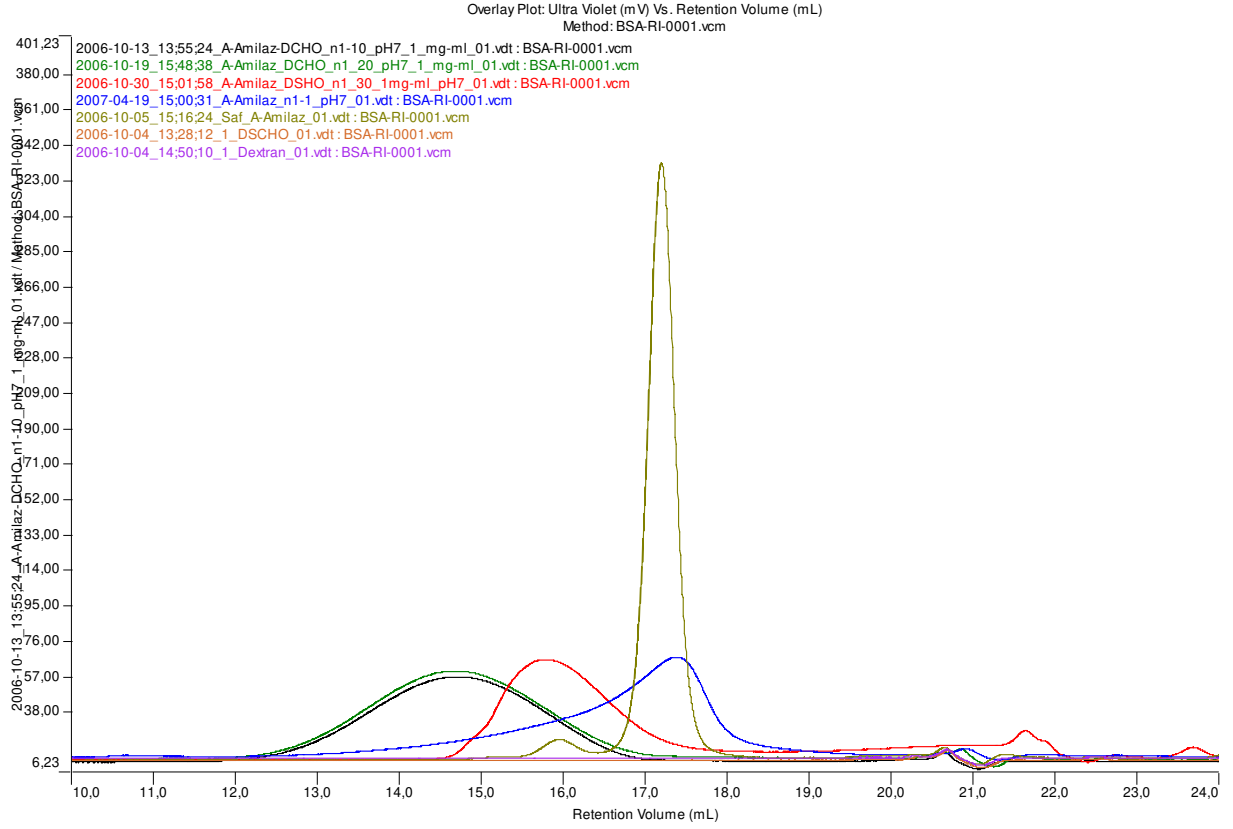
4.5 $M_w \sim 75\ 000$ olan Dekstranla Sentezlenen Alfa Amilaz Dekstran Konjugatlarının Dört Dedektörlü GPC Sistemi ile İncelenmesi

Farklı mol oranlarında sentezlenen konjugatların ve saf enzimin kromatogramları alınıp kıyaslanmıştır (Şekil 4.6a, 4.6b, 4.6c, 4.6d, 4.6e, 4.6f, 4.6g, 4.6h).



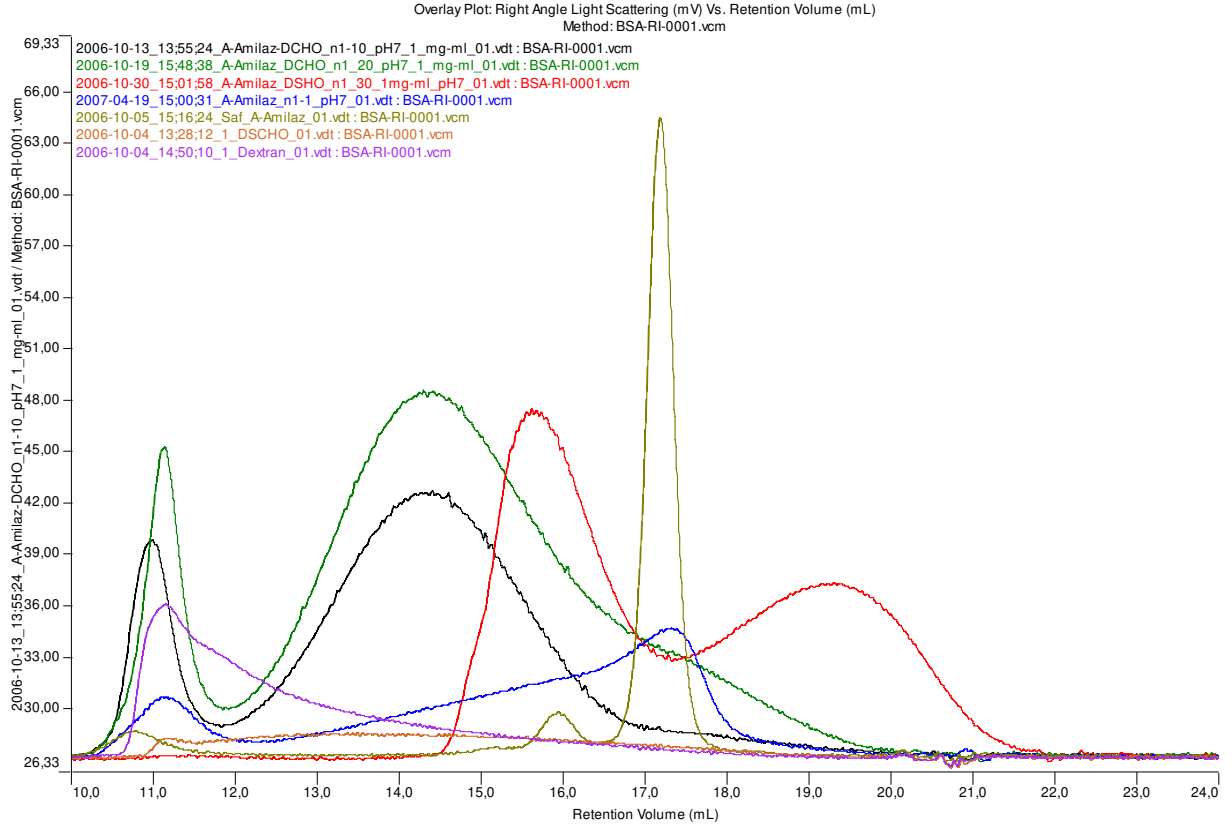
Şekil 4.6a α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında RI dedektöründen alınan kromatogramları.

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/10$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/20$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/30$, — DCHO, — Dekstran.



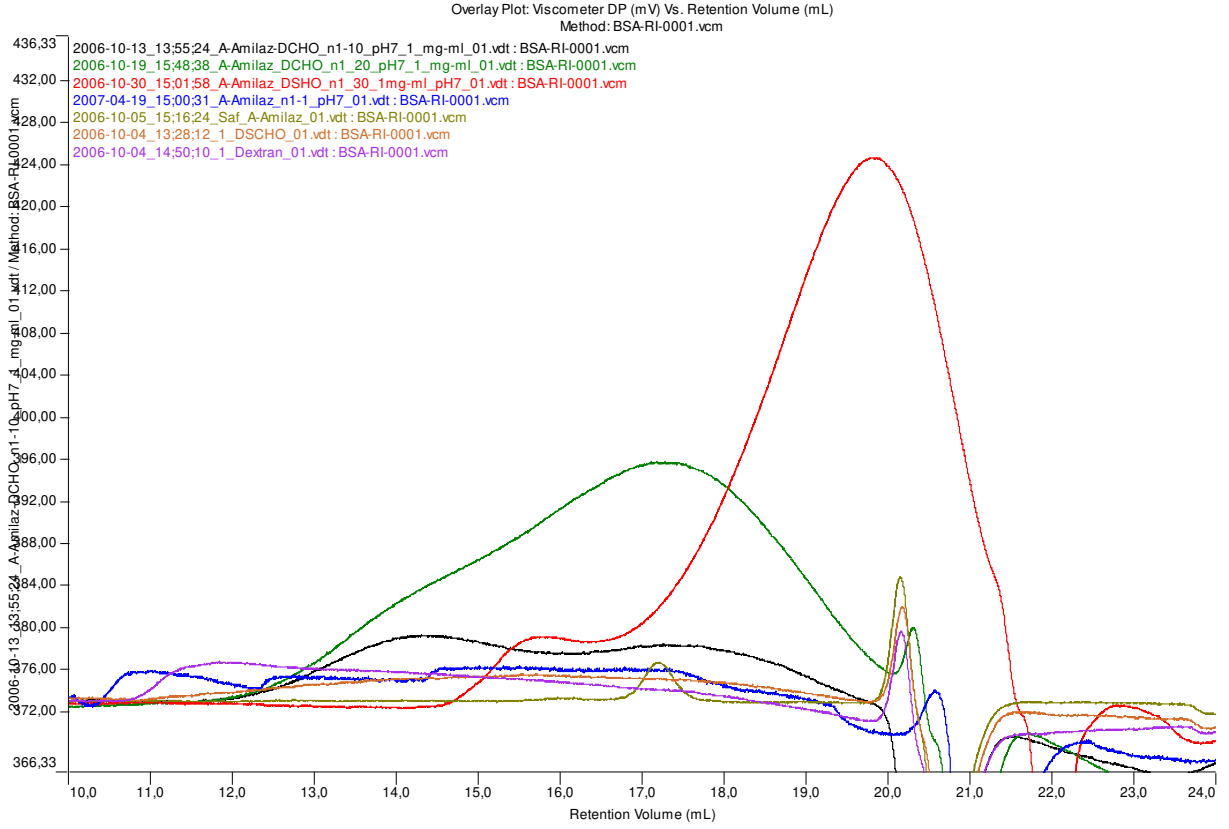
Şekil 4.6b α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında UV dedektörü ile alınan kromatogramları.

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/10$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/20$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/30$, — DCHO, — Dekstran.



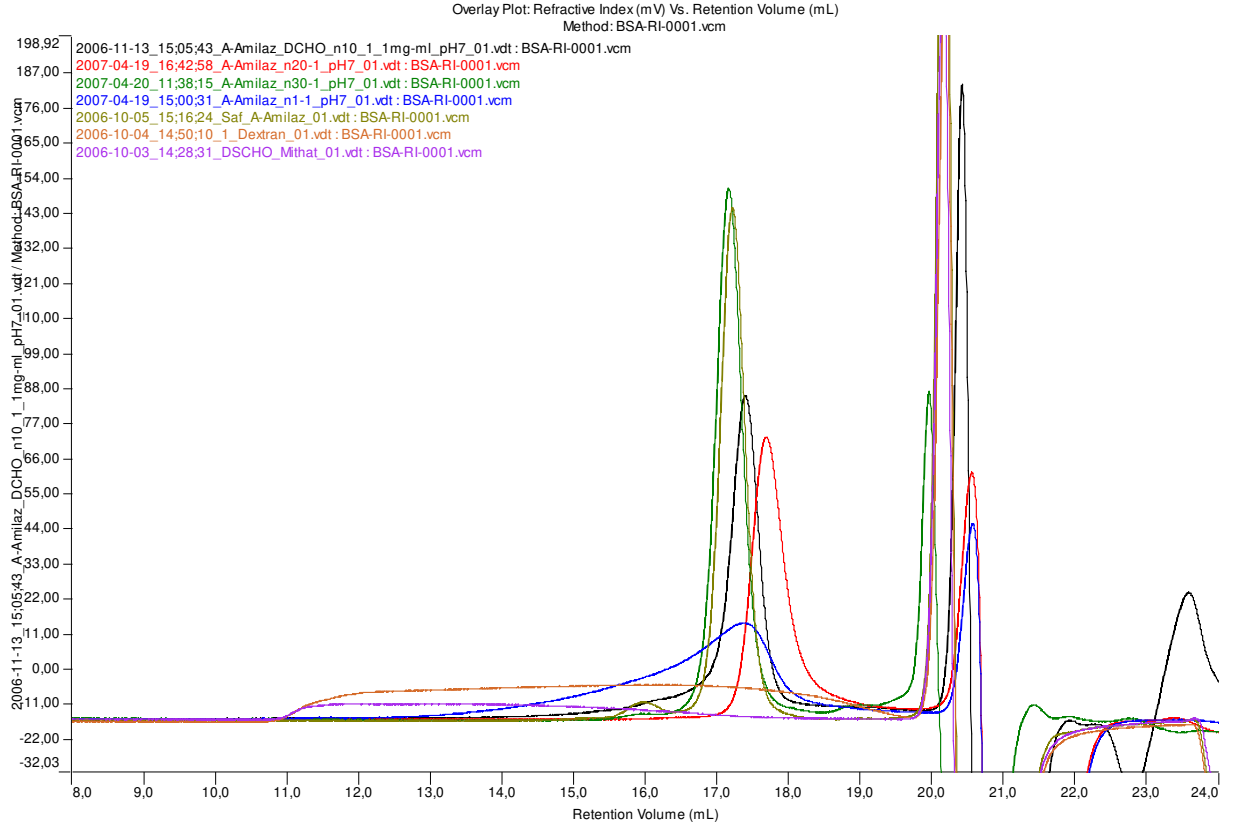
Şekil 4.6c α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında LS dedektörü ile alınan kromatogramları

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-Dekstran $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO
 $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/10$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/20$, — α -Amilaz-
 DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/30$, — DCHO, — Dekstran.



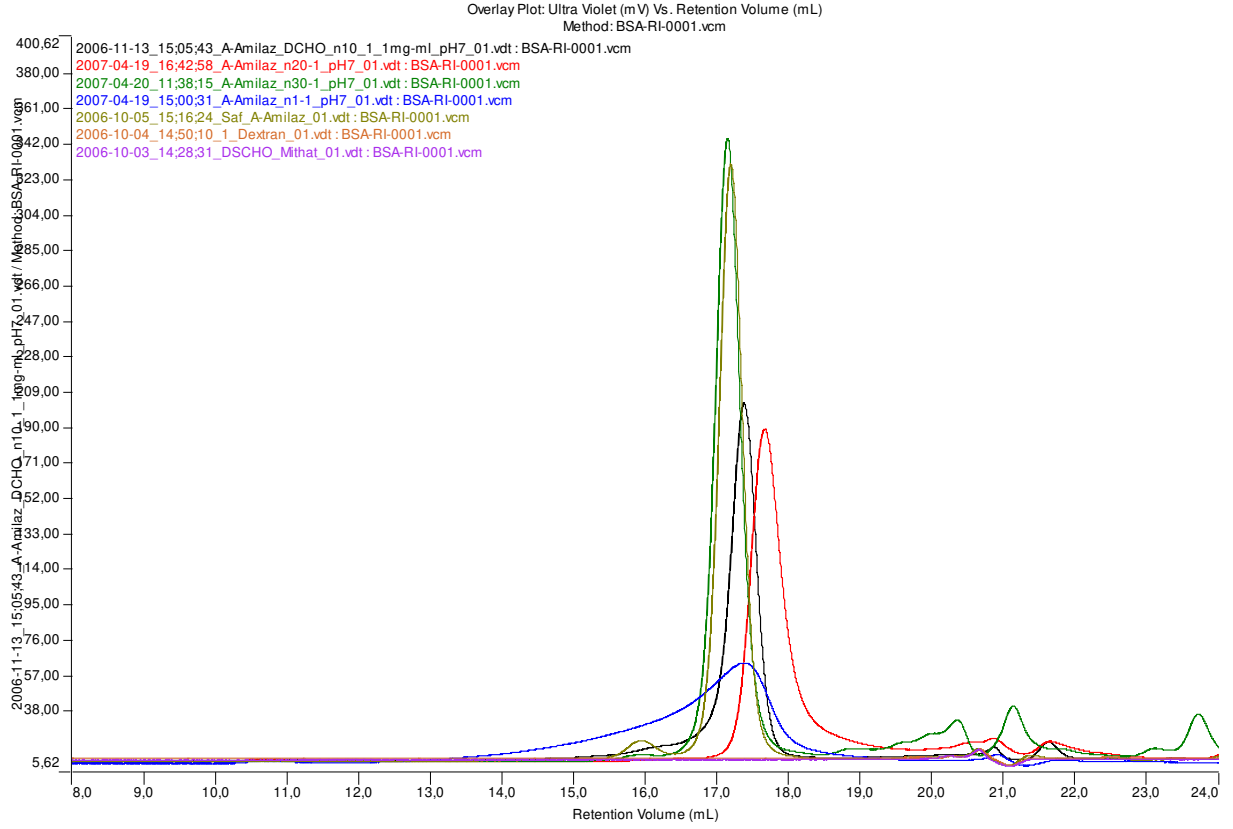
Şekil 4.6d α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-DCHO konjugatlarının Viscotek cihazında viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları.

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/10$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/20$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/30$, — DCHO, — Dekstran.



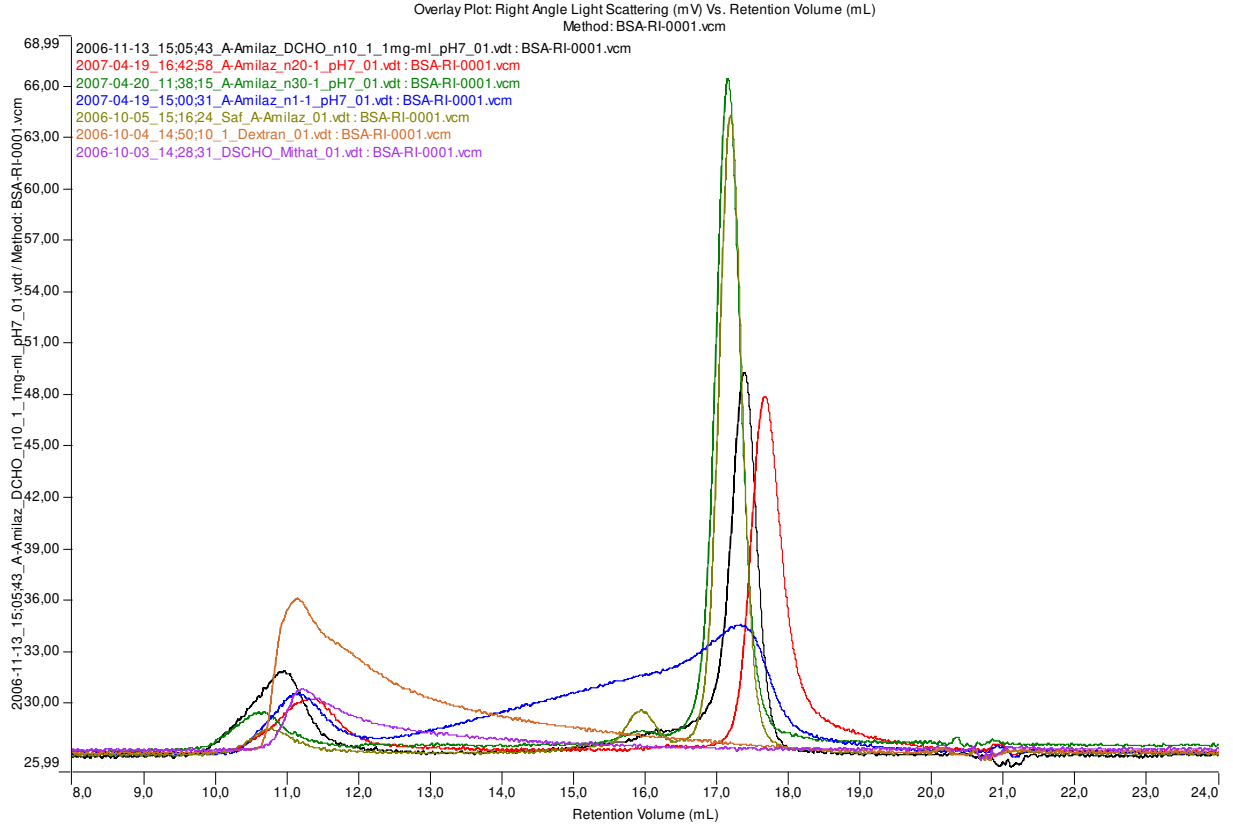
Şekil 4.6e α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında RI dedektörü ile alınan kromatogramları

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 10/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 20/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 30/1$, — DCHO, — Dekstran.



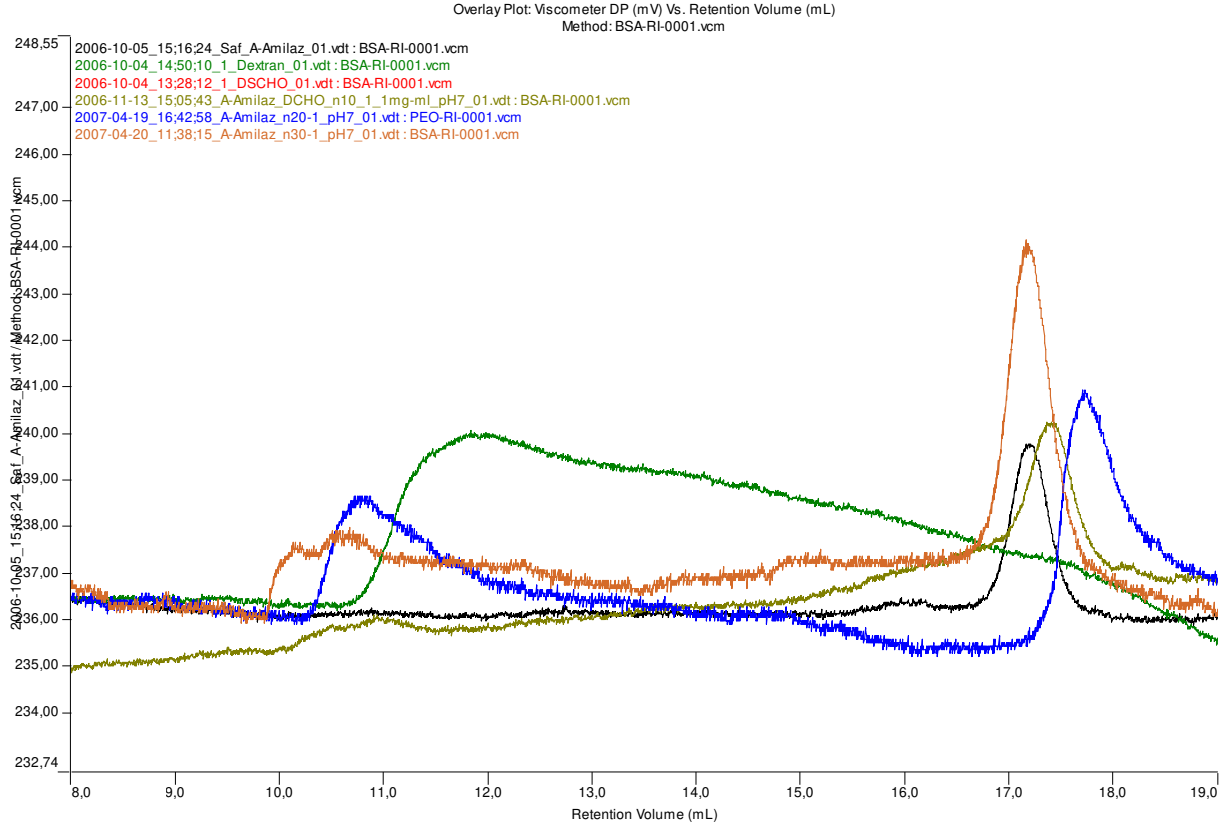
Şekil 4.6f α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında UV dedektörü ile alınan kromatogramları.

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 10/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 20/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 30/1$, — DCHO, — Dekstran.



Şekil 4.6g α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında LS dedektörü ile alınan kromatogramları.

— Saf α -Amilaz, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 1/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 10/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 20/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 30/1$, — DCHO, — Dekstran.



Şekil 4.6h α -Amilaz ve farklı mol oranlarındaki α -Amilaz-Dekstran konjugatlarının Viscotek cihazında viskozite dedektörü ile alınan kromatogramları

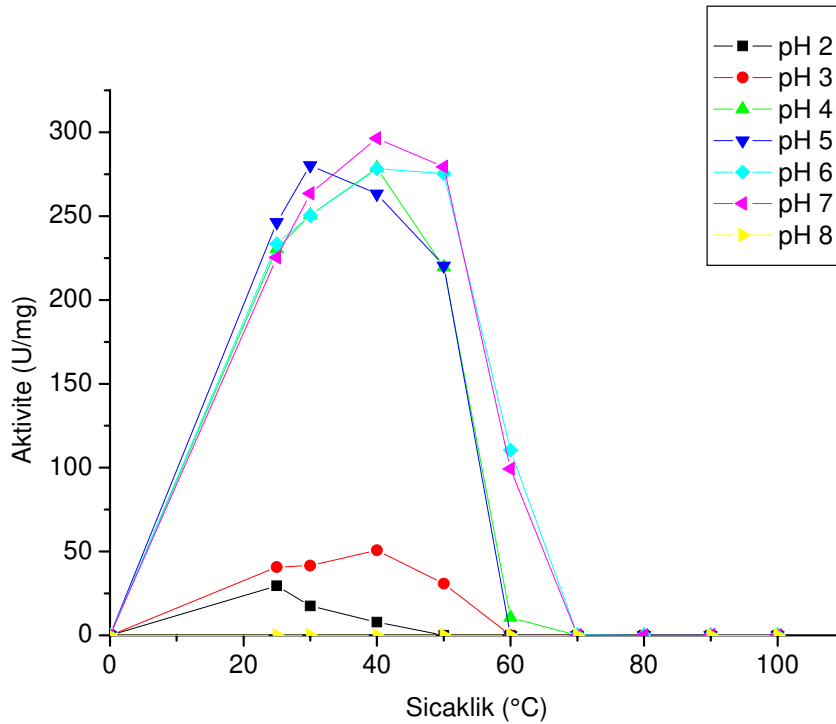
— Saf α -Amilaz, — $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 10/1$, — α -Amilaz-DCHO — $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 20/1$, — α -Amilaz-DCHO $n_{\alpha\text{-Amilaz}} / n_{\text{DCHO}} = 30/1$, — DCHO, — Dekstran.

4.6 Satın Alınan ve Saf Alfa Amilazın Aktivite Değerleri

Satın alınan ve saflaştırılan alfa amilaz enziminin farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteleri tayin edildi (Şekil 4.7 ve 4.8). Buna göre; pH 4–7 aralığında saf alfa amilaz satın alınan enzime oranla 25–60°C sıcaklık değerleri arasında daha yüksek aktivite gösterdi. Saf enzimin optimum pH değeri 7 olarak belirlendi.

Çizelge 4.1 Satın alınan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda tayin edilen aktivite değerleri.

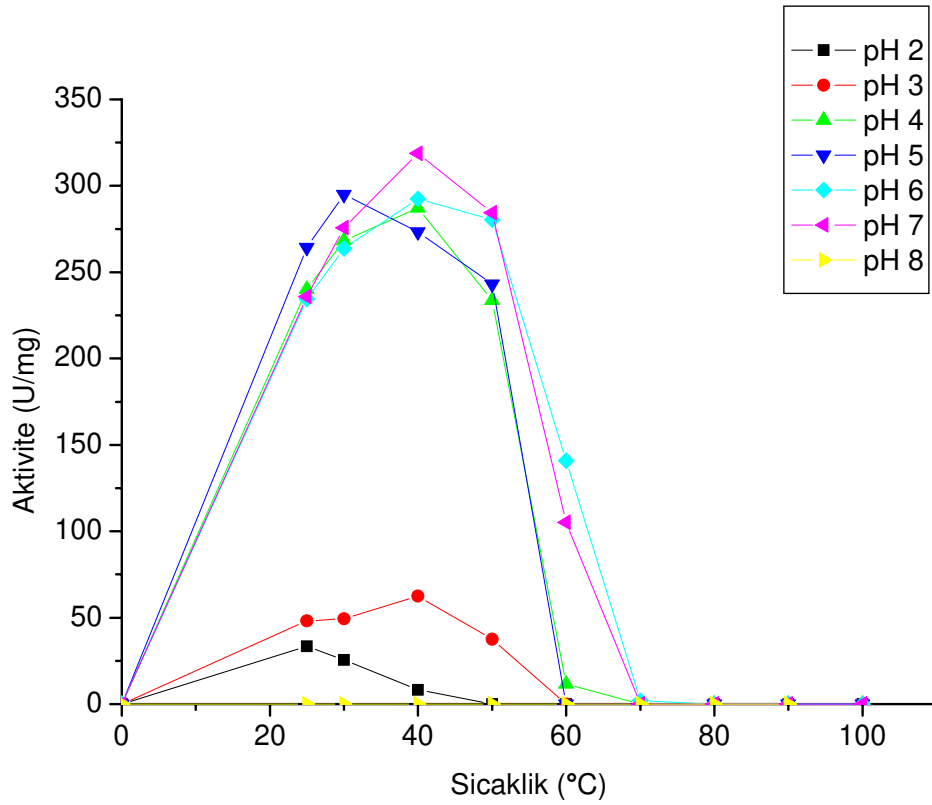
Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	29,62U/mg	40,63U/mg	230,5U/mg	246,3U/mg	233,32U/mg	225,29U/mg	0
30	17,49U/mg	41,59U/mg	250,5U/mg	280,27U/mg	250,3 U/mg	263,47U/mg	0
40	7,78 U/mg	50,77U/mg	278,6U/mg	263,30U/mg	278,37U/mg	296,35U/mg	0
50	0	30,75U/mg	219,52U/mg	220,4 U/mg	275,4 U/mg	279,32U/mg	0
60	0	0	10,63 U/mg	0	110,36U/mg	99,3 U/mg	0
70	0	0	0	0	0,3 U/mg	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.7 Satın alınan alfa amilazın pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklardaki aktivite değerleri.

Çizelge 4.2 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	33,41U/mg	48,19U/mg	240,05U/mg	264,29U/mg	234,43U/mg	235,89U/mg	0
30	25,46U/mg	49,34U/mg	268,16U/mg	294,94U/mg	263,8 U/mg	275,73U/mg	0
40	8,35 U/mg	62,51U/mg	287,2 U/mg	273,34U/mg	292,38U/mg	318,79U/mg	0
50	0	37,58U/mg	233,63U/mg	243,15U/mg	280,45U/mg	284,38U/mg	0
60	0	0	11,58 U/mg	0	140,86U/mg	105,08U/mg	0
70	0	0	0	0	1,98 U/mg	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.8 Saflaştırılan alfa amilazın pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklardaki aktivite değerleri.

4.7 $M_w \sim 75\ 000$ olan Dekstran ile Sentezlenen Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının Aktivite Değerleri

4.7.1 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 0 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

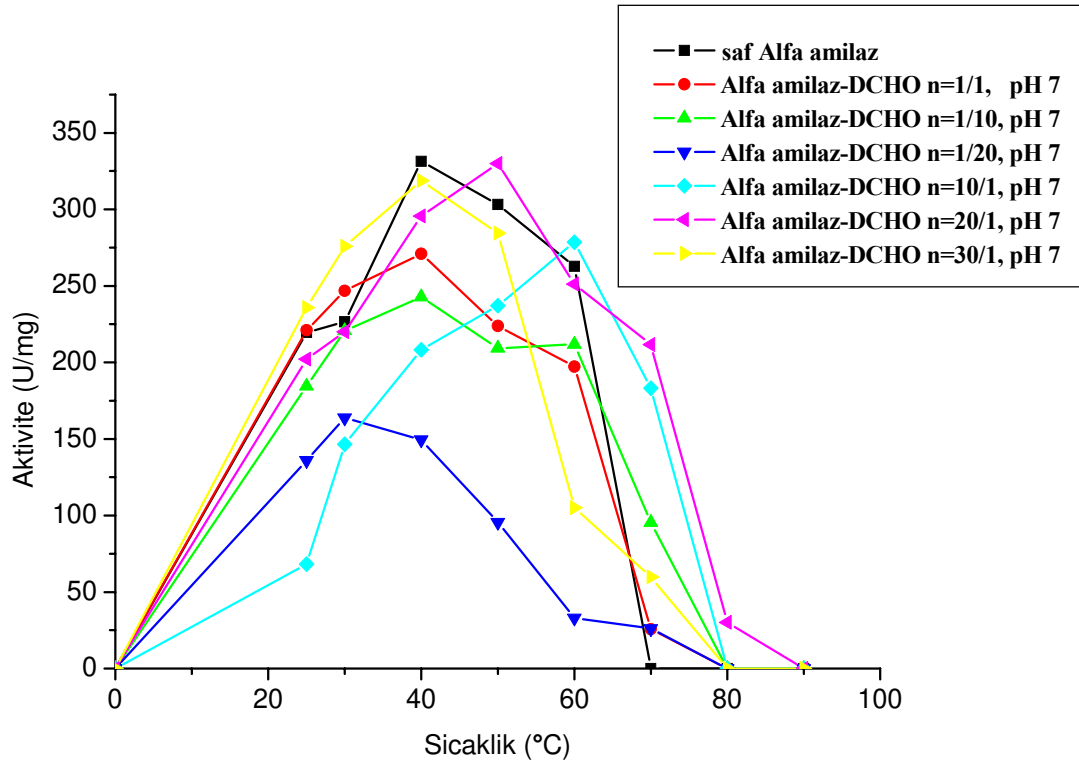
Saf alfa amilaza kovalent olarak dekstranın bağlanması ile elde edilen farklı mol oranlarındaki konjugatların zamana bağlı olarak aktiviteleri tayin edildi. 0. dakikada yapılan aktivite tayinlerinin grafiği Şekil 4.9’da verilmiştir. 10/1, 20/1, 30/1 ve 1/10 oranlarının aktivite değerlerine bakıldığında saf enzime kıyasla 80°C’ ye kadar stabilitelelerini korudukları görüldü.

Çizelge 4.3 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 0 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	33,41U/mg	48,19U/mg	240,05U/mg	264,29U/mg	234,43U/mg	235,89U/mg	0
30	25,46U/mg	49,34U/mg	268,16U/mg	294,94U/mg	263,8 U/mg	275,73U/mg	0
40	8,35 U/mg	62,51U/mg	287,2 U/mg	273,34U/mg	292,38U/mg	318,79U/mg	0
50	0	37,58U/mg	233,63U/mg	243,15U/mg	280,45U/mg	284,38U/mg	0
60	0	0	11,58 U/mg	0	140,86U/mg	105,08U/mg	0
70	0	0	0	0	1,98 U/mg	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.4 $M_w \sim 75000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (0. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	221,16	184,46	136,12	0	68,28	202,1	235,89
30	246,82	220,65	163,73	0	146,63	219,94	275,73
40	271,02	242,74	149,56	0	208,21	295,69	318,79
50	223,85	209,34	95,55	0	237,05	329,91	284,38
60	197,21	211,85	32,99	0	278,59	251,22	105,08
70	25,65	95,31	26,15	0	183,28	211,63	59,87
80	0	0	0	0	0	30,06	0



Şekil 4.9 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 0 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.7.2 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 15 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

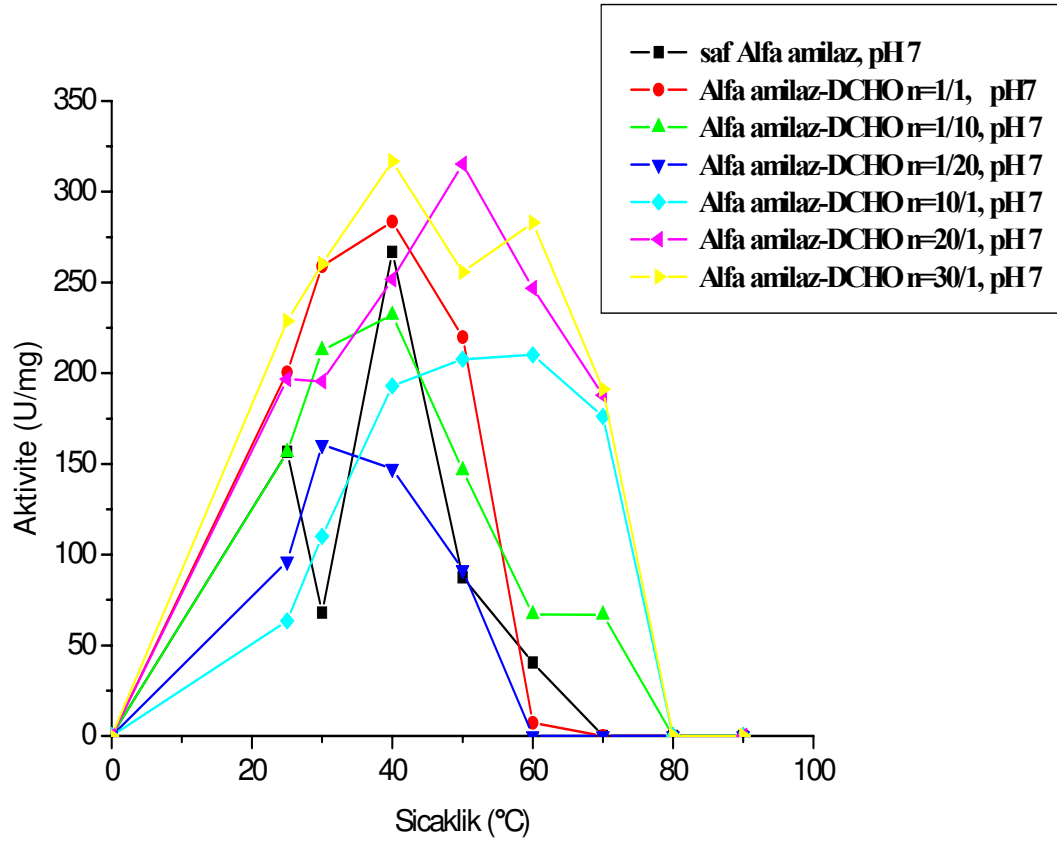
Şekil 4.10’a göre 15 dakika bekleme süresi sonunda aktiviteleri tayin edilen farklı mol oranlarındaki konjugatlarda; 1/1, 1/10, 10/1, 20/1, 30/1 oranlarının 75°C’ye kadar aktivitelerini korudukları ve saf enzime göre daha yüksek aktivite değerlerine sahip oldukları gözlemlendi.

Çizelge 4.5 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 15 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	20,33U/mg	25,67U/mg	189,98U/mg	211,33U/mg	214,43U/mg	228,75U/mg	0
30	10,09U/mg	16,78U/mg	244,34U/mg	259,09U/mg	232,56U/mg	260,1 U/mg	0
40	0	8,77 U/mg	245,66U/mg	277,24U/mg	278,77U/mg	316,88U/mg	0
50	0	0	85,43 U/mg	198,08U/mg	221,1 U/mg	255,72U/mg	0
60	0	0	0,44 U/mg	0	122,67U/mg	282,89U/mg	0
70	0	0	0	0	0	191,17U/mg	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.6 $M_w \sim 75000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (15. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	200,49	156,35	96,28	0	63,54	196,73	228,75
30	259,04	212,54	160,56	0	109,97	195,5	260,1
40	283,48	232,16	147,36	0	193,06	251,71	316,88
50	219,94	146,41	91,64	0	207,72	315,25	255,72
60	7,33	66,95	0	0	210,17	246,82	282,89
70	0	66,72	0	0	176,05	187,93	191,17
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.10 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 15 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.7.3 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 30 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

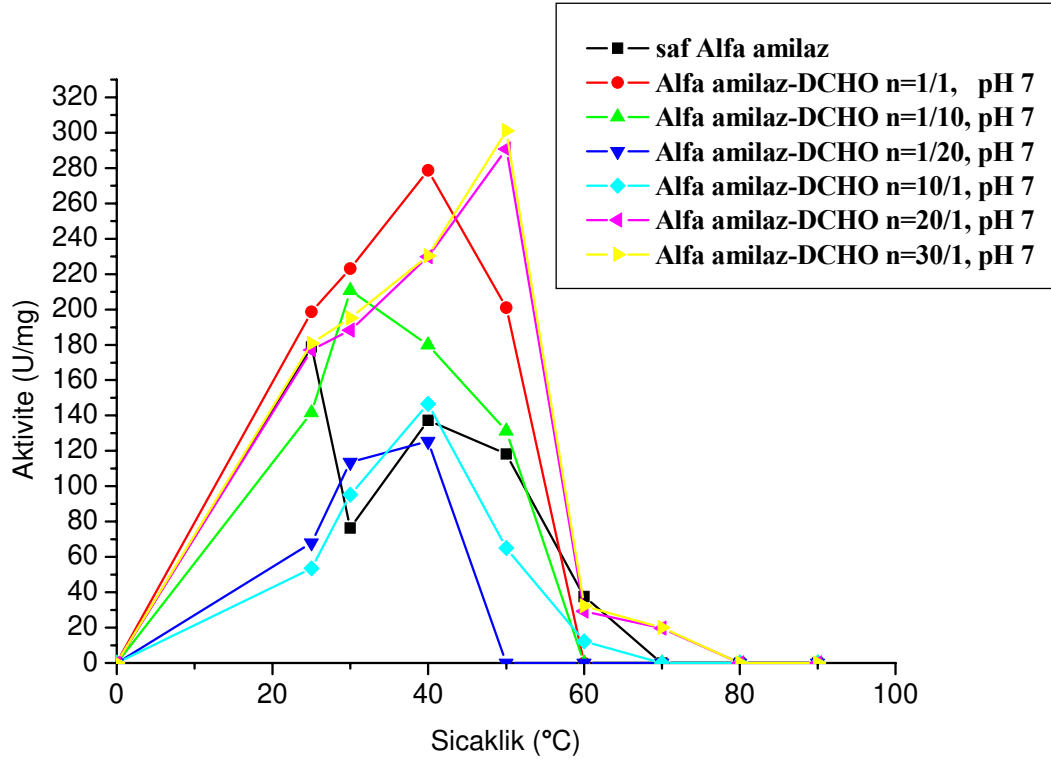
pH 7’de enzimin farklı sıcaklıklarda 30 dakika beklemesi sonucunda yapılan aktivite tayinlerine göre; 1/1, 1/10, 10/1, 20/1 ve 30/1 oranlarında sentezlenen konjugatların stabilitelerini saf alfa amilaza kıyasla 25–60°C sıcaklık aralığında korudukları; saf enzimin ise 40°C’ den sonra aktivitesini kaybetmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 4.11).

Çizelge 4.7 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 30 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	7,44U/mg	18,19U/mg	165,63U/mg	139,76U/mg	175,43U/mg	180,90U/mg	0
30	6,13U/mg	9,59U/mg	169,98U/mg	156 U/mg	186,32U/mg	195,12U/mg	0
40	0,78U/mg	6,77 U/mg	199,21U/mg	194,30U/mg	207,21U/mg	230,36U/mg	0
50	0	0	224,2U/mg	188,36U/mg	211,28U/mg	251,18U/mg	0
60	0	0	0,11 U/mg	0	26,58 U/mg	32,33 U/mg	0
70	0	0	0	0	0	20,01 U/mg	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.8 $M_w \sim 75000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (30. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	178,89	198,63	141,52	0	67,94	53,62	177,17
30	148,09	223,09	210,66	0	113,64	95,31	188,17
40	137,34	278,59	179,84	0	125,37	146,63	229,72
50	118,28	201,12	131,23	0	85,28	65,00	290,81
60	37,63	0	0	0	0	12,22	273,70
70	0	0	0	0	0	0	19,55
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.11 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 30 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.7.4 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 60 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

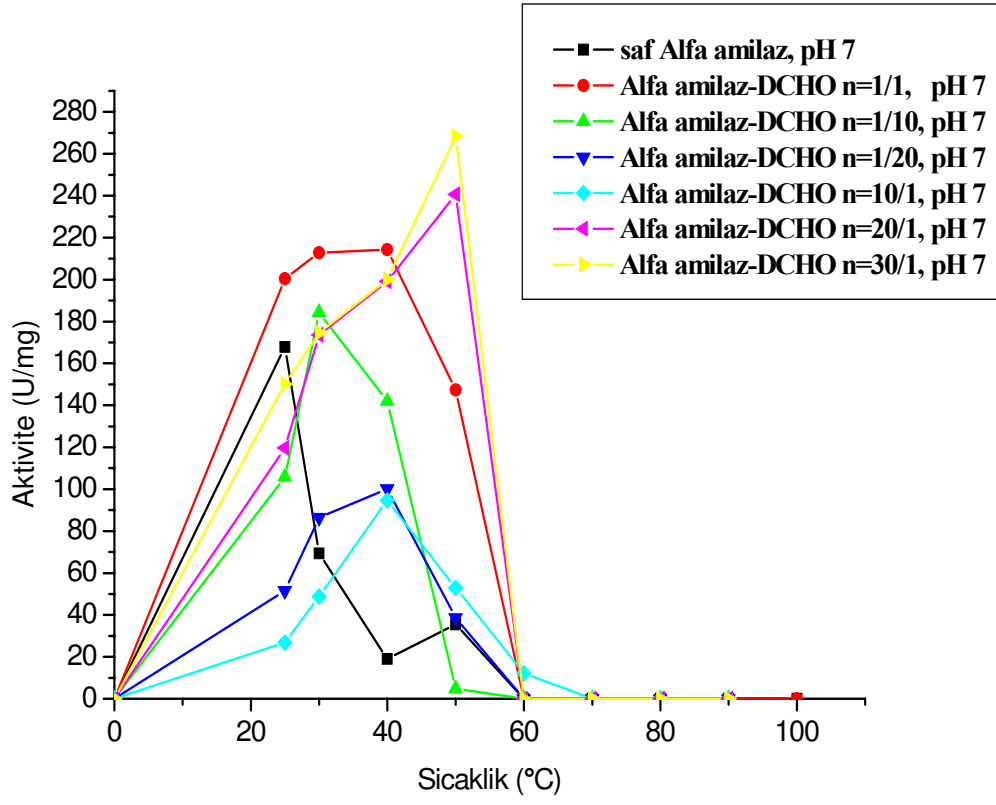
1/1, 1/10, 20/1, 30/1 oranlarındaki konjugatların aktiviteleri saf alfa amilazın aktivite sonuçları ile karşılaştırılırsa; bu oranların aktivitelerinin 60°C’ye kadar dayandığı görülmüştür. Saf enzim ise 30°C’de aktivitesini kaybetmeye başlamıştır (Şekil 4.12).

Çizelge 4.9 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 60 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	0,47U/mg	8,17U/mg	110,77U/mg	120,29U/mg	147,76U/mg	150,08U/mg	0
30	0,34U/mg	0,59U/mg	148,76U/mg	149,97U/mg	173,66U/mg	174,55U/mg	0
40	0	0,77 U/mg	179,88U/mg	176,44U/mg	187,67U/mg	200 U/mg	0
50	0	0	181,24U/mg	182,23U/mg	199,09U/mg	218,37U/mg	0
60	0	0	0,63 U/mg	0	9,36 U/mg	22,14 U/mg	0
70	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.10 $M_w \sim 75000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (60. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	200,39	105,76	51,56	0	26,88	119,75	150,08
30	212,85	184,28	86,51	0	48,88	173,51	174,55
40	214,32	142,01	100,19	0	94,57	199,17	200
50	147,36	4,88	38,62	0	52,98	240,71	268,37
60	0	0	0	0	12,22	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.12 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 60 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.8 $M_w=188\ 000$ olan Dekstran ile Sentezlenen Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının Aktivite Değerleri

4.8.1 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 0 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

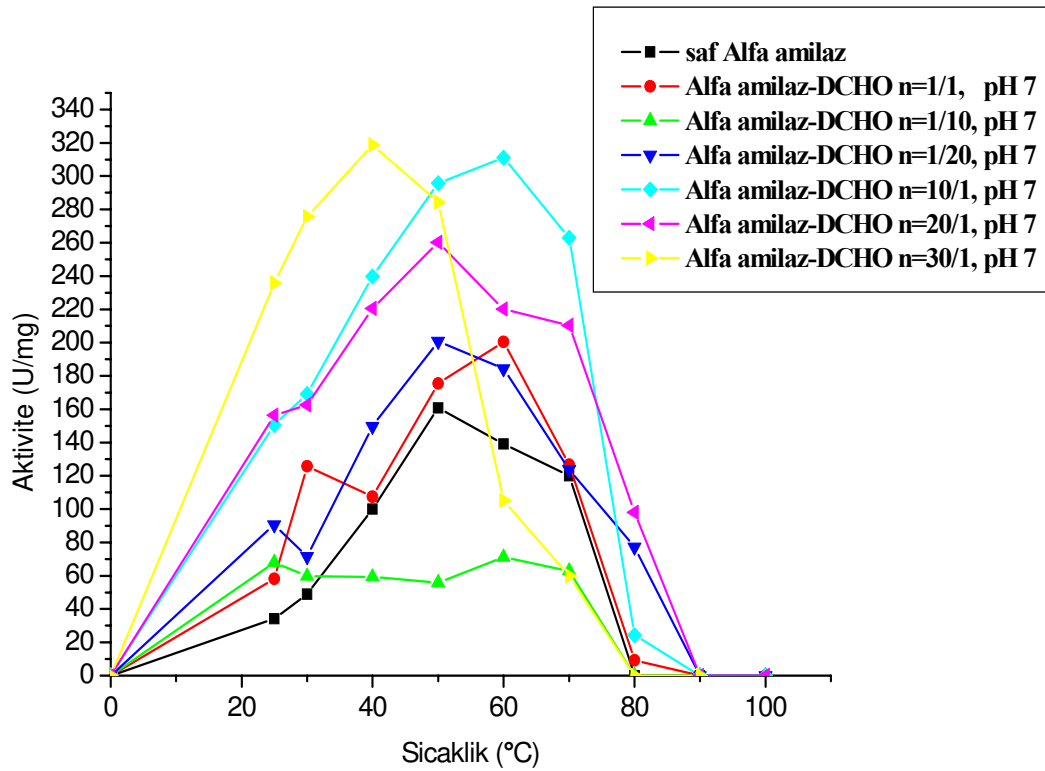
$M_w = 188\ 000$ olan dekstran ile sentezlenen farklı mol oranlarındaki konjugatlar, $M_w \sim 75\ 000$ olan dekstran ile kovalent bağlanarak elde edilen konjugatlardan daha yüksek sıcaklıkta aktivite gösterdi ve elde edilen konjugatların daha kararlı oldukları görüldü. Zamana bağlı olarak ölçülen aktivite tayinlerinde 0 dakika bekleme süresi ile yapılan denemelere bakıldığında 10/1, 20/1 ve 30/1 oranları saf enzime kıyasla 25–90°C aralığında yüksek aktivite gösterdi. Saf alfa amilaz 60°C’de aktivitesini kaybetmeye başladı (Şekil 4.13).

Çizelge 4.11 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 0 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	33,41U/mg	48,19U/mg	240,05U/mg	264,29U/mg	234,43U/mg	235,89U/mg	0
30	25,46U/mg	49,34U/mg	268,16U/mg	294,94U/mg	263,8 U/mg	275,73U/mg	0
40	8,35 U/mg	62,51U/mg	287,2 U/mg	273,34U/mg	292,38U/mg	318,79U/mg	0
50	0	37,58U/mg	233,63U/mg	243,15U/mg	280,45U/mg	284,38U/mg	0
60	0	0	11,58 U/mg	0	140,86U/mg	105,08U/mg	0
70	0	0	0	0	1,98 U/mg	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.12 $M_w=188000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (0. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	58,26	67,99	90,66	0	150,54	156,5	235,89
30	125,85	59,72	71,61	0	169,21	162,51	275,73
40	107,53	59,26	149,66	0	239,74	220,43	318,79
50	175,46	55,83	200,88	0	295,69	260,26	284,38
60	200,39	71,14	184,26	0	311,09	220,18	105,08
70	126,83	62,95	123,9	0	262,95	210,29	59,87
80	9,28	0	77,22	0	24,44	97,99	0



Şekil 4.13 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 0 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.8.2 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 15 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

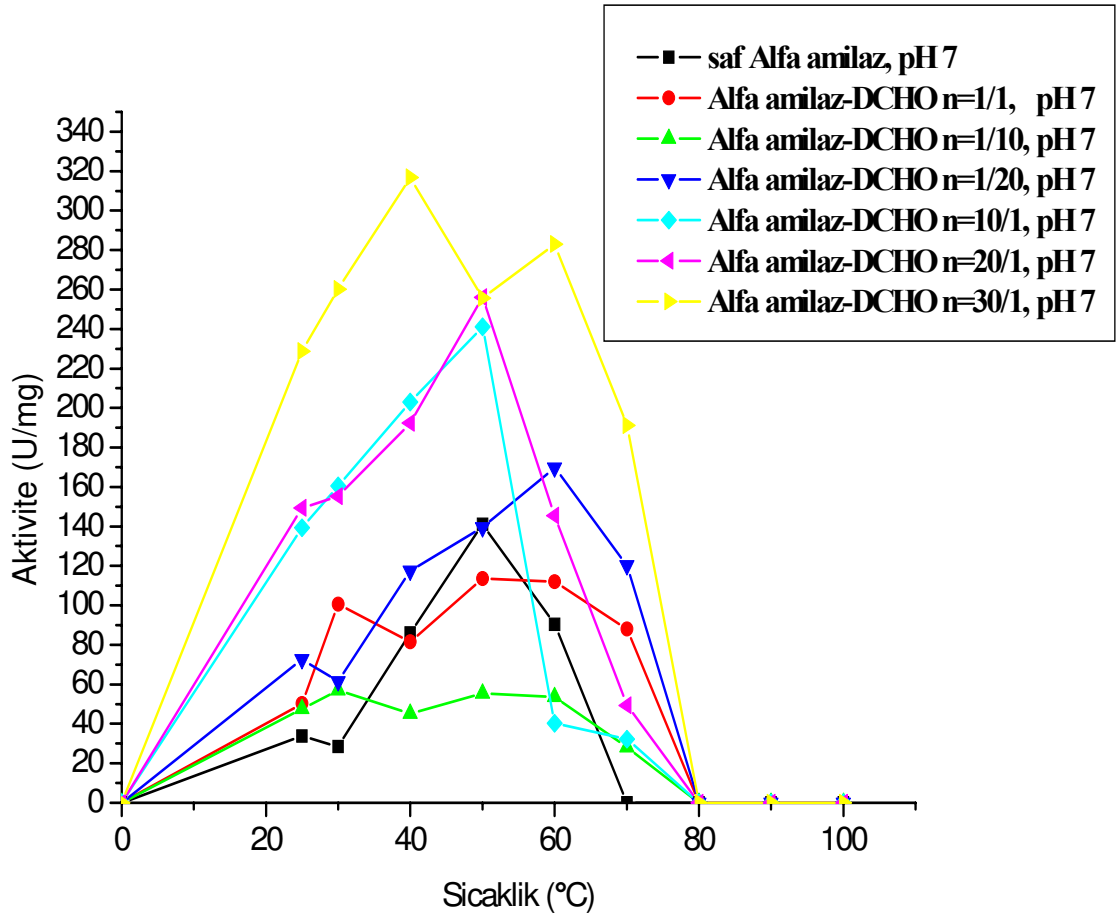
Konjugatların 15 dakika farklı sıcaklıklarda bekletilmesi ile yapılan aktivite tayinlerinin grafiği Şekil 4.14’de verilmiştir. Şekilden de açıkça görüldüğü gibi tüm oranlar saf enzimden daha stabildirler ve 80°C sıcaklığa kadar aktivitelerini korumaktadırlar.

Çizelge 4.13 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 15 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	20,33U/mg	25,67U/mg	189,98U/mg	211,33U/mg	214,43U/mg	228,75U/mg	0
30	10,09U/mg	16,78U/mg	244,34U/mg	259,09U/mg	232,56U/mg	260,1 U/mg	0
40	0	8,77 U/mg	245,66U/mg	277,24U/mg	278,77U/mg	316,88U/mg	0
50	0	0	85,43 U/mg	198,08U/mg	221,1 U/mg	255,72U/mg	0
60	0	0	0,44 U/mg	0	122,67U/mg	282,89U/mg	0
70	0	0	0	0	0	191,17U/mg	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.14 $M_w=188000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (15. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	50,34	47,62	72,8	0	139,29	149,26	228,75
30	100,68	56,92	61,53	0	160,56	155,18	260,1
40	81,62	45,21	117,55	0	203,08	192,33	316,88
50	113,64	55,39	139,57	0	241,2	255,99	255,72
60	111,93	53,73	169,84	0	40,32	145,41	282,89
70	87,98	28,01	120,23	0	32,26	49,36	191,17
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.14 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 15 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.8.3 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 30 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

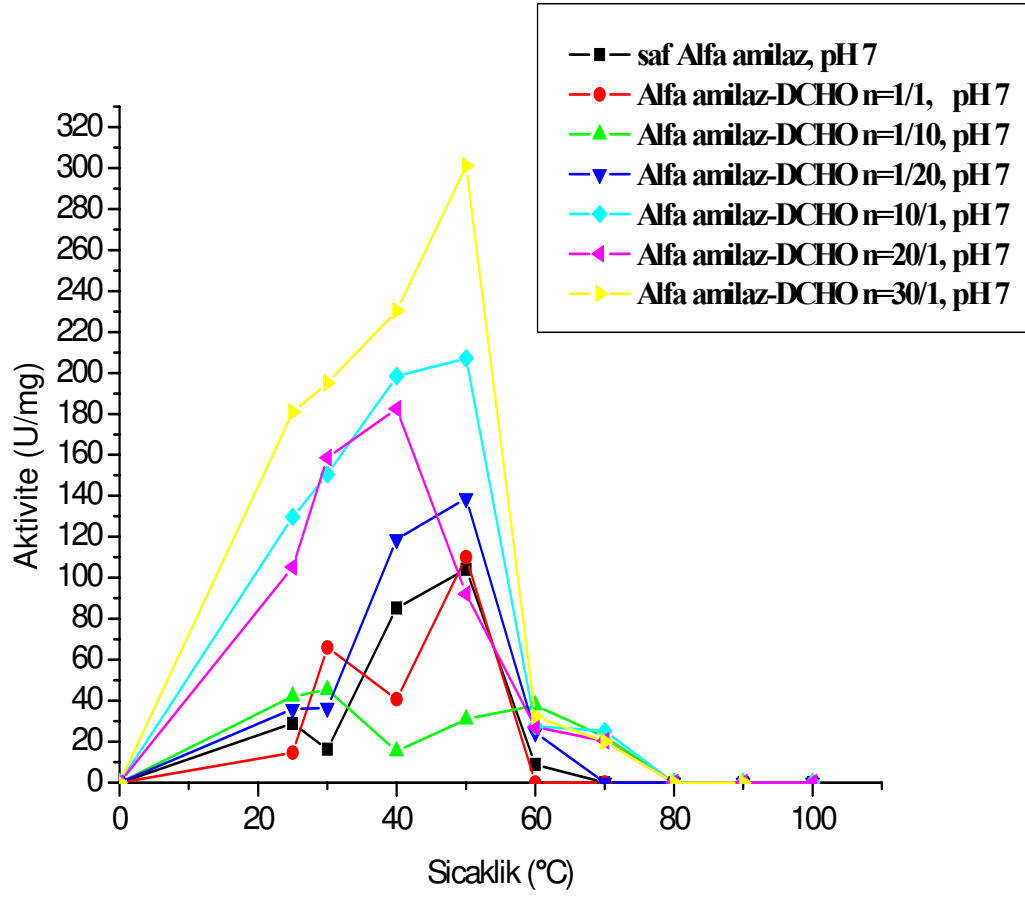
30 dakika bekleme süresi sonunda tayin edilen aktivite değerlerinin grafiği Şekil 4.15’ de verilmiştir. 1/20, 10/1, 20/1 ve 30/1 oranları, saf enzimin aktivite değerlerinden çok yüksek sıcaklık değerlerinde aktivite gösterdi ve sıcaklık aralıkları 80°C’ ye kadar genişledi.

Çizelge 4.15 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 30 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	7,44U/mg	18,19U/mg	165,63U/mg	139,76U/mg	175,43U/mg	180,90U/mg	0
30	6,13U/mg	9,59U/mg	169,98U/mg	156 U/mg	186,32U/mg	195,12U/mg	0
40	0,78U/mg	6,77 U/mg	199,21U/mg	194,30U/mg	207,21U/mg	230,36U/mg	0
50	0	0	224,2U/mg	188,36U/mg	211,28U/mg	251,18U/mg	0
60	0	0	0,11 U/mg	0	26,58 U/mg	32,33 U/mg	0
70	0	0	0	0	0	20,01 U/mg	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.16 $M_w=188000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (30. dakika)

Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	14,66	42,05	35,92	0	129,76	105,33	180,9
30	65,98	45,45	36,41	0	150,54	158,6	195,12
40	40,81	15,33	118,77	0	198,44	182,55	230,36
50	109,97	31,01	138,81	0	207,23	92,13	301,18
60	0	37,83	24,44	0	27,61	27,13	32,33
70	0	22,31	0	0	25,17	20,31	20,01
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.15 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 30 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri.

4.8.4 Alfa Amilaz-Dekstran Konjugatlarının 60 Dakika Bekleme Süresi Sonunda pH 7’de Tayin Edilen Aktiviteleri

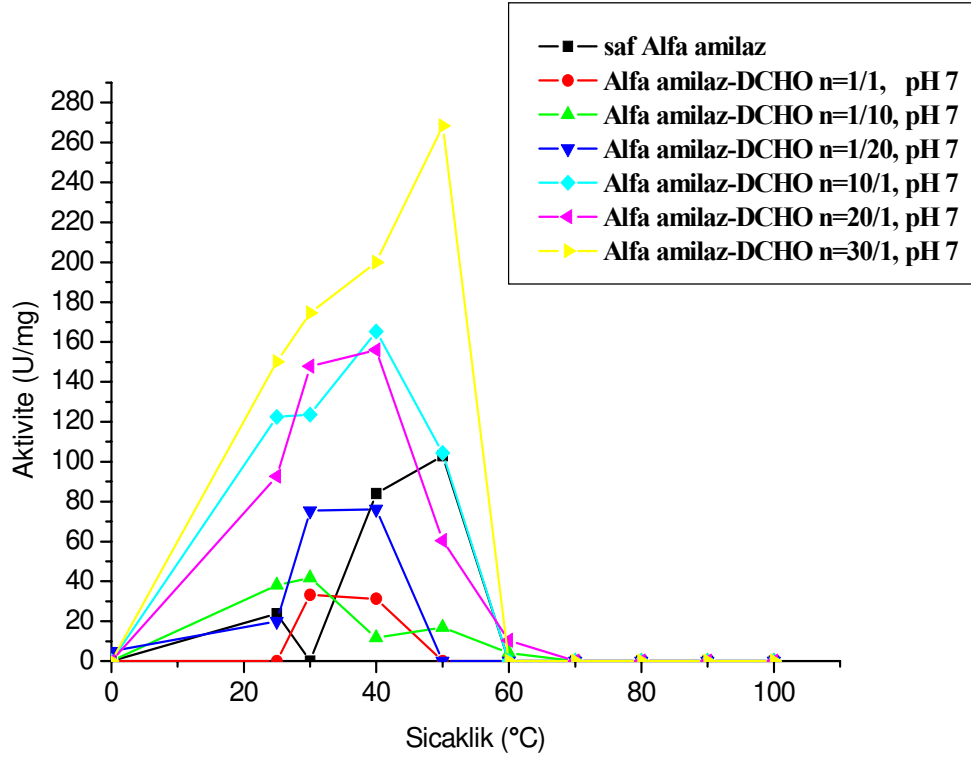
$M_w=188\ 000$ olan dekstran ile sentezlenen alfa amilaz-dekstran konjugatlarının 60 dakika bekleme süresi sonunda tayin edilen aktivite değerlerine göre; 1/10, 1/20, 10/1, 20/1 ve 30/1 oranları, saf enzimden çok daha yüksek sıcaklıkta aktivite gösterdi (Şekil 4.16).

Çizelge 4.17 Saflaştırılan enzimin pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 değerlerinde ve her bir pH için 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C sıcaklıklarda 60 dakika bekleme süresi ile tayin edilen aktivite değerleri.

Sıcaklık	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
25	0,47U/mg	8,17U/mg	110,77U/mg	120,29U/mg	147,76U/mg	150,08U/mg	0
30	0,34U/mg	0,59U/mg	148,76U/mg	149,97U/mg	173,66U/mg	174,55U/mg	0
40	0	0,77 U/mg	179,88U/mg	176,44U/mg	187,67U/mg	200 U/mg	0
50	0	0	181,24U/mg	182,23U/mg	199,09U/mg	218,37U/mg	0
60	0	0	0,63 U/mg	0	9,36 U/mg	22,14 U/mg	0
70	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.18 $M_w=188000$ olan Dekstran ile sentezlenen konjugatların aktivite değerleri (60. dakika)

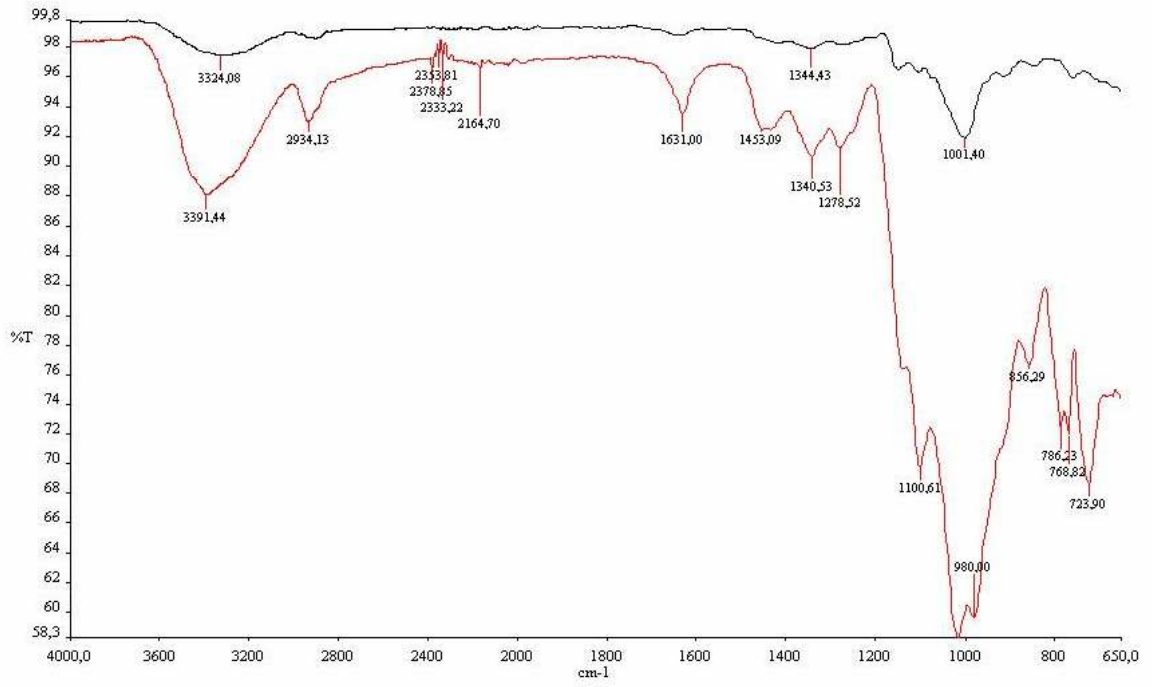
Sıcaklık (°C)	n=1/1 (U/mg)	n=1/10 (U/mg)	n=1/20 (U/mg)	n=1/30 (U/mg)	n=10/1 (U/mg)	n=20/1 (U/mg)	n=30/1 (U/mg)
25	23,70	32,46	38,11	0	4,9	122,43	92,62
30	0	33,24	41,69	0	19,97	123,66	147,85
40	84,06	31,28	11,73	0	75,46	165,20	155,91
50	102,88	0	16,86	0	76,25	104,35	60,36
60	0	0	4,15	0	0	0	10,44
70	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.16 Saf alfa amilazın ve farklı mol oranlarındaki Alfa Amilaz-Dekstran konjugatlarının 60 dakika bekleme süresi sonunda pH 7’de tayin edilen aktiviteleri

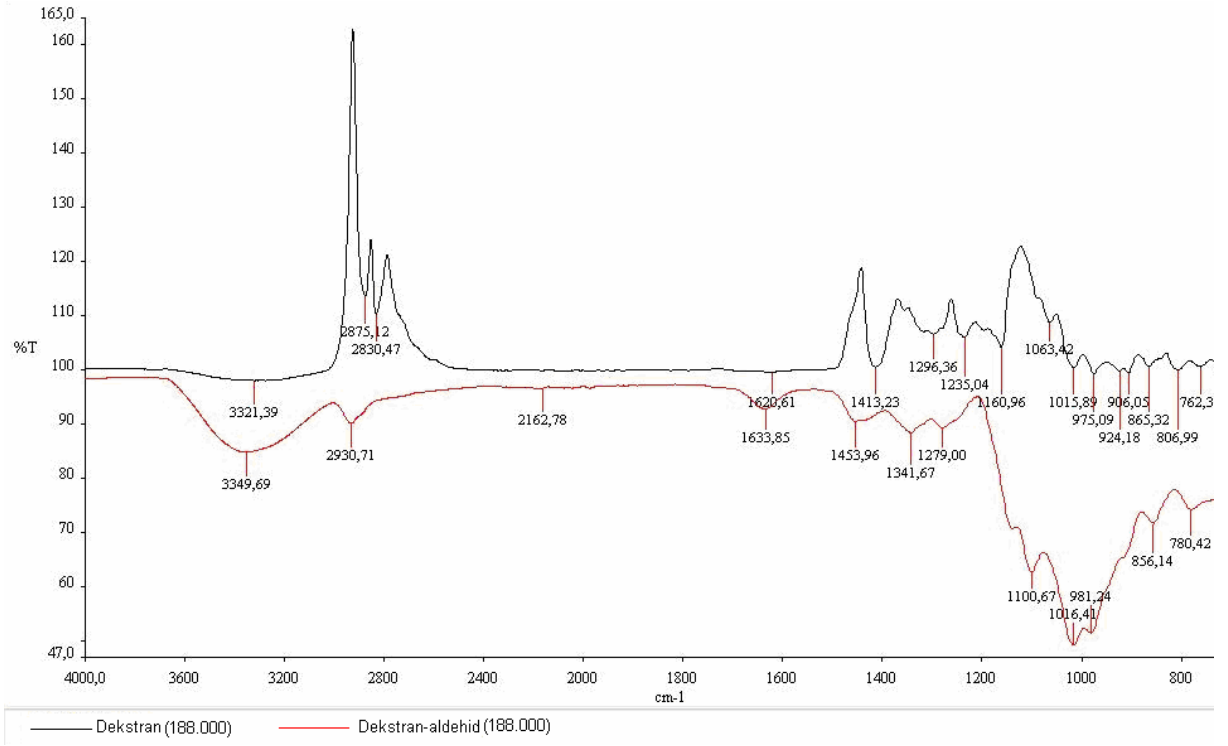
4.9 $M_w \sim 75\ 000$ ve $M_w = 188\ 000$ olan Dekstran ve Aldehid Türevlerinin FTIR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

FTIR spektrumunda 1630 cm^{-1} civarında oluşan pikler iki farklı molekül ağırlıklı Dekstranda C=O bağı oluştuğunu, dolayısı ile Dekstran aldehid türevinin sentezlendiğini gösterdi (Şekil 4.17 ve 4.18).



Şekil 4.17 $M_w \sim 75\ 000$ olan Dekstran ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.

(----- Dekstran, ----- Dekstran aldehid türevi)



Şekil 4.18 $M_w = 188\,000$ olan Dekstran ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.

(----- Dekstran, ----- Dekstran aldehid türevi)

Sonuçların Değerlendirilmesi;

- Satın alınan enzimin safsızlık içerdiği HPLC ve Viscotek cihazları ile belirlendi. Bu enzim “Sephadex G-50” dolgu maddesi içeren 2,5 cm x 40 cm boyutlardaki jel filtrasyon kolonundan geçirilerek, protein saflaştırma sisteminde saflaştırıldı.
- Satın alınan ve saflaştırılan alfa amilazın izoelektrik noktaları tayin edildi.
- Satın alınan ve saflaştırılan alfa amilazın farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteleri tayin edildi ve kıyaslandı.
- Saflaştırılan alfa amilaz ile $M_w \sim 75\ 000$ ve $M_w = 188\ 000$ olan dekstranın farklı mol oranlarında kovalent konjugatları sentezlendi. Satın alınan, saflaştırılan alfa amilaz ve farklı mol oranlarındaki alfa amilaz-dekstran konjugatları HPLC ve GPC cihazlarında incelendi.
- $M_w \sim 75\ 000$ ve $M_w = 188\ 000$ olan dekstran ile sentezlenen alfa amilaz-dekstran konjugatlarının pH 7’de 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C sıcaklıklarda ve 0, 15, 30, 60 dakika süreler beklenerek tayin edilen aktivite sonuçları değerlendirildi. Özellikle polimer oranı düşük olan konjugatların saf enzime kıyasla çok daha yüksek değerde ve geniş sıcaklık aralığında aktivite verdiği belirlendi. $M_w \sim 75\ 000$ ve $M_w = 188\ 000$ olan dekstran ile sentezlenen 1/30 oranlı konjugatlarda aktivite gözlenmedi.
- $M_w = 188\ 000$ olan dekstran ile sentezlenen konjugatlar, $M_w \sim 75\ 000$ olan dekstran ile sentezlenen konjugatlara kıyasla çok daha yüksek sıcaklıklarda stabilitesini korudu, ve dolayısıyla aktivite değerleri daha yüksek elde edildi.
- Dekstran aldehid türevlerinin sentezlendiği FTIR spektrumlarındaki 1630 cm^{-1} civarında oluşan C=O pikinden anlaşıldı.

KAYNAKLAR

- Abian, O., Wilson, L., Mateo, C., (2002), "Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules new enzyme derivatives to be used in any reaction medium", *J. Molecular Catalysis B*, 19-20, 295-303.
- Andre, G., Buleon, A., Juy, M., Aghajari, N., Haser, R., Tran, V. (1999), "Amylose Chain Behavior in an Interacting Context II. Molecular Modeling of a Maltopentaose Fragment in the Barley α -Amylase Catalytic Site", *Biopolymers*, Vol. 49, 107–119.
- Bailey, J. E., Ollis, D. F. (1986), *Biochemical Engineering Fundamental*, Mc Graw-Hill Book Company.
- Balabuchevich, N., G., Zimina, E., P., Larionova, N., I., (2004), "Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine", *Biochemistry*, 69, 763-769.
- Battle, N., Carbonell, J. V., Sendra, J. M., (2000), "Determination of Depolymerization Kinetics of Amylose, Amylopectin, and Soluble Starch by *Aspergillus Oryzae* α -Amylase Using Fluoremetric 2-p-Toluidinylnaphtalene-6-Sulfonate/Flow-Injection Analysis System", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 70, No. 5.
- Beazell, J. M., (1941), "A reexamination of the role of the stomach in the digestion of carbohydrates and protein", *American Journal of Physiology*, 132:42-50.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., (2004), "Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde", *Journal of Biotechnology*, 110, 201–207.
- Brzozowski, A. M., Davies, G. J., (1997), "Structure of the *Aspergillus Oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose, at 2 resolution", *Biochemistry*, 36, 10837-10845.
- Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Turkenburg, J.P., Bisgaard-Frantzen, H., Svendsen, A., Borchert, T. V., Dauter, Z., Wilson, K. S., Davies, G. J., (2000), "Structural Analysis of a Chimeric Bacterial α -Amylase. High-Resolution Analysis of Native and Ligand Complexes", *Biochemistry*, 39, 9099–9107.
- Buryan, P., (1991), *Food Science and Technology*, Oxford: Blackwell.
- Bush, D. S., Sticher, L., Huystee, R., Wanger, D., Jones, R. L., (1989), 264(32), 19392-19398.
- Chen, J., Chu, D., Sun, Y., (1997), "Immobilization of α -Amylase to Temperature-Responsive Polymers by Single or Multiple Point Attachments", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69, 421-428.
- Collen, A., Ward, M., Tjerneld, F., (2001), "Genetically engineered peptide fusion for improved protein partitioning in aqueous two-phase system Effect of fusion localization on endogluconase I of *Trichoderma reesei*", *J. Chromatography A*, 910, 275-284.

- Decklerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C., (2000), "Probing Structural Determinants Specifying High Thermostability in *Bacillus licheniformis* α -Amylase", *J. Mol. Biol.*, 301, 1041-1057.
- Dobrenchenko, S., N., Ivanova, I., L., S., Kleiner, A., R., (1993), "An investigation of periodate-oxidised dextran", *Carbohydrate Research*, 241, 189-199.
- Dordick, J., (1991), *Biocatalysts for Industry*, Plenum Press, New York.
- Fuentes, M., Segura, L., R., Abian, O., (2004), "Determination of protein-protein interaction through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking", *Proteomics*, 4, 2602-2607.
- Gary, D. B., Yaogand, L., Stephen, G. W., (1995), *Protein Science*, 4:1730-1742, USA.
- Gonzalez, C.F., Farina, J.I., Figueroa, L.I.C., (2002), "A critical assessment of a viscometric assay for measuring *Saccharomycopsis fibuligera* α -amylase activity on gelatinised cassava starch", *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 169–175.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003), "Microbial α -amylases: a biotechnological perspective", *Process Biochemistry*, 38, 1599- 1616.
- Hakamada, Y., Hatada, Y., Ozawa, T., et all., (2001), "Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus* alkaline cellulase by construction of chimeras from monophilic and thermostable enzymes and site-directed mutagenesis", *FEMS Microbiol. Letters*, 195, 67–72.
- Haser, R., Gottschalk, T. E., Driguez, H., Svensson, B., Aghajar, N., (2003), "The Structure of Barley α -Amylase Isozyme 1 Reveals a Novel Role of Domain C in Substrate Recognition and Binding: A Pair of Sugar Tongs", *Structure*, Vol. 11, 973–984.
- Herman, S., Persijn, G., Vandekerckhove, J., Schacht'vt, E., (1993), "Synthesis of Dextran Derivatives with Thiol-Specific Reactive Groups for the Preparation of Dextran-Protein Conjugates", *Bioconjugate chemistry*, 4, 402-405.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., ve Nakatani, H., (1990), *Biochemistry*, 29, 7119-7123.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., Nakatani, H., ve Honda, K., (1993), "Substrate Recognition at the Binding Site in Mammalian Pancreatic α -Amylases", *Biochemistry*, 32, 6259-6265.
- Kadziola, A., Sùgaard, M., Svensson, B., Haser, R. (1998), "Molecular Structure of a Barley α -Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis", *J. Mol. Biol.*, 278, 205-217.
- Kamalakkannan S., Murugan, V., Jagannadham, M., V., et all, (2004), "Bacterial lipid modification of proteins for novel protein engineering application", *Prot.Eng.*, 17, 721-729.
- Karşıl原因, H., Hemmilä, I., Takalo, H., Toivonen, A., Petterson, K., Lövgren, T., Mikkala, V. M., (1997), "Influence of Coupling Method on the Luminescence Properties, Coupling Efficiency, and Binding Affinity of Antibodies Labelled with Europium(III) Chelates", *Bioconjugate Chem.*, 8(1), 71-75.

- Khajeh, K., Ranjbar B., Naderi-Manesh H., Habibi, A. E., Nemat-Gorgani, M. (2001), "Chemical modification of bacterial α -amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1548, 229-237.
- Machius, M., Vertesy, L., Huber, R., Wiegand, G., (1996), "Carbohydrate and Protein-based Inhibitors of Porcine Pancreatic α -Amylase: Structure Analysis and Comparison of Their Binding Characteristics", *J. Mol. Biol.*, 260, 409-421.
- Muralikrishna, G., Nirmala, M., (2005), "Cereal α -amylases—an overview", *Carbohydrate Polymers*, 60, 163–173.
- Mustafaev, M., Osada, Y., Matsukata, M., Basalp, A., Çirakoğlu, B., Bermek, E., (1996), "New Amphiphilic Immunogens by Poly(N-Isopropylacrylamide)-Modified Bovine Serum Albumin", *Polymer Gels and Networks.*, 4, 363-372.
- Mustafaev, M., Yücel, F., Çirakoğlu, B., Bermek, E., (1996), "Immuno Response to Progesterone Involved in Cu^{2+} -Mediated Polyanion-Protein Complex – Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", *Immunology letters*, 52, 63-68.
- Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E., Osada, Y., (1998), "New Amphiphilic Immunogens by Cu^{2+} -Mediated Complexes of Water-Born Poly(N-isopropylacrylamide) and Bovine Serum Albumin", *J. Bioact Compet. Polym.*, 13, 33-49.
- Nielsen J. E., Borchert T. V. (2000), "Protein engineering of bacterial α -amylases", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 253-274.
- Quian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., Payan, F., (1994), "The Active Center of a Mammalian α -Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic α -Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-Å", *Biochemistry*, 6284-6294.
- Roy, J.J., Sumi, S., Sangeetha, K., Abraham, T., E., (2005), "Chemical modification and immobilization of papin", *J. Chemical Tech. Biotech.*, 80, 184-188.
- Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., (1998), "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *J. Biol. Macromol.*, 10, 305-310.
- Srisawat, C., Goldstein, I. J., Engelke, D. R., (2001), "Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures", *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 2 e4.
- Swift, H. J., Brady, L., Defwenda, Z. S., Dodson, J., Turkenburg, J. P., (1991), *Acta Crystallogr., Sect. B* V. 47, 535.
- Taylor, R. F. (1991), *Protein Immobilization Fundamentals and Applications*, Markel Dekker Inc, New York
- Ueyama, H., Chiba, Y., Kobayashi, M., (1995), "Comparison of o-Phtalaldehyde Modification of α -Amylases from Porcine Pancreas and *Bacillus subtilis* with Taka-amylase A", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (5), 864-868.

Vogt, G., Woell, S., Argos, P., (1997), "Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs", *J. Mol. Biol.*, 269, 631-643.

Zhang, X., Wu, D., Chu, C., (2004), "Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH sensitive Dex-MA/PNIPAAm hydrogels", *Biomaterials*, 25, 4719-4730.

Zhang, R., (2005), "Synthesis, characterization and reversible transport of thermo-sensitive carboxyl methyl dextran/poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel", *Polymer*, 46, 2443-2451.

İNTERNET KAYNAKLARI

<http://www.ghettodriveby.com/glycogen/>

<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/547glycogen.html>

<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca>

http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb74_1.html

http://www.bio.nite.go.jp/dogan/ProteinInformation?ORF_ID=AO090005000884

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	06.05.1980
Doğum yeri	Nürnberg/Almanya
Lise	1994-1998 Pertevniyal Lisesi
Lisans	1999-2004 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2004- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı