

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -AMİLAZ ve α -GLUKOSİDAZININ (OLİGO
(1-6), (1-4) GLUKOSİDAZ) EKSPRESYONU, KARAKTERİZASYONU, CLEA
METODU İLE İMMOBİLİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Emel ALEMDAROĞLU

MAYIS 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -AMİLAZ ve α -GLUKOSİDAZININ (OLİGO
(1-6), (1-4) GLUKOSİDAZ) EKPREZYONU, KARAKTERİZASYONU, CLEA
METODU İLE İMMOBİLİZASYONU

Emel ALEMDAROĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17 / 04 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 09 / 05 / 2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T α -amilaz ve α -glukosidazının (oligo (1-6), (1-4) glukosidaz) ekspresyonu, karakterizasyonu, CLEA metodu ile immobilizasyonu” başlıklı doktora tezimde danışmanlığımı üstlenerek, çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve her türlü desteği benden esirgemeyen ve tez süresi boyunca tecrübe, fikir ve bilgilerinden yararlandığım, sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, biyoinformatik alanda edindiğim bilgi birikimini borçlu olduğum Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e ve tezimin kritik anında manevi desteği ile çalışmalarımın ilerlemesine katkı sağlayan Prof. Dr. Kadriye İNAN’a teşekkür ederim.

Doktora tezim süresince, danışmanımdan sonra bana en büyük desteği veren, bilgi, fikir ve tecrübelerini benimle her zaman paylaşan, tezimin ilerlemesinde çok büyük katkıları olan ve manevi olarak bana her zaman cesaret veren sayın Dr. Öğretim Üyesi Fulya AY’a, teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, doktora dönemi boyunca, yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan başta Dr. Öğretim Üyesi Dilşat Nigâr ÇOLAK olmak üzere, tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Emel ALEMDAROĞLU

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T α -amilaz ve α -glukosidazının (oligo (1-6), (1-4) glukosidaz) ekspresyonu, karakterizasyonu, CLEA metodu ile immobilizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 09/05/2025

Emel ALEMDAROĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	X
SUMMARY	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XV
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Amilolitik Enzimlerin Önemi.....	1
1.2. Glikozit Hidrolazlar Ailesi	4
1.2.1. Alfa Amilaz Ailesi (EC 3.2.1.1)	5
1.2.2. β -Amilaz.....	6
1.2.3. γ -Amilaz.....	7
1.2.4. Amilazın Yapısı	7
1.2.5. Glikozidik Bağın Hidroliz Mekanizması	9
1.3. α -Glukosidazlar	9
1.4. İmmobilizasyon	11
1.4.1. Adsorbsiyon Metodu.....	11
1.4.2. Tutuklama Metodu	11
1.4.3. Kovalent Bağlanma Metodu	12
1.4.4. Çapraz Bağlanma Metodu.....	12
1.5. Nişasta	14
1.5.1. Nişasta Yapısı	15
1.6. S-Tabaka Katmanı (SLH Domain).....	16
1.7. Biyoteknolojik Uygulamalar	17
1.8. Termofilik Mikroorganizmalar.....	20
1.9. Bacillaceae Ailesi	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Materyal.....	24

2.1.1.	Kimyasallar	24
2.1.2.	Bakteri ve Vektörler	24
2.1.3.	Moleküler Analizler	25
2.1.4.	Besiyerleri	25
2.1.5.	Genomik DNA İzolasyonu.....	25
2.1.6.	α -Amilaz ve α -Glukosidaz Genlerinin Klonlanması.....	26
2.1.7.	Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	29
2.1.8.	α -Amilazın Zimogram Analizi.....	29
2.1.9.	α -Glukosidazın Zimogram Analizi	30
2.2.	α -Amilazın ve α -Glukosidazın Karakterizasyonu	30
2.2.1.	α -Amilazın Aktivitesinin Belirlenmesi	30
2.2.2.	α -Glukosidazın Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31
2.2.3.	Optimum pH	31
2.2.4.	Optimum Sıcaklık	31
2.2.5.	Enzimlerin Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi	31
2.2.6.	Enzimlerin Kararlılıkları Üzerine pH'nın Etkisi	32
2.2.7.	İnhibe Edici Ajanların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	32
2.2.8.	Substrat konsantrasyonunun α -Amilazın Aktivitesi Üzerine Etkisi	33
2.2.9.	Substrat Konsantrasyonunun α -Glukosidazın Aktivitesi Üzerine Etkisi	33
2.3.	α -Amilazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu	34
2.3.1.	Presipitasyon Aşaması	34
2.3.2.	Çapraz-Bağ Oluşturma.....	34
2.4.	Amilaz-CLEA'nın Karakterizasyonu.....	34
2.4.1.	Amilaz-CLEA'nın Optimum pH Tayini	34
2.4.2.	Amilaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklık Tayini.....	35
2.4.3.	Amilaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığının Tayini	35
2.4.4.	Amilaz-CLEA'nın pH Kararlılığının Tayini.....	35
2.4.5.	Amilaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi.....	35
2.4.6.	Substrat Konsantrasyonunun Amilaz-CLEA'nın Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	35
2.5.	α -Glukozidazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu	36
2.5.1.	Presipitasyon Aşaması	36
2.5.2.	Çapraz-Bağ Oluşturma.....	36

2.6.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Karakterizasyonu.....	36
2.6.1.	α -Glukozidaz-CLEA'nın Optimum pH Tayini.....	36
2.6.2.	α -Glukozidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklık Tayini.....	37
2.6.3.	α -Glukozidaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığının Tayini	37
2.6.4.	α -Glukozidaz-CLEA'nın pH Kararlılığının Tayini	37
2.6.5.	α -Glukozidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	37
2.6.6.	Substrat Konsantrasyonunun α -Glukozidaz-CLEA'nın Aktivitesi Etkisinin Belirlenmesi.....	37
2.7.	α -Amilaz ve α -Glukosidaz Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (Kombi-CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu.....	38
2.7.1.	Çapraz-Bağ Oluşturma.....	38
2.8.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Karakterizasyonu	38
2.8.1.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın optimum pH Tayini	38
2.8.2.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklık Tayini	39
2.8.3.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) Sıcaklık Kararlılığının Tayini	39
2.8.4.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) pH Kararlılığının Tayini	39
2.8.5.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	39
2.9.	One Pot Hidroliz.....	40
3.	BULGULAR.....	41
3.1.	Moleküler Analizler	41
3.1.1.	α -Glukosidazın Klonlanması	42
3.1.2.	α -Glukosidazın SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Saflaştırılması.....	42
3.2.	α -Glukosidazın Karakterizasyonu	43
3.2.1.	α -Glukosidazın Optimum pH'sı.....	43
3.2.2.	α -Glukosidazın Optimum Sıcaklığı	43
3.2.3.	α -Glukosidazın Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi	44
3.2.4.	α -Glukosidazın pH Kararlılığı.....	45
3.2.5.	Metal İyonlarının ve İnhibe Edici Ajanların α -Glukosidazın Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	45
3.2.6.	α -Glukosidazın K_m ve V_{max} 'si	49
3.3.	Moleküler Analizler	51
3.3.1.	α -Amilaz Geninin Klonlanması	52

3.3.2.	α -Amilazın SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ve Saflaştırılması.....	52
3.4.	α -Amilazın Karakterizasyonu	53
3.4.1.	α -Amilazın Optimum pH'sı	53
3.4.2.	α -Amilazın Optimum Sıcaklığı.....	53
3.4.3.	α -Amilazın Kararlığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	54
3.4.4.	Metal İyonlarının ve İnhibe Edici Ajanların α -Amilazın Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	55
3.4.5.	α -Amilazın pH Kararlığı	59
3.4.6.	α -Amilazın K_m ve V_{max} 'sı.....	60
3.5.	α -Amilaz Çapraz Bağlı Enzim Aggregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu	61
3.5.1.	Presipitasyon Aşaması	61
3.5.2.	Çapraz-Bağ Oluşturma Süreci	61
3.6.	α -Amilaz-CLEA'nın Karakterizasyonu	62
3.6.1.	α -Amilaz-CLEA'nın Optimum pH'sı	62
3.6.2.	α -Amilaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklığı.....	63
3.6.3.	α -Amilaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığı	64
3.6.4.	α -Amilaz-CLEA'nın pH Kararlılığı.....	64
3.6.5.	α -Amilaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğı.....	65
3.6.6.	α -Amilaz-CLEA'nın K_m ve V_{max}	66
3.7.	α -Glukozidazın Çapraz Bağlı Enzim Aggregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu	67
3.7.1.	Presipitasyon Aşaması	67
3.7.2.	Çapraz-Bağ Oluşturması Süreci.....	67
3.8.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Karakterizasyonu	69
3.8.1.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum pH'sı.....	69
3.8.2.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklığı	69
3.8.3.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığı	70
3.8.4.	α -Glukosidaz-CLEA'nın pH Kararlılığı	71
3.8.5.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	71
3.8.6.	α -Glukosidaz-CLEA'nın K_m ve V_{max} 'ı.....	72
3.9.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) Çapraz Bağlı Enzim Aggregatları (CLEA) Metodu ile Birlikte İmmobilizasyonu	73
3.9.1.	Çapraz-Bağ Oluşturma Süreci	73

3.9.2.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) Birlikte Karakterizasyonu	75
3.9.3.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum pH'sı	75
3.9.4.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklığı.....	75
3.9.5.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığı.....	76
3.9.6.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın pH Kararlılığı.....	77
3.9.7.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	78
3.9.8.	One Pot Hidroliz	79
4.	TARTIŞMA	80
5.	SONUÇLAR.....	94
6.	ÖNERİLER.....	97
7.	KAYNAKLAR	98
8.	EKLER.....	104
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

“*Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T α -AMİLAZ VE α -GLUKOSİDAZININ (OLİGO (1-6), (1-4) GLUKOSİDAZ) EKSPRESYONU, KARAKTERİZASYONU, CLEA METODU İLE İMMOBİLİZASYONU”

Emel ALEMDAROĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 103 Sayfa, 4 Sayfa Ek

α -Amilaz ve α -glukosidaz, Glikozit hidrolazın temsilcilerindendir. Bu tez kapsamında, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -amilaz ve α -glukosidaz genlerinin klonlanması, ekspresyonları, rekombinant olarak üretilen enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonları ve CLEA yöntemi ile immobilizasyonları yapıldı.

α -Amilaz ve α -glukosidazın doğal PAGE ve zimogram analizleri yapılarak, optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlendi. Toprak alkali metaller, alkali metaller, potansiyel inhibitörler, iyonik ve non-iyonik deterjanların, organik çözücülerin α -amilaz ve α -glukosidaz üzerine etkileri araştırıldı. α -Amilazın, substrat olarak patates nişastası varlığında optimum pH'sı 6,0-8,0 aralığında bulundu. Enzimin optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlendi. Patates nişastası için, α -amilazın Lineweaver-Burk eğrisi ile K_m değeri 1,14 mg/ml, V_{max} değeri 31 U/mg olarak belirlendi. α -Glukosidazın substrat olarak pNPG varlığında optimum pH'sı 6,0-8,0 aralığında, optimum sıcaklığı ise 60 °C olarak belirlendi. Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) metodu kullanılarak enzimlerin ayrı olarak ve birlikte immobilizasyonu yapıldı. İmmobilize α -amilazın da karakterizasyonu yapılarak, optimum pH'sı 8,0-9,0, optimum sıcaklığı 70 °C, K_m ve V_{max} değerleri sırası ile, 0,94 mg/ml ve 35 U/ml olarak belirlendi. İmmobilize α -glukosidaz için optimum sıcaklık 55 °C, optimum pH 6,0-8,0 ve K_m ve V_{max} değerleri sırası ile 0,66 mM ve 811 U/mg olarak belirlendi. Birlikte immobilize edilen enzimler için optimum sıcaklık 55 °C, optimum pH 7,4 olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz, α -Glukosidaz, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T, immobilizasyon, karakterizasyon

PhD. Thesis

SUMMARY

“EXPRESSION, CHARACTERIZATION, IMMOBILISATION BY CLEA METHOD of *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T α -AMYLASE and α -GLUCOSIDASE (OLİGO (1-6), (1-4) GLUCOSIDASE)”

Emel ALEMDAROĞLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 103 Pages, 4 Pages Appendix

α -Amylase and α -Glucosidase are representatives of glyoxyl hydrolysis. In this study, cloning, expression, immobilization and characterization of α -glucosidase and α -amylase of *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T were performed. α -amylase and α -glucosidase genes were produced recombinantly and purified.

Zymogram and Native PAGE analyses of α -amylase and α -glucosidase were performed, optimum pH, optimum temperature and kinetic parameters were determined. The effects of alkaline earth metals, alkali metals, potential inhibitors, ionic and non-ionic detergents, organic solvents on α -amylase and α -glucosidase activity were investigated. The optimum pH of α -amylase was between 6-8 in the presence of potato starch as a substrate. The optimum temperature of the enzyme was determined as 70 °C. For potato starch, the K_m and V_{max} values of α -amylase were 1.14 mg/ml and 31 U/mg by means of Lineweaver-Burk curve, respectively. The optimum pH for α -glucosidase in the presence of *p*NPG as substrate was found to be in the range of 6-8. The optimum temperature of the enzyme was 60 °C. The enzymes were immobilized separately and together by using the cross-linked enzyme aggregate (CLEA) method. The optimum pH for immobilized amylase was 8-9, the optimum temperature was 70 °C and the kinetic parameters were K_m : 0.94 mg/ml and V_{max} : 35 U/ml. The optimum temperature for immobilized glucosidase was determined as 55 °C, the optimum pH as 6-8 and the kinetic parameters as K_m : 0.66 mM and V_{max} : 811 U/mg. The optimum pH for the co-immobilized enzymes was 55 °C and the optimum pH was 7.4.

Key Words: α -Amylase, α -Glucosidase, *Anoxybacillus flavithermus*, immobilization, characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Anoxybacillus</i> sp. α -amilazının üç boyutlu yapısı	4
Şekil 2. Nişastanın α -Amilaz tarafından hidrolizi	5
Şekil 3. Amilolitik enzimlerin nişasta üzerinde etkin olduğu bağların şeması.....	6
Şekil 4. α -Amilaz yapısı.....	8
Şekil 5. α -Amilazın glikosidik bağ hidroliz mekanizması.....	9
Şekil 6. α -Glukosidazın hidrolitik reaksiyon şeması	10
Şekil 7. Organik bir çözücünde CLEA'nın hazırlanması	13
Şekil 8. Nişastanın yapısı. a) Amiloz ve b) Amilopektinin yapısı.....	16
Şekil 9. Nişastanın SEM görüntüsü	16
Şekil 10. a) S-Tabakanın elektron mikroskobu görüntüsü b) Gram-negatif ve Gram- pozitif hücre duvarı yapısı.....	17
Şekil 11. InterPro programı ile α -glukosidaz sekansının glikozil hidrolaz 13 ailesine ait olduğunun belirlenmesi	41
Şekil 12. α -Glukosidaz 3D-Modeli.....	41
Şekil 13. PCR ile elde edilen α -glukosidaz geninin agaroz jel görüntüleri	42
Şekil 14. α -Glukosidazın jel elektroforezis görüntüleri.....	43
Şekil 15. α -Glukosidazın optimum pH grafiği.....	43
Şekil 16. α -Glukosidazın optimum sıcaklık grafiği.....	44
Şekil 17. α -Glukosidazın ısıl kararlılık grafiği	44
Şekil 18. α -Glukosidazın pH kararlılık grafiği	45
Şekil 19. Metallerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi.....	47
Şekil 20. Alkali Metallerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi.....	47
Şekil 21. İyonik ve non-İyonik Deterjanların α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi.....	48
Şekil 22. Potansiyel inhibitörlerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi.....	48
Şekil 23. Organik Çözücülerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi.....	49
Şekil 24. α -pNPG sönme katsayısının elde edildiği doğrusal grafik.....	49
Şekil 25. α -Glukosidazın pNPG substratı varlığında elde edilen Michaelis-Menten grafiği (a) ve Lineweaver-Burk eğrisi (b)	50
Şekil 26. α -Amilaz sekansının glikozil hidrolaz 13 ailesine ait olduğu belirlendi	51
Şekil 27. α -Amilazın üç boyutlu modeli için, “alpha-amylase R4F9M5.1” kalıp olarak kullanıldı	51

Şekil 28.	α -Amilaz aminoasit sekansı içindeki transmembran domainin tespiti	51
Şekil 29.	α -Amilazın SDS jel görüntüleri.....	52
Şekil 30.	α -Amilazın optimum pH grafiği	53
Şekil 31.	α -Amilazın optimum sıcaklık grafiği	54
Şekil 32.	α -Amilazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi	55
Şekil 33.	Potansiyel inhibitörlerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi	57
Şekil 34.	Alkali metallerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 35.	Metallerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi	58
Şekil 36.	İyonik ve non-iyonik deterjanların α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi	58
Şekil 37.	Organik Çözücülerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 38.	α -Amilazın pH kararlılığı grafiği.....	59
Şekil 39.	(a) Michaelis-Menten grafiği ve (b) Lineweaver-Burk eğrisi α -Amilazın çözünür patates nişasta substratı varlığında.....	60
Şekil 40.	Organik Çözücülerin α -Amilaz Presipitasyonuna Etkisi.....	61
Şekil 41.	Çapraz-Bağ oluşturma sürecinin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi	62
Şekil 42.	α -Amilaz-CLEA'nın Optimum pH'sı.....	63
Şekil 43.	α -Amilaz-CLEA'nın optimum sıcaklığı.....	63
Şekil 44.	α -Amilaz-CLEA'nın Sıcaklık kararlılığı	64
Şekil 45.	α -Amilaz-CLEA'nın pH Kararlılığı	65
Şekil 46.	α -Amilaz-CLEA'nın yeniden kullanılabilirliği	65
Şekil 47.	İmmobilize α -amilazın nişasta varlığında elde edilen b) Lineweaver-Burk eğim grafiği ve a) Michael-Menten grafiği	66
Şekil 48.	α -Glukosidaz-CLEA'nın presipitasyon aşamalarındaki aktiviteleri.....	67
Şekil 49.	Çapraz-Bağ oluşturma aşamasındaki glutaraldehit konsantrasyonlarının α -Glukosidaz-CLEA'nın aktivitesi üzerine etkisi.....	68
Şekil 50.	Çapraz-Bağ oluşturma aşamasındaki glutaraldehit inkübasyon sürelerinin α -glukosidaz-CLEA'nın aktiviteler üzerine etkisi.....	68
Şekil 51.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum pH'sı	69
Şekil 52.	α -Glukosidaz-CLEA'nın optimum sıcaklığı	70
Şekil 53.	α -Glukosidaz-CLEA'nın Sıcaklık kararlılığı.....	70
Şekil 54.	α -Glukosidaz-CLEA'nın pH Kararlılığı.....	71
Şekil 55.	İmmobilize α -glukosidazın yeniden kullanılabilirliği	72
Şekil 56.	α -pNPG sönme katsayısının elde edildiği doğrusal grafik	72
Şekil 57.	İmmobilize α -glukosidazın pNPG varlığında elde edilen a) Lineweaver-Burk eğim grafiği ve b) Michaelis-Menten	73

Şekil 58.	Çapraz-bağ oluşturma aşamasında glutaraldehit konsantrasyonlarının immobilize enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi	74
Şekil 59.	Çapraz-bağ oluşturma aşamasında glutaraldehit ile inkübasyon sürelerinin immobilize enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi	74
Şekil 60.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (immo-GA) ve serbest α -amilazın ve α -glukosidaz karışımının (serbest-GA) optimum pH	75
Şekil 61.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (immo-GA)ve serbest α -amilazın ve α -glukosidaz karışımının (serbest-GA) optimum sıcaklığı.....	76
Şekil 62.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (immo-GA) ve serbest α -amilazın ve α -glukosidaz karışımının (serbest-GA) kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi.....	77
Şekil 63.	Serbest α -Amilaz ve α -Glukosidaz karışımının pH kararlılığı	78
Şekil 64.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın pH kararlılığı	78
Şekil 65.	α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın yeniden kullanılabilirliği	79
Şekil 66.	α -Amilaz-CLEA (immo- A), Serbest-Amilaz (Serbest-A), α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA (immo-GA) ve Serbest α -amilaz ve α -glukosidaz karışımından (Serbest-GA) elde edilen nişasta hidroliz grafiği	79

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. α -Amilaz ve α -glukosidaz genlerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyonu ve şartları	26
Tablo 2. Ayırma jeli ve Denge jeli içerikleri	29
Tablo 3. Yürütme tamponu ve örnek yükleme tamponu içerikleri	30
Tablo 4. Farklı mikroorganizmalara ait α -amilazın K_m ve V_{max} değerleri.....	82
Tablo 5. Bazı mikroorganizmalarda α -amilazın biyokimyasal özellikleri.....	85
Tablo 6. Mikroorganizmaların α -glukosidazlarının K_m ve V_{max} değerleri	87
Tablo 7. Bazı mikroorganizmalarda α -glukosidazın biyokimyasal özellikleri	88

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Arg, (R)	: Arjinin
Asp, (D)	: Aspartik asit
bp	: Baz çifti
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CLEA	: Cross-linked enzime agregat (çapraz-bağlı enzim kümesi)
CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
CuSO ₄	: Bakır (II) sülfat
Cys, (C)	: Sistein
Da	: Dalton
dk.	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
DTT	: Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
EGTA	: Etilen glikol-bis (β-aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetraasetik asit
Glu, (E)	: Glutamik asit
HCl	: Hidrojen klorür
His, (H)	: Histidin
IPTG	: Isopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid
kb	: Kilo baz
k_{cat}	: Turnover katsayısı
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
l	: Litre
<i>lacZα</i>	: Beta- galaktosidazı α domain geni
LB	: Luria Bertani Sıvı Besiyeri
M	: Molar
mg	: Miligram

MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnCl ₂	: Mangan (II) klorür
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
NiCl ₂	: Nikel (II) klorür
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Phe, (F)	: Fenilalanin
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
Triton X-100	: 2-[4-(2,4,4-trimetilpentan-2-yl) fenoksi] etanol
Trp, (W)	: Triptofan
Tween-20	: Polioksietilen (20) sorbitan monolaurat
Tyr, (Y)	: Tirozin
UV	: Ultraviyole
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid
α	: Alfa
α-pNP	: 4-Nitrofenil
α-pNPG	: 4-Nitrofenil α-D-glukopiranosit
β-me	: β-merkaptotanol
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Amilolitik Enzimlerin Önemi

Tüm canlı türleri enzimler vasıtasıyla yaşar ve aynı zamanda enzim üretirler. Bunun sonucunda enzimler üç farklı kaynaktan elde edilebilir: Bitkilerden, Hayvanlardan ve Mikroorganizmalardan bitkilerden ve hayvanlardan ekonomik olarak geri kazanılabilen enzimlerin sayısı sınırlı olduğundan, mikroorganizmalar tercih edilen bir endüstriyel enzim kaynağı haline gelmektedir. Endüstriyel enzimlerin üretimi için mikrobiyal hücreler mantar, bakteri veya maya gruplarından seçilmektedir. Endüstriyel enzimlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmaların iyi biyolojik aktiviteye sahip olması gerekir. Bu mikroorganizmaların bazıları endüstriyel enzimlerin ticari üretiminde kullanılır; birçoğunun yakın gelecekte pazar potansiyeli vardır. Günümüzde 50'den az mikrobiyal enzim endüstriyel öneme sahiptir (Volesky, 1984).

Termofilik organizmalar, enzimler, proteinler ve nükleik asitler gibi ısı kararlı hücresel bileşenlere sahiptir. Ayrıca aşırı asidik ve alkali koşullara dayanıklı oldukları bilinmektedir. Isıl kararlı enzimler, bazı endüstriyel süreçlerde halihazırda bulunan mezofilik enzimlere göre oldukça spesifik olduğu için daha kullanışlı alternatifler olarak incelenmektedir (Giver ve ark. 1998).

Taradığım literatürde *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T, alkali şartlara uyumlu termofilik bir mikroorganizma olarak yer almaktadır. Gıda ve kağıt endüstrisinde, deterjanlarda, ilaçlarda, toksik atıkların giderilmesinde ve petrol sondajında gerçekleştirilen reaksiyonları en üst düzeye çıkaran amilolitik enzimler kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Giver ve ark. 1998; Haki ve Rakshit 2003). Endüstride ve biyoteknolojik araştırmalarda iyi bir kullanım alanı olması nedeniyle, bu tip enzimlerin karakterizasyonu oldukça önemlidir.

α -Amilaz (EC 3.2.1.1), Glikozit hidrolaz enzim ailesinin en iyi bilinen temsilcilerindendir. Amilazlar genel olarak α , β ve γ alt tiplerine göre sınıflandırılır. Bunlardan ilk ikisi en çok araştırılanlardır. α -Amilaz, β -amilazdan daha hızlı etki eden bir enzimdir. Amilazlar α -(1-4) glikozidik bağlara etki eder ve bu nedenle glikozit hidrolazlar olarak da adlandırılmaktadır. Amilazlar, endoamilazlar ve ekzoamilazlar olarak ikiye ayrılır. Endoamilazlar, nişasta molekülü hidrolizini rastgele bir şekilde kataliz eder. Tüm α -amilazlar (EC 3.2.1.1) nişastayı (polisakkarit) parçalayabilme özelliğine sahiptir. Reaksiyon

sonucu, küçük glukoz (monosakkarit) ve maltoz (disakkarit) birimleri üretilir (Gupta ve ark. 2003).

Enzimler günümüzde çeşitli sanayi sektörlerinde kullanılmaktadır. Deterjanlarda, kâğıt endüstrisinde, tekstil endüstrisi, gıda endüstrisi ve diğer endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Nişastanın sakkarifikasyonu, bira üretimi, sindirim bozukluklarının tedavisi ve süttten peynir üretimi gibi aşamalarda kullanılır. Pek çok enzim arasında yaygın olarak kullanılan amilolitik enzimler nişastanın hidrolizindeki önemli rolü ve bu hidrolitik etkinin uygulamaları nedeniyle giderek artan bir talep görmektedir (Gupta ve ark. 2003).

Anoxybacillus cinsinde karbohidrat metabolizmasında görevli gen kümesi şu enzimlerden oluşur: hücre içi α -glukosidaz, hücreye bağlanan bir α -amilaz, üç maltoz/maltodekstrin ABC taşıyıcı periplazmik proteinler (MalE, MalF ve MalG; permeaz olarak da bilinir) ve hücre içi siklomaltodekstrinaz (CDaz). Nişasta parçalama süreci büyük olasılıkla α -amilaz ve amilopullulanazın C-terminallerinde sırasıyla transmembran bölgeleri ve S-layer homoloji (SLH) domainiyle hücrelere bağlanması ve hücrede sabitlenmesi eylemi ile başlatılır. Oligosakkaritlere parçalanan nişasta, maltodekstrin ABC taşıyıcı periplazmik proteinler tarafından hücrelere taşınır ve ayrıca oligosakkaritler hücre içi α -glukosidaz tarafından maltoza ve glukozu parçalanır (Turner, 2005).

Endüstride kullanılan enzimlerin kararlılıkları oldukça önemlidir. Enzimleri kararlı hale getirerek onlardan daha uzun süre yararlanabilmek için enzimlerin immobilizasyonu günümüzde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Enzim immobilizasyonunun farklı yöntemleri bulunmaktadır. Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) metodunda, taşıyıcı içermeyen immobilize enzim, ekstra inaktif olan bir kütle veya desteğe ihtiyaç duymaz. Genellikle çözünmüş enzimlerin doğrudan çapraz bağlanmasıyla üretilir. Bu fiziksel agregatlar kovalent olmayan bağlar ile bir arada tutulan moleküler yapılardır ve suda dağınık olduğu için tekrar çözünmezler. Agregat yapıları içindeki çapraz bağlı her bir protein katalitik aktiviteyi sürdürür (Lopez-Serrano ve ark. 2002). Taşıyıcı kullanılan immobilize enzimlere benzer şekilde, CLEA metodu, enzimlere şiddetli koşullar altında serbest enzimden daha iyi bir stabilite sunmaktadır. CLEA metodu enzimleri, pH, organik çözücüler, sıcaklık ve inhibitör ürünlere veya denatüranlara karşı daha yüksek direnç gösteren, endüstriyel uygulamalar için umut verici çözünmeyen biyokatalizörlere dönüştürmektedir. Taşıyıcı içermemesi ve enzimlerin saf olarak kullanılmasının gerekmemesi gibi avantajlarından dolayı, enzimlerin yapısını daha kararlı hale getirmek için CLEA immobilizasyon methodu tercih edilmektedir (Roberge ve ark. 2009) (Sheldon, 2011)

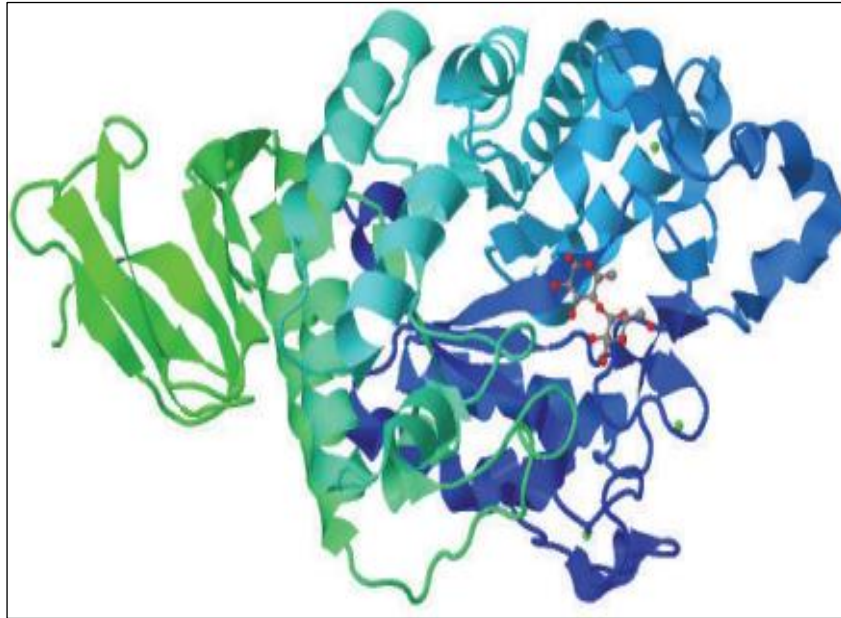
Endüstride α -glukosidaz, esas substratı olarak nişastayı glukozla dönüştürmek için kullanılır. α -Glukozidazın yanı sıra oligo-1,4-1,6- α -Glukosidaz (O16G, oligo-1,6-glukosidaz, izomaltaz, sükröz) biyolojik açıdan incelenmemiştir (Schomburg, 2012). α -Glukosidaz enzimleri esas olarak α -1,6-glikozidik bağlarına (iki glukoz birimi) veya izomalto-oligosakkaritlere (226 glukoz ünitesi) saldırır. α -Glukosidazlar veya maltazlar (α -D-glukozit glikohidrolaz EC 3.2.1.20) mikroorganizmalar arasında yaygın olarak bulunur. Kısa zincirlerin α (1-4) ve (1-6) glikozidik bağlarını hidrolize eder. Diğer amilolitik enzimlerin etkisiyle oluşan sakkaritler ve indirgeyici olmayan uçtan α -D-glukoz birimlerini serbest bırakır. Gıda endüstrisinde α -glukosidaz, α -amilazla birlikte nişastayı glukozla parçalamada pullulanazın yerine kullanılmaktadır. α -Glukosidazın α -1,6-glikozidik bağ aktivitesine sahip olması nedeniyle, nişasta hidrolizinde pullulanaza alternatif olarak endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir (Goh, 2014).

Anoxybacillus cinsine ait türler, karbon kaynağı elde etmek için çeşitli glikozit hidrolaz (GH) enzimlerini kullanırlar. Taradığım literatürde *Anoxybacillus flavithermus* WK1 referans genomunda tüm Glikozit hidrolazlar henüz tanımlanmamıştır. Yapılan çalışmalarla, karbohidrat metabolizmasında rol oynayan birçok proteine sahip oldukları gösterilmiştir. *Anoxybacillus flavithermus* DSM2641^T suşunun karbohidrat metabolizmasında görev alan enzimleri için endüstriyel açıdan güçlü kaynak olduğu düşünülmektedir. (Goh, 2014). *Anoxybacillus* sp. SK3-4 ve *Anoxybacillus flavithermus* WK1 α -amilazı, hücreye-bağlı- α -amilaz olarak tanımlanmıştır. Amilolitik enzimler ve α -glukosidazlar genellikle mikroorganizmada bir arada bulunur ve çalışır (Kahar, 2016)

Bu tür verilerden yola çıkarak ülke ekonomisine katkıda bulunmak ve Dünya'daki gelişmelere ayak uydurmak amacıyla bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus flavithermus* DSM2641^T α -amilaz ve α -glukosidazını kodlayan genlerin belirlenmesi, bu genlerin pET28a⁽⁺⁾ ekspresyon vektörüne klonlanması, rekombinat üretimi, saflaştırma koşullarının belirlenmesi, ayrıca katalitik direncini artırmak için CLEA immobilizasyonu metodu üzerinde durulacaktır. Ayrıca, endüstride daha geniş bir kullanım alanı bulabilmesi için, enzimlerin pH ile termal kararlılığı belirlenecek, bununla birlikte kimyasallar varlığında enzim aktivitesinin değişimi incelenecektir.

1.2. Glikozit Hidrolazlar Ailesi

Tüm karbohidrat-aktif enzimlerinin amino asit dizilerine bağı olarak yapılan sınıflandırma sistemi, Glikozit hidrolazlar (GH) ailesini oluşturur. α -Amilaz, GH13 ailesinin başlıca temsilcisidir. GH13 ailesi genel olarak α -amilazlar ailesi olarak da bilinir. GH13 ailesi içinde α -amilazların sınıflandırılmasında; konfigürasyonun meydana getirdiği reaksiyon mekanizması, paylaşılan 4-7 korunmuş dizi bölgeleri (korunmuş dizi bölgesi) ve katalitik düzenek, sahip olunan (β/α)-barrel katalitik birim dikkate alınmaktadır. α -Amilaza ilaveten GH13 ailesi içinde α -glukosidaz, izoamilaz, pullulanaz, amilopullulanaz, neopullulanaz ve bazı ekzo enzimler tanımlanmıştır (Henrissat, 1991). GH13 ailesi, 3 domainli proteinlerdir. Bunlar 1) Domain A, ana katalitik (β/α)-barrel domain (sekiz iç paralel β zinciri onu çevreleyen sekiz α heliks), 2) Domain B, heliks $\alpha 3$ ve $\beta 3$ dizi arasında barrelin dışına doğru uzanan daha uzun loop olan küçük domain, 3) Domain C, C terminal uçta bulunur (MacGregor, 1993) (Svensson, 1994) (MacGregor ve ark. 2001) (Van Der Maarel ve ark. 2002). Özgün GH13 ailesi üyeleri özgünlüklerini sağlayan iki uçtan birinde ilave domainler içerirler. İşlevselliği hala tam olarak anlaşılamamış bu domainler nisaşta, glikojen ve diğer sakkaritleri bağlayıcı domainleri kapsar. (Janecek ve ark. 2003).



Şekil 1. *Anoxybacillus* sp. α -amilazının üç boyutlu yapısı (Gopinath, 2017)

1.2.1. Alfa Amilaz Ailesi (EC 3.2.1.1)

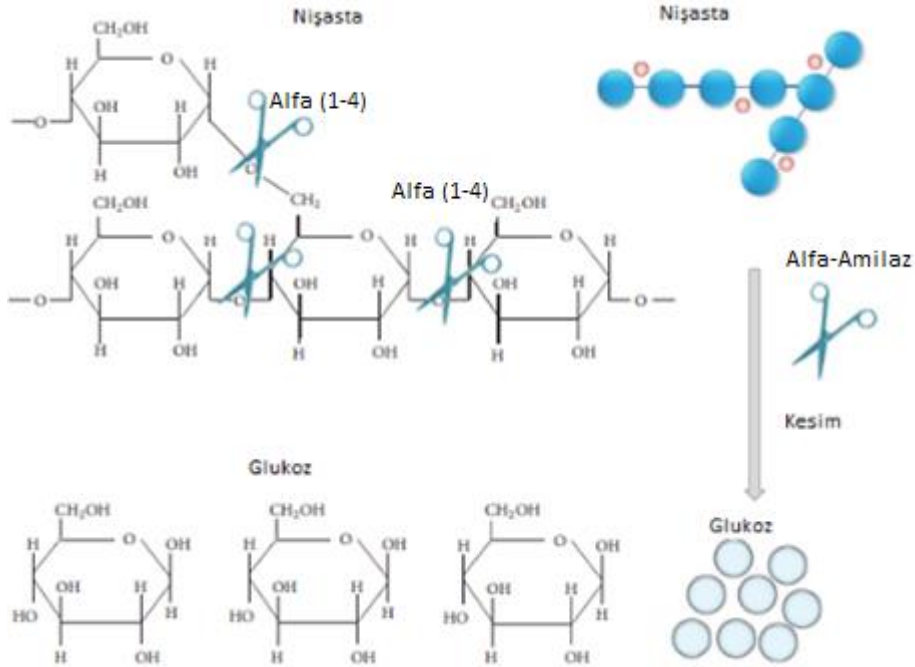
Niştayı parçalayan başlıca dört tip enzim vardır:

1. (1 → 4) α -D-glikozidik bağları hidrolize eden (amilazlar);
2. (1 → 6) α -D-glikozidik bağları hidrolize eden (izoamilazlar);
3. (1 → 4) α -D-glikozidik bağları transfer eden (glukanosiltransferazlar); ve
4. Dallanma enzimleri [α -(1 → 4) α -(1 → 6)] (transferazlar).

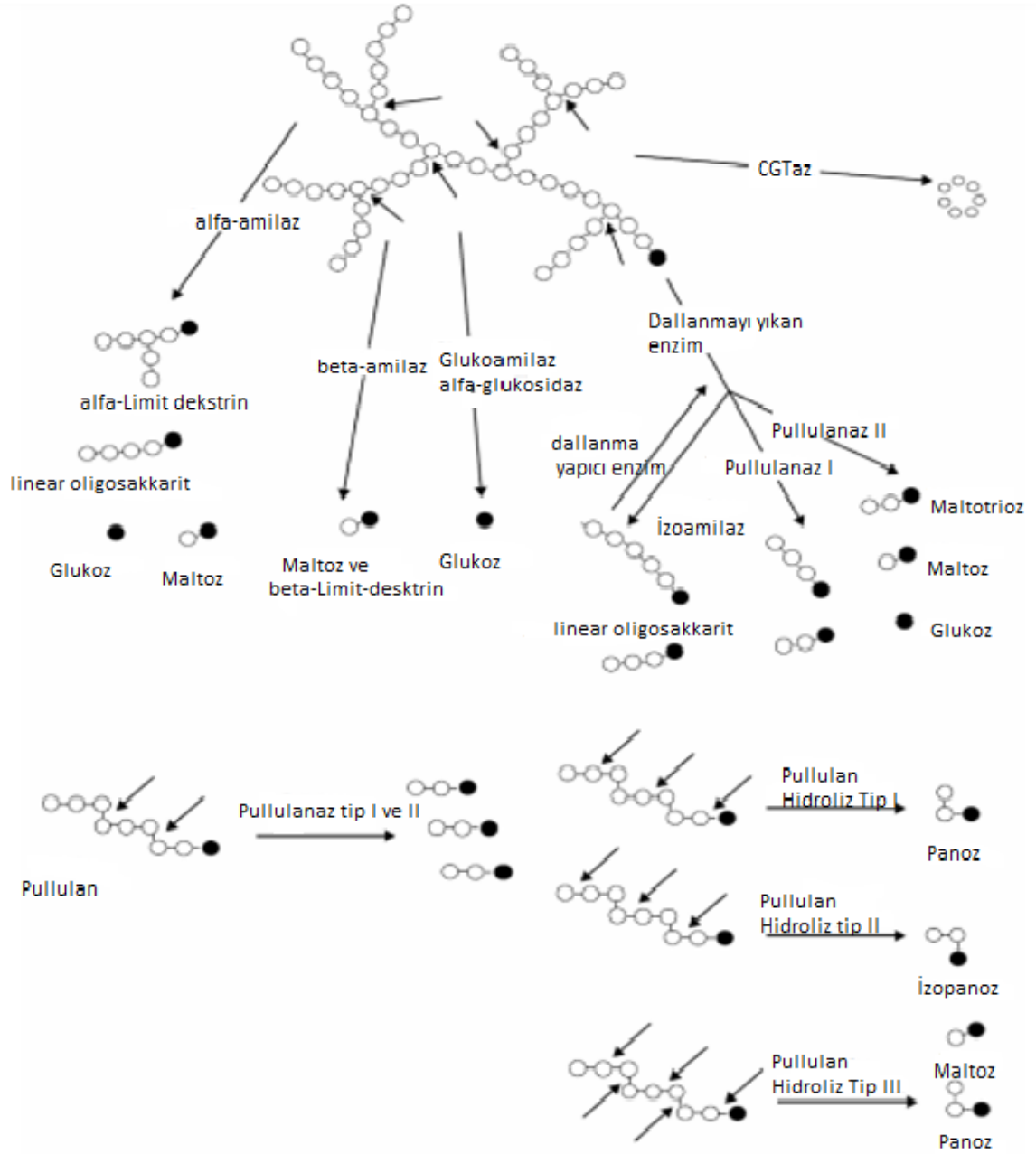
Her enzim tipi için Glu230, Asp297 ve Asp206 rezidüleri enzim aktivitesi için zorunludur, ayrıca bu familyanın çoğu enzimi transisyon durumunun stabilizasyonu için kritik iki histidin rezidüsü içerir. Bu beş rezidü bu familya boyunca dört korunmuş kısa diziyi oluşturur ve bu dizilerdeki bazı temel amino asit rezidüleri enzim spesifitesi ile ilişkilidir (MacGregor ve ark. 2001).

Amilazlar üç sınıfa ayrılır:

1. Endo-etkin α -Amilazlar;
2. Ekzo-etkin β -Amilazlar;
3. İzoamilazlar



Şekil 2. Niştanın α -Amilaz tarafından hidrolizi (Gopinath, 2017)



Şekil 3. Amilolitik enzimlerin nişasta üzerinde etkin olduğu bağların şeması (Bertoldo, 2001)

1.2.2. β -Amilaz

β -Amilaz (EC 3.2.1.2), α -(1,4) glukan bağlarının hidrolizi için bir polisakkarit zincirinin indirgeyici olmayan ucuna etki ederek ardışık maltoz birimleri üreten bir ekzo-hidrolaz enzimidir. Glikojen veya amilopektin gibi dallanan polisakkaritlerdeki dallanmayı ayıramadığı için hidroliz tamamlanmaz ve dekstrin birimleri kalır. β -Amilazın birincil

kaynakları daha yüksek bitkilerin tohumları ve tatlı patateslerdir. Meyvelerin olgunlaşması sırasında β -amilaz nişastayı maltoza parçalayarak olgunlaşmış meyvenin tatlılığını sağlar. Enzimin optimum pH'sı 4,0 ila 5,5 arasındadır. β -Amilaz, araştırma ve endüstriyel alanda farklı uygulamalar için kullanılabilir. Çeşitli yöntemlerle üretilen nişasta ve glikojen moleküllerinin yapısal çalışmaları için kullanılabilir. Endüstride, bira ve damıtma endüstrisinde fermantasyon için kullanılır. Ayrıca, yüksek maltozlu şuruplar üretmek için kullanılır (Sundarram ve Murthy, 2014).

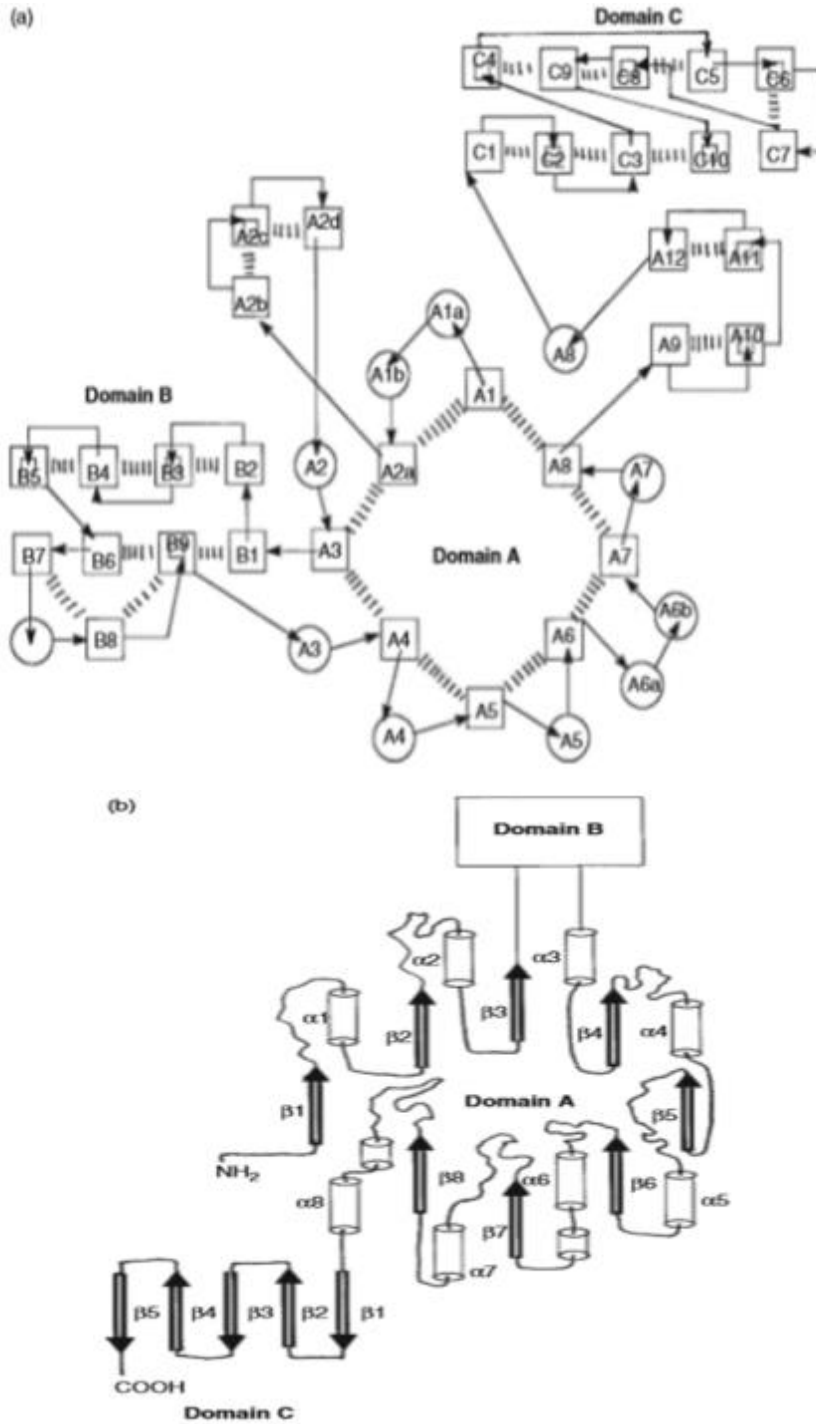
1.2.3. γ -Amilaz

γ -Amilaz (EC 3.2.1.3), amiloz ve amilopektinin indirgeyici olmayan ucundaki son α -(1-4) glikozidik bağları kesmenin yanı sıra, α -(1-6) glikozidik bağları keser, diğer amilaz formlarının aksine, glukoz üretir. γ -amilaz asidik ortamlarda verimlidir ve optimum pH'sı 3'tür (Sivaramakrishnan, 2006).

1.2.4. Amilazın Yapısı

Amilazlar, yeni oluşan ürünlerinde indirgen uç anomerik karbonunda α -konfigürasyonuna ve nişasta zincirlerinin iç kısımda kalan glukoz residülerindeki nişasta zincirlerine saldıran endo-mekanizmasına sahiptirler. Amilazların endo-mekanizması nişasta zincirlerine rastgele saldırarak daha küçük zincirleri oluşturur ve bundan dolayı viskosite hızlıca azalır ve endo-etkin amilazlar bu yüzden sıvılaştırıcı amilazlar olarak isimlendirilir. Endo-etkin amilazlardan yapısı kristalografi yöntemiyle belirlenen domuzda bulunan pankreatik α -amilaz, N-asetil polipeptit 496 amino asit, 5 disülfid bağlantı ve 2 sülfidril grup içerir, 55.000 Da moleküler ağırlığına sahiptir (Levitzki, 1974). Bu enzimlerin ürün özgünlüklerindeki farklılıklar, nişasta zincirlerindeki glikozil birimlerine bağlı affinitelerinden ve glikozil birimlerinin sayısından dolayıdır. Ayrıca amino asit kompozisyonu ve β/α yapısına katılan farklı loplara katlanması da ürün özgünlüklerindeki farklılığı etkiler (Buisson, 1987). Domuz pankreatik amilazı üç domain içerir; Domain B, domain A'nın üç β -tabaka dizisi ve üç α -heliksi arasında gömülüdür. Bu β -tabaka dizilerinin üçü antiparalel, biri paraleldir. Domain C, ayrı bir globuler üniteden oluşur, 405 ve 496 rezidüleri arasında uzanır, antiparalel β -tabaka dizisi yapıları içerir (Mizuno, 1992). 403 amino asit ünitelerinden oluşan sekiz α -heliksin katıldığı sekiz paralel β -tabaka dizisi birlikte büyük domain A'yı oluşturur. Bütün yapı TIM-barrel veya (β/α) 8-barrel yapı olarak bilinen

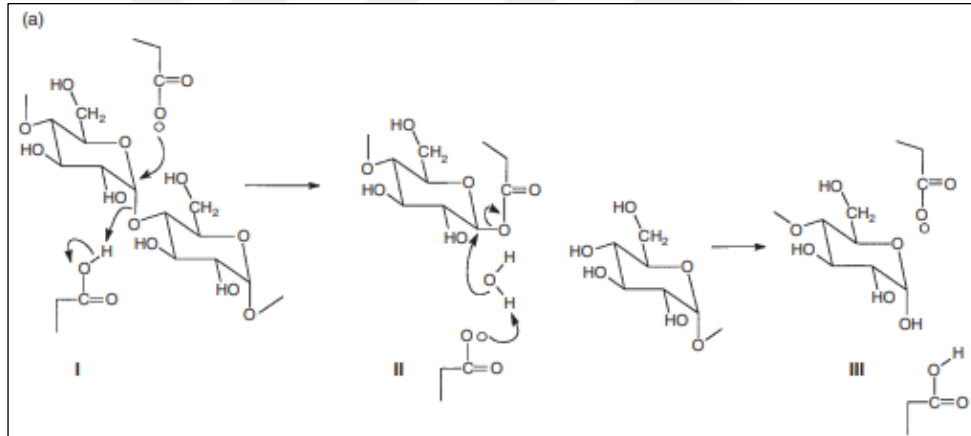
çember düzen içinde dizilir. Enzim allosterik aktivatör olarak hareket eden bir klor iyonu içerir. Proteinin tersiyer yapısını, enzim aktivitesi sürdürmek için bir kalsiyum iyonuna bağlıdır. (Kadziola, 1994).



Şekil 4. α -Amilaz yapısı (Kadziola, 1994)

1.2.5. Glikozidik Bağın Hidroliz Mekanizması

Bu mekanizmada, karboksilatın, nükleofil hidrolizine maruz kalan glukopiranozil ünitesinin C-1 karbonu nükleofilik saldırı yoluyla glikozidik bağın hidrolizini başlatır. Eş zamanlı olarak, karboksilat glukozun oksijeni ile yer değiştirir ve karboksilik asit grubu tarafından protonlanır. Saldıran karboksilat grubu bir kovalent bağ ile bağlı bir glukopiranozil-enzim kompleksi (ara ürün) veren, β -asetal-esteri oluşturur. Bu yüksek enerjili bağ sonradan su tarafından hidroliz edilir. Bu enzimlerin aktif bölgesinde ikinci aspartat amino asitinin karboksilat grubu tarafından suyla reaksiyonu kolaylaştırır. Karboksilat grubu sudan bir proton alır, böylece β -bağlı asetal-ester üzerinde su daha nükleofilik hale gelir. Bu sayede enzim kompleksinden salınan glukopiranozil biriminin anomerik karbon atomu, ürünün indirgen ucu konfigürasyonun muhafazasını sağlayan, α -konfigürasyona sahiptir (Mosi, 1997) (Whistler ve ark. 2012).



Şekil 5. α -Amilazın glikosidik bağ hidroliz mekanizması (Whistler ve ark. 2012)

1.3. α -Glukosidazlar

α -Glukosidazlar (EC 3.2.1.20) tipik bir ekzo-hidrolaz enzimidir. Oligo ve polisakkaritler gibi substratların indirgenmemiş ucundan α -glukoz serbestleştirir. Genellikle nişastanın tam olarak parçalanmasına eşlik eden diğer amilolitik enzimlerle ilişki halindedirler. α -Glukosidazlar, substrat spesifikliğinde ve transglukozilasyon aktivitelerinde çok yönlülük gösterirler ve bu spesifiklik büyük ölçüde enzim kaynağı ile çeşitlilik gösterir (Kelly, 1983). Bu enzimler temel araştırmalarda, endüstriyel nişasta proseslerinde, klinik laboratuvarlarda α -amilaz analiz kitlerinde ve sentetik oligo-, di-, ve trisakkaritlerde çok sayıda uygulamaya sahiptir. Hücrelerin stres şartlarında oluşturduğu sporla ilişkili bazı ısı

kararlı α -glukosidazlar, hızlı biyolojik indikatör olarak sterilizasyonun kontrolünde kullanılır (Kelly, 1983) (Kelly, 1986) (Albert, 1998) (Nashiru, 2001). Glikozit hidrolazların amino asit dizi bazlı sınıflandırmasına göre, α -glukosidazlar esas olarak glikozit hidrolaz ailesinin (GH) 13 ve 31 sınıfındadırlar. Bakteriler, mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*) ve böceklerden elde edilenlerin çoğu α -glukosidaz GH13 ailesine aittir. GH13, α -glukosidazların katalitik alanları, $(\beta/\alpha)_8$ barrel katlanmalarla oluşturulur (Suzuki, 1992) (Nakao, 1994). Hidrolitik reaksiyonlar, glukozil rezidüsünün glukozidik oksijeni (Cj--O) ile anomerik karbonu arasındaki bağın bölünmesiyle meydana gelir. Glukozil rezidüsü sudan gelen bir proton veya bir alıcı tarafından değiştirilir. Kısacası glikozil rezidüsü ile proton arasındaki bu değişim hidroliz reaksiyonudur (Chiba, 1997).



Şekil 6. α -Glukosidazın hidrolitik reaksiyon şeması (Chiba, 1997).

Mikroorganizmada intraselüler, ekstrasellüler veya hücreye bağlı olarak bulunurlar (Nashiru, 2001). Bazı α -glukosidazlar ayrıca ortamda glikosil akseptörleri yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğu zaman transglukozilasyon reaksiyonlarını katalizler (Van Der Maarel ve ark. 2002).

Her iki aile enziminin katalitik çekirdeği, katalitik alanın dördüncü β -tabakanın C-terminal ucunda yer alır. GH13 ve GH31 enzimlerinin genel asit/baz katalizörleri, sırasıyla katalitik alanların beşinci ve altıncı β -kollarının C-terminallerindedir. Bakteriyel α -glukosidaz genellikle maltooligosakkaritlerin hücre içi metabolizmasında rol oynar. Günümüzde α -glukosidazlar, nişasta endüstrilerinde nişasta hidrolizi için en çok tüketilen enzimlerdir (Haki, 2003). Doğal nişastanın yanı sıra modifiye nişasta endüstrisi olan glukoz ve maltoz şurubu ve farklı seviyelerde eşitlenmiş şuruplar, ayrıca kâğıt ve tekstil endüstrileri, çeşitli tatlandırıcılar ve biyoyakıt için alkol ve endüstrilerde çeşitli amaçlar için kullanılır (Saburi, 2015). Nişasta metabolizması bakteride salgılanan α -amilazlara bağlıdır. α -Amilaz nişastadan linear maltodekstrinleri oluştururken, hücre ilişkili α -glukosidazlar da nişastayı maltoza, maltodekstrinler ve glukozla dönüştürür (Cihan ve ark. 2010).

1.4. İmmobilizasyon

α -Amilaz uygulamasındaki en büyük engel, büyük ölçekli reaksiyonlar sırasında israf edilmesi ve yeni enzimler sağlamanın yüksek maliyete neden olmasıdır. Tutuklama, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve kovalent bağlanma gibi immobilizasyon yöntemleri ile enzim tekrar tekrar kullanılmaktadır. Dahası, immobilizasyon enzimatik materyalin geri kazanılmasına ve yeniden kullanımına izin vererek üretim maliyetlerini düşürür ve katalitik aktivitesinin tutulmasını sağlar ve enzim stabilitesini iyileştirir (Far, 2020). Endüstride kullanılan biyokatalizörler tek kullanımlıktır ve bu nedenle yeni enzimler sağlamak ek maliyet getirir. İmmobilizasyon, enzimi kullanarak döngü sayısının artırılması için kullanılan en yaygın stratejidir. İmmobilizasyon enzim tasarrufu sağlar, daha sofistike ve modern prosesler için kullanım kolaylığı ve daha uzun bir depolama süresi olanağı sağlar (Mafakher, 2023).

1.4.1. Adsorbsiyon Metodu

Birkaç enzim immobilizasyon yöntemi arasında, katı taşıyıcılarla adsorpsiyon metodu yaygın olarak uygulanabilir. Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve iyonik etkileşimler de dâhil olmak üzere fiziksel etkileşimler, enzim ve taşıyıcı arasında oluşur. Zayıf etkileşimler, enzimin doğal yapısını ve aktivitesini korur.

Özellikle, makul maliyet, bulunabilirlik, kararlılık ve reaktiviteye sahip bir taşıyıcı seçmek, enzim ve taşıyıcı arasında iyi bir afinite oluşturmak için önemlidir. Dahası, parçacık boyutu, yüzeye yerleştirilen fonksiyonel grupların türü, yüzey alanı ve gözenek yapısı da dâhil olmak üzere taşıyıcıların fizikokimyasal parametreleri dikkate alınmalıdır. Taşıyıcıların yüzeyi, enzim-taşıyıcı etkileşimlerine neden olan belirli aktif grupları sağlamalıdır. Taşıyıcılar iki gruba ayrılır: organik (kitosan, selüloz, kitin ve aljinat gibi) ve inorganik (silika, hidroksiapatit ve titanya gibi) (Mafakher, 2023).

1.4.2. Tutuklama Metodu

Bu yöntemde, enzim sentetik veya doğal polimerik gözenekli membrana (jel ve mikrokapsülleme gibi) hapsedilir; substrat ve ürün serbestçe içinden yayılır. Bu yaklaşım, hafif koşullar gerektiren uygun fiyatlı ve hızlı bir yöntemdir ve enzimi, hidrofobik çözücülerden ve gaz kabarcıklarından korur; ancak, kütle transferinde bir sınırlaması vardır

ve düşük seviyeli enzim yüklemesi bu yöntemin dezavantajıdır. Bu dezavantaj enzim aktivitesinin kaybı ile sonuçlanır; bu sorunu ele almak için polimer gözenekliliğinin, yüzey işlevselliğinin, ağ yapısının ve parçacık boyutunun değiştirilmesi gerekir (Mafakher, 2023).

1.4.3. Kovalent Bağlanma Metodu

Kovalent bağlanma yaklaşımı, taşıyıcı elektronların taşıyıcının yüzeyi ile enzimin fonksiyonel âmin grubu arasında paylaşıldığı ve böylece kovalent bağla enzimin bağlanması yoluyla enzimin kararlılığını artırır. Diazo bağlantısı, izo-üre bağlantısı, peptit bağlanması ve alkilasyon gibi çeşitli reaksiyonlar, enzim molekülleri ve destek arasındaki kovalent etkileşime katkıda bulunur. Hareketsizleştirme yoluyla, enzimler zorlu koşullarda bile taşıyıcıya bağlı kalır. Yöntemin dezavantajı, titiz hazırlama koşulu ve toksik çapraz bağlama reaktifleriyle reaksiyonu nedeniyle enzimin aktivitesinin kaybına neden olur (Mafakher, 2023).

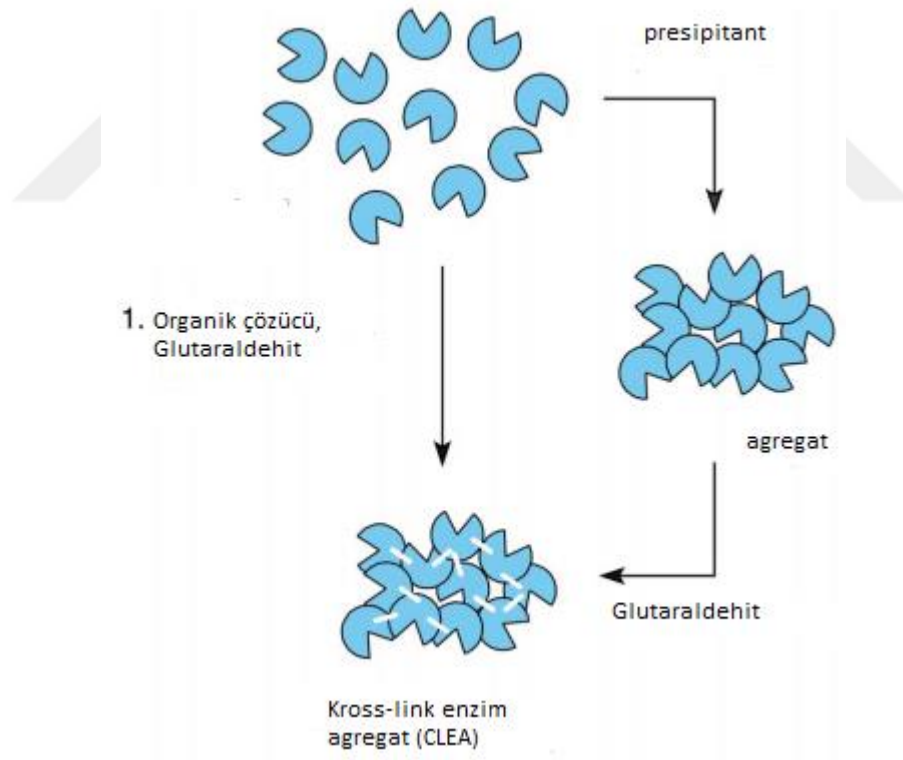
1.4.4. Çapraz Bağlanma Metodu

CLEA metodu, taşıyıcı içermeyen immobilize enzimler ekstra inaktif olan bir kütle veya desteğe ihtiyaç duymaz. Genellikle çözünmüş enzimlerin doğrudan çapraz bağlanmasıyla üretilir. (Lopez-Serrano ve ark. 2002)

Quioco ve Richards tarafından 1964 yılında yapılan çalışmada, glutaraldehit gibi kimyasal grupların proteinlerde çapraz bağlanmalar oluşumuna yardımcı olarak protein aggregatları oluşturduğunu ilk kez rapor etmiştir (Quioco ve Richards, 1964). Birbirine bağlı bu enzimlerin çapraz bağlı enzimler (CLE) olarak da aktivitelerini sürdürdükleri görüldü. Bu çapraz bağlı proteinler çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC) olarak adlandırıldı (Quioco ve Richards, 1966). CLEC'in bir dezavantajı, oldukça saf enzime ihtiyaç duyulması ve kristalize edilmesi gerektiğiydi. Bu fikir ilk önce CLEA teknolojisi olarak tanıtıldı (Cao ve ark. 2000). Bu yöntemin bir dezavantajı; her enzim için farklı çapraz bağlanma protokollerinin oluşturulması gerektiğinden, hazırlama koşullarının optimize edilmesi önemlidir. CLEA'nın katalitik özellikleri çöktürücü maddeye bağlıdır. Çöktürücü ajanlar çeşitliliği, CLEA'nın seçiciliğini güçlü bir şekilde etkileyen, oluşturduğu enzim aggregatlarının konformasyonu birbirinden farklıdır (Cao ve ark. 2000). Fiziksel aggregatlar kovalent olmayan bağlar ile bir arada tutulan yoğun moleküler yapılardır ve suda dağınık

agregatlar olduğu için tekrar çözünmezler. Agregat yapılar içindeki CLEA'daki herbir protein katalitik aktiviteyi sürdürür (Lopez-Serrano ve ark. 2002).

Taşıyıcı immobilize enzimlere benzer şekilde, CLEA metodu, zorlayıcı koşullar altında serbest enzimden daha iyi bir kararlılık sunar. Enzimleri pH, organik çözücüler, sıcaklık ve inhibitör veya denatüre edici ajanlara karşı daha kararlı gibi reaksiyon koşulları isteyen endüstriyel uygulamalar için umut verici çözünmeyen biyokatalizlere dönüştürmek endüstri için umut vadetmektedir (Roberge ve ark. 2009) (Sheldon, 2011). Kristalizasyona kıyasla başka bir çapraz bağlama yöntemi olan enzim moleküllerinin agregat (CLEA) oluşturması daha ucuz bir metottur ve ileri düzeyde çapraz bağlayıcı tuz ve organik çözücüler veya non iyonik polimerler tarafından çöktürülerek sağlanır (Sheldon ve van Pelt, 2013). CLEC veya CLEA elde etmek için kristalizasyon veya agregasyon koşulları, biyokatalizörlerin seçiciliğini ve/veya aktivitesini değiştirebilir (Talekar ve ark. 2013).



Şekil 7. Organik bir çözücünde CLEA'nın hazırlanması (Lopez-Serrano, 2002)

Bacillus amyloliquefaciens'e ait α -amilazın, amonyum sülfat ve %2'lik glutaraldehit varlığında 6 saat inkübe edilerek, çapraz-bağlı enzim agregatları oluşturduğu gözlenmiştir.

B. amyloliquefaciens'e ait α -amilazının CLEA'larının, 4 operasyonel döngü sonucunda aktivitesinin %65 olduğu belirlenmiştir (Talekar ve ark. 2012).

α -Amilaz yapılan başka bir çalışmada, üç ticari enzim; α -amilaz, glukoamilaz ve pullulanaz kullanılarak "kombi-CLEA'lar" hazırlanmıştır. Amonyum sülfatla presipite edilen enzimlerin performansı beş operasyonel döngü sonunda değişmeden kalmıştır. Hazırlanan Combi-CLEA sayesinde enzimlerin ısıl kararlılığı artmıştır (Talekar, 2013).

Ticari enzim olarak satılan OPTIMAX® 7525, kombi-CLEA yöntemi kullanılarak glukoamilaz ve pullulanazın taşıyıcısız, ortaklaşa-immobilize formu olarak hazırlanmıştır. Glukoamilaz ve pullulanaz, amonyum sülfat kullanılarak çöktürülmüştür. Sekiz operasyonel döngü sonunda, birlikte immobilize edilen glukoamilaz ve pullulanaz, başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %90 ve %85'ini korumuştur (Talekar, 2013).

Zophobas morio (süper yemek kurdu) larvalarından elde edilen α -amilazın immobilizasyonu çalışmasında, α -amilaz, çöktürücü olarak aseton ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve katkı maddesi olarak bovine serum albümini kullanılarak immobilize edilmiştir. CLEA-amilazın yüksek sıcaklığa karşı daha fazla kararlı olduğu ve 6 kez tekrarlanan kullanımdan sonra kalan aktivitesinin %14,9' unu koruduğu belirlenmiştir (Easa ve Yusof, 2017).

Bacillus lehensis G1 kaynaklı maltojenik α -amilaz CLEA'ları (Mag1), gözenekli bir ajanın (Mag1-p-CLEA'lar) eklenmesiyle geliştirilmiştir. %0,8 (w/h) narenciye pektini (gözenekli ajan), %0,25 (w/v) kitosan ile hazırlanan gözenekli yapıya sahip Mag1-pCLEA'lar (çapraz bağlı) 1,5 saat çapraz bağlanma sonunda %91,20 aktivite gözlenmiştir. 40 °C'de 30 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitenin %80'i koruduğu ve serbest Mag1 ve Mag1-CLEA'lardan daha uzun yarı ömür gösterdiği belirlenmiştir (Nawawi, 2020).

1.5. Nişasta

Nişasta birçok yiyecekte makrobileşen olarak bulunur. Gıda endüstrisinde insan beslenmesi için birçok önemli özelliklere sahip bir bileşendir. İnsan diyetinde enerjinin %50-70'ine katkı sağlar ve ayrıca direkt glukoz kaynağıdır. Metabolik enerji üretmek için beyin ve kırmızı kan hücreleri için gerekli bir substrattır (Perry, 2007). Ayrıca nişasta gıda ve diğer endüstriyel alanlarda düşük maliyetinden dolayı kullanılan büyük potansiyele sahip çok yönlü bir polimerdir. Nişasta çeşitli buğday tuber ve köklerden elde edilmekte ve % 60'ı yiyeceklerde (örnek olarak fırın ürünlerde, soslarda, çorbalarda, şeker şuruplarında,

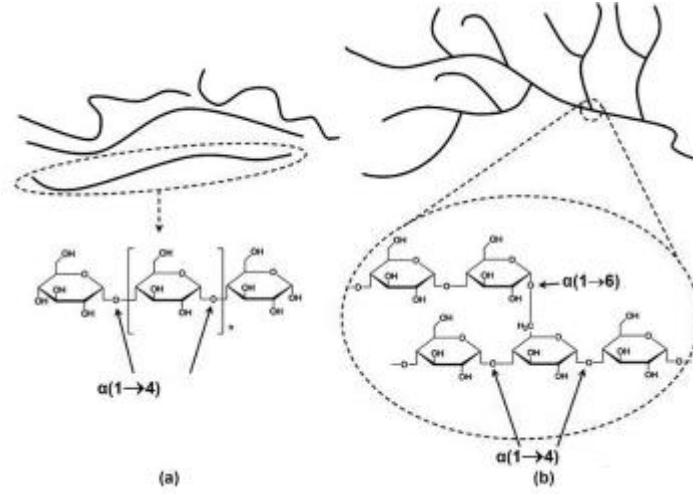
dondurmada, atıştırmalıklarda, et ürünlerinde, bebek yiyeceklerinde, içeceklerde), % 40'ı farmakositik ve diğer alanlarda kâğıt, çocuk bezi, tekstil, bioplastik, yapıştırıcı, inşaat materyalinde kullanılmaktadır (Burrell, 2003) (Copeland ve ark. 2009). Nişasta, ideal “green” biopolimer (çevre dostu) olarak hizmet eder (Ray vd., 2012).

1.5.1. Nişasta Yapısı

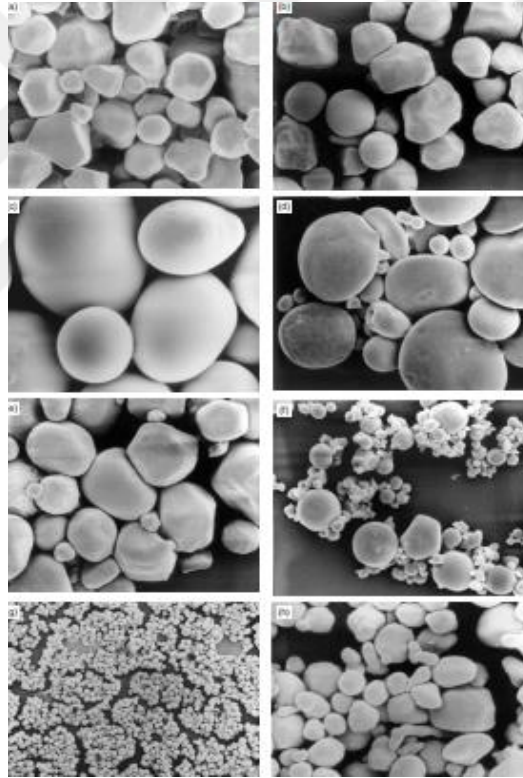
Nişasta D-glukoz birimlerinden oluşan bir polisakkarittir, homoglukan veya glukopiranoz olarak da tanımlanır. Nişasta başlıca α -(1-4) ve α -(1-6) glikosidik bağlarla bağlı D-glukopiranoz polimerlerini içerir. Oluşan bu bağlar; D-glukopiranoz üzerinde C1 komşu D-glukopiranozdan C4 veya C6 ile bağlanır. Nişasta polimerleri daima bir uç üzerindeki serbest aldehit grubundan dolayı bir indirgen (reducing) uca sahiptir. Polimerin diğer ucu indirgen olmayan (non-reducing) uç olarak isimlendirilir. Glikozidik bağlar nişastada α - konfigürasyonundadır. α -Bağlarının oluşumu piranoz halkanın C1'nin üzerindeki hidroksil grubunun oryantasyonu tarafından belirlenir. α -Bağ benzer nişasta polimerlerinin helikal yapı oluşturmaya izin verir. Bu helikal yapı onun özgün özelliklerine ve enzim ile parçalanabilirliğine katkı sağlar (Thomas ve ark. 1999) (BeMiller, 2009).

Bitkisel orjinine bakmaksızın nişasta çeşitleri başlıca iki farklı anhidroglukoz polimerleri içerir; Amiloz ve Amilopektin. Bu polimerler farklı yapı ve özelliklere sahiptir (Thomas ve ark. 1999) (Zobel, 1988). Amilozun yapısı oldukça uzun, düz zincir α -glukan biriminden oluşan ve % 99 civarında α (1-4) ve α (1-6) bağlar içerir. Bitkisel orjinine bağlı olarak yapısı ve büyüklüğü farklıdır. Düşük derecede dallanmasından dolayı çözünmüş amiloz çözünmeyen yarı kristal agregatlar oluşturmaya eğilimlidir (Buleon ve ark. 1998) (Tester ve ark. 2004).

Amilopektin, amiloza göre daha dallanmış bir yapıda olan, % 95 oranında α (1-4) ve % 5 oranında α (1-6) bağlarından oluşan bir yapıdır. Amilopektin amilozdan daha büyük bir moleküldür (Wang ve White, 1994).



Şekil 8. Nişastanın yapısı. a) Amiloz ve b) Amilopektinin yapısı (Whistler ve ark, 2012)



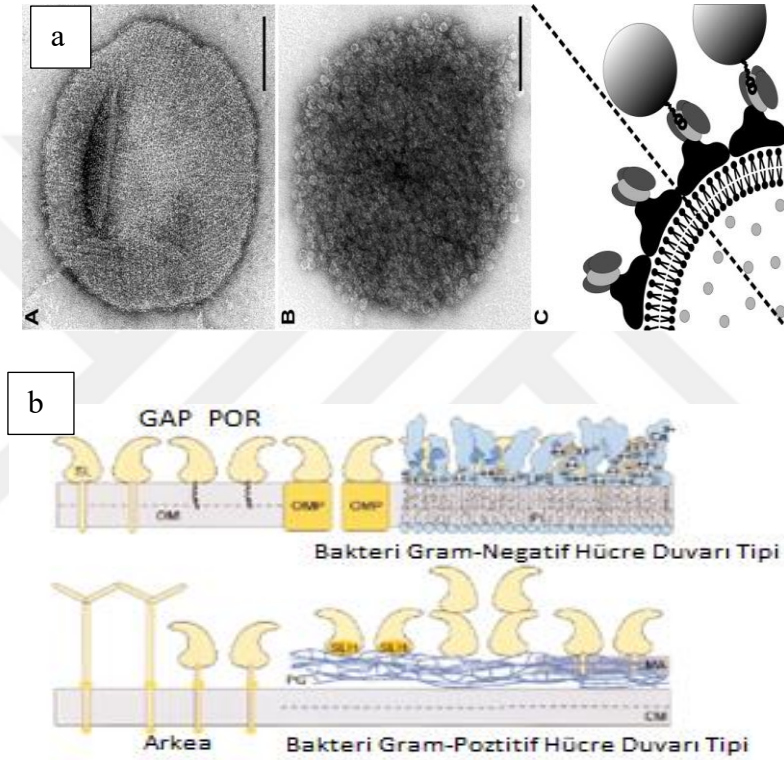
Şekil 9. Nişastanın SEM görüntüsü (Whistler ve ark, 2012)

1.6. S-Tabaka Katmanı (SLH Domain)

Birçok arkea, özellikle hipertermofiller, tek hücre duvarı katmanı olarak bir S-tabakaya sahiptir. S-tabaka parakristalin hücre zarfıdır. Bakteriyel S-tabakalarının yapısal bütünlüğüne yönelik başlıca tehditler olan, yüksek sıcaklık, aşırı pH, dış proteazlar, kayma

kuvvetlerinin neden olduğu mekanik stres veya ozmotik basınç değişiklikleri ve son olarak yüksek iyonik kuvvetlerden bakteriyi korur. Bakteri hücresinin dış yüzeyinde S-tabakada kanca benzeri yapılara bağlı olarak enzimler bulunur. Ayrıca, çoğu bakteri hücresinin en dış engelini temsil eden S-tabakaları, bakteriyi korumaya katkıda bulunur (Moll, 2002).

SLH domaini, basiller, klostridyalar ve ilgili Gram-pozitif bakterilerin S-tabakalarında görülen özel bir dizi modelidir. Ancak, S-tabakaları evrim sürecinde oldukça farklı hücre yüzey yapılarına uyum sağlamıştır (Engelhardt, 1998) (Pavkov-Keller, 2011).



Şekil 10. a) S-Tabakanın elektron mikroskobu görüntüsü b) Gram-negatif ve Gram- pozitif hücre duvarı yapısı (Engelhardt, 1998)

1.7. Biyoteknolojik Uygulamalar

Amilazlar, gıda endüstrisinde; ekmek yapımı, tatlandırıcılar, fruktoz ve glukoz şurubu, meyve suyu, alkollü içecekler gibi sektörlerde, kâğıt endüstrisinde, tekstilde, deterjanlarda, kuru temizlemede leke çıkarıcı olarak, etanolden yakıt eldesinde ve bunun gibi çeşitli endüstriyel alanlarda geniş bir uygulamaya sahiptir.

Nişasta endüstrisi, α -amilazı kullanan başlıca endüstridir. Kimyasal olarak asit, nişastanın sindirimi için kullanılabilmesine rağmen, enzimler, reaksiyon koşulları ve ikincil reaksiyonların olmaması nedeniyle nişastayı işlemek için daha uygundur.

(Gupta, 2003)Ekmek yapım sürecinde hamura eklenen α -amilazlar nişastanın dekstrinlere hidrolizini sağlar ve dekstrin mayalar tarafından fermente edilerek kullanılır. α -Amilaz, nişastayı dekstrinlere hidrolize ederek fermentasyon oranını artırır. Ayrıca nişastanın hidrolizini sağlayarak hamur viskozitesini azaltır. Böylece hamur kabarak ekmek hacmi artar ve ekmek dokusu gelişir. Fırıncılık ürünlerinin depolandığı süreçte bazı değişimler gözlenir. Bunlar kabuğunun sertliğini ve ırtılığını kaybetmesi, kabuğunun neminin azalması ve ekmeğın lezzetini kaybetmesine neden olan bayatlama olarak telaffuz edilen bir süreçtir. (Kulp, ve ark. 1981). Geleneksel olarak, bayatlamayı önlemek ve fırınlanmış ürünlerin dokusunu ve lezzetini iyileştirmek için çeşitli katkı maddeleri kullanılır. Katkı maddeleri arasında kimyasallar, küçük şekerler, enzimler/bunların kombinasyonları, süttozu, emülgatörler, monogliseritler/digliseritler, şeker esterleri, lesitin, granül yağlar, antioksidanlar (askorbik asit veya potasyum borat) bulunur. Son zamanlarda, enzimlerin hamur iyileştirmede/bayatlama önleyici maddeler olarak kullanımına vurgu yapılmıştır. Pullulanazlar ve α -amilazın kombinasyonu etkili bayatlama önleyici özelliktir. Fırıncılık ürünlerinin bayatlamasına önler ve yumuşaklıklarını sürdürmelerini sağlar. (Gupta ve ark. 2003)

Enzimler, artık modern kompakt deterjanların bileşenlerinden biridir. Enzimlerin amaşır ve bulaşık deterjanı üretimindeki kullanımı artmıştır. Deterjanlarda enzim uygulamasının temel avantajı, enzimsiz deterjanlara göre çok daha kolay koşullara sahip olmasıdır. İlk otomatik bulaşık makinası deterjanları çok sertti, gıdalarla tüketildiğinde yaralanmaya neden oluyordu, hassas ini ve ahşap tabaklarla uyumlu değildi. Bu, deterjan endüstrilerini daha kolay ve daha etkili özümmler aramaya zorladı. Tüketiciler, soğuk suda ve ılımlı şartlarda çalışan deterjanlara ihtiyaç duymaktadır. Başlangıçta deterjanlar olarak kimyasal maddeler kullanıldı fakat zararlı etkilere sebep olduğu görüldü. Bu yüzden enzimler endüstride alternatif çözüm yolu olarak kullanıldı. Enzimler, evre dostu ve ılımlı şartlarda çalışabilmektedir. Bulaşık deterjanları içerisindeki, α -amilazlar, bulaşıklar üzerindeki yiyecek kalıntıları içindeki nişastayı parçalamak için kullanılmıştır. Çamaşır deterjanları içerisindeki amilazlar giyecekler üzerindeki lekelerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Düşük sıcaklıklarda ve alkali pH'larda α -amilazın stabilitesini devam ettirmesi deterjanlarda kullanımına olanak sağlamaktadır. α -Amilazlar, 1975'ten beri toz

Çamaşır deterjanlarında kullanılmaktadır. Günümüzde, tüm sıvı deterjanların %90'ı α -amilaz içerir ve otomatik bulaşık deterjanları için α -amilazlara olan talep artmaktadır. Deterjanlardaki α -amilazların sınırlamalarından biri, enzimin kalsiyuma karşı duyarlılık göstermesi ve düşük kalsiyumlu bir ortamda kararlılığının ciddi şekilde tehlikeye girmesidir. Ek olarak, çoğu yaban tip α -amilaz, genellikle deterjan formülasyonlarının bir bileşeni olan oksidanlara karşı hassastır. Ev deterjanlarındaki oksidanlara karşı kararlılıkları, proteaz gibi diğer enzimlerle takip edilen başarılı stratejiler kullanılarak arttırılmıştır. Son zamanlarda, iki büyük deterjan enzimi tedarikçisi olan Novozymes ve Genencore International'dan bilim insanları, α -amilazların ağartma işlemlerinde kararlılıklarını iyileştirmek için protein mühendisliğini kullanmışlardır. Oksidasyona duyarlı amino asitleri değiştiren mutasyon çalışmaları yapmışlardır. *B. licheniformis*, 197. pozisyondaki metiyoninin lösin ile değiştirilmesi sonucu oksidatif bileşiklere karşı daha dirençli α -amilaz üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Bu iyileştirilmiş oksidasyon kararlılığı, ağartıcı içeren deterjan formülasyonlarında mutant enzimin daha iyi depolama stabilitesi ve performansıyla sonuçlanmıştır. (Gupta ve ark. 2003).

Özellikle fruktoz ve glukoz şurubu üretiminde nişasta kullanılır. Bu retim jelatinasyon, likuefaksiyon ve sakkarifikasyon aşamalarından oluşur. Jelatinasyon; nişasta granüllerinin suda vizkoz bir süspansiyon oluşturması aşamasıdır. Likuefaksiyon jelatinasyondan sonra oluşan vizkoz nişasta süspansiyonu α -amilaz tarafından kısa dekstrin zincirlerine kısmı hidroliziyle vizkozitesinin azaldığı aşamadır. Sakkarifikasyonda ise likuefaksiyondan sonra oluşan ürünün daha da hidrolize olmasıyla glukoz ve fruktoz şurubu oluşur. Elde edilen fruktoz şurubu tatlandırıcı olarak özellikle içecek endstirisinde kullanılır (Gupta ve ark. 2003).

Nişasta tekstil endstirisinde haşıllama ajanı olarak kullanılır. Tekstil için modern üretim süreçleri içinde dokuma sırasında ipliğin kopmaması önlenmelidir. Bu amaçla, ipliklere çıkarılabilir bir koruyucu katman uygulanır. Bu boyut katmanı için kullanılan malzemeler oldukça farklıdır. Nişasta çok cazip bir boyuttur, çünkü ucuzdur, dünyanın çoğu bölgesinde kolayca bulunur ve oldukça kolay bir şekilde elde edilir. Nişasta ile boyutlandırılmış tekstillerin iyi bir şekilde çapının çıkarılması için, seçici olarak nişastayı uzaklaştıran ve liflere saldırmayan α -amilazların uygulanmasıyla elde edilir. Ayrıca, nişastayı rastgele olarak suda çözünen ve yıkamayla çıkarılabilen dekstrinlere ayırır. Kullanılan nişastanın uzaklaştırılmasında enzim kullanımı özellikle iplikleri etkilemeksizin

yalnızca nişasta moleküllerine etki eder. Büyük dayanıklı lifler üretmek için tekstilde α -amilazlar kullanılmaktadır (Gupta, 2003).

Greyfurtun meyve suyuna acılığını veren naringin maddesinden, oligo- α -1,6-glukosidazlar vasıtasıyla enzimatik transglukozilasyon yoluyla, naringin modifikasyonu ile naringenin elde edilmiştir (Tramice, 2009).

Yem endüstrisinde α -amilazın kullanımıyla vücut ağırlığı ve yem dönüşüm oranının arttığı bildirilmiştir. α -Amilaz, nişasta polimerlerini kolayca fruktoz ve glukozu hidrolize eder, bu da karbohidratların sindirilebilirliğini artırır. (Hussain, 2013)

Biofuel olarak etanol en çok kullanılan enerji kaynakları arasındadır. Nişasta, etanol üretiminde kullanılan ekonomik başlangıç maddesidir. Sakkarifikasyon prosesinde nişasta etanole dönüştürülecek fermente olan şekere hidroliz edilir. Daha sonra bu şeker mayalar tarafından fermente edilerek alkole dönüştürülür, bu aşamada da mikrobiyal kökenli enzimlerin önemi giderek artmaktadır (Sundarram ve Murthy, 2014).

Oligo- α -1,6-glukosidazlar, nişastadaki amilopektin yapıları veya sukrozu parçalayarak şeker şurubu üretiminde kullanılırlar. Oligo- α -1,6-glukosidazlar, α -amilazlarla beraber, etanol ya da gıda endüstrisinde dirençli nişasta, izomaltooligosakkarit ve panoz üretiminde kullanılırlar. Glukoz ve fruktoz şurubu üretimi, besinlerin bayatlamasının geciktirilmesi gibi amaçlarla gıda endüstrisinde kullanım alanlarına sahiptir (Dong, 2020).

Tekstilde olduğu gibi nişasta, kâğıtta da haşıllama ajanı olarak kullanılır. Haşıllama ile pürüzsüz yazılabilir silinebilir daha kaliteli kâğıt oluşturulur. Nişasta, yaygın olarak haşıllama ajanı olarak kullanılır.

1.8. Termofilik Mikroorganizmalar

Bakteriler yaşama ortamının sıcaklığına göre üç gruba ayrılırlar: Mezofiller, Termofiller ve Sakrofiller. Sakrofiller, -10 °C'ye kadar olan sıcaklıklara uyum sağlayabilirler fakat optimum olarak üreyebildikleri sıcaklıklar 15 °C dolayındadır. Mezofiller, normal şartlardaki sıcaklıklarda (20-45 °C) ürerler. Termofiller, 45 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda dahi çoğalabilirler (Brock, 1985). Endüstride enzimatik ve mikrobiyolojik proseslerin yüksek sıcaklıkta işlem görmesinin önemli yararları vardır. Böylece yüksek sıcaklıkta prosesin kararsız bileşikler tarafından engellenmesinin önüne geçilmiş olur. Başlıca avantajları yüksek sıcaklıklarda, daha fazla reaksiyon hızı oluşur, çoğu kimyasalın daha fazla oranda çözünebilmesini sağlar, akıcılığın

ve difüzyon hızlarının fazla olmasına neden olur (Kristjansson, 1989). Şaperonlar olarak bilinen bazı proteinler, termofilik mikroorganizmalar tarafından fazlaca üretilir. Bu proteinler denaturasyona karşı proteinlerin tekrar doğal yapılarında katlanmasına ve işlevlerini tekrar kazanmalarına yardım ederler (De Macario, 2000). Bu mikroorganizmaların hücre zarları doymuş yağ asitlerinden meydana gelmiştir. Doymuş yağ asitleri mikroorganizmaya hidrofobik bir ortam sağlar. Bu sayede yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmanın yaşamasını sağlar. Termofiller, revers DNA giraz sayesinde süper sarmal DNA yapısı oluşturur (Lopez, 1999) Mikroorganizmalar, varolan tüm canlılar gibi varlıklarını sürdürebilmek için yaşadıkları ortama uyum sağlamak zorundadırlar. Termofil mikroorganizmaların ihtiva ettikleri proteinleri yüksek sıcaklığa, denaturasyona ve proteolize karşı dayanıklıdır (Kumar ve Nussinov, 2001).

Termofiller, genellikle 55 °C'den yüksek sıcaklıkları seven mikroorganizmalardır. Üremeleri için optimum sıcaklığı 65 °C'den yüksek olanlar ekstrem termofil, 80 °C'den yüksek olanlar hipertermofil, daha yüksek sıcaklıklarda yaşayanların çoğu ise arkeadır (Noll, 2013). Kaplıcalar, termofillerin kolonizasyonu için uygun doğal ortamlar olarak kabul edilir. Bu ortamlarda sıcaklık değişimleri fiziko-kimyasal özellikler ve jeolojik özelliklere göre farklılık gösterir. Bu bölgeler, esas termofilik mikroorganizmalar olan bakteri ve arkeaların 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kolonizasyon özelliğini artırır. Termofillerin çeşitliliği ve karakterizasyonuna ilişkin ilk kayıtlar, Yellowstone Milli Parkı'ndandır. Bu bölgelerdeki termofillerin çeşitliliği sıcaklık, pH ve çözünmüş hidrojen sülfür seviyeleri, biyocoğrafya ve jeolojik tarih gibi faktörlere bağlanmıştır (Whitaker, 2003) (Purcell ve ark. 2007) (Takacs-Vesbach ve ark. 2008) (Valverde ve ark. 2012).

1.9. Bacillaceae Ailesi

Anoxybacillus flavithermus (ilk tanımlandığında *Bacillus flavithermus*), Yeni Zelanda'daki bir kaplıcadan izole edilmiştir ve 30–70 °C aralığında büyüyen sarı pigmentli fakültatif anaerob olarak karakterize edilmiştir (Heinen ve ark. 1982). Yellowstone Park (Ahtapot Kaynağı) ve Avustralya Büyük Artezyeni Havza Ulusal'da *B. flavithermus* suşları bulundu (Byers ve ark. 1998) (Nold ve ark.1996). İkibin yılından önce, *B. flavithermus* suşları üzerine yapılan çalışmalar sınırlıydı. İkibin yılında Pikuta ve arkadaşları hayvan gübresinden anaerobik K1^T suşunu izole etti (Pikuta, 2000). *Anoxybacillus* spp. Cinsi ilk kez 2000 yılında topraktan izole edildi ve ardından bu cinsin üyelerinin sayısı giderek arttı.

(Pikuta, 2000). 16S rRNA'ya dayalı DNA-DNA hibridizasyon analizleri ve K1^T suşunun fenotipik özelliklerine dayanarak, *Anoxybacillus* cinsi, *Bacillaceae* familyasının yeni bir cinsi olarak önerilmiştir. *Anoxybacillus* ismi bakterinin anaerobik özelliğine dayanarak önerildi. *Anoxybacillus*, oksijen olmadan hayatta kalabilen küçük, çubuk şeklinde (basil) bir mikroorganizmayı ifade etmektedir. K1^T suşu, bu nedenle *Anoxybacillus pushchinensis* olarak adlandırıldı. *A. pushchinensis* K1^T ve *B. flavithermus* filogenetik olarak birlikte kümelenmiş olduğundan *B. flavithermus*, *Anoxybacillus flavithermus* olarak yeniden sınıflandırıldı (Pikuta, 2000). *Anoxybacillus* hücreleri genellikle çubuk şeklindedir ve düz veya hafif kavislidir, sıklıkla çiftler halinde veya kısa zincirler oluştururlar ve endospor oluşumu görülür (Saw, 2008). *Bacillaceae* familyası, özellikle bol miktarda yararlı proteinler ve enzimler üretilebilmesi nedeniyle, endüstriye, biyoteknolojiye önemli katkı sağlayan mikroorganizma grubudur (Goh, 2013). Familya içerisindeki tüm türler Gram pozitifdir. Bu familya içerisinde 20.000'den fazla suş tanımlanmıştır. NCBI veritabanı, genom dizileme projeleri kayıtlarına göre, *Bacillaceae* için tanımlanmış genomların %99'dan fazlasını *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsleri temsil eder. *Bacillaceae* genomları arasında *Amphibacillus xylanus* NBRC 15112, 2,57 Mb ile en küçük boyuta ve en düşük toplam gen ve protein sayısına (sırasıyla 2.489 ve 2.411) sahiptir. *Bacillus* genomları genellikle büyüktür, ortalama olarak yaklaşık 5,4 Mb'dir ve 5.000'den fazla ORF'ye (Açık Okuma Zinciri) sahiptir. *Bacillaceae* üyelerinin genomunun %G+C oranı ile optimum hücre çoğalma sıcaklıkları arasında ilişkili yoktur. Mezofilik *Halobacillus*'un %G+C'si 44,3 ve *Salimicrobium* %G+C 46,3 dür. *Geobacillus* cinsi, 16S rRNA filogenisine ve dizi benzerliğine göre *Anoxybacillus*'a en yakın cins gibi görünmektedir (Goh, 2013). Bugüne kadar *Anoxybacillus*'un toplam 22 türü ve iki alt türü bulunmaktadır (Zhang ve ark. 2013) (Cihan, ve ark. 2013) (Deep ve ark. 2013). *Anoxybacillus* hücreleri alkalifilik veya alkali toleranslıdır ve türlerin çoğu nötr pH'da üreyebilmektedir (Goh, et al., 2013).

Amilolitik enzimler, tüm nişasta bazlı endüstriler için en önemli hidrolitik enzimler arasındadır ve α -amilazların ticarileştirilmesi, ilk olarak 1984'te sindirim bozukluklarının tedavisi için bir farmasötik yardımcı olarak kullanılmasıyla başlamıştır. Bu ışık altında, mikrobiyal α -amilazlar, nişasta işleme endüstrisinde kimyasal hidrolizin yerini tamamen almıştır. Ayrıca, farmasötik ve ince kimyasal endüstrilerinde potansiyel olarak kullanılabilirler. Günümüzde, amilolitik enzimler dünyada pazar payının büyük bir kısmına sahiptir. Literatürden yola çıkarak ülke ekonomisine katkıda bulunmak ve Dünya'daki gelişmelere ayak uydurmak amacıyla bu tez kapsamında, alkali şartlara uyumlu, termofilik

bir bakteri olan *Anoxybacillus flavithermus* DSM2641^T'un karbohidrat metabolizmasında görevli α -amilaz ve α -glukosidaz kodlayan genleri belirlenerek, pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanıp, enzimler rekombinant olarak bol miktarda üretilmiştir. Üretilen enzimler saflaştırılarak, katalitik dirençlerini artırmak için CLEA immobilizasyonu metodu ile ayrı ayrı ve birlikte immobilize (combi-CLEA) edilmiştir. Ayrıca, endüstride daha geniş bir kullanım alanına sahip olan amilolitik enzimlerin karakterizasyonu için enzimlerin pH ile termal kararlılığı belirlenerek, kimyasallar varlığında enzim aktivitesinin değişimi incelenmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasallar

Yeast extract (Merck), NaCl (Merck), Trypton (Merck), Taq DNA Polymerase (Promega), dNTP (Promega), pGEM®-T Easy Vector System I (Promega), EDTA (Merck), X-Gal (Applchem), IPTG (Applchem), CaCl₂ (Aktar Kimya), CuSO₄ (Merck), Kanamycin (Applchem), Etil Alkol, Ampicillin (Applchem), *EcoRI* (Promega), *NcoI* (Promega), T4 DNA Ligase (NEB), *XhoI* (Promga), Jel Ekstraksiyon Kiti (Thermoschintific), Na₂HPO₄ (Merck), Methylene Blue (Merck), β-mercaptoethanol (Merck), Methanol (Isolab), Asetik asit (Isolab), Glyserol (Merck), Amonium Sulfate (Merck), TEMED (Janssen Chimica), Protein Ladder (Biolab), KCl (Merck), MgCl₂ (Sigma), LiCl (Sigma), CuCl₂ (Sigma), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck), Phosphoric Acid (Merck), BSA (NEB), Sodium Acetate (Merck), Trisma Base (Sigma), Acrylamide(Sigma), Bis-Acrylamide (Promega), Bromophenol Blue (Gerbu), NaOH (Merck), KOH(Sigma-Aldrich), Citric Acid (Merck), *pNPG* (4-Nitrophenyl-α-D- glucopyranoside) (Sigma-Aldrich)

2.1.2. Bakteri ve Vektörler

Bu çalışmada α-amilaz ve α-glukosidaz gen kaynağı olarak *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T kullanıldı. *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T bakterisi DSMZ- (German collection of microorganizm and cell culture) firmasından satın alındı.

Promega'dan satın alınan pGEM®-T Easy Vector Sytems I (Promega, A1360) ve pUCM-T vektörü, α-amilaz ve α-glukosidaz genlerinin klonlanması için kullanıldı. pGEM®-T Easy vektörü, yüksek kopya sayılı, ampisilin direnç geni, T7 RNA polimeraz promotörü, MCS (çoklu kesim bölgesi) ve bir *lacZα* geni ihtiva eder. pUCM-T T7 RNA polimeraz promotörü, β-galaktosidaz geni ihtiva eder.

α-Amilaz ve α-glukosidaz genlerinin ekspresyonları için laboratuvarımızın stoklarında Novagen'den satın alınan pET28a⁽⁺⁾ ekspresyon vektörü kullanıldı. pET28a⁽⁺⁾, düşük kopya

sayılı, T7 RNA polimeraz promotörü, genin N- veya C-terminaline eklenebilecek polihistidin etiketi ve kanamisin direnç geni içeren bir ekspresyon vektörüdür.

2.1.3. Moleküler Analizler

SWISS-MODEL vasıtasıyla proteinlerin 3D modelleri yapıldı.

(<https://swissmodel.expasy.org/>; (Schwede, 2003)).

InterPro vasıtasıyla α -amilaz ve α -glukosidazın mensup oldukları aile grubu tespit edildi.(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; (Apweiler, 2000)).

2.1.4. Besiyerleri

LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T ve *E. coli* JM101, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin çoğaltılması için kullanıldı. LB hazırlamak için; 5 g yeast ekstrakt, 10 g tripton ve 5 g NaCl, 1000 ml distile su içerisinde çözöldü. pH değeri 7,2'ye ayarlanarak, 121 °C'de 20 dk otoklavla steril edildi.

LB (Luria-Bertani) katı besiyeri, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T ve *E. coli* JM101, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin çoğaltılması için kullanıldı: 5 g yeast ekstrakt, 10 g tripton, 5 g NaCl ve 12 g agar, 1000 ml distile su içerisinde çözöldü, pH 7.2 ye ayarlanarak, 121 °C'de 20 dk otoklavla steril edildi.

2.1.5. Genomik DNA İzolasyonu

Anoxybacillus flavithermus 2641^T suşu LB sıvı besiyeri içerisinde 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler Promega Wizard genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T Gram pozitif olduğu için bakterinin hücre duvarlarını zayıflatmak için, 37 °C'de 60 dk 120 µl lizozim (10 mg/ml) ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 2 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Pelletlerin üzerine, 600 µl Nuclei lizis solüsyonu ilave ederek 80 °C'de 5 dk'lık inkübasyon ile hücreler patlatıldı. Bakterinin sahip olduğu RNA'ların degradasyonu için solüsyona, 2 µl RNaz ilave edilerek, 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığında biraz soğutulan örnek üzerine 200 µl protein presipitasyon solüsyonu ilave edildi. Örnek 20 sn vortekslenerek buz üzerinde 5 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sayede hücre içi proteinler degrede edildi. Ardından

13.000 rpm'de 5 dk santrifüjle genomik DNA dışındaki hücre kalıntıları çöktürüldü. Süpernatanta 600 µl izopropanol eklendi. Pellet oluşumu gözlemlendi ve oluşan pellet 2 dk 13.000 rpm'de santrifüjle çöktürüldü. Pellet kurumaya bırakıldı. Pellet iyice kuruduktan sonra %70'lik etanol eklenerek DNA yıkandı ve 2 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından 37 °C'de 15 dk. inkübasyon yapıldı. Genomik DNA, 100 µl DNA rehidrasyon solüsyonunda 1 saat inkübasyona bırakıldı.

2.1.6. α -Amilaz ve α -Glukosidaz Genlerinin Klonlanması

α -Amilaz ve α -glukosidaz genlerinin dizileri, GenBank'ta bulunan *Anoxybacillus flavithermus* genomundan elde edildi. Bioinformatik program üzerinde genlere uygun primerler tasarlandı.

Primerler,

α -Glukosidaz için

Forward: 5' -GCTAGC**ATG**AAACGGACATGGTGGAAAG-3'

Revers: 5' -GAATTCTTATTGTAATGCATAAATTCTTGC-3'

α -Amilaz için

Forward 5' - CCC**ATg**gggATgAAACgT**gTA**TTTCgCG-3'

Reverse 5' - CCTCgAgTgATgCCTTTCgTT**TAC**-3'

Primerler, pGEM®-T Easy Vector, pUCM-T ve pET28(+) vektörlerine uyumlu olarak, His-Tag etiketi içerecek şekilde tasarlandı.

Tablo 1. α -Amilaz ve α -glukosidaz genlerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyonu ve şartları

PCR Şartları	
1X PCR reaksiyon buffer	1. 95 °C 5 dk
1 µg <i>A. flavithermus</i> 2641 ^T DNA'sı	2. 95 °C 1 dk denatürasyon
0,2 µM Forward primer	3. 54 °C 1:30 dk bağlanma
0,2 µM Reverse primer	4. 72 °C 2 dk uzama
4,0 mM MgCl ₂	5. 72 °C 5 dk uzama, 2:36 döngü
0,1 mM dNTP	6. 4 °C soğutma
1 U DNA polimeraz	

α -Amilaz ve α -glukosidaz genlerinin Tablo.1'de belirtilen PCR şartları yerine getirilerek amplifiye edildi. Fragmentlerin doğruluğu %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek teyit

edildi. Oluşan fragmentlerin pGEM®-T Easy Vector ve pUCM-T klonlama vektörlerine ligasyonları reaksiyonu kuruldu. Ligasyon şartları, 1 µL PCR ürünü, 1X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µL T4 DNA ligaz (1 U), 1 µL pGEM®-T Easy Vector ve pUCM-T klonlama vektörü (25 ng/µL), 4 µL ddH₂O içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. Ligasyon 16 saat 16 °C’de inkübasyona bırakıldı. Transformasyon yapabilmek için *E. coli* JM101 ile kompetent hücre hazırlandı. Kompetent hücre hazırlamak için, *E. coli* JM101 suşu 37 °C’de, LB besiyeri ortamında 16 saat inkübasyona bırakıldı. Gece kültüründen, OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde LB besiyerine inokülasyon yapılarak optik yoğunluğu 0,45’e ulaşıncaya kadar 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından bakteri hücreleri, 4.500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete 10 ml 0,1 M CaCl₂ eklendi ve buzun üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 4.500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve pellet üzerine 2 ml 0,1 M CaCl₂ eklendi. İki saat sonra kullanılmak üzere +4 °C’de bırakıldı.

Ligasyon ürününün üzerine 200 µl *E. coli* JM101 kompetent hücresi ilave edildi. Daha sonra 30 dk buzda inkübasyona bırakıldı. Takiben 2 dk 42 °C’de ısı şoku yapıldı. Hücrelerin üzerine 200 µl LB ilave edilerek 2 saat 37 °C’de, inkübasyona bırakıldı. Hücreler, LB agar petrilere yayılmadan önce, petrilere 40’ar µl IPTG (stok 100 mM) ve X-Gal (stok 40 mg/ml) yayıldı. İki saatlik inkübasyonun sonunda hücreler 50 mg/ml ampicilin içeren LB agar petrisine yayıldı. LB agar petrisi bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı (Sambrook vd., 1989). Daha sonra 16 saat inkübasyonun ardından mavi-beyaz klonlar oluştuğu gözlemlendi. Klonlama çalışmalarının başarısının teyit edilmesi için oluşan beyaz klonlardan alınıp, LB besiyerine inokülasyonları yapılarak 37 °C’de 16 saat inkübe edildi. 16 saat inkübasyonun ardından kültürlerine alkalizim plazmit izolasyonu metodu uygulandı. Alkalizim metodu için, gece kültürleri 3 dk 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Pellet alınarak, üzerine solüsyon I (50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl ve 10 mM EDTA) ilave edildi, vortekslendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra solüsyon II (0,2 N NaOH, %1 SDS) ilave edildi. Karışım alt üst yapılarak, 5 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Proteinlerin çökmesi için, 7,5 M amonyum asetat ilave edildi, 1 dk zaman aralıkları ile alt üst yapılarak, 15 dk buzda inkübasyona bırakıldı. Protein, hücre atıklarını, genomik DNA’yı uzaklaştırmak için 15 dk 13.000 rpm’de santrifüj yapıldı. Plazmit DNA’sını içeren süpernatant pelletten başka bir ependorfa alınarak ayrıştırıldı ve üzerine 600 µl izopropanol ilave edildi. Ardından 10 dk inkübasyona bırakılarak sonrasında 13.000 rpm’de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine %70’lik soğuk

etanol ilave edildi. Pellet 5 dk bekletilip ardından 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant yavaşça dökülerek uzaklaştırıldı ve etanolü uçurmak ve örneği kurutmak için 37 °C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Pelletin üzerine 100 µg/ml RNaz içeren TE (Tris-HCl, EDTA) tamponu ilave edildi. İzole edilen plazmitler, *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kontrol kesimi yapılarak istenen genleri içeren koloniler belirlendi. Klonlara pGEM-Amilaz ve pUCM-Glukosidaz isimleri verildi

α -Amilaz ve α -glukosidaz genlerinin daha sonra pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlamaları yapıldı. Klonlama için, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle, pGEM-Amilaz, pUCM-Glukosidaz ve pET28a(+) plazmitlerine, NEB firmasının önerdiği koşullar altında enzim kesimi uygulandı. Daha sonra kesilen DNA’lar, %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jel üzerinde pGEM®-T Easy Vector ve pUCM-T’den kesilerek çıkartılan α -amilaz ve α -glukosidaz genlerine ait DNA’lar, Qiagen Jelden Çıkarma kiti yardımı ile jelden ayrıştırıldı. Restriksiyon kesim sonrasında vektör solüsyonundaki kontaminantları uzaklaştırmak için etanol presipitasyonu uygulandı. Etanol presipitasyonu için, DNA, hacminin 1/10’u kadar sodyum asetat (3 M, pH 5,2) ve hacminin 3 katı kadar %96’lık etanol ile karıştırıldı. 20 °C de 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra 14.800 rpm’de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 µl %96’lık etanol eklenerek ve karışım alt üst edildikten sonra 14.800 rpm’de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 500 µl %70’lik etanol eklendi. Alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 14.800 rpm’de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 37 °C’lik etüvde 15 dk kurutmaya bırakıldı ve ddH₂O’da çözülerek etanol presipitasyonu sonlandırıldı. Yapışkan uçlara sahip α -amilaz ve α -glukosidaz genleri, aynı yapışkan uçlara sahip pET28a⁽⁺⁾ vektörü ile T4 DNA ligaz yardımıyla birleştirildi. Ligasyonlar, 16 °C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Ligasyon ürünlerinin transformasyonu için, daha önce anlatılan kompetent hazırlama metoduyla, *E. coli* BL21(DE3) kompetent hücreleri hazırlandı. Ligasyon ürünlerinin *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine yine aynı yöntemle transformasyonları yapıldı. Transformasyon, 50 mg/ml kanamisin içeren LB agar petrilere yayıldı. Ardından beyaz klonların inokülasyonu ile hazırlanan 16 saatlik kültürlerden plazmit izolasyonu, alkali-liziz metodu ile yapıldı. Elde edilen plazmitlerin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kontrol kesimi yapıldı. Rekombinant DNA’ları içeren kolonilerden, 50 mg/ml kanamisin içeren LB katı besiyerine ekim yapıldı. *E. coli* BL21(DE3)/pET28-AflAmy ve *E. coli* BL21(DE3)/pET28-NheIAflGlu klonlarını içeren petriler, ekspresyon için 4 °C’de muhafaza edildi. (Şahinkaya, 2023)

2.1.7. Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

E. coli BL21(DE3)/pET28-AflAmy ve *E. coli* BL21(DE3)/pET28-NheIAflGlu hücrelerinden 37 °C’de 200 rpm’de 16 saatlik kültürler hazırlandı. Hazırlanan 16 saatlik kültürlerden OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde 100 ml LB’ye ekimleri yapıldı ve 37 °C’de 200 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Kültürlerin OD₆₀₀’si 0,6 olunca 0,4 mM IPTG ilave edilerek 5 saat inkübasyona devam edildi. *E. coli* BL21(DE3)/pET28-NheIAflGlu hücreleri farklı olarak bir 12 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kültürler, 10.000 rpm 15 dk santrifüj yapılarak pelletler toplandı. Pelletler, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 6,0) çözüldü. Elde edilen enzimler takara firmasından satın alınan TALON® Metal Affinite Resin kromatografisi ile saflaştırıldı. Bu yöntemde ilk olarak kolon, yıkama tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) ile yıkandı ve ardından protein, 3 katı yıkama tamponu ile seyreltildi ve kolona yüklendi. Yıkama tamponu ile kolon yıkanarak daha küçük ve His-kuyruksuz proteinler uzaklaştırıldı. Elusyon tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0), 300 mM NaCl, 150 mM imidazol) ilave edilerek, enzimler fraksiyonlar halinde toplandı. Her iki enzim için de bu ortak saflaştırma protokolü kullanıldı.

2.1.8. α-Amilazın Zimogram Analizi

α-Amilaz için %0,1 nişasta içeren % 10’luk SDS-PAGE jeli, aşağıda verilen tabloda verilen içerikle hazırlandı (Tablo 2).

Tablo 2. Ayırma jeli ve Denge jeli içerikleri

Ayırma Jeli	Denge jeli
1000 µl Tris-HCl pH 8,8	500 µl Tris-HCl pH 6,8 0,5 M
1330 µl %30 Akrilamid-Bis akrilamid	300 µl Akrilamid-Bis akrilamid %30
400 µl SDS %10	200 µl SDS %10
400 µl soluble nişasta %1	
20 µl APS %10	10 µl APS %10
5 µl TEMED	5 µl TEMED
845 µl dH ₂ O	900 µl dH ₂ O

Tablo 3. Yürütme tamponu ve örnek yükleme tamponu içerikleri

Yürütme tamponu pH 8,3	Örnek yükleme tamponu
3,03 g Tris-baz	200 µl Tris-HCl pH 6,8 0,5 M
14,4 g glisin	500 µl gliserol %80
1 g SDS	400 µl SDS %10
1000 ml dH ₂ O	710 µl dH ₂ O
	40 µl bromfenol blue %0,5

Kuyucuklara yüklemek üzere numuneler, 20 µl enzim, 5 µl yükleme tamponu içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan numuneler, 60 °C’de 8 dk ısı ile muamele edildi. Örnekler jelde yürütüldükten sonra jel, %1 Triton X-100 solusyonu ile 10 dk oda sıcaklığında çalkalanarak SDS ortamdan uzaklaştırıldı. Ardından jel, 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) solusyonu ile 55 °C’de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Diğer taraftan, 2 g potasyum iyodür (KI) 50 ml distile suda çözüldü ve üzerine 1 g iyot eklendi ve karıştırılarak hacmi ddH₂O ile 100 ml’ye tamamlandı. Üç saat inkübasyonun ardından, jel, distile su ile yıkanarak üzerine potasyum iyot solüsyonu ilave edildi (Andrades, 2017).

2.1.9. α-Glukosidazın Zimogram Analizi

α-Glukosidazın zimogram analizi için % 10’lik doğal jel hazırlandı ve örnekler jelde yürütüldükten sonra bir kabın içerisinde 3 mM 4-methylumbelliferyl-α-D-glucopyranoside ile muamele edilerek jel, ultraviyole ışık altında incelendi (Calvo-Mndez, 2004).

2.2. α-Amilazın ve α-Glukosidazın Karakterizasyonu

2.2.1. α-Amilazın Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzimin aktivitesinin belirlenmesi indirgen şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. 100 µl aktivite tamponu (50 mM, pH 8,0 Tris-HCl tamponu) üzerine %1’lik nişasta çözeltisinden 250 µl ve 0,001 µg enzim eklendi. 70 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımı üzerine 500 µl DNS çözeltisi ilave edilerek su banyosunda 10 dakika kaynatıldı. Reaksiyon karışımının absorbansı spektrofotometrede 540 nm’de okundu. Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µM glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı.

2.2.2. α -Glukosidazın Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi, sentetik substrat *p*NPG kullanılarak spektrofotometre ile belirlendi. Fosfat tamponu (pH 8,0) içinde 1 mM *p*NPG, 280 μ l 50 mM fosfat tamponu (pH 8,0) ve 0,018 μ g enzim içeren reaksiyon karışımı (530 μ L) 60 °C'de 10 dakika inkübe edildi. 10 dakikalık reaksiyona 100 μ l 1 M Na₂CO₃ eklenerek durduruldu ve oluşan renk değişimi 405 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Tanımlanmış deney koşulları altında bir μ mol *p*NP/dakika oluşumunu katalize etmek için gereken enzim miktarı, bir birim (1 U) enzim aktivitesi olarak adlandırıldı.

2.2.3. Optimum pH

Enzimlerin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisini belirleyebilmek amacıyla enzimler, 100 mM sitrat tamponu (pH 3,0-4,0-5,0-6,0), 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 5,0-6,0-6,5), 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6,0-7,0-8,0), 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) ve 100 mM Glisin-NaOH tamponları (pH 10,0-12,0) hazırlanarak bu tamponlarda substratları ile inkübe edildi. Enzimlerin en iyi aktivite hızına sahip olduğu pH değerleri 100 kabul edilerek, % bağıl aktiviteleri hesaplandı.

2.2.4. Optimum Sıcaklık

Enzimlerin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10 °C'lik artışlarla 20-90 °C aralığında sıcaklık değerlerinde enzimler inkübe edilerek ölçümler yapıldı. Tampon ve α -amilaz için %1 lik nişasta, α -glukosidaz için *p*NPG substrat olarak kullanılarak, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında α -amilaz için 30 dakika ve α -glukosidaz için 10 dakika inkübe edildi. Enzimlerin en iyi aktivite hızına sahip olduğu sıcaklık değerleri 100 kabul edilerek, % bağıl aktiviteleri hesaplandı.

2.2.5. Enzimlerin Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

α -Amilazın ve α -glukosidazın kararlılıklarını incelemek amacıyla, enzimler, sırasıyla, 70 °C ve 60 °C'de inkübe edildi. 10. dk, 30. dk, 60. dk, 120. dk, 150. dk, 240. dk'da numuneler alınarak, optimum şartlar altında reaksiyonlar hazırlandı ve ölçümler yapıldı. İnkübasyon esnasında α -amilaza 3,75 mM olacak şekilde CaCl₂ ilave edildi. Enzimlerin

inkübasyondan önceki aktiviteleri 100 kabul edilerek, enzimlerin kalan aktiviteleri % olarak hesaplandı.

2.2.6. Enzimlerin Kararlılıkları Üzerine pH'nın Etkisi

α -Amilazın pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,0), 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0), Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0), 100 mM Glisin-NaOH tamponu (pH 10,0) Enzim-tampon karışımları, 70 °C inkübe edildi. 10 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk, 240 dk aralıklarla ölçüm yapıldı. DNS metodu kullanılarak aktivite tayini yapıldı

α -Glukosidazın pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 100 mM pH 6.0 Citrat tamponu, 100 mM pH 7 sodyum fosfat tamponu, 100 mM pH 8 potasyum fosfat tamponu ile karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları, 60 °C de inkübe edildi. 10 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk, 240 dk aralıklarla ölçüm yapıldı. Gözlenen kalan aktiviteler ile grafik oluşturuldu. Substrat olarak pNPG kullanılarak aktivitesi ölçüldü

2.2.7. İnhibe Edici Ajanların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Enzimler, içeriğinde olabilecek metallere arındırmak için, 10 mM EDTA ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Ardından EDTA ile muamele edilen enzimler 18 saat boyunca 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) tamponuna karşı diyaliz edildi. Bu sayede aktivitesinin bir metale bağlı olup olmadığı belirlendi. Sadece diyaliz edilen enzimlerin aktiviteleri üzerine Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} metallere ve alkali metallere K^{+} , Na^{+} iyonlarının etkisini incelemek amacıyla bu metallerin klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonları, enzimlere nihai konsantrasyonları 1 mM, 2 mM, 5 mM şekilde ilave edildi ve inkübasyonların ardından optimum şartlar altında % kalan aktivite tayinleri yapıldı. Enzimlerin metal iyonlar ilave edilmeden ölçülen aktiviteleri 100 kabul edildi.

α -Amilaz ve α -glukosidazların potansiyel inhibitörlerinden, EDTA, EGTA, DTT, nihai konsantrasyonları 2 mM, 5 mM, 10 mM olacak şekilde enzimlere eklendi.

α -Amilazın ve α -glukosidazın aktivitesi üzerine iyonik-noniyonik deterjanların etkisini incelemek için, enzime %1, %2, %5 konsantrasyonlarında Triton X-100, Tween-20, SDS eklenerek inkübe edildi.

α -Amilazın ve α -glukosidazın aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi % 5, % 10, % 20 konsantrasyonlarında DMSO, Etanol, Metanol, Bütanol, Propanol ile incelendi.

α -Amilaz inhibe edici veya aktive edici ajanlarla 70 °C’de 30 dk inkübe edildi. α -Glukosidaz inhibe edici veya aktive edici ajanlarla 60 °C 30 dk inkübe edildi. Daha sonra α -amilazın DNS metodu kullanılarak aktivitesi tayini yapıldı. α -Glukosidaz için daha sonra 1 mM *p*NPG substrat olarak kullanılarak aktivite tayini yapıldı.

2.2.8. Substrat konsantrasyonunun α -Amilazın Aktivitesi Üzerine Etkisi

α -Amilazın aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 1-5 mg/ml substrat konsantrasyonlarında sırasıyla çözünür patates nişastası ve aktivatör olarak CaCl₂ 3,75 mM ilave edilerek, substratı için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Sabit enzim miktarı karşısında substrat miktarları artırılarak enzim reaksiyonları kuruldu ve grafik oluşturuldu.

2.2.9. Substrat Konsantrasyonunun α -Glukosidazın Aktivitesi Üzerine Etkisi

α -Glukosidaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 0,05-1,1 mM *p*NPG substrat konsantrasyonları için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Sabit enzim miktarı karşısında substrat miktarları artırılarak enzim reaksiyonları kuruldu ve grafik oluşturuldu.

α -*p*NPG substratlarının sönme katsayıları (epsilon değerleri) hesaplandı. α -*p*NPG (4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside) substratının, α -glukosidazla reaksiyonu ile α -*p*NP (4-Nitrophenyl α -D) oluşmaktadır. α -Glukosidaz reaksiyon şartlarında α -*p*NP ürünü kullanılarak örnekler hazırlandı. Buna göre, 100 mM potasyum fosfat (pH 8,0) tamponunda, 0,04, 0,18, 0,36, 0,54, 0,72, μ mol α -*p*NP içeren 500 μ l’lik örnekler, 60 °C’de 10 dk inkübe edildi, ardından tüm örneklerle 100 μ l Na₂CO₃ (son hacim 1 M) ilave edildi. Son olarak, 0,1 cm’lik kuvartz küvette 405 nm’de ölçümler alındı. Daha sonra, lineer bir grafik oluşturuldu. Grafikten elde edilen eğimi küvetin ışık yolu uzunluğuna bölündü ve böylece sönme katsayısı hesaplandı.

2.3. α -Amilazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu

2.3.1. Presipitasyon Aşaması

Enzim, %96'lık etanol, izopropanol, aseton, amonyum sülfat ve bütanol ile ayrı ayrı +4 °C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 11.000xg 10 dk santrifüj edildi. Ardından süpernatant atılarak 0,1 mM Tris-HCl (pH 8,0) ilave edildi. 11.000 xg 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atılarak yine tampon ilave edildi. DNS kullanılarak enzimin kalan aktivitesi 540 nm'de ölçüldü.

2.3.2. Çapraz-Bağ Oluşturma

Enzimler, içerisinde son konsantrasyonları, (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM) olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda glutaraldehit ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 4 saat boyunca ayı ayrı inkübe edildi. İnkübasyonun ardından numuneler, 11.000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, pellet, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) tamponuyla yıkandı. Numuneler, 11.000xg'de 5 dk santrifüj edilerek, üzerlerine 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ilave edildi. DNS metodu ile enzimin kalan aktivitesi ölçüldü.

2.4. Amilaz-CLEA'nın Karakterizasyonu

2.4.1. Amilaz-CLEA'nın Optimum pH Tayini

Amilaz-CLEA farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak çözünür patates nişastası kullanılarak optimum pH belirlendi. Enzimlerin en iyi aktivite hızına sahip olduğu pH değerleri 100 kabul edilerek, % bağıl aktiviteleri hesaplandı. Bunun için, 100 mM pH (5,0) sodyum sitrat, 100 mM pH (6,0-7,4) sodyum fosfat, 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat tamponu, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl ve 100 mM pH (10,0-12,0) arasında Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı.

2.4.2. Amilaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklık Tayini

Amilaz-CLEA, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C sıcaklıklarda 30 dk inkübe edildi. Enzim aktivitesi tayini indirgen şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. Enzimlerin en iyi aktiviteye hızına sahip olduğu sıcaklık değerleri 100 kabul edilerek, % bağıl aktiviteleri hesaplandı.

2.4.3. Amilaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığının Tayini

Amilaz-CLEA ısı kararlılığını belirlemek amacıyla, saf enzim, 70 °C sıcaklıklarda 10 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk, 150 dk, 240 dk süre ile inkübe edildi. Substrat olarak patates nişastası kullanıldı ve hidroliz reaksiyonu sırasında aktivatör olarak 3,75 mM CaCl₂ ilave edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı.

2.4.4. Amilaz-CLEA'nın pH Kararlılığının Tayini

pH kararlılığını belirlemek için, 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl, 100 mM Glisin-NaOH pH 10 tamponları kullanıldı. Substrat olarak patates nişastası kullanıldı ve hidroliz reaksiyonu sırasında aktivatör olarak 3,75 mM CaCl₂ ilave edildi. İmmobilize enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı.

2.4.5. Amilaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Amilaz-CLEA ile optimal şartlar altında (70 °C, 0,1 M Tris-HCl (pH 9,0)) substrat olarak patates nişastası kullanılarak hidroliz reaksiyonu başlatıldı. Hidroliz reaksiyonu sırasında aktivatör olarak 3,75 mM CaCl₂ ilave edildi. Reaksiyon 30 dk sonra sonlandırıldı. Örnek 11.000 xg 10 dk santrifüj edildi ve 0,1 M Tris-HCl pH 9,0 tamponu ile yıkandı ve ayırdığımız süpernatant DNS kullanılarak kalan enzim aktivitesi 10 kez ölçüldü.

2.4.6. Substrat Konsantrasyonunun Amilaz-CLEA'nın Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Amilaz-CLEA aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 1-5 mg/mL substrat

konsantrasyonları için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Substrat olarak patates nişastası kullanıldı ve hidroliz reaksiyonu sırasında aktivatör olarak 3,75 mM CaCl₂ ilave edildi. Sabit enzim miktarı karşısında substrat miktarları artırılarak enzim reaksiyonları kuruldu ve grafik oluşturuldu.

2.5. α -Glukozidazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu

2.5.1. Presipitasyon Aşaması

Etanol, İzopropanol, Asetonitril, Aseton, Amonyum sülfat, Bütanol, %96 lık organik çözücüler enzimle birlikte ayrı ayrı +4 °C 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 11.000 xg 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Örnek Potasyum fosfat 100 mM pH 8 ile yıkandı. 11.000xg 5 dk santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Potasyum fosfat tamponundan ilave edildi. Enzim aktivitesi, spektrofotometre ile sentetik substrat *p*NPG kullanılarak belirlendi.

2.5.2. Çapraz-Bağ Oluşturma

Presipitasyon aşamasında elde edilen enzim üzerine farklı konsantrasyonlarda (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM) glutaradehit ilave edildi. Enzim ve gluraldehit oda ısısında 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat inkübe edildi. Bu zaman sonunda 11.000xg 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve potasyum fosfat pH 8 0,1 M tamponu ile yıkanarak 11.000xg de 5 dk santrifüj edildi. Potasyum fosfat tamponu ilave edildi. *p*NPG substrat olarak kullanılarak 405 nm ölçümler yapıldı.

2.6. α -Glukosidaz-CLEA'nın Karakterizasyonu

2.6.1. α -Glukozidaz-CLEA'nın Optimum pH Tayini

α -Glukozidaz-CLEA farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle (100 mM pH 5,0 sodyum sitrat, 100 mM pH (6,0-7,4) sodyum fosfat, 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat tamponu, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl ve 100 mM pH (10,0-12,0) arasında Glisin-NaOH) enzim aktivitesi incelendi. *p*NPG substrat olarak kullanılarak 405 nm ölçümler yapıldı.

2.6.2. α -Glukozidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklık Tayini

α -Glukozidaz-CLEA 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, sıcaklıklarda 30 dk inkübe edildi. *p*NPG substrat olarak kullanılarak 405 nm ölçümler yapıldı.

2.6.3. α -Glukozidaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığının Tayini

Enzimin ısı kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim, 55 °C sıcaklıklarda 10 dk, 20 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk boyunca inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlarla grafik çizilerek değerlendirildi.

2.6.4. α -Glukozidaz-CLEA'nın pH Kararlılığının Tayini

Farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak *p*NPG kullanılarak pH kararlılığı belirlendi. Bunun için 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat tamponu, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl tamponları kullanıldı. Saf enzim, 55 °C sıcaklıklarda 10 dk, 20 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk süre ile inkübe edildi.

2.6.5. α -Glukozidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

İmmobilize edilmiş α -glukosidaz optimal şartlar altında (55 °C, Potasyum fosfat tamponu pH 8,0) substrat olarak *p*NPG kullanılarak hidroliz reaksiyonu başlatıldı. Reaksiyon 10 dk sonra sonlandırıldı. Örnek 11000xg 10 dk santrifüj edildi ve pellet potasyum fosfat pH 8,0 tamponu ile yıkandı ve ayırdığımız süpernatant 405 nm spektrometrede ölçüldü.

2.6.6. Substrat Konsantrasyonunun α -Glukozidaz-CLEA'nın Aktivitesi Etkisinin Belirlenmesi

α -Glukosidaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 0.05-1.1 mM *p*NPG substrat konsantrasyonları için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Sabit enzim miktarı karşısında substrat miktarları artırılarak enzim reaksiyonları kuruldu ve grafik oluşturuldu.

α -*p*NPG substratlarının sönme katsayıları (epsilon değerleri) hesaplandı. α -*p*NPG (4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside) substratının, α -glukosidazla reaksiyonu ile α -*p*NP (4-

Nitrophenyl α -D) oluşmaktadır. α -Glukosidaz reaksiyon şartlarında α -pNP ürünü kullanılarak örnekler hazırlandı. Buna göre, 100 mM potasyum fosfat (pH 8,0) tamponunda, 0,04, 0,18, 0,36, 0,54, 0,72, μ mol α -pNP içeren 500 μ l'lik örnekler, 60 °C'de 10 dk inkübe edildi, ardından tüm reaksiyonlara 100 μ l Na₂CO₃ (son hacim 1 M) ilave edildi. Son olarak, 0,1 cm'lik kuvarz küvette 405 nm'de ölçümler alındı. Daha sonra, lineer bir grafik oluşturuldu. Grafikten elde edilen eğimi küvetin ışık yolu uzunluğuna bölündü ve böylece sönme katsayısı hesaplandı.

2.7. α -Amilaz ve α -Glukosidaz Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (Kombi-CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu

2.7.1. Çapraz-Bağ Oluşturma

Önceden belirlenen çöktürücü ajan ile çöktürülen enzimler üzerine farklı konsantrasyonlarda (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM) glutaradehit ilave edildi, oda ısısında 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat inkübe edildi. Bu zaman sonunda 11.000 xg'de 10 dk santrifüj edildi. Potasyum fosfat pH 8,0 0,1 M tamponu ile yıkanarak 11.000 xg de 5 dk santrifüj edildi. Örneğe potasyum fosfat pH 8,0 0,1 M tamponu ilave edildi. α -Amilaz aktivitesi DNS metodu kullanılarak belirlendi ve α -Glukosidaz için pNPG substrat olarak kullanılarak aktivitesi belirlendi.

2.8. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Karakterizasyonu

2.8.1. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın optimum pH Tayini

Farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltiler hazırlandı ve substrat olarak çözünür patates nişastası kullanıldı. Bunun için, 100 mM pH 5,0 sodyum sitrat, 100 mM pH (6,0-7,4) sodyum fosfat, 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat tamponu, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl ve 100 mM pH (10,0-12,0) arasında Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı.

2.8.2. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklık Tayini

α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C sıcaklıklarda 30 dk inkübe edildi. Enzim aktivitesi tayini indirgen şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı

2.8.3. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) Sıcaklık Kararlılığının Tayini

α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA ısı kararlılığını incelemek amacıyla 60 °C'de 10 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk, 150 dk, 240 dk boyunca inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. Substrat olarak patates nişastası kullanıldı ve hidroliz reaksiyonu sırasında aktivatör, stabilizatör olarak 3,75 mM CaCl_2 ilave edildi. Enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı

2.8.4. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) pH Kararlılığının Tayini

Farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak çözünür patates nişastası kullanılarak pH kararlılığı belirlendi. Enzim 55 °C sıcaklıkta 10 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk, 150 dk, 240 dk boyunca inkübe edildi. Bunun için, 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl, Glisin-NaOH pH 10 100 mM tamponları kullanıldı. Substrat olarak patates nişastası kullanıldı ve hidroliz reaksiyonu sırasında aktivatör olarak 3,75 mM CaCl_2 ilave edildi. İmmobilize enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı.

2.8.5. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA, optimal şartlar altında (55 °C, 0,1 M sodyum fosfat pH 7,4) substrat olarak patates nişastası kullanılarak hidroliz reaksiyonu başlatıldı. Reaksiyon, 30 dk sonra sonlandırıldı. Örnek 11.000 xg 10 dk santrifüj edilir ve sodyum fosfat tamponu ile yıkandı ve ayırdığımız süpernatant DNS kullanılarak kalan enzim aktivitesi 10 kez ölçüldü.

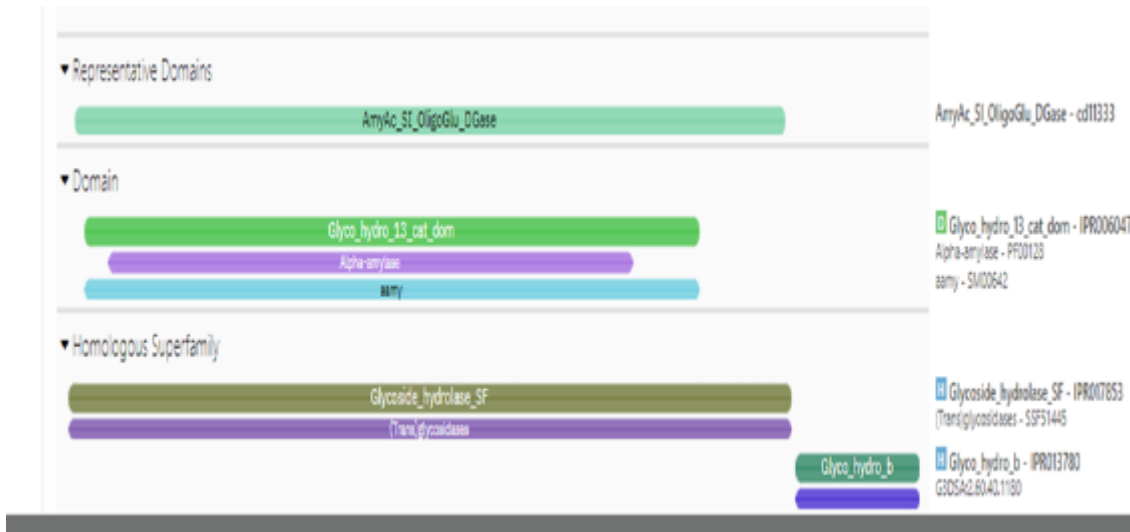
2.9. One Pot Hidroliz

Nişastanın hidrolizini gözlemlemek amacıyla one pot hidroliz analizi yapıldı. %3 lük mısır nişastası hazırlandı. 30 dk otoklavda 120 °C jelatinasyon yapıldı. 10 U α -amilaz ve 100 U α -glukosidazın birlikte immobilize hali, immobilize edilmeyen karışım, immobilize α -amilaz, immobilize edilmeyen α -amilaz için ayrı ayrı sırasıyla 55 °C ve 60 °C’de sıcaklıklarda hidroliz reaksiyonu başlatıldı. %26 potasyum iyodür ve %2,6 iyot ile nişasta belirteci iyot solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon kullanım sırasında %0,15 KI ve %0,015 I sulandırılarak kullanıldı. Hidroliz reaksiyonundan her 30 dakikada bir 750 μ l örnek ependorflara alındı. Hidroliz reaksiyonunu durdurmak için üzerine 5 mM HCl ilave edildi. Ependorflara toplanan hidroliz ürünlerinden 250 μ l tüpe alındı, üzerine 250 μ l iyot solüsyonu ve 2 ml dH₂O ilave edildi. 610 nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

3. BULGULAR

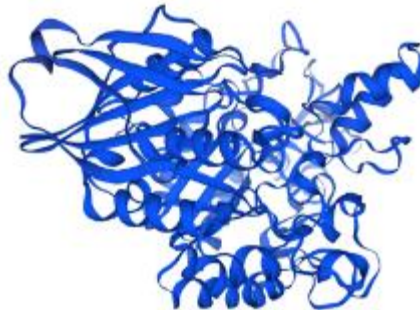
3.1. Moleküler Analizler

a) InterPro programı kullanılarak yapılan karşılaştırmada α -glukosidaz amino asit dizisinin glikozil hidrolaz 13 ailesine ait olduğu belirlendi.



Şekil 11. InterPro programı ile α -glukosidaz sekansının glikozil hidrolaz 13 ailesine ait olduğunun belirlenmesi

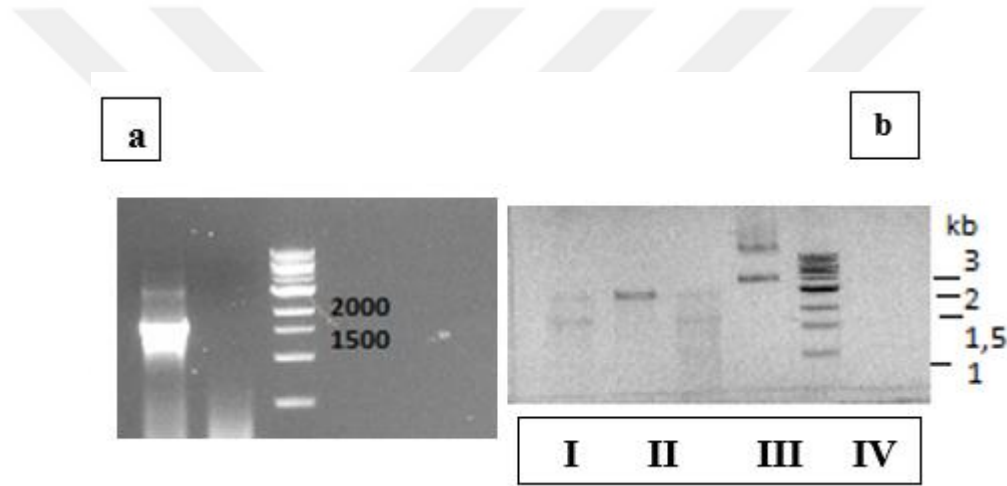
b) α -Glukosidaz sekansı, SWISS-MODEL programında analiz edildi. α -Glukosidazın boyutlu yapısı oluşturuldu.



Şekil 12. α -Glukosidaz 3D-Modeli (AlphaFold AF-A0A160F4Z8-F1-model-v4)

3.1.1. α -Glukosidazın Klonlanması

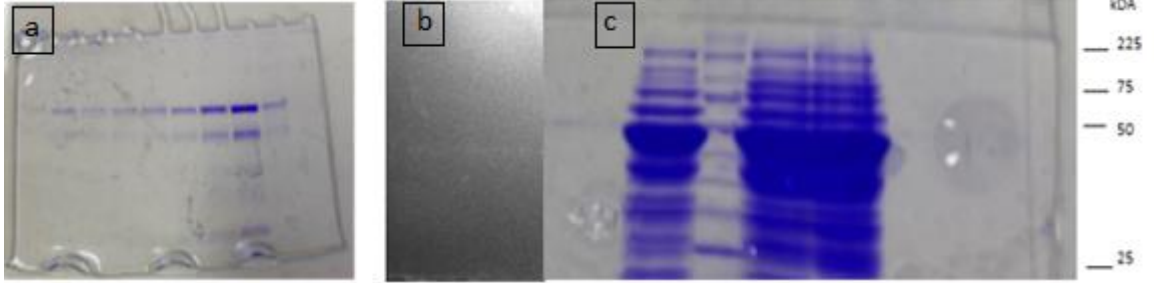
Uygun primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda 1650 bp uzunluğunda fragment elde edildi. Bu fragment klonlama vektörü pUCM-T'ye klonlandı ve *E.coli* JM101'e transformasyonu yapıldı. Elde edilen mavi-beyaz klonlardan plazmit izolasyonu yapıldı ve *E.coli* JM101/pUCM-T-NheIAflGlu klonu elde edildi ve gliserol stok yapılarak -20 °C'de saklandı. İlgili gen aşırı ekspresyon için pET 28a⁽⁺⁾ ekspresyon vektörüne klonlandı ve *E.coli* JM101 transformasyonu yapıldı. Aynı şekilde α -glukosidaz genini taşıyan plazmitin varlığı teyit edildi. Elde edilen plazmitlerin *E.coli* BL21(DE3)'e transformasyonu yapıldı ve *E.coli*BL21(DE3)/pET28-NheIAflGlu elde edildi. Rekombinant α -glukosidaz ekspres edildi.



Şekil 13. PCR ile elde edilen α -glukosidaz geninin agaroz jel görüntüleri a) PCR ile amplifiye edilen α -glukosidaz geninin jel görüntüsü b) pUCM-T'ye klonlanan genin ilgili restriksiyon enzim ile muamele edilerek klonun varlığının tespitini gösteren jel görüntüsü I) *PstI* ile muamele edilmiş klon. II) Restriksiyon enzimi ile muamele edilmiş boş vektör IV) Restriksiyon enzimi uygulanmamış plazmit

3.1.2. α -Glukosidazın SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Saflaştırılması

Saflaştırma sonucu elde edilen ürünün SDS-PAGE'de yürütülüp Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucunda tek bir bandın gözlenmesi enzimin başarılı bir şekilde saflaştırılabildiği sonucunu desteklemektedir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 50 kDa olarak belirlendi. α -Glukosidazın varlığı, zimogramında ortada silik beyaz bantlar halinde gözlemlendi.

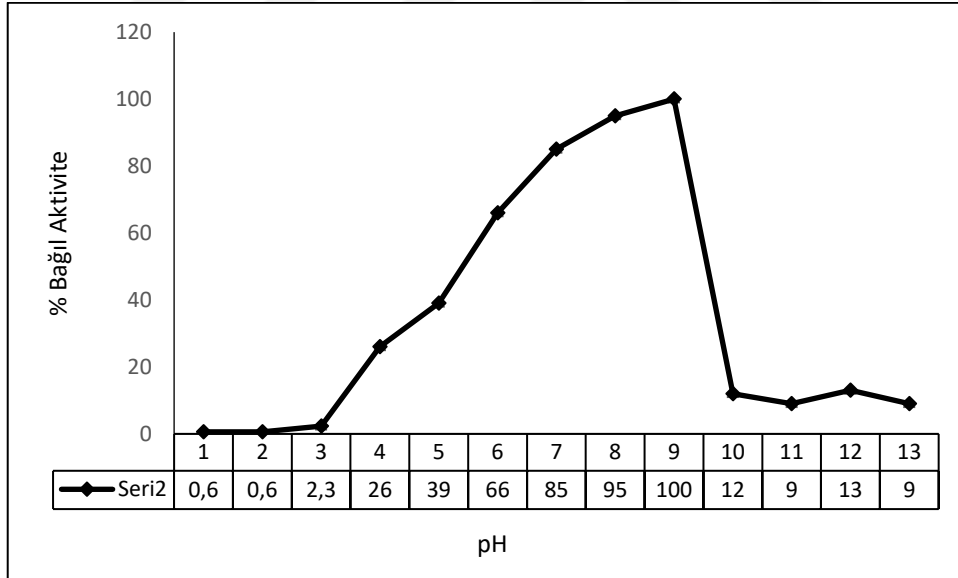


Şekil 14. α -Glukosidazın jel elektroforezis görüntüleri. a) Saflaştırılmış α -glukosidaz (% 10' luk SDS-PAGE) b) α -Glukosidazın Zimogramı c) α -Glukosidazın ham ekstratı (SDS-PAGE)

3.2. α -Glukosidazın Karakterizasyonu

3.2.1. α -Glukosidazın Optimum pH'sı

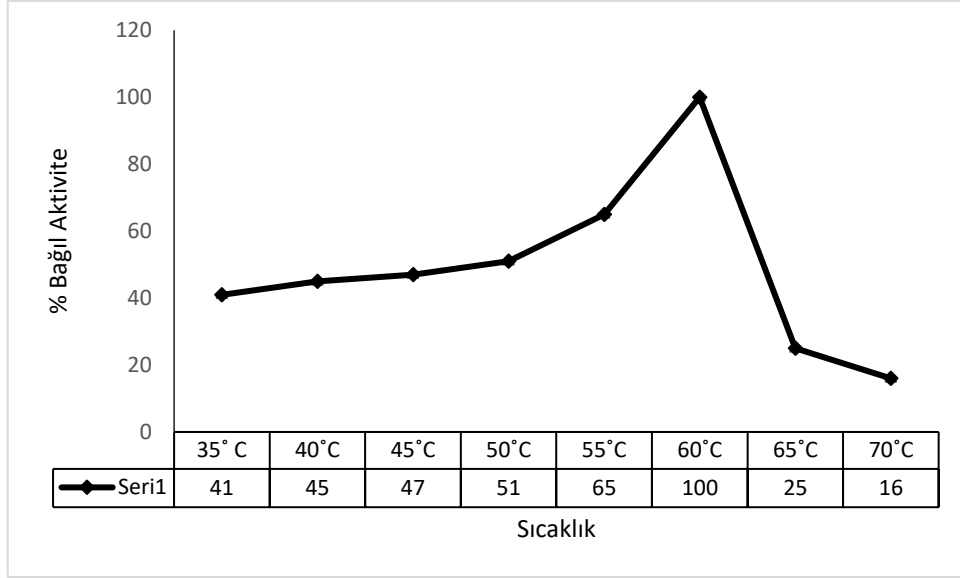
Elde edilen veriler kullanılarak pH-% Rezidual Aktivite grafiği çizildi (Şekil 15). Optimum pH 8 olarak belirlendi.



Şekil 15. α -Glukosidazın optimum pH grafiği.

3.2.2. α -Glukosidazın Optimum Sıcaklığı

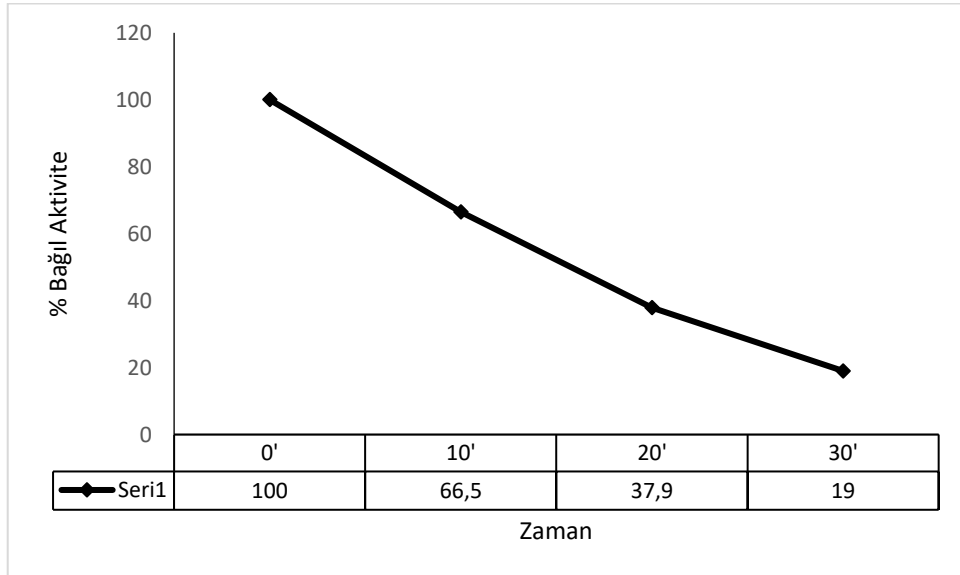
Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-% Rezidual Aktivite grafiğine göre α -Glukosidaz için optimum sıcaklık 60 °C olarak belirlendi.



Şekil 16. α -Glukosidazın optimum sıcaklık grafiği

3.2.3. α -Glukosidazın Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

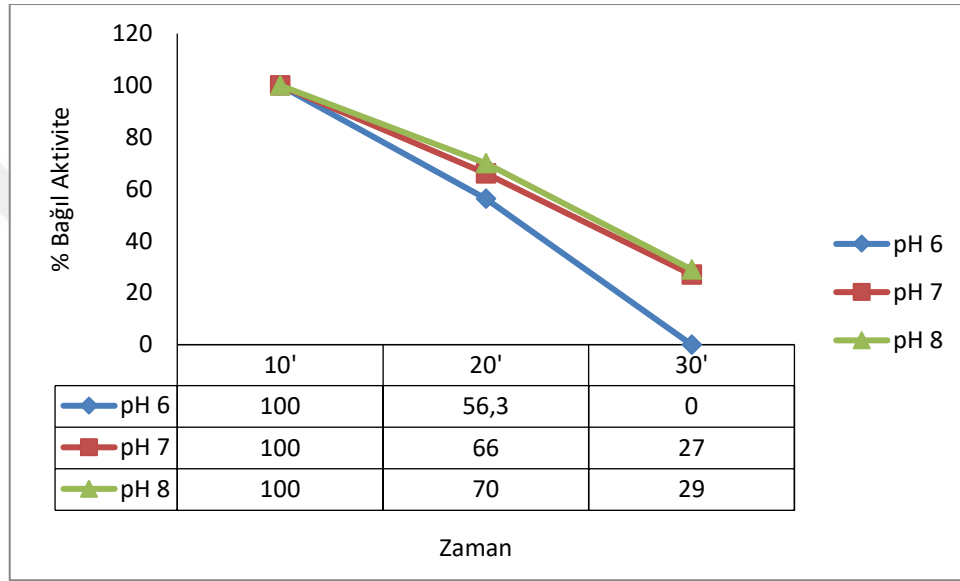
α -Glukosidazın ısı kararlılığını incelemek amacıyla, potasyum fosfat tamponu (100 mM, pH 8,0) içindeki saf enzim, 10 dk, 20 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk boyunca bekletildi ve ölçümler alındı. α -Glukosidazın ısı kararlılığı 20 dk olarak belirlendi.



Şekil 17. α -Glukosidazın ısı kararlılık grafiği

3.2.4. α -Glukosidazın pH Kararlılığı

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 100 mM pH 6,0 sitrat tamponu, 100 mM pH 7 sodyum fosfat tamponu, 100 mM pH 8 potasyum fosfat tamponu kullanıldı. 60°C'de inkübe edildi. 10 dk, 20 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk boyunca 60°C'de inkübe edildi ve ölçümler alındı. Bunun sonucunda, pH 8 potasyum fosfat tamponunda 20 dk kararlı olarak belirlendi.

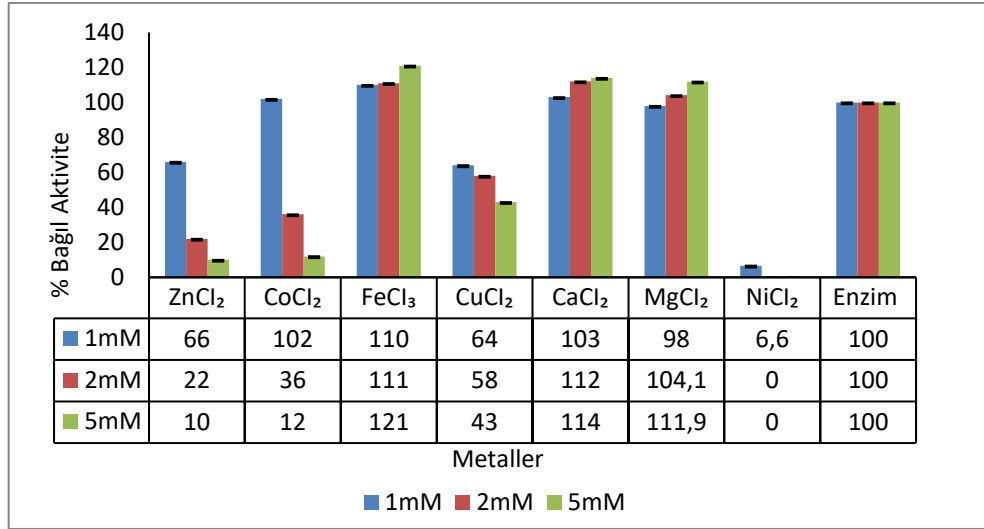


Şekil 18. α -Glukosidazın pH kararlılık grafiği

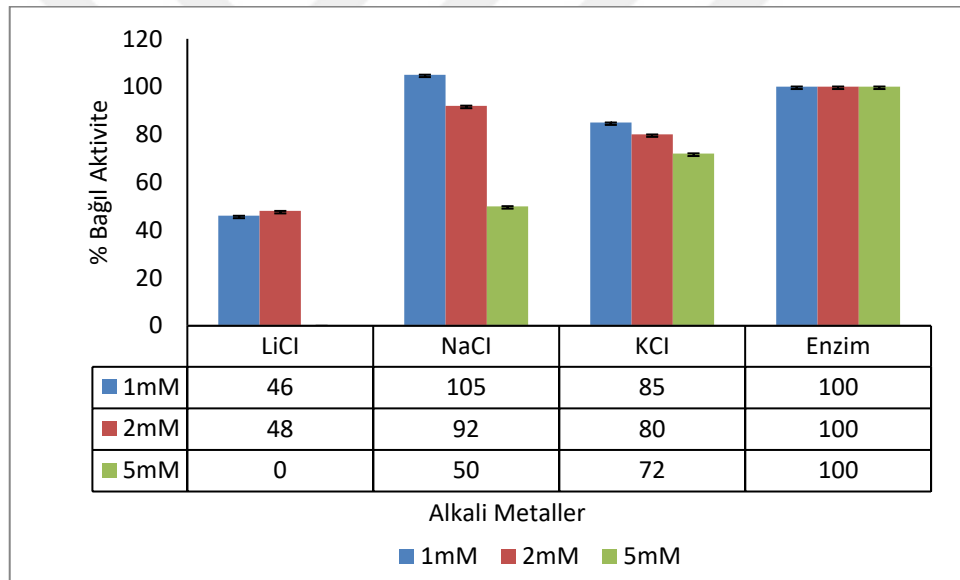
3.2.5. Metal İyonlarının ve İnhibe Edici Ajanların α -Glukosidazın Aktivitesi Üzerine Etkisi

α -Glukosidazın aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Na^+ , K^+ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarına 2 mM, 5 mM, 10 mM nihai konsantrasyonlar oluşacak miktarda ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Fe^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} iyonları α -glukosidaz aktivitesini sırasıyla %21, %11,9, %14 oranında artırdığı gözlemlendi. Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} iyonlarının α -glukosidazın aktivitesini sırasıyla %90, %100, %88 inhibe etti. 1 mM konsantrasyonundaki Na^+ α -glukosidazın aktivitesini %5 oranında artırırken, 5 mM konsantrasyonundaki Na^+ enzimin aktivitesini %50 oranında inhibe etti. 1 mM konsantrasyonundaki K^+ α -glukosidazın aktivitesini %28 oranında inhibe etti. Metallerin enzimler üzerine etkisi incelendiğinde üç temel fonksiyona sahip olduğu

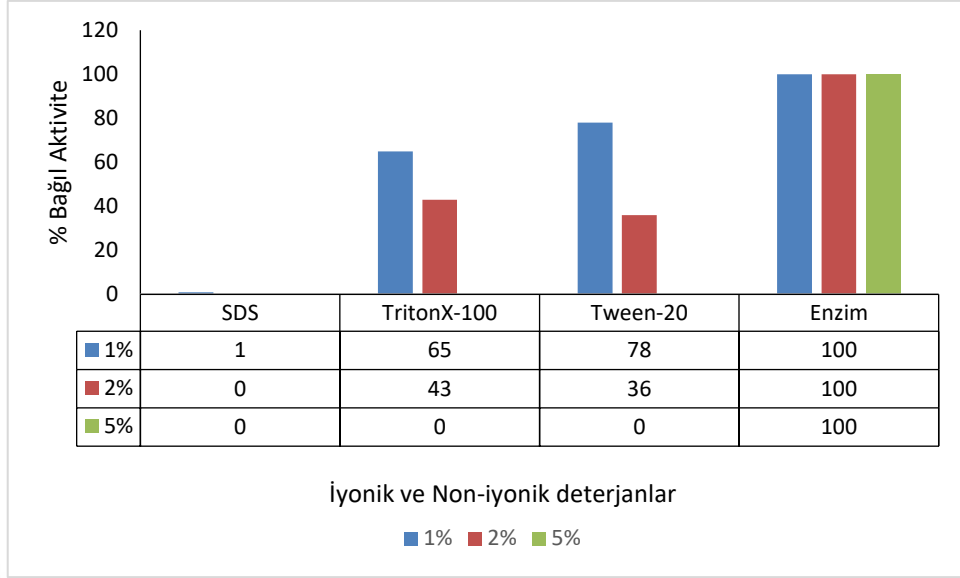
bilinmektedir. Metaller enzimlerin katalitik merkezinde hizmet edebilir, bir bağlayıcı grup olarak enzim-substrat kompleksi oluşumunda görev alabilir ve bir başka enzimin, enzim sistemi üzerindeki etkisini antagonize ederek, fizyolojik etkisini sürdürmesi için gerekli olabilir. Bununla birlikte, enzimler, çözelti içerisinde su dışında protein ve substrata bağlanmak için metallere ihtiyaç duyabilir. Enzimlerin katalitik aktivitesi; metalin kütlesine, iyonik yüküne, iyonik yarıçapına (sulu çözeltilerdeki iyonik yarıçap farklı olabilir), yayılma oranına, elektriksel alanda hareketine, çözeltideki metalik iyonların hidratlarının konfigürasyonuna ve kararlılığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. 1 mM konsantrasyonundaki EDTA α -glukosidazın aktivitesini %93,5 oranında korudu. α -Glukosidaz metalloenzim olmadığı, EDTA'nın inhibisyon etkisi olmaması veya farklı konsantrasyonlarda metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde anlamlı farklılık oluşturmamasından da anlaşılmaktadır. EDTA ligandında ise polioksietilen köprülerindeki oksijen donör atomları bulunmadığından EDTA ortamda bulunan sodyum veya potasyum iyonları ile etkileşim yapamayarak, kompleksleşme meydana gelmeyebilir ve inhibisyon etkisi ortaya koymayabilir. 10 mM konsantrasyonundaki DTT α -glukosidazın aktivitesini %100 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. %2 konsantrasyondaki Triton X-100 ve Tween-20 sırasıyla α -glukosidazın aktivitesini %57, %64 oranında inhibe etti. İyonik deterjan SDS α -glukosidazın aktivitesini %99 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Triton X-100 iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir. Non-iyonik deterjanlar, yüksüz hidrofilik baş gruplarına sahiptir. Tween-20 yağ asidi ester kısmı ve uzun bir polietilen oksit zinciri içeren polisorbate yüzey aktif maddesidir. Genellikle nazik yüzey aktif maddesidir, proteini çözünürleştirmede etkilidirler. Triton X-100 ve Tween-20 enzimin hidrojen bağı yapma yeteneğini azaltabileceği ve üç boyutlu yapı üzerinde değişimlere neden olabileceğinden dolayı inhibisyon etkisi göstermiştir. SDS tarafından enzimin inhibisyonu, sert anyonik deterjan olmasından, iyonik bağlarını, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri bozabilme özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. SDS, enzimin hidrofobik bölgeleri ile reaksiyona girerek enzimin üç boyutlu yapısında modifikasyona neden olarak enzim inaktivasyonuna neden olur. %5 konsantrasyonundaki DMSO enzimin aktivitesini %80 oranında korudu. %5 konsantrasyonlarındaki Metanol, Etanol, Butanol, Propanolde enzimin aktivitesini sırasıyla %95, %98,5, %68, %95 oranlarında inhibe etti.



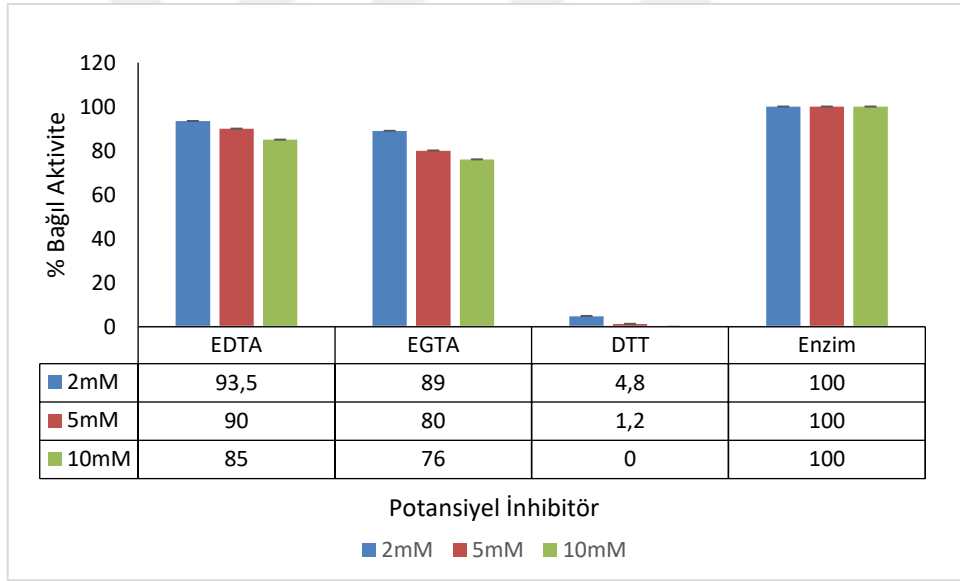
Şekil 19. Metallerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi



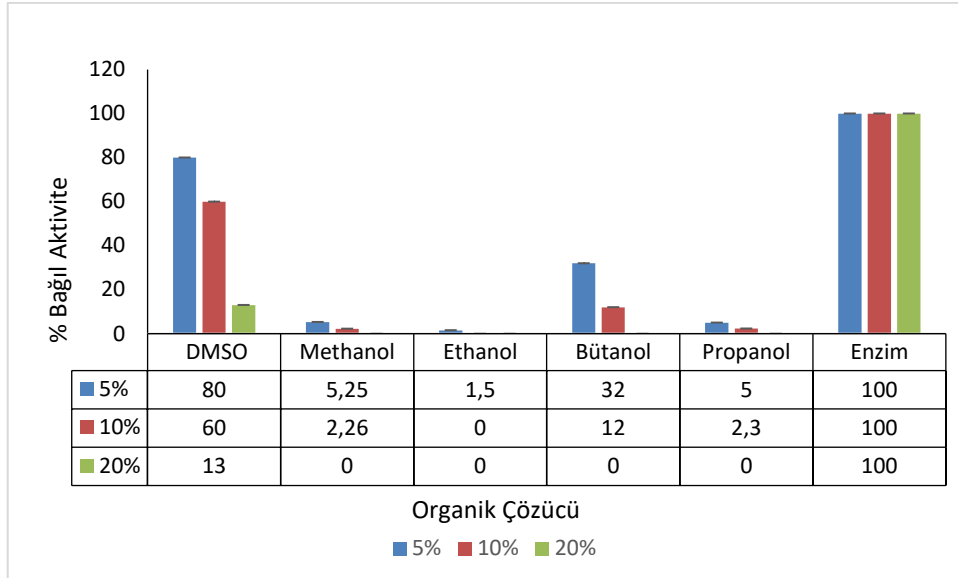
Şekil 20. Alkali Metallerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 21. İyonik ve non-İyonik Deterjanların α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi



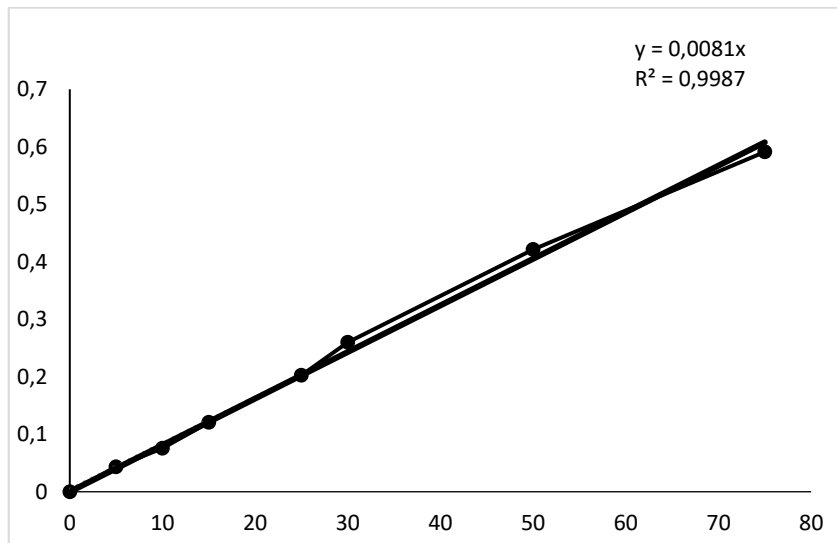
Şekil 22. Potansiyel inhibitörlerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi



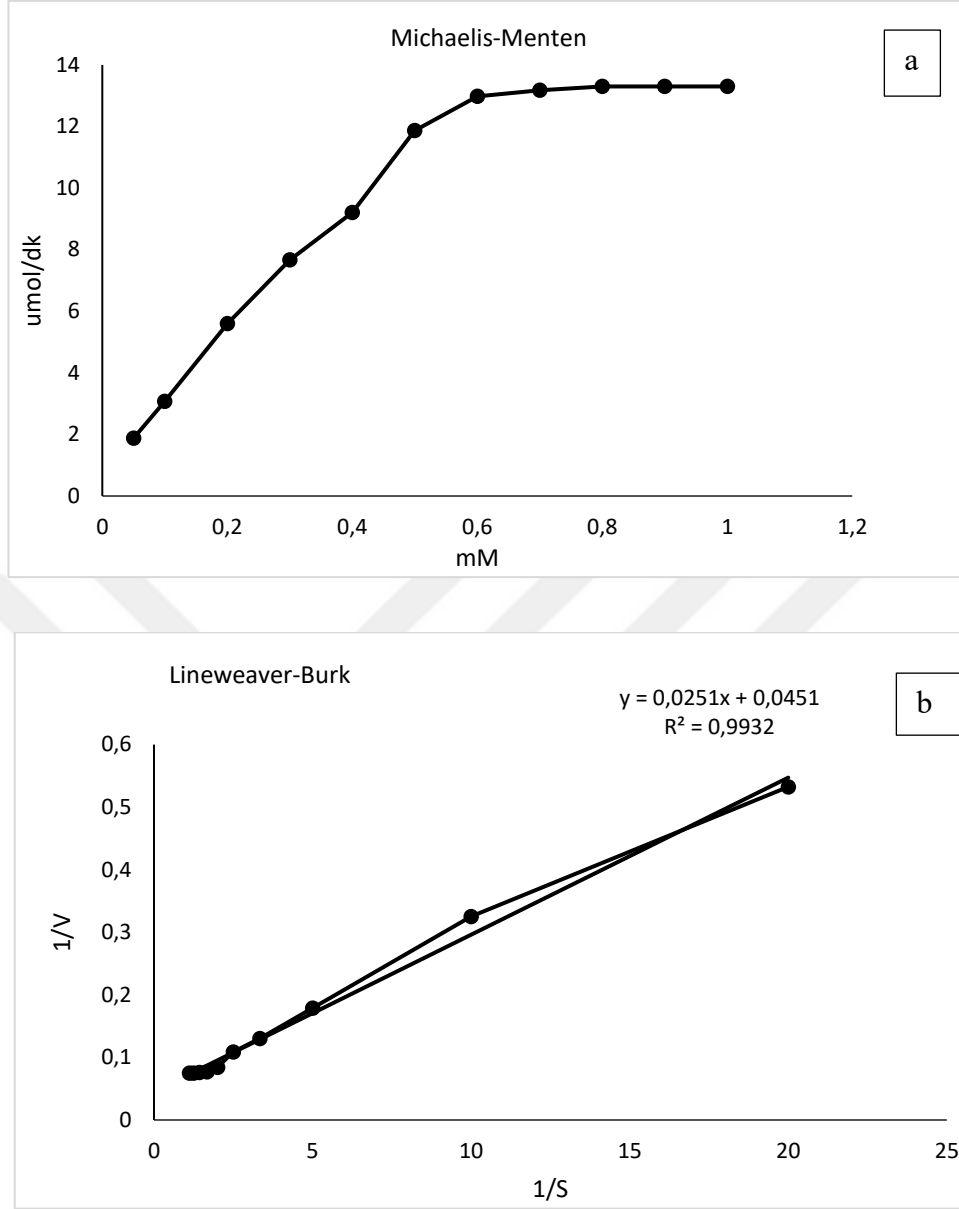
Şekil 23. Organik Çözücülerin α -Glukosidazın aktivitesi üzerine etkisi

3.2.6. α -Glukosidazın K_m ve V_{max} 'si

α -Glukosidazın aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 0,05-1,1 mM p NPG substrat konsantrasyonları için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Belirli sabit enzim miktarı karşısında substrat miktarları artırılarak enzim reaksiyonları kuruldu ve grafik oluşturuldu. Sönme katsayısı 13,3 olarak belirlenmiştir. Oluşturulan grafik sonucu $K_m=0,5$ mM $V_{max}=22$ μ mol/min olarak belirlendi.



Şekil 24. α - p NPG sönme katsayısının elde edildiği doğrusal grafik



Şekil 25. α -Glukosidazın *p*NPG substratı varlığında elde edilen Michaelis-Menten grafiği (a) ve Lineweaver-Burk eğrisi (b)

3.3. Moleküler Analizler

- a) InterPro programı ile α -Amilaz sekansının glikozil hidrolaz 13 ailesine ait olduğu belirlendi.



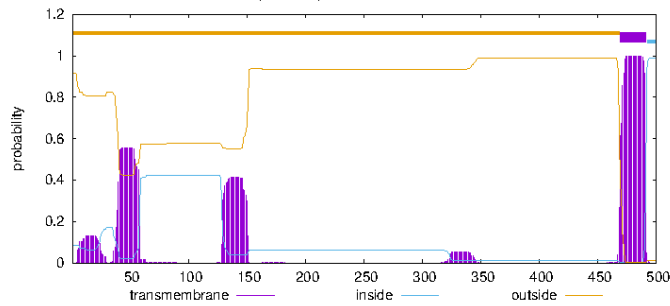
Şekil 26. α -Amilaz sekansının glikozil hidrolaz 13 ailesine ait olduğu belirlendi

- b) α -Amilaz sekansı, SWISS-MODEL programında analiz edildi. α -Amilazın üç boyutlu yapısı oluşturuldu.



Şekil 27. α -Amilazın üç boyutlu modeli için, “alpha-amylase R4F9M5.1” kalıp olarak kullanıldı

- c) α -Amilaz aminoasit sekansı, TMHMM programında analiz edildi. α -Amilazın trans membran domain tespit edildi.



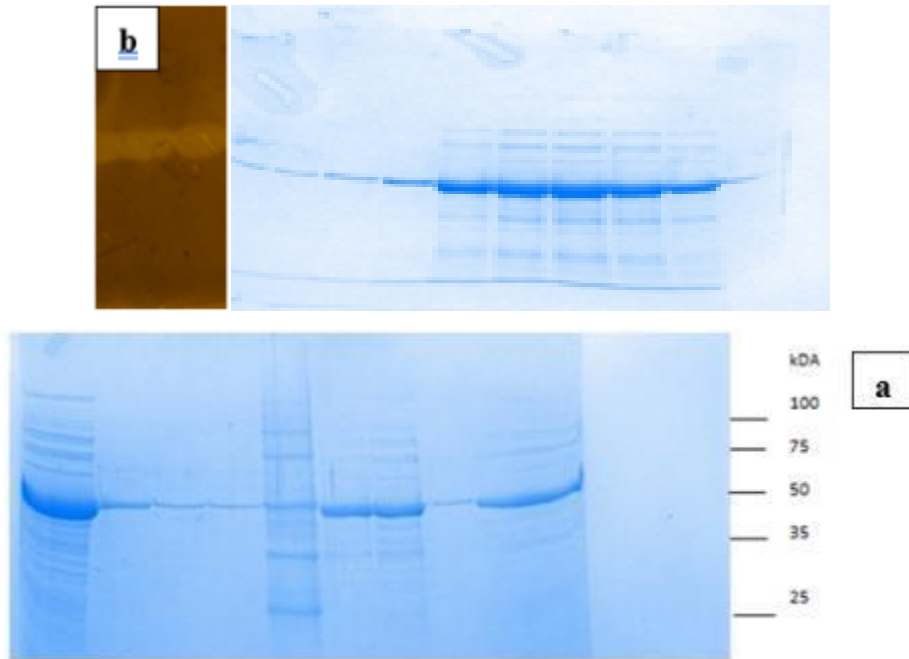
Şekil 28. α -Amilaz aminoasit sekansı içindeki transmembran domainin tespiti

3.3.1. α -Amilaz Geninin Klonlanması

Anoxybacillus flavithermus 2641^T bakterisinin α -amilaz geninin transmembran domaini ve sinyal dizisi belirlendi ve bu bölgeler dışarıda kalacak şekliyle primerler tasarlandı. İlgili gen PCR ile çoğaltıldı. 1450 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edildi. PCR ürününün pGEM®-T Easy Vektörüne klonlanması için ligasyon yapıldı ve *E.coli* JM101'e transformasyon yapıldı. Elde edilen mavi-beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Doğruluğu teyit edilen gen pET 28a⁽⁺⁾ ekspresyon vektörüne aktarıldı ve *E.coli* JM101 transformasyonu yapıldı. α -Amilaz genini taşıyan plazmit kültürün gliserol stoğu yapıp 20 °C saklanmıştır. Elde edilen rekombinant vektör *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarıldı ve kültür yapıp izole edilen plazmitlerden α -amilaz geni tespit edildi. Böylece *E.coli* BL21(DE3)/pET28-AnxyflvAmy elde edilmiş ve klonlama süreci tamamlanmış oldu.

3.3.2. α -Amilazın SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Saflaştırılması

Saflaştırma sonucu elde edilen ürünün SDS-PAGE'de yürütülüp Comassie Brilliant blue R-250 ile boyanması sonucunda tek bir bandın gözlenmesi α -amilazın başarılı bir şekilde saflaştırılabildiği sonucunu desteklemektedir. Molekül kütlesi yaklaşık 50 kDa olarak belirlendi.

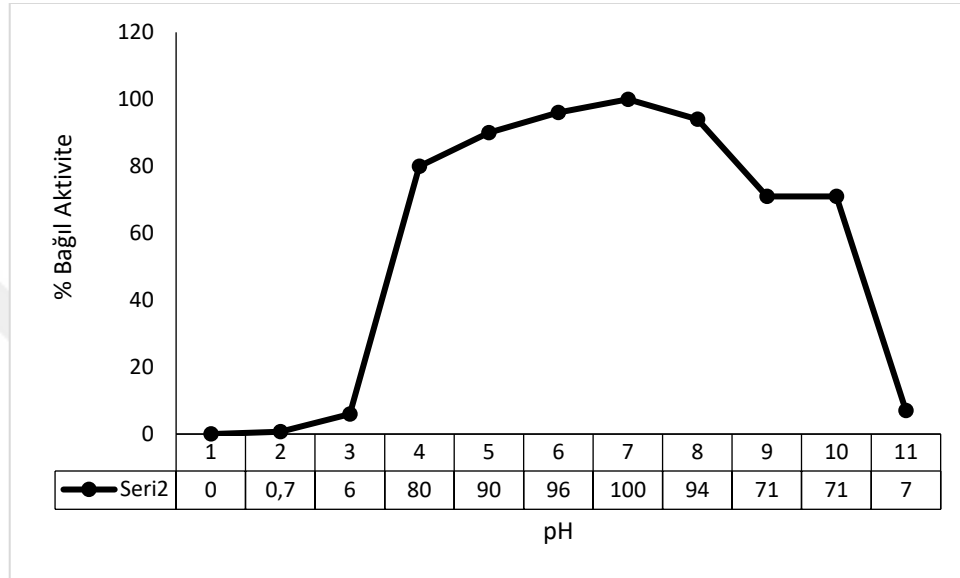


Şekil 29. α -Amilazın SDS jel görüntüleri. a) α -Amilazın ham ekstratının ve saf α -Amilazın SDS jel görüntüleri b) α -Amilazın zimogramı

3.4. α -Amilazın Karakterizasyonu

3.4.1. α -Amilazın Optimum pH'sı

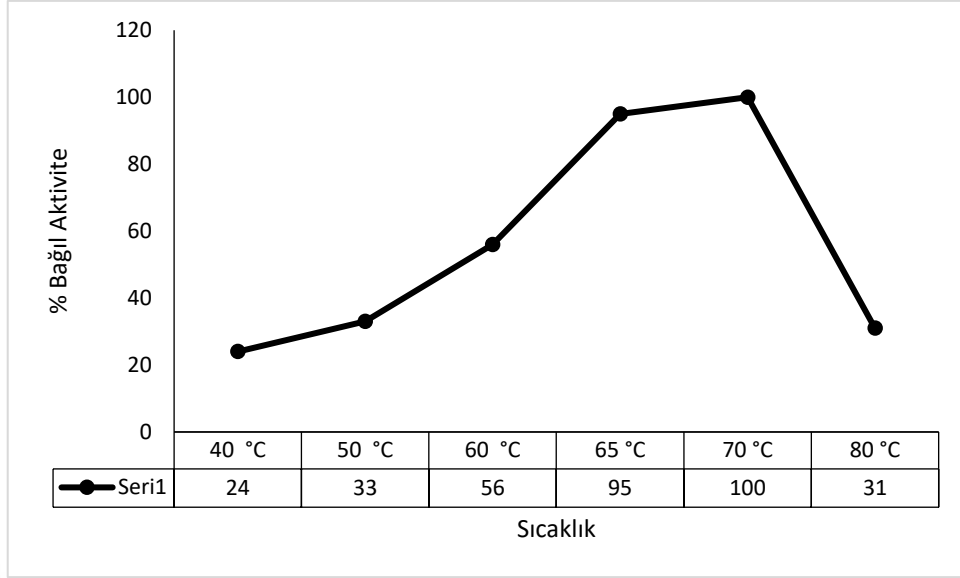
Elde edilen veriler kullanılarak pH grafiği çizildi. Optimum pH 8,0 olarak belirlendi.



Şekil 30. α -Amilazın optimum pH grafiği

3.4.2. α -Amilazın Optimum Sıcaklığı

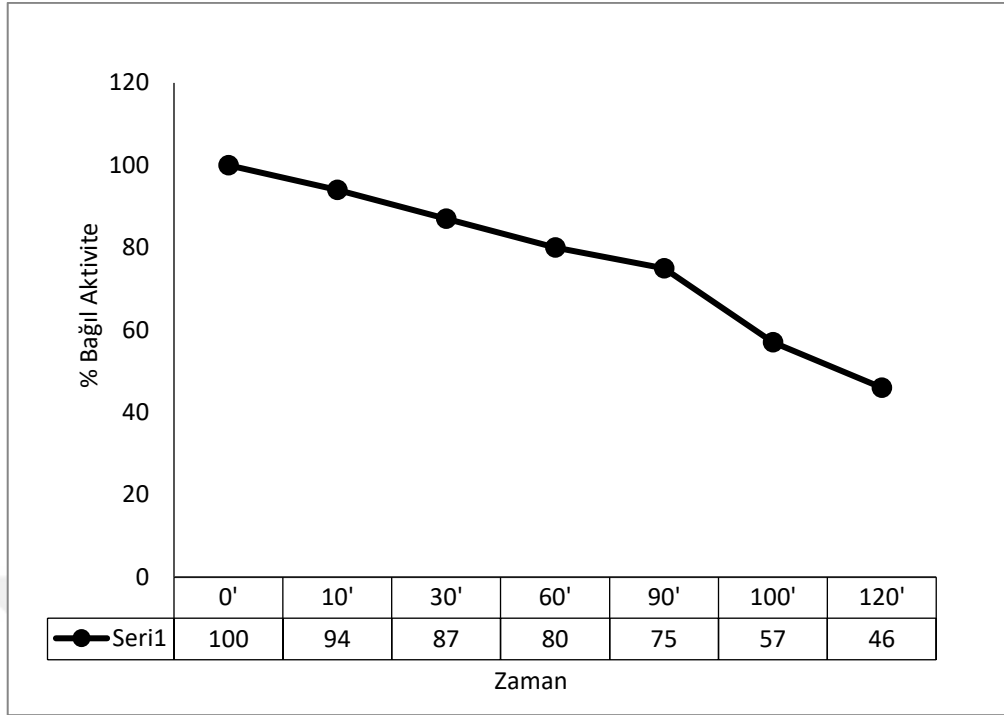
Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Şekil 31'deki sıcaklık grafiğine göre α -amilaz için optimum sıcaklık 70 °C olarak belirlendi.



Şekil 31. α -Amilazın optimum sıcaklık grafiği

3.4.3. α -Amilazın Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

α -Amilazın ısı kararlılığını belirlemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (100 mM, pH 8,0) içinde ve 3,75 mM CaCl_2 ilavesiyle saf enzim, 70 °C sıcaklıkta inkübe edildi ve belirli zamanlarda optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Gözlenen kalan bağlı aktiviteler, sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Uygulanan sıcaklıklarda enziminin aktivitesini 120 dk olarak belirlendi. (Şekil 32).

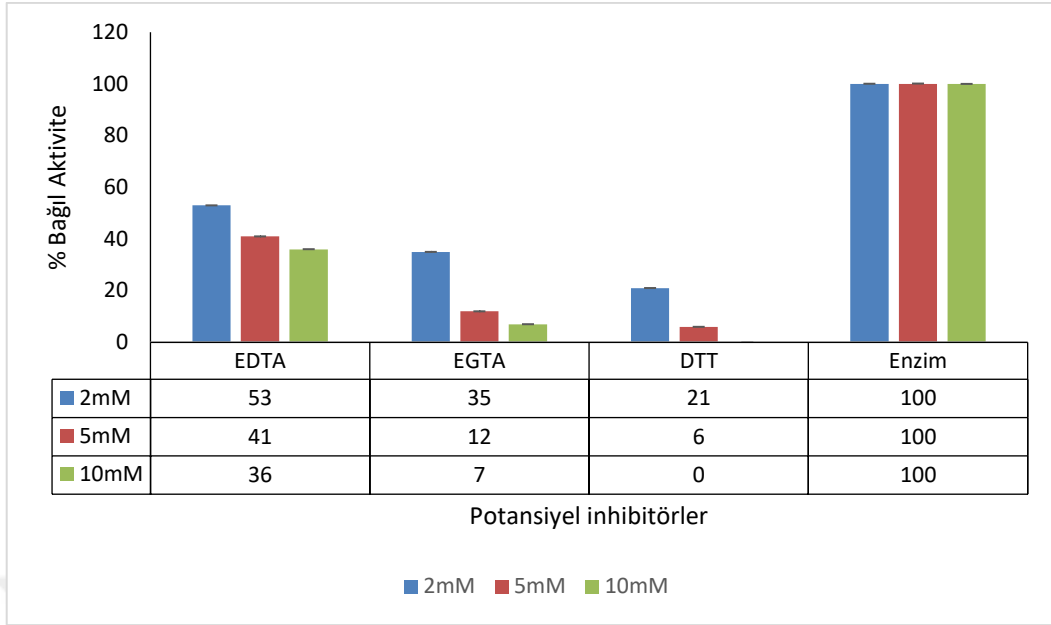


Şekil 32. α -Amilazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi

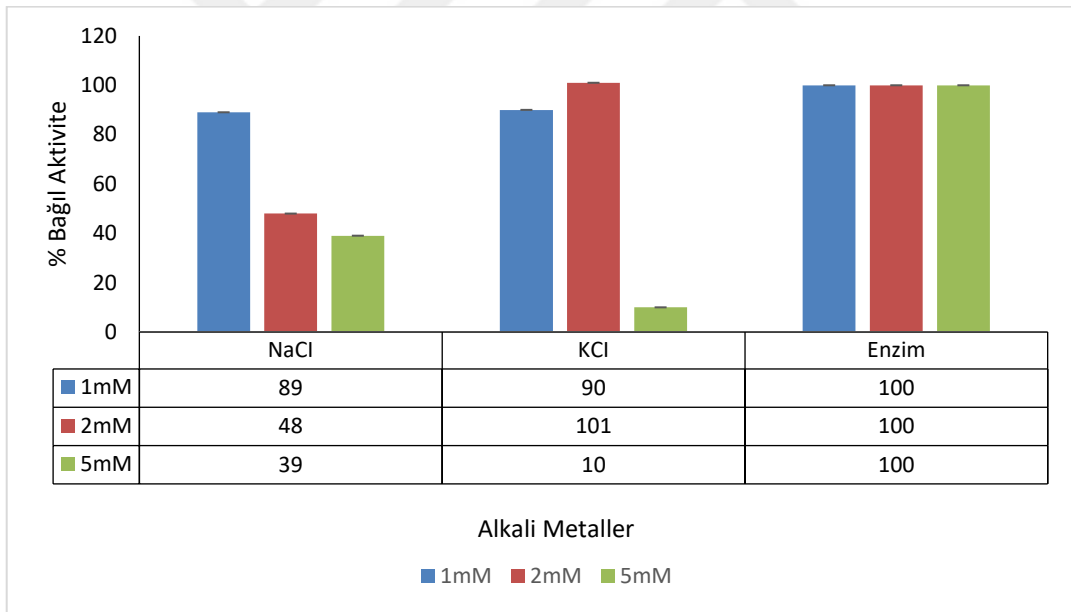
3.4.4. Metal İyonlarının ve İnhibe Edici Ajanların α -Amilazın Aktivitesi Üzerine Etkisi

α -Amilaz'ının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+} , Zn^{+2} , Na^{+} , K^{+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 2 mM, 5 mM, 10 mM şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Mg^{+2} , Ca^{+2} metal iyonları enzimin aktivitesini sırasıyla %20, % 28 oranında artırdı. Bu aktivitenin sebebi substratın bağlanma yarığının ikincil bağlanma bölgesine bağlanan Ca^{+2} iyonlarının etkisinden kaynaklanıyor olabilir. 1 mM konsantrasyonundaki K^{+} , Na^{+} metal iyonu enzimin aktivitesini sırasıyla %10, %11 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} α -amilazın aktivitesini %100 oranında inhibe etti. Metal iyonları, aktif bölgede veya substrat bağlanma bölgelerinde yer alan bazı önemli aminoasit kalıntıları ile etkileşime girebilir, bu da aktivitede azalmaya yol açan bir konformasyonel değişikliğe neden olabilir. 10 mM konsantrasyonundaki EDTA α -amilazın aktivitesini %64 oranında inhibe etti. α -Amilaz bir metalloprotein olduğu için EDTA'nın inhibisyon etkisi vardır. EDTA ligandında polioksietilen köprülerindeki oksijen donör atomları bulunmadığından EDTA ortamda bulunan sodyum veya potasyum iyonları ile

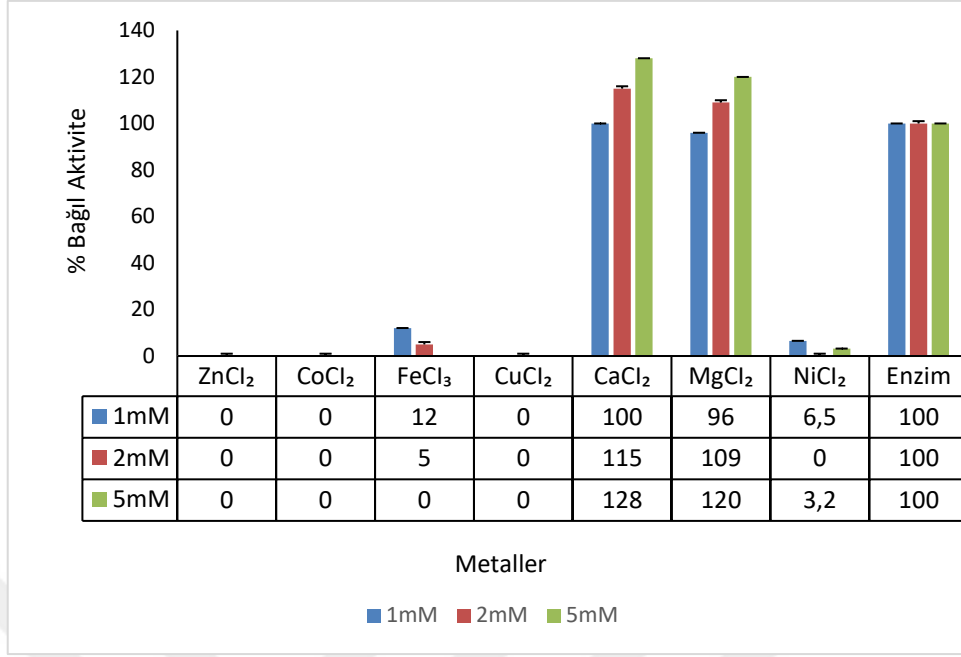
etkileşim yaparak komplekleşme meydana getirir ve inhibisyon etkisi ortaya koyar. 2 mM konsantrasyonlarındaki EGTA ve DTT sırasıyla %55 ve %79 oranında enzimin aktivitesini inhibe etti. Deterjanların arasında, non-iyonik deterjanlar, %1 konsantrasyonlarındaki Triton X-100 ve Tween-20 α -amilazın aktivitesini sırasıyla %18, %22 oranında inhibe ederken ve iyonik deterjan SDS, enzimin aktivitesinde %90 oranında inhibisyon gösterdi. Triton X-100 iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir. Non-iyonik deterjanlar, yüksüz hidrofilik baş gruplarına sahiptir. Tween-20 yağ asidi ester kısmı ve uzun bir polietilen oksit zinciri içeren polisorbitat yüzey aktif maddesidir. Genellikle nazik yüzey aktif maddesidir, proteini çözünürleştirmede etkilidir. Triton X-100 ve Tween-20 enzimin hidrojen bağı yapma yeteneğini azaltabileceği ve üç boyutlu yapı üzerinde değişimlere neden olabileceğinden dolayı inhibisyon etkisi göstermiştir. SDS'in enzim inhibisyonu, etkili bir yüzey aktif maddedir. İyonik deterjanlar, hidrofobik bir zincir ve yüklü bir baş grubundan oluşur. Proteinler içindeki ve arasındaki kovalent olmayan bağları bozarak onları denatüre eder ve doğal konformasyonları ile işlevlerini kaybetmelerine neden olur. Proteinin yükünü maskeler. Böylece, SDS, izoelektrik noktalarına (pI) bakılmaksızın tüm proteinlere genel bir negatif yük ekler. SDS ile inhibisyonun sebebi olarak sert anyonik deterjan olmasından, iyonik bağlarını, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri bozabilme özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. SDS, enzimin hidrofobik bölgeleri ile reaksiyona girerek, enzimin 3 boyutlu yapısını modifiye ederek, enzim inaktivasyonuna neden olur. %5 konsantrasyonunda DMSO %98 oranında enzimin aktivitesini korur ve %5 konsantrasyonundaki metanol, etanol, bütanol, propanol, enzimin aktivitesini sırasıyla, %94,7, %95,2, %89, %95,7 oranlarında inhibe etti.



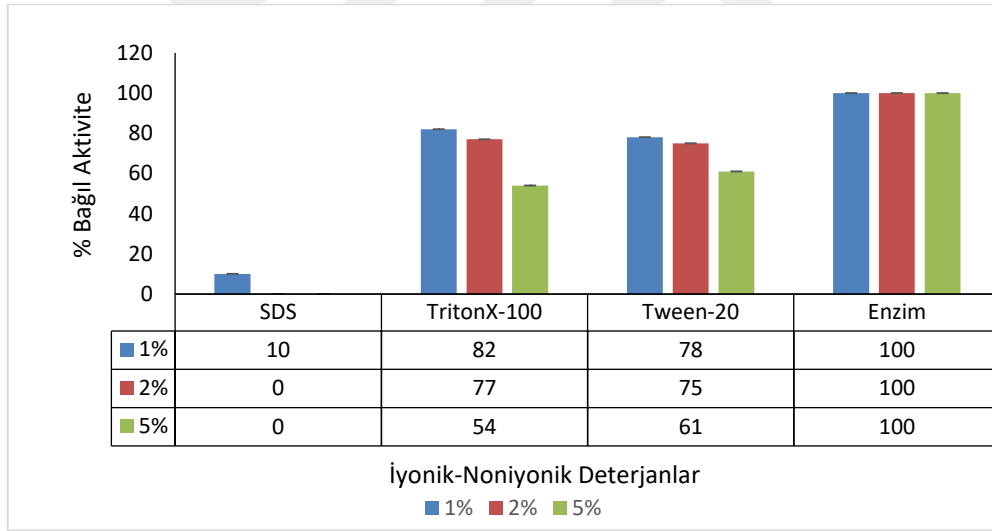
Şekil 33. Potansiyel inhibitörlerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi



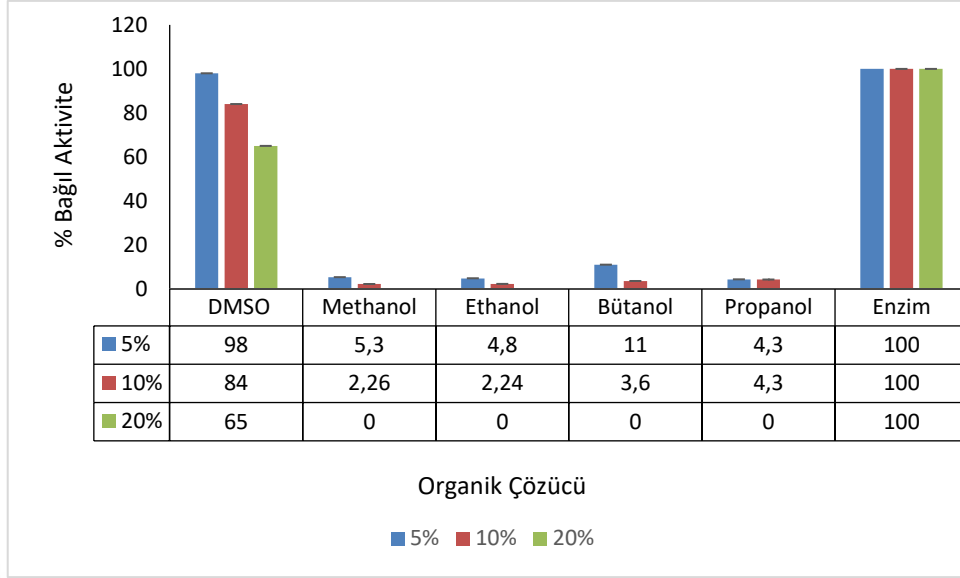
Şekil 34. Alkali metallerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 35. Metallerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi



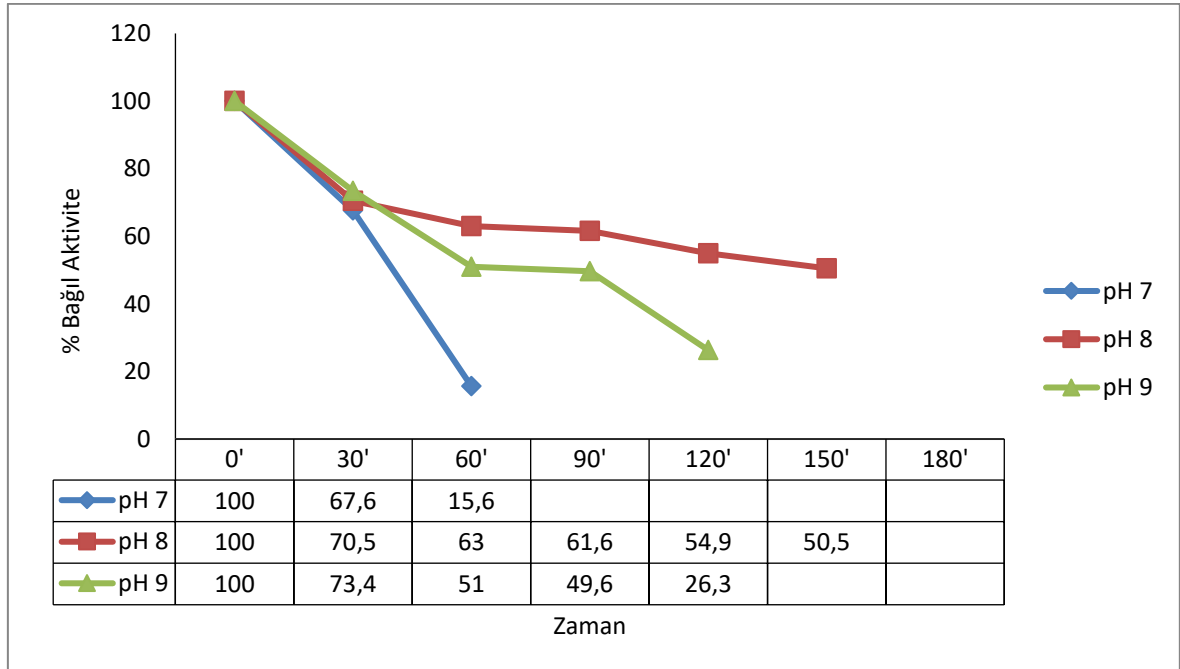
Şekil 36. İyonik ve non-iyonik deterjanların α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 37. Organik Çözücülerin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi

3.4.5. α -Amilazın pH Kararlılığı

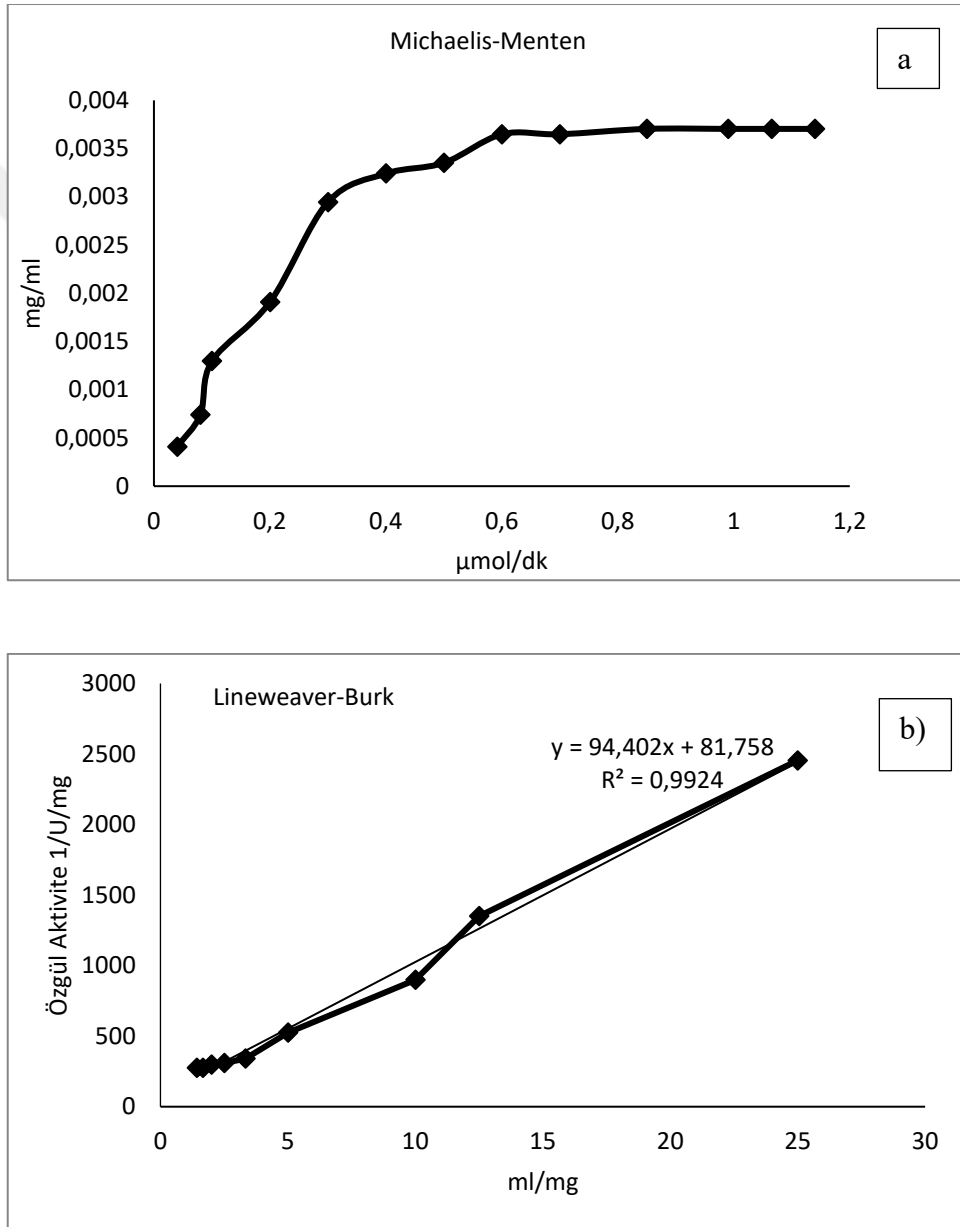
α -Amilazın 70 °C 100 mM pH 8,0 Tris-HCl de 150 dk aktivitesini koruyabildiği belirlendi.



Şekil 38. α -Amilazın pH kararlılığı grafiği

3.4.6. α -Amilazın K_m ve V_{max} 'sı

α -Amilazın aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 1-5 mg/ml konsantrasyonlarında çözünür patates nişastası substratı için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Hesaplamalar sonucunda $K_m=1,14$ mg/ml ve $V_{max}= 31$ U/mg değerleri belirlendi.

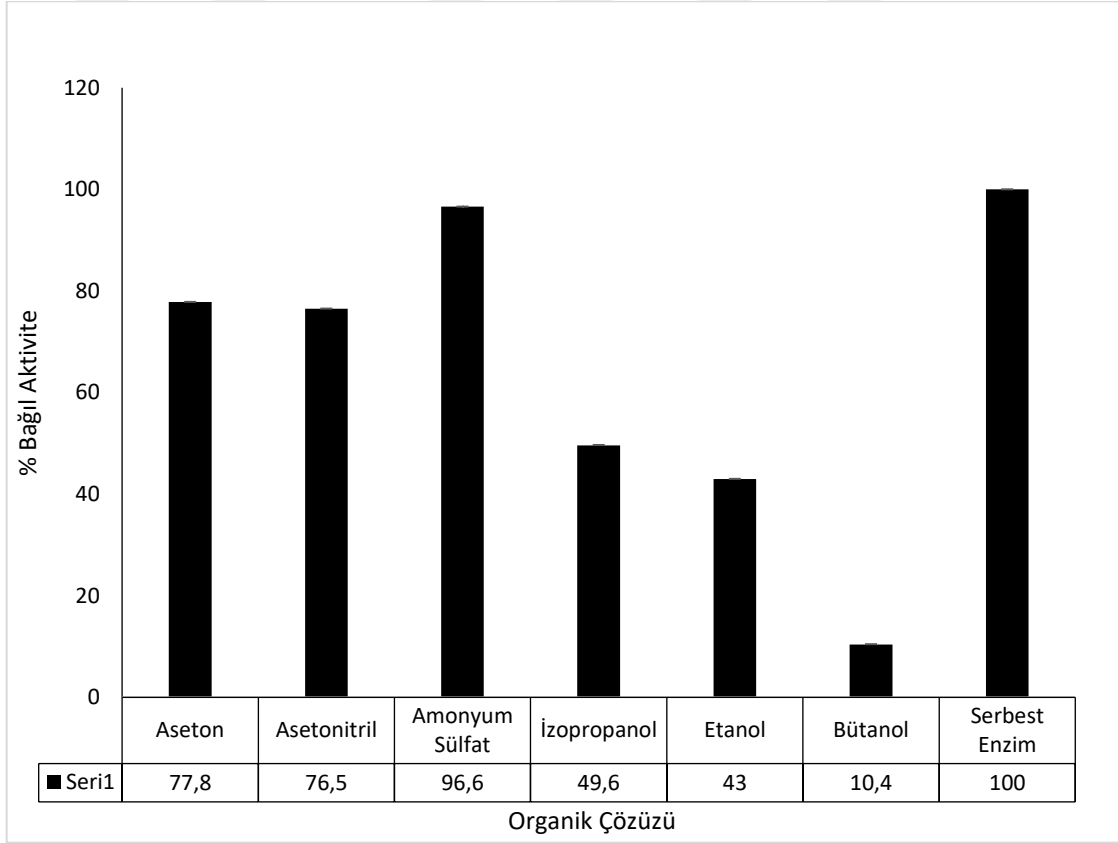


Şekil 39. (a) Michaelis-Menten grafiği ve (b) Lineweaver-Burk eğrisi α -Amilazın çözünür patates nişasta substratı varlığında

3.5. α -Amilaz Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu

3.5.1. Presipitasyon Aşaması

Enzim için en uygun presipitasyon ajanını bulmak amacıyla Etanol, İzopropanol, Asetonitril, Aseton, Amonyum sülfat, Bütanol, %96 lık organik çözücüler ile ayrı ayrı muamele edilmesi sonucunda presipite edilen enzimlerin aktivitesi serbest enzim ile kıyaslandığında aktiviteleri sırasıyla %43, %49, %76, %77, %96, %10 olarak belirlendi. En yüksek aktivite oranı %96 Amonyum sülfatta gözlemlendi. İmmobilizasyona amonyum sülfat ile devam edildi.

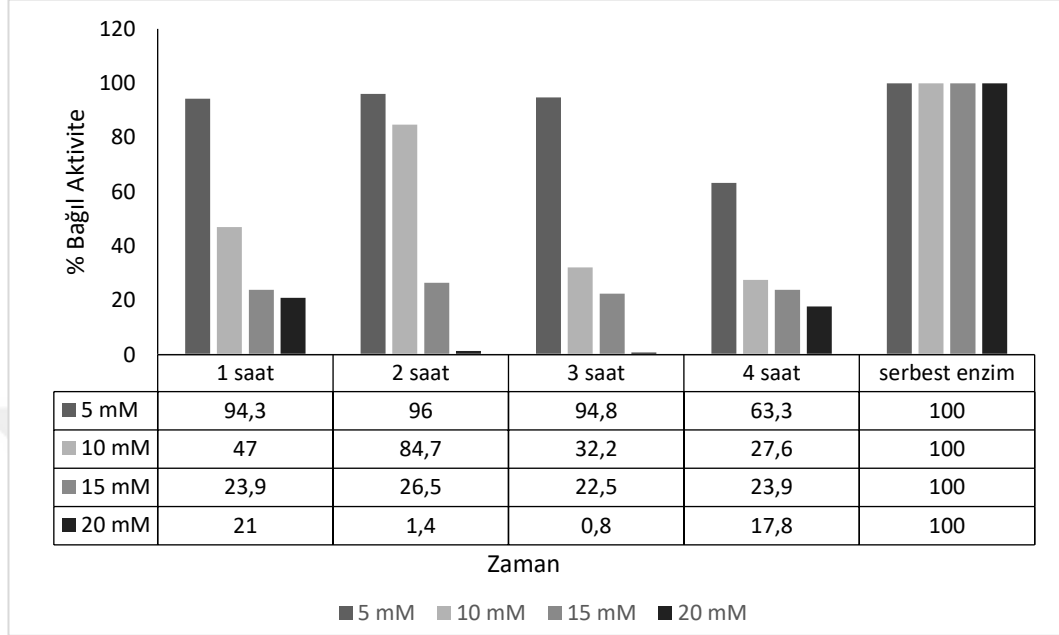


Şekil 40. Organik Çözücülerin α -Amilaz Presipitasyonuna Etkisi

3.5.2. Çapraz-Bağ Oluşturma Süreci

Çapraz bağ oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM) glutaraldehit kullanıldı. Sonuçlar serbest enzim aktivitesiyle karşılaştırıldığında

optimum immobilizasyon şartlarında, 5 mM glutaraldehit konsantrasyonunda 2 saat sonunda aktivitesinin % 96'sını koruduğu tespit edildi.

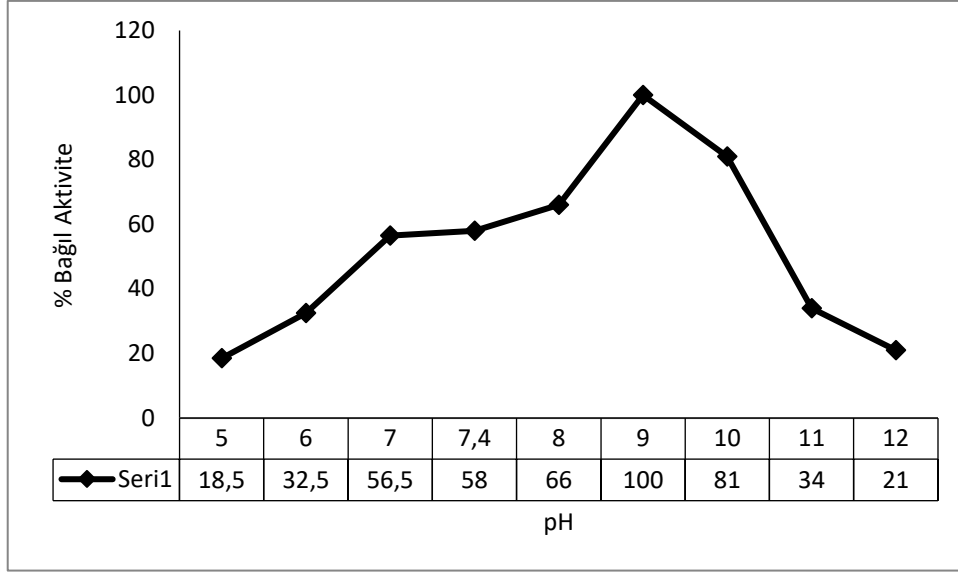


Şekil 41. Çapraz-Bağ oluşturma sürecinin α -Amilaz aktivitesi üzerine etkisi

3.6. α -Amilaz-CLEA'nın Karakterizasyonu

3.6.1. α -Amilaz-CLEA'nın Optimum pH'sı

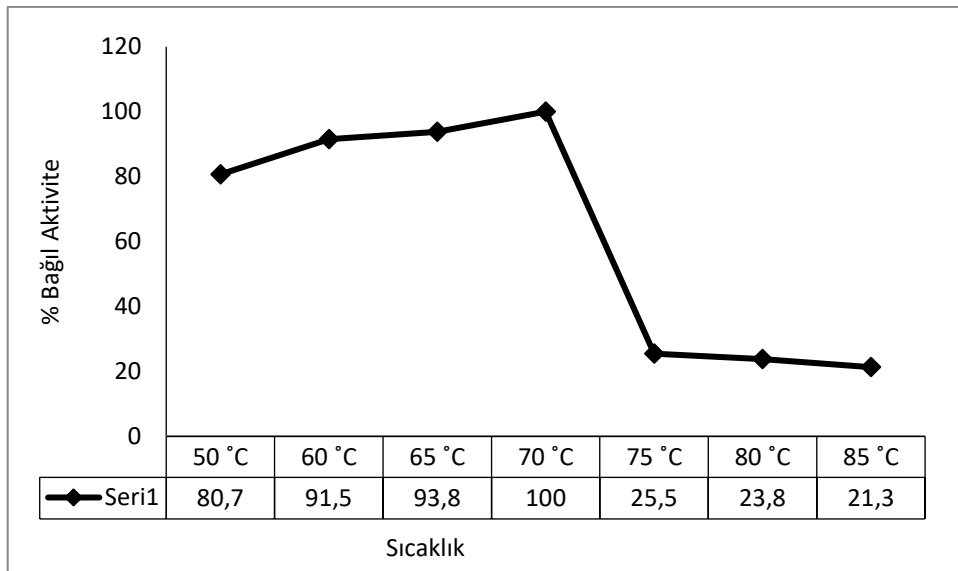
Farklı pH tampon çözeltilerle hazırlanarak, substrat olarak çözünür patates nişastası kullanılarak optimum pH belirlendi. Enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlar neticesinde çizilen grafikten optimum pH 9,0 olarak belirlendi.



Şekil 42. α -Amilaz-CLEA'nın Optimum pH'sı

3.6.2. α -Amilaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklığı

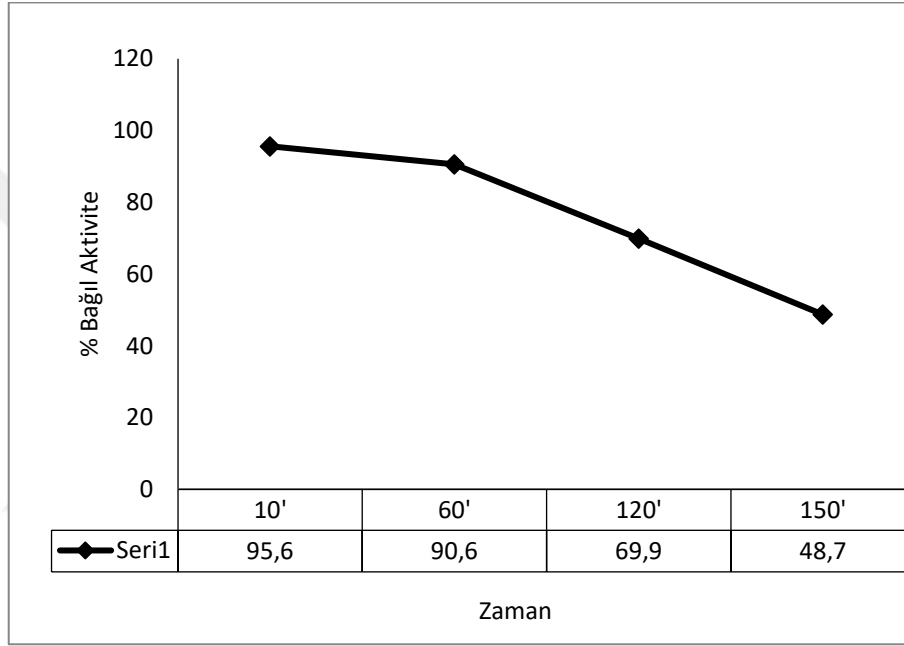
İmmobilize edilen enzim 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C sıcaklıkları ile 30 dk inkübe edilerek, enzim aktivitesi tayini indirgen şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe aktarıldığında optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlendi (Şekil 43).



Şekil 43. α -Amilaz-CLEA'nın optimum sıcaklığı

3.6.3. α -Amilaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığı

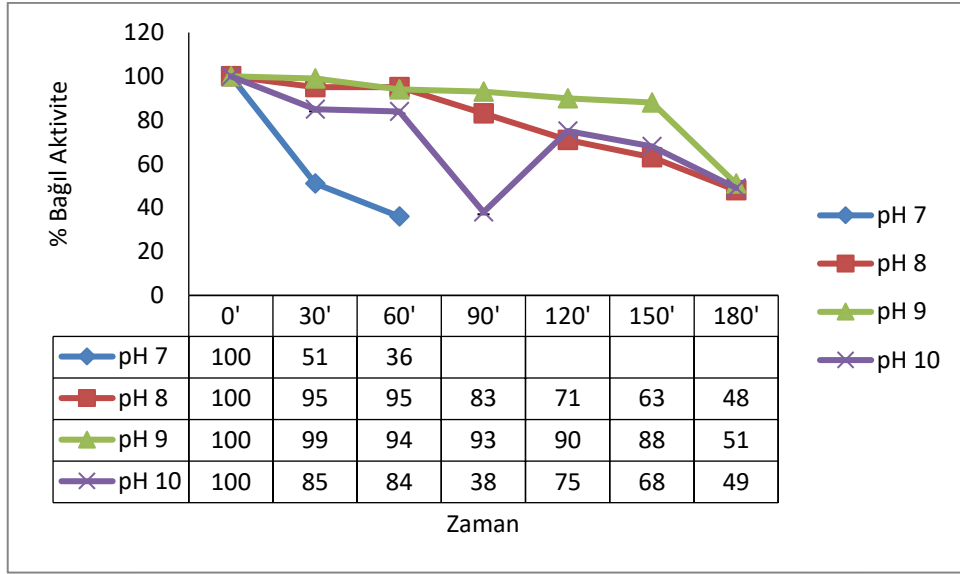
Enzimin ısı kararlılığını incelemek amacıyla, immobilize enzim 3,75 mM CaCl_2 , ilavesiyle birlikte 70 °C sıcaklıkta 10 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 150 dk süre ile inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlarla grafik çizildiğinde immobilize enzimin aktivitesinin yarılanma ömrünün yaklaşık 2,5 saat olduğu belirlendi.



Şekil 44. α -Amilaz-CLEA'nın Sıcaklık kararlılığı

3.6.4. α -Amilaz-CLEA'nın pH Kararlılığı

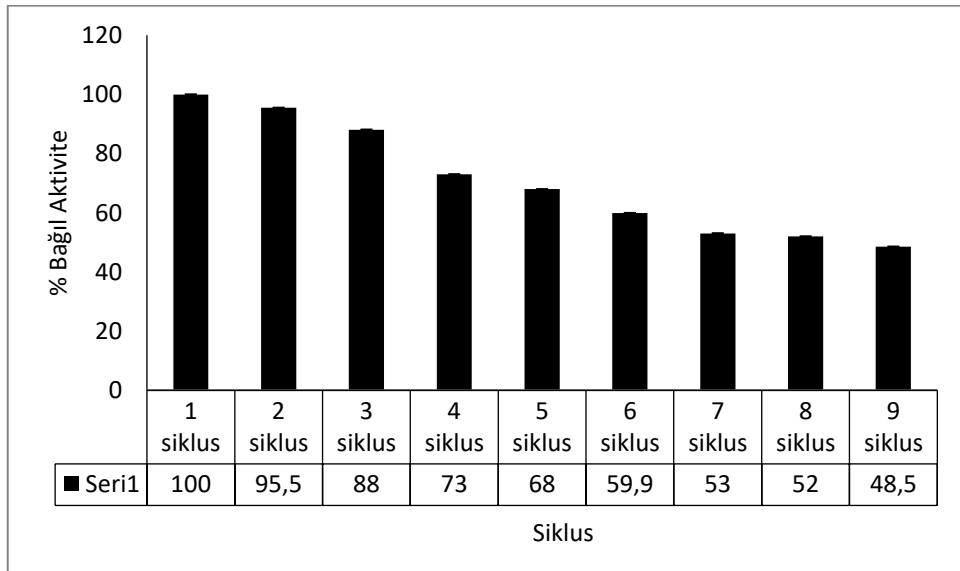
Farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak çözünür patates nişastası kullanılarak pH kararlılığı belirlendi. Bunun için, 100 mM pH 6.0-8.0 potasyum fosfat tamponu, 100 mM pH 8.0-9.0 Tris-HCl, Glisin-NaOH 100 mM pH 10 tamponları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar immobilize enzimin yüksek alkali şartlara dayanıklılığının arttığı gözlenmiştir.



Şekil 45. α -Amilaz-CLEA'nın pH Kararlılığı

3.6.5. α -Amilaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliği

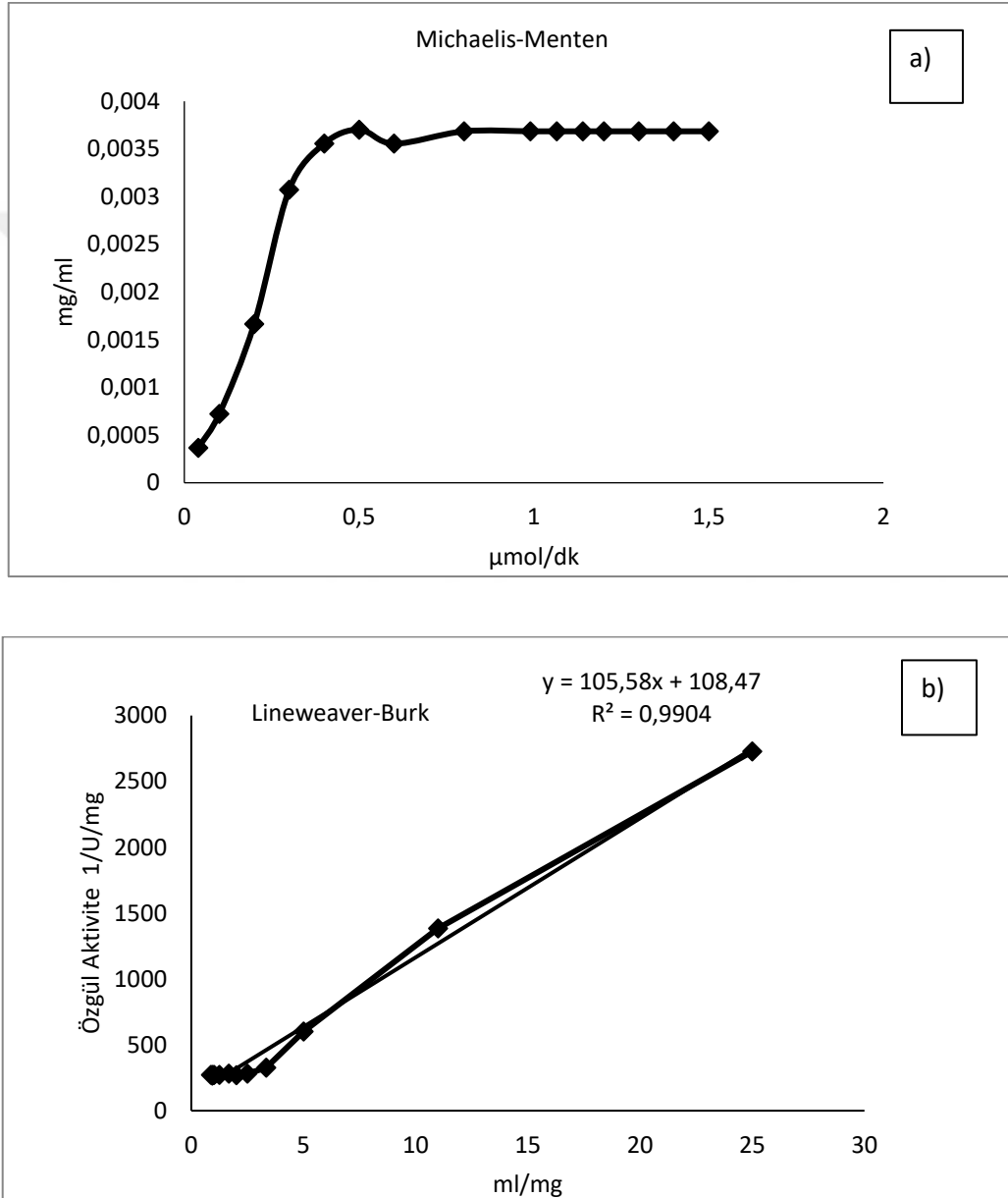
İmmobilize edilmiş α -amilaz optimal şartlar altında (70 °C, Tris-HCl pH 9) substrat olarak patates nişastası kullanılarak hidroliz reaksiyonu başlatıldı. Enzimin 9 kullanım sonucunda aktivitesinin %50'sini koruduğu gözlemlendi.



Şekil 46. α -Amilaz-CLEA'nın yeniden kullanılabilirliği

3.6.6. α -Amilaz-CLEA'nın K_m ve V_{max}

α -Amilazın aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 1-5 mg/ml çözünür patates nişastası için kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Analizler sonucu $K_m = 0,9$ mg/ml ve $V_{max} = 35$ U/mg olarak belirlendi.

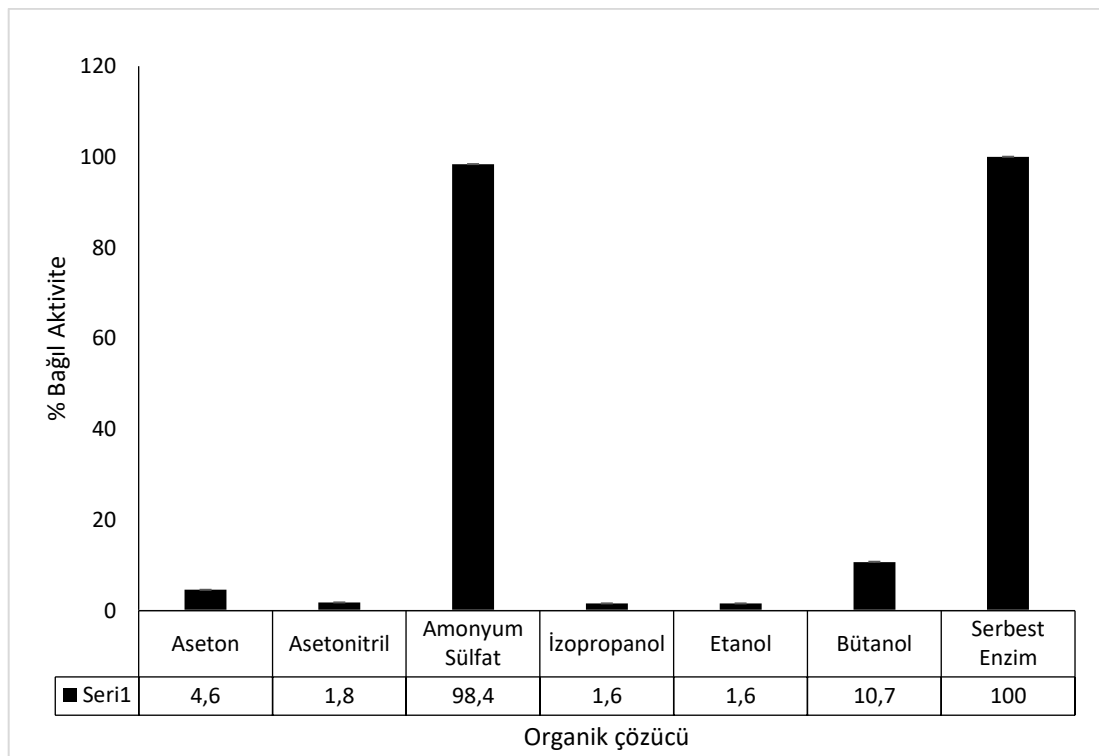


Şekil 47. İmmobilize α -amilazın nişasta varlığında elde edilen b) Lineweaver-Burk eğim grafiği ve a) Michael-Menten grafiği

3.7. α -Glukozidazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Metodu ile İmmobilizasyonu

3.7.1. Presipitasyon Aşaması

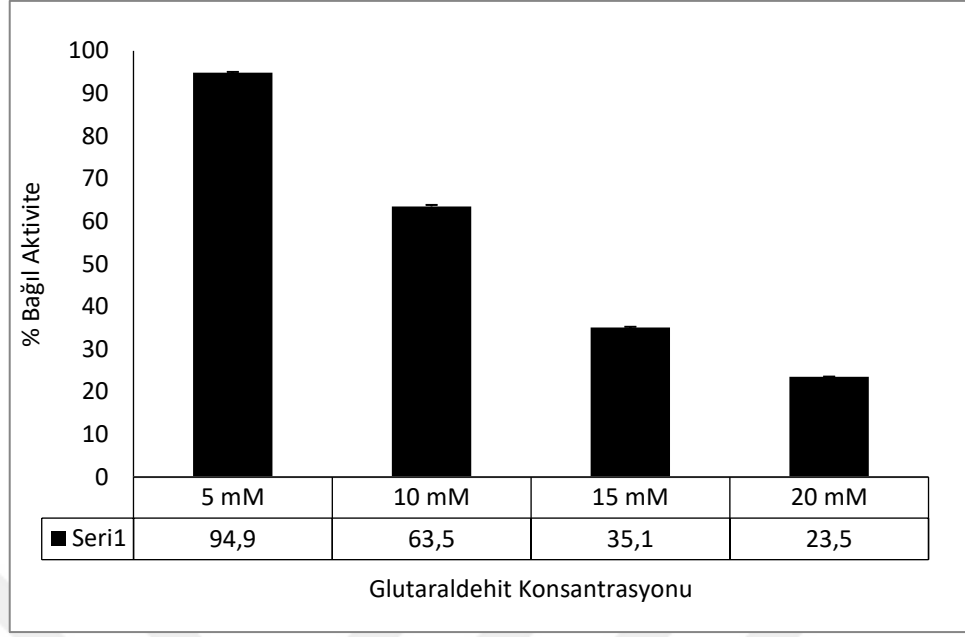
α -Glukozidazın en uygun presipitasyon ajanını bulmak amacıyla Etanol, İzopropanol, Asetonitril, Aseton, Amonyum sülfat, Bütanol, %96 lık organik çözücüler ayrı ayrı enzim ile inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar neticesinde serbest enzim aktivitesine göre kıyaslandığında en yüksek aktivite Amonyum sülfatta, %98 oranında gözlemlendi.



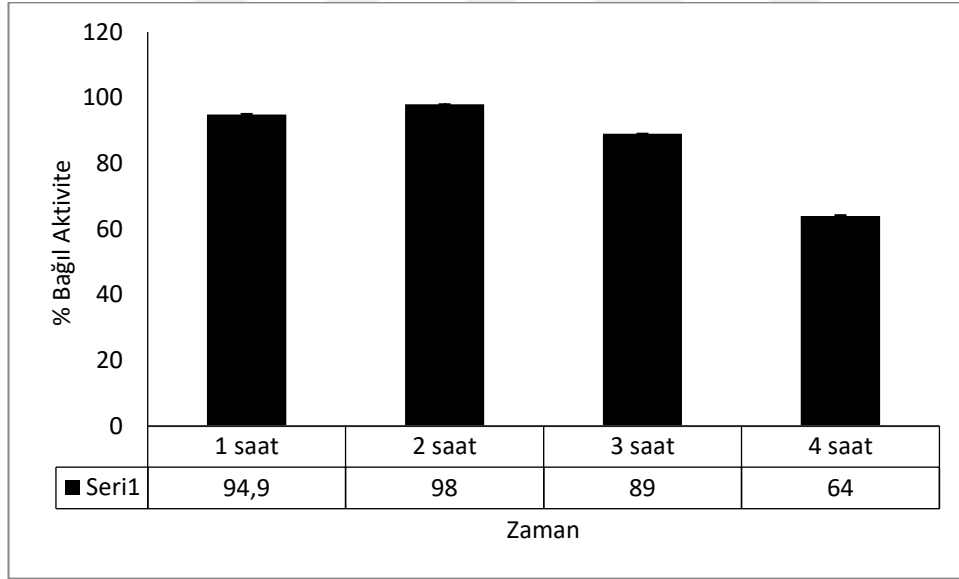
Şekil 48. α -Glukosidaz-CLEA'nın presipitasyon aşamalarındaki aktiviteleri

3.7.2. Çapraz-Bağ Oluşturması Süreci

Çapraz bağ oluşturma sürecinde en uygun konsantrasyonu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM) glutaradehit ile α -glukozidaz muamele edildi. Oda ısısında 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat inkübe edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde optimum immobilizasyon şartlarının 5 mM glutaraldehit ve 2 saat inkübasyon olduğu gözlemlendi.



Şekil 49. Çapraz-Bağ oluşturma aşamasındaki glutaraldehit konsantrasyonlarının α -Glukosidaz-CLEA'nın aktivitesi üzerine etkisi

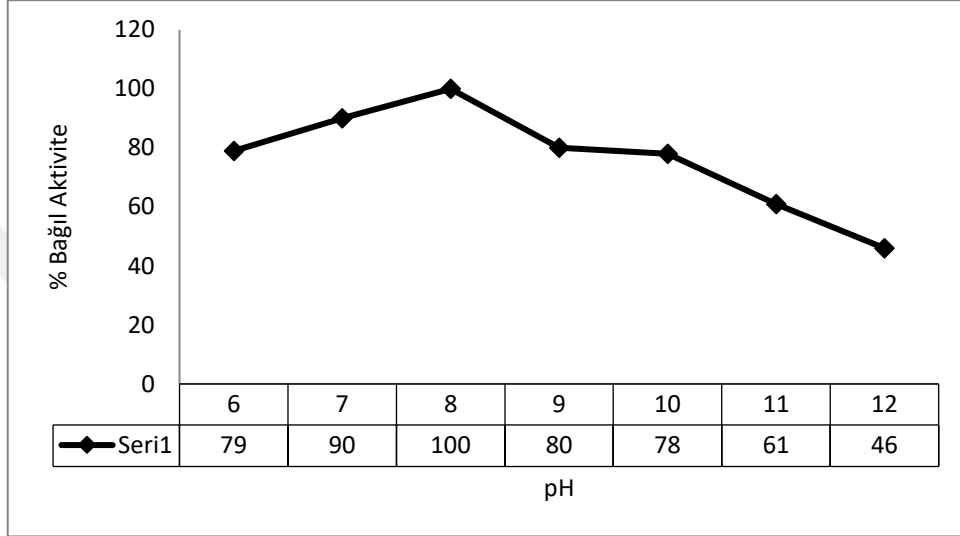


Şekil 50. Çapraz-Bağ oluşturma aşamasındaki glutaraldehit inkübasyon sürelerinin α -glukosidaz-CLEA'nın aktiviteler üzerine etkisi

3.8. α -Glukosidaz-CLEA'nın Karakterizasyonu

3.8.1. α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum pH'sı

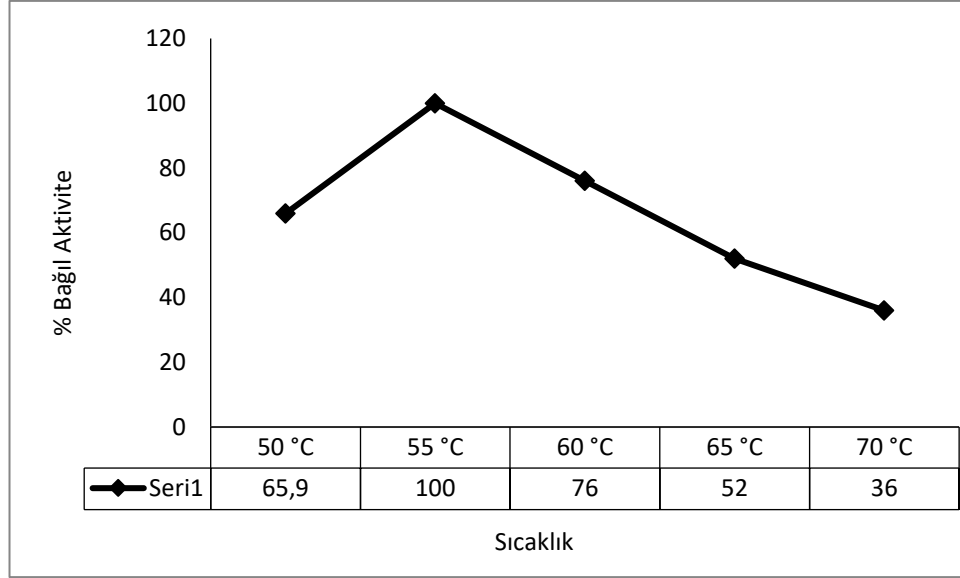
Farklı pH'ya sahip tamponlar kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda enzimin optimum pH'sı 8 olarak belirlendi.



Şekil 51. α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum pH'sı

3.8.2. α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklığı

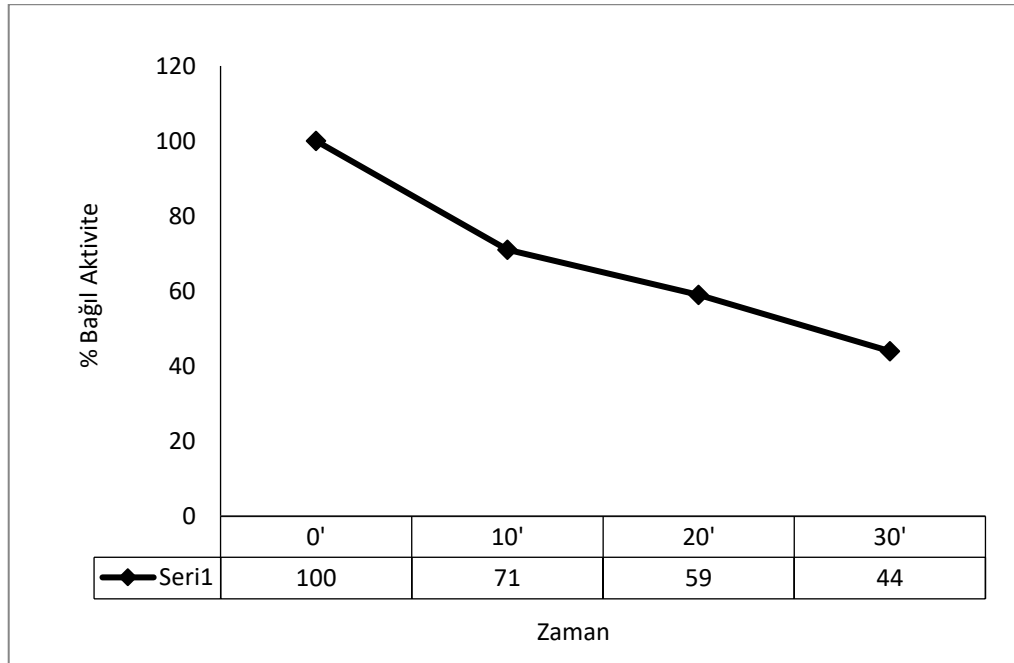
İmmobilize edilen α -glukozidaz 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C sıcaklıklarında 30 dk inkübe edildi. *p*NPG substrat olarak kullanılarak sonuçlar gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde immobilize enzimin optimum sıcaklığı 55 °C olarak belirlendi (Şekil 52).



Şekil 52. α -Glukosidaz-CLEA'nın optimum sıcaklığı

3.8.3. α -Glukosidaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığı

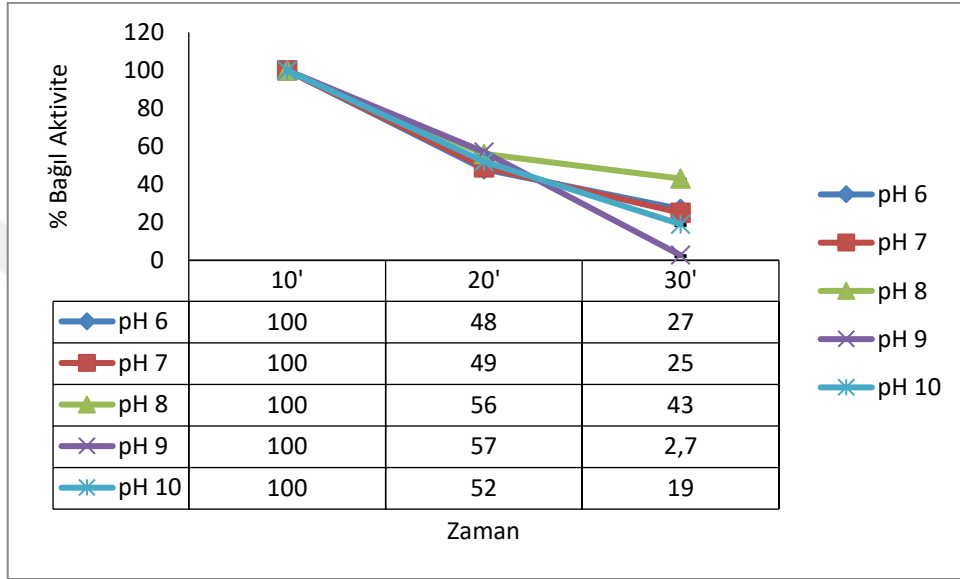
α -Glukozidaz ısı kararlılığını incelemek amacıyla, yapılan değerlendirmeler neticesinde yarılanma ömrü yaklaşık olarak 20 dk olduğu tespit edildi.



Şekil 53. α -Glukosidaz-CLEA'nın Sıcaklık kararlılığı

3.8.4. α -Glukozidaz-CLEA'nın pH Kararlılığı

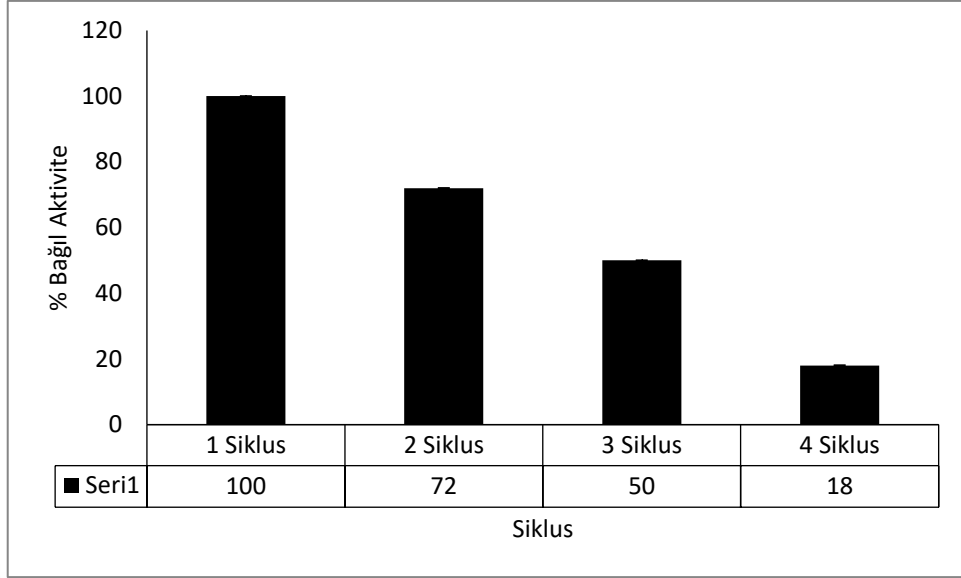
Farklı pH'ya sahip tampon çözeltiler ve *p*NPG substrat olarak kullanılarak α -glukozidaz kararlılığı incelendi. Bunun için, 100 mM pH (6,0-8,0) potasyum fosfat tamponu, 100 mM pH (8,0-9,0) Tris-HCl tamponları kullanıldı. Analizler sonucunda pH 8'de 20 dk kararlı olduğu tespit edildi.



Şekil 54. α -Glukozidaz-CLEA'nın pH kararlılığı

3.8.5. α -Glukozidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

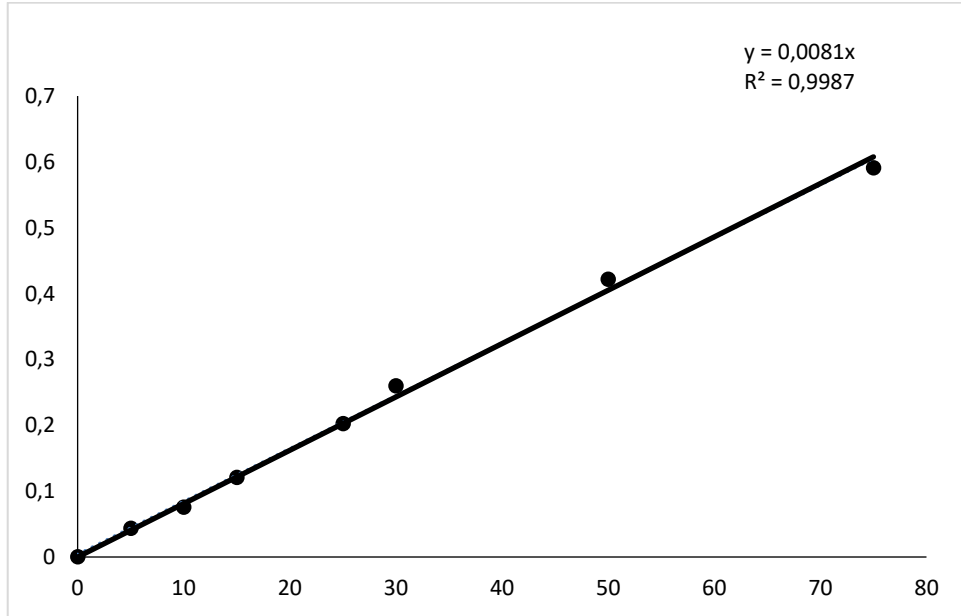
İmmobilize α -glukozidaz ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda enzimin 3 döngüye kadar aktivitesini % 50 koruduğu belirlendi.



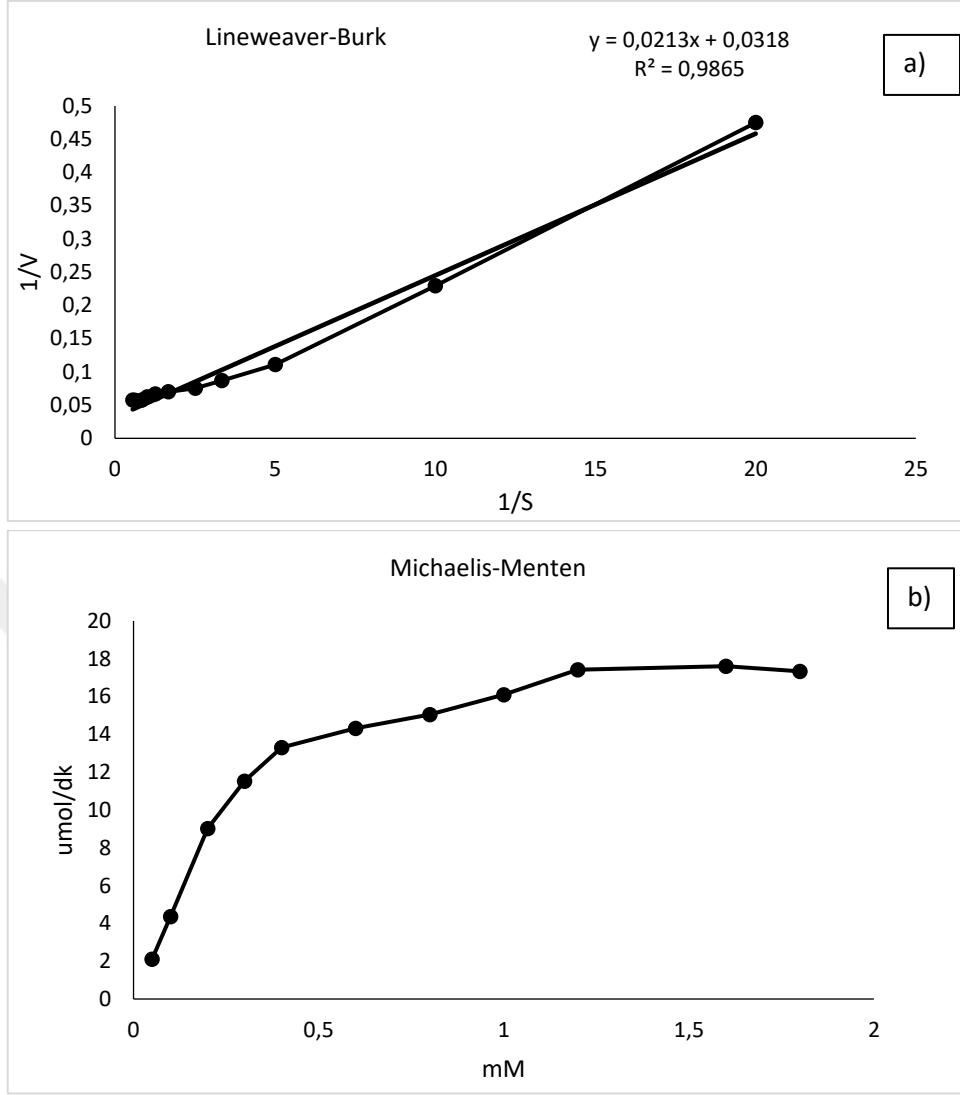
Şekil 55. İmmobilize α -glukosidazın yeniden kullanılabilirliği

3.8.6. α -Glukosidaz-CLEA'nın K_m ve V_{max} 'ı

Sönme katsayısı 13,3 olarak belirlendi. Analizler sonucu $K_m = 0,66$ mM ve $V_{max} = 818$ U/mg olarak belirlendi.



Şekil 56. α -pNPG sönme katsayısının elde edildiği doğrusal grafik

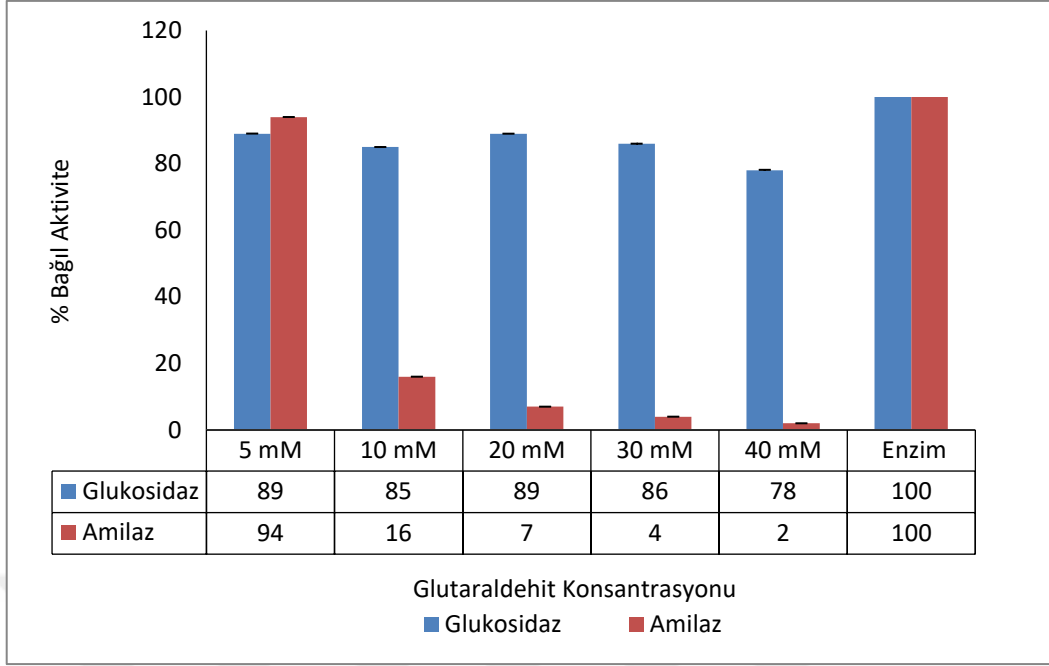


Şekil 57. İmmobilize α -glukosidazın *p*NPG varlığında elde edilen a) Lineweaver-Burk eğim grafiği ve b) Michaelis-Menten

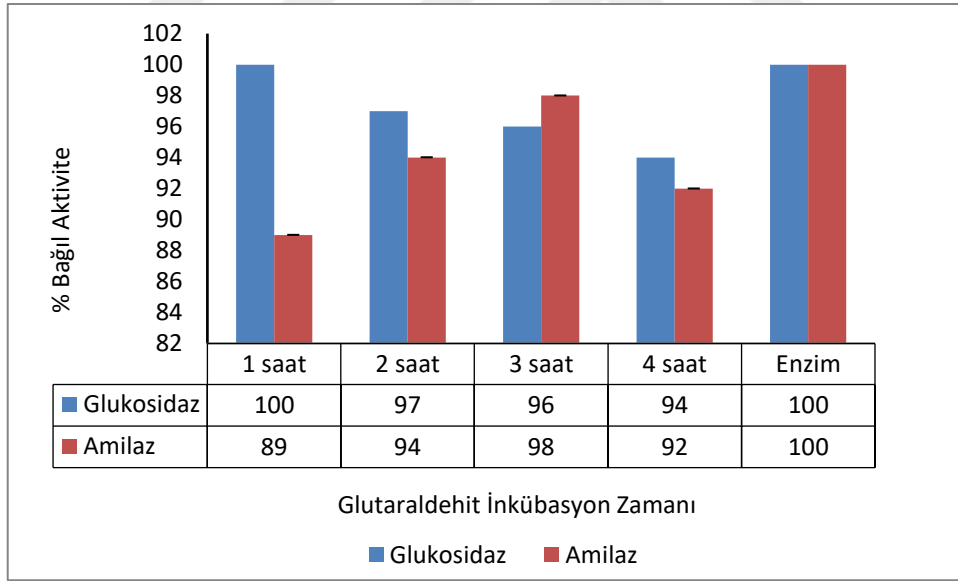
3.9. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) Çapraz Bağlı Enzim Aggregatları (CLEA) Metodu ile Birlikte İmmobilizasyonu

3.9.1. Çapraz-Bağ Oluşturma Süreci

α -Amilaz ve α -glukosidazın ayrı olarak aktivitelerine bakılarak sonuçlar değerlendirildiğinde optimum iki enzim için ortaklaşa immobilizasyonun 5 mM glutaraldehit konsantrasyonunda 3 saatlik süre sonucunda gözlemlendi.



Şekil 58. Çapraz-bağ oluşturma aşamasında glutaraldehit konsantrasyonlarının immobilize enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi

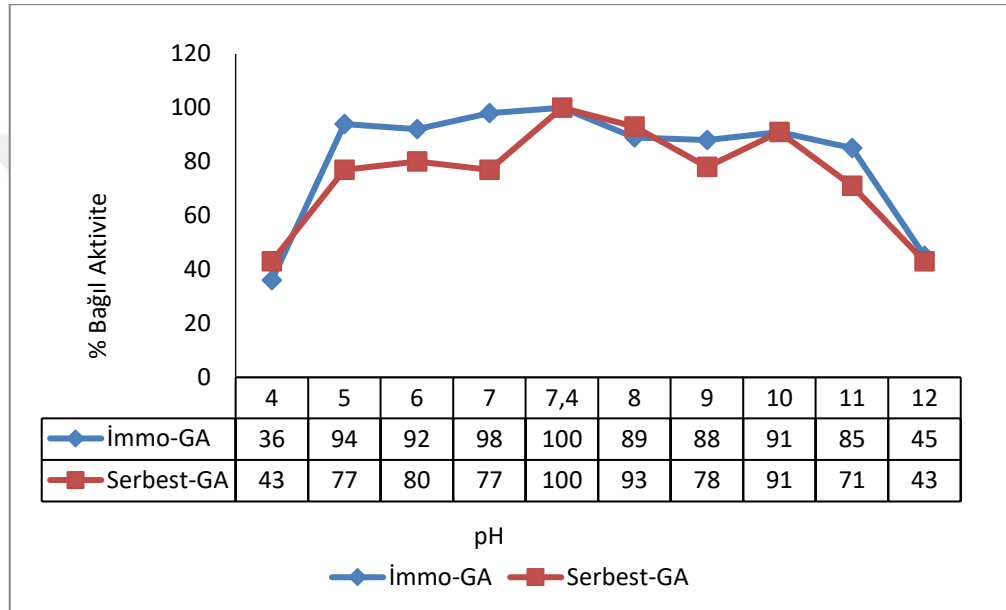


Şekil 59. Çapraz-bağ oluşturma aşamasında glutaraldehit ile inkübasyon sürelerinin immobilize enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi

3.9.2. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (Kombi-CLEA) Birlikte Karakterizasyonu

3.9.3. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum pH'sı

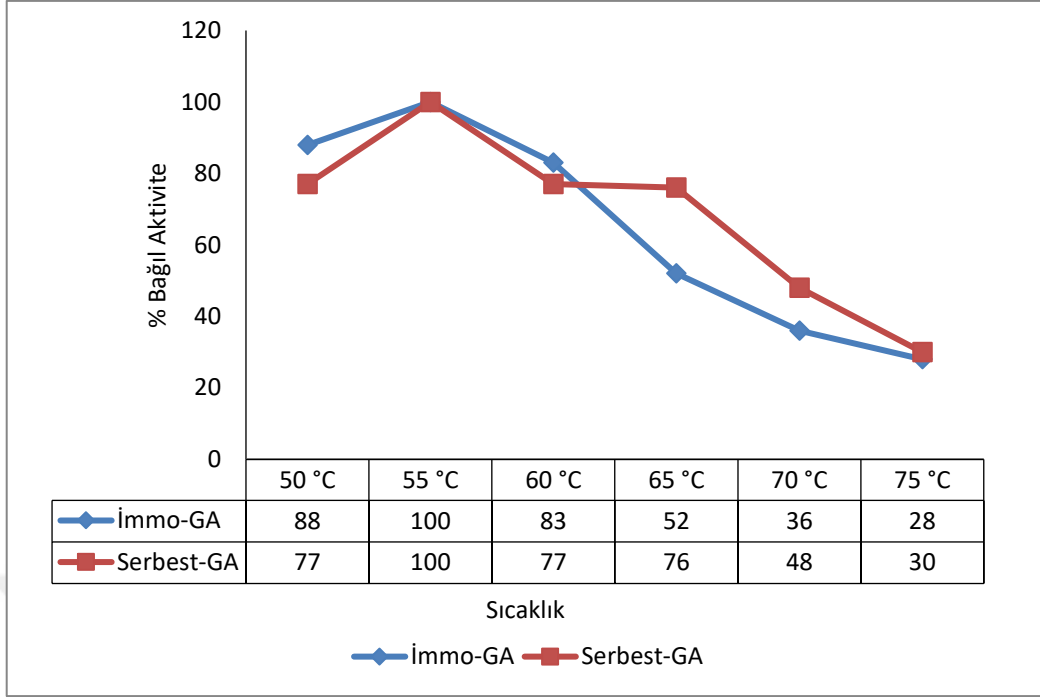
Enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldığında analizler sonucunda serbest α -amilaz ve α -glukosidaz karışımının ve α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA için optimum pH 7,4 olarak gözlemlendi



Şekil 60. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (immo-GA) ve serbest α -amilazın ve α -glukosidaz karışımının (serbest-GA) optimum pH

3.9.4. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Optimum Sıcaklığı

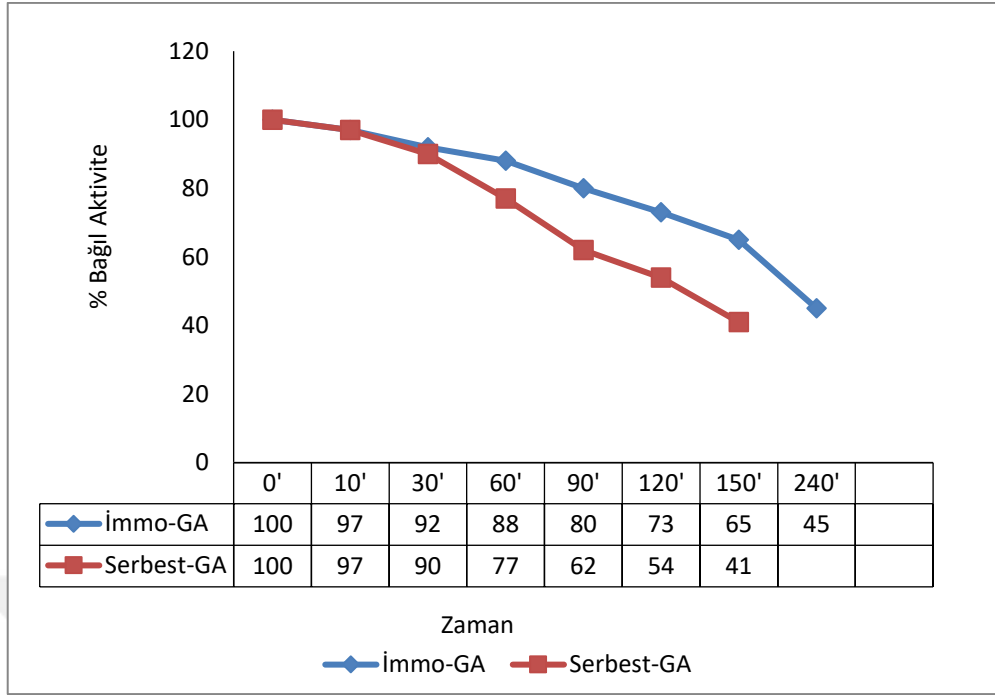
İmmobilize edilen enzim ve serbest enzimlerin karışımı ayrı ayrı 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C sıcaklıklarda inkübe edildi. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın ve serbest α -amilaz ve α -glukosidaz karışımının her ikisi için de optimum sıcaklık 55 °C olarak gözlemlendi.



Şekil 61. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (immo-GA)ve serbest α -amilazın ve α -glukosidaz karışımının (serbest-GA) optimum sıcaklığı

3.9.5. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Sıcaklık Kararlılığı

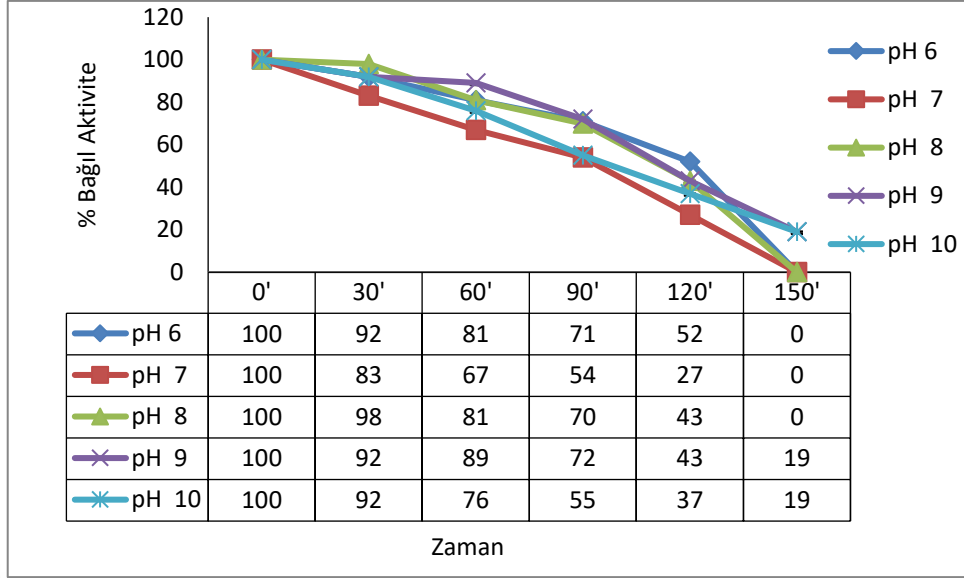
Enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. Analizler sonucunda serbest α -amilaz ve α -glukosidaz karışımının 120. dk'da %54, birlikte immobilize α -amilazın ve α -glukosidaz 150. dk'da %65 aktiviteye sahip olduğu bulundu.



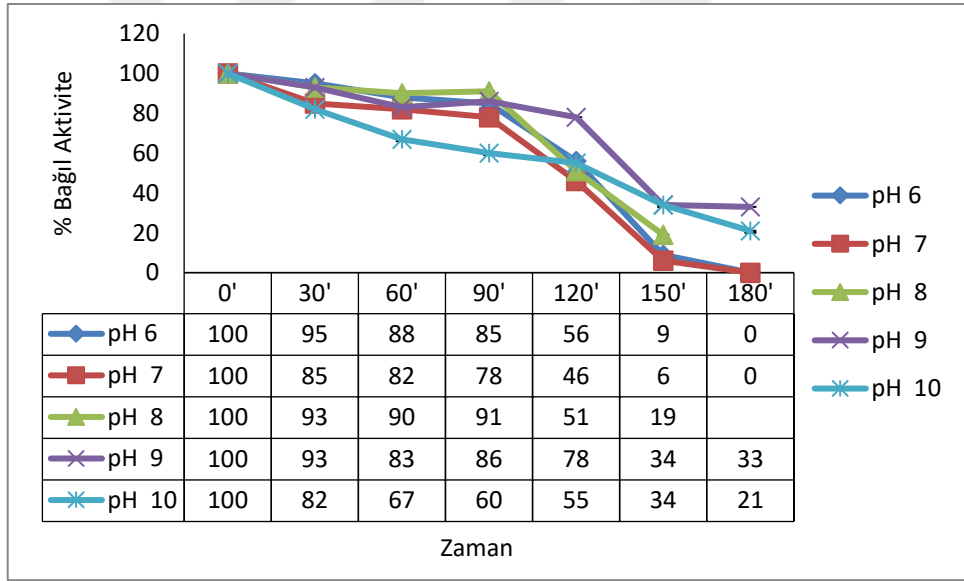
Şekil 62. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın (immo-GA) ve serbest α -amilazın ve α -glukosidaz karışımının (serbest-GA) kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi

3.9.6. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın pH Kararlılığı

İmmobilize enzim aktivitesi indirgeyici şeker tayini yöntemi olan 3,5-Dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde serbest α -amilaz ve α -glukosidaz karışımının pH (7,0-9,0) arasında, α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın ise pH (7,0-10,0) arasında aktivitelerinin % 50 civarında olduğu belirlendi.



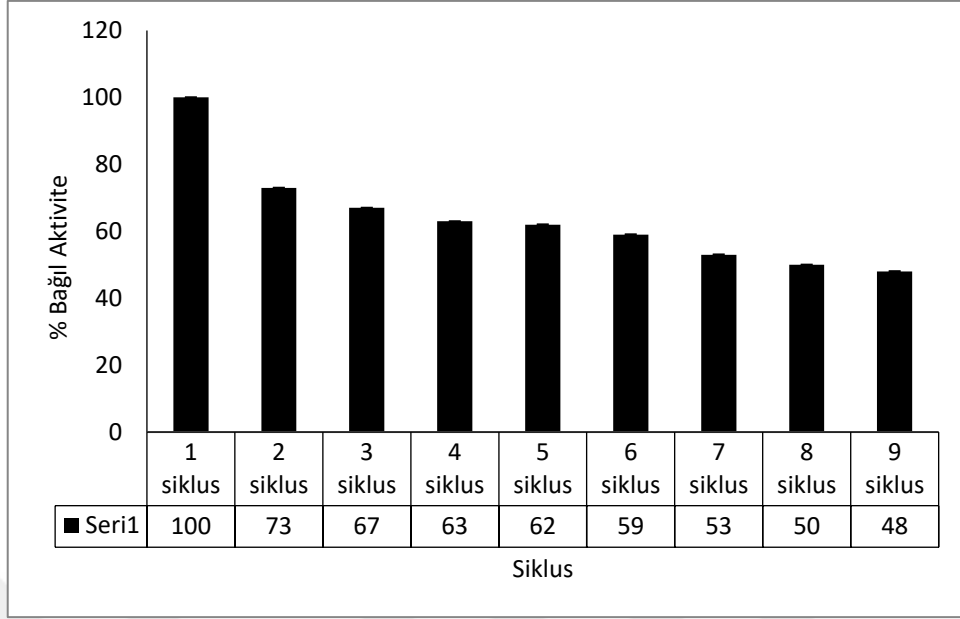
Şekil 63. Serbest α -Amilaz ve α -Glukosidaz karışımının pH kararlılığı



Şekil 64. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın pH kararlılığı

3.9.7. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

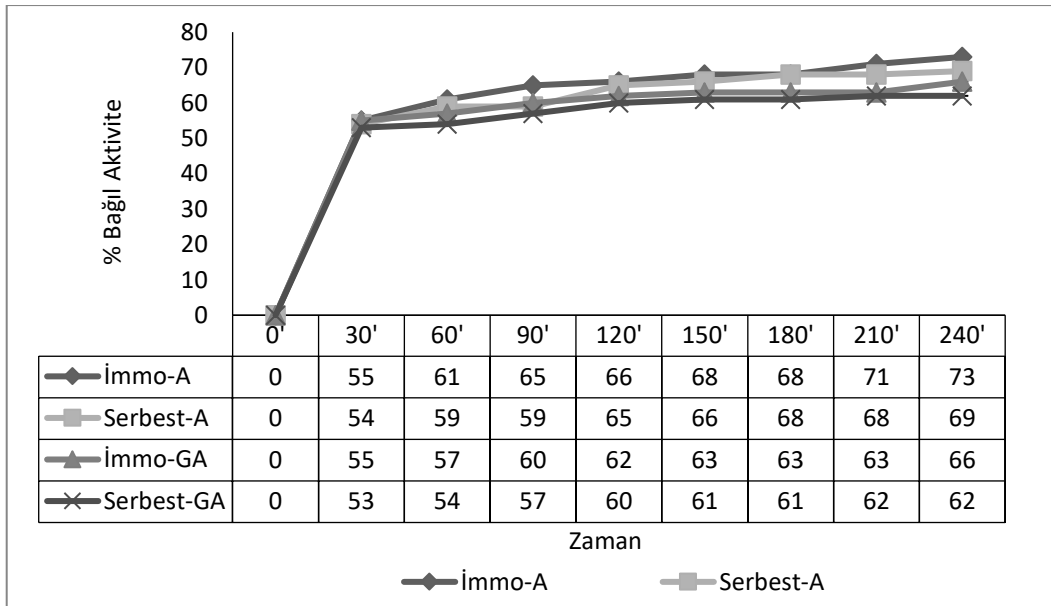
Birlikte immobilize α -amilazın ve α -glukosidaz gerçekleştirilen reaksiyonlar neticesinde 9 siklus sonucunda aktivitenin %50'ye indiği belirlenmiştir.



Şekil 65. α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın yeniden kullanılabilirliği

3.9.8. One Pot Hidroliz

İmmobilize α -amilaz, serbest α -amilaz, α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA'nın ve serbest α -amilaz- α -glukosidaz karışımı birbirine benzer oranlarda 60 dk içinde yaklaşık %50 oranında nişastayı hidroliz ettiği belirlenmiştir (Şekil 66).



Şekil 66. α -Amilaz-CLEA (immo- A), Serbest-Amilaz (Serbest-A), α -Amilaz- α -Glukosidaz-CLEA (immo-GA) ve Serbest α -amilaz ve α -glukosidaz karışımından (Serbest-GA) elde edilen nişasta hidroliz grafiği

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin farklı iki enziminin, α -amilaz ve α -glukozidazının, gen sıraları belirlenerek klonlanması, üstdüzey ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca bu enzimler CLEA metodu ile immobilize edilerek, enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine immobilizasyonun etkisi incelendi.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'den elde edilen α -amilazın molekül kütlesi yaklaşık 50 kDa olarak belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda *Anoxybacillus gonensis* Z4'den saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın molekül ağırlığı 50 kDa (Baltaş, 2012), *Anoxybacillus sp.* YIM342'den saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın molekül ağırlığı 68 kDa (Zhang ve ark. 2016), *Bacillus aquimaris*dan saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın molekül ağırlığı 64,4 kDa (Puspasari, 2013), *B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın molekül ağırlığı 83,17 kDa (Ölmez, 2017), *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1'den saflaştırılan α -amilazın molekül ağırlığı 43 kDa (Kikani ve Singh, 2012), *Bacillus subtilis* KIBGE HAS'tan saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın molekül ağırlığı 56 kDa (Bano, 2011), *Anoxybacillus sp.* SK3-4'den saflaştırılan α -amilazın molekül ağırlığı 50 kDa (Kahar, Sani, Chan, ve Goh, 2016), *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T dan elde edilen rekombinant α -amilazın molekül ağırlığı 50 kDa olup, bu sonuçlarla uyumludur. Bu sonuçlar, farklı *Anoxybacillus* türlerinden elde edilen α -amilazların molekül ağırlıklarının benzer aralıklarda olduğunu gösterdi. Bu benzerlik, α -amilazların yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin korunmuş olabileceğini düşündürür. Ayrıca, bu enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği açısından önemli ipuçları sunar. Özellikle, yüksek sıcaklıklarda ve çeşitli pH seviyelerinde stabilite gösteren α -amilazlar, gıda, tekstil ve biyoyakıt üretimi gibi alanlarda geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir.

İnceleme sonucunda *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T'den elde edilen α -amilazın optimum pH'sı 8,0 olarak belirlendi. Ayrıca enzimin asidik pH'larda çok daha düşük aktivite gösterdiği gözlemlendi. Yapılmış olan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre *Anoxybacillus sp.* SK3-4'den saflaştırılan α -amilazın optimum pH'sı pH 8,0 (Kahar 2016), *B. subtilis* 65'ten saflaştırılan α -amilazın optimum pH'sı 6,0-9,0 (Hayashida, 1988), *Anoxybacillus sp.* AH1'den saflaştırılan α -amilazın optimum pH'sı 6,5-8,0 (Acer ve ark. 2016), *Geobacillus sp.* IIPN'den saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın optimum pH'sı 5,5-8,5 (Dheeran,

2010), *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10'den saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın optimum pH'sı 5,5 (Ezeji ve Bahl, 2006), *Geobacillus stearothermophilus* SR74'den saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın optimum pH'sı 7,0 (Gandhi ve ark. 2015), *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1 saflaştırılan α -amilazın optimum pH'sı 7,0 (Kikani ve Singh, 2012) olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T'den elde edilen rekombinant α -amilazın optimum pH bakımından taradığım literatürle uyumlu olduğu belirlendi. Bu uyum, enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini artırmakta ve farklı üretim süreçlerinde etkinliğini sağlar. Özellikle, deterjan ve gıda endüstrisinde, bu tür enzimlerin pH toleransı önemli bir avantaj sunabilir.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'den elde edilen α -amilazın aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 20-80 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde incelendi. Elde edilen sonuçlara göre enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık 70 °C olarak belirlendi. Taradığım literatürde yapılan incelemeler sonucu saflaştırılan α -amilazın optimum sıcaklığının, *Anoxybacillus sp.* SK3-4 α -amilazında 70 °C, *Geobacillus stearothermophilus* SR74 α -amilazında 65 °C, *Anoxybacillus sp.* AH1 α -amilazında 60 °C, *Bacillus sp.* I-3 α -amilazında 70 °C, *B. licheniformis* SO7 α -amilazında 90 °C, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1 α -amilazında 80 °C (Kikani ve Singh, 2012), *Geobacillus sp.* IIPN α -amilazında 80 °C olduğu rapor edildi. (Acer ve ark. 2016; Kahar U, 2016; Ölmez, 2017; Gandhi ve ark. 2015; Goyal, 2005), Tüm bu verilere dayanarak *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T'den elde edilen rekombinant α -amilazın termofilik bir enzim olduğu ve taradığım literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Bu termofilik özellik, enzimin yüksek sıcaklıklarda stabil kalmasını sağlamak ve endüstriyel süreçlerde, özellikle nişasta bazlı ürünlerin işlenmesinde önemli avantajlar sunar. Yüksek sıcaklıklarda çalışabilme kapasitesi, enerji tasarrufu ve işlem sürelerinin kısaltılması gibi faydalar sağlanabilir.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'den elde edilen α -amilazın aktivitesinin substrat konsantrasyonuyla olan ilişkisini belirlemek amacıyla protein konsantrasyonu sabit tutularak değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite tayini yapıldı. Patates nişastası substrat olarak kullanıldığında elde edilen Lineweaver-Burk grafiğine göre oluşturuldu ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -amilazının $K_m=1,14$ mg/ml ve $V_{max}= 31$ U/mg bulundu. Çalışmamız taranan literatürdeki K_m ve V_{max} değerleriyle uyumludur (Tablo 2). Bu veriler, farklı mikroorganizmalardan elde edilen α -amilazların kinetik özelliklerinin çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T nin K_m ve V_{max} değerleri, diğer

mikroorganizmalardan elde edilen α -amilazlarla karşılaştırıldığında, enzim-substrat etkileşimlerinin ve enzim verimliliğinin mikroorganizma türüne bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Örneğin, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1'in yüksek $V_{\max}$ değeri, bu enzimin substrat dönüşüm hızının oldukça yüksek olduğunu işaret ederken, *Geobacillus* sp. IPTN'nin yüksek K_m değeri, substrata olan düşük afinitesini göstermektedir. Bu tür karşılaştırmalar, endüstriyel uygulamalar için en uygun enzim kaynağının seçilmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, bu farklılıklar, enzim mühendisliği ve biyoteknolojik uygulamalar için yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir

Tablo 4. Farklı mikroorganizmalara ait α -amilazın K_m ve $V_{\max}$ değerleri

Mikroorganizma	K_m	$V_{\max}$	Kaynaklar
<i>Anoxybacillus beppuensis</i> TSSC-1	0,5 mg /ml	3571,42 mol/ml/mg	(Kikani ve Singh, 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE HAS	2,68 mg/ml	1773 U/ml	(Bano, 2011)
<i>Anoxybacillus</i> sp. YIM 342	4,18 mg/ml	7,48 mmol/dk/mg	(Kikani ve Singh, 2012)
<i>B.licheniformis</i> SO7	3,24 mg/ml	204,08 EU/ml	(Ölmez, 2017)
<i>Anoxybacillus</i> sp. AH1	0,102 μ mol	0,929 μ mol/min	(Acer,Bekler,vd., 2016)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> HRO10	3,05 mg/ml	7,35 U /ml	(EzejiveBahl, 2006)
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	0,005 mM	3,5 mol/min	(Fincan, 2014)
<i>Anoxybacillus thermarum</i> A4	0,5 mg/ml	–	(Baltas, 2016)
<i>Geobacillus</i> sp. IPTN	36 mg/ml	222 μ mol/ mg/min	(Dheeran, 2010)
<i>B. subtilis</i>	3,845 mg/ml	585,1 U/ml	(Marco, 1996)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	6,1 mg/ml	221 mol/mg/min	(Mok, 2013)
<i>Bacillus thermoleovorans</i> NP54	0,8-1,1 mg/ml	250-500 mol/mg/min	(Malhotra, 2000) (Uma Maheswar Rao, 2007)
<i>Bacillus subtilis</i> KCC103	2,6 mg/ ml	909 U/ mg	(Nagarajan, 2006)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	3,92 mg/ml	17,664 nmol/min/mg	(Lu, 2014)

α -Amilazın ısı kararlılığını incelemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (100 mM, pH 8,0) içindeki saf enzim, 70 °C'de inkübe edildi ve belirli zamanlarda optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. 70 °C sıcaklıkta enzimin 120 dk boyunca kararlı olduğu belirlendi. *Anoxybacillus* sp. YIM 342 saflaştırılan ekstraselüler α -amilazın 70 °C de 1 saat aktivitesinin %4 koruduğunu, 80 °C 30 dk aktivitesinin %49'un altına düştüğünü, 90 °C 20 dk' da aktivitesinin keskin düşüş gösterdiği rapor edildi (Zhang ve ark. 2016). Taranan literatüre göre *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -amilazının oldukça yüksek ısı kararlılığına

sahip olduğu söylenebilir. Bu yüksek ısı kararlılık, enzimin endüstriyel uygulamalarda, özellikle yüksek sıcaklık gerektiren süreçlerde, daha uzun süre etkin kalmasını sağlar. Bu özellik, enerji verimliliği ve işlem sürelerinin optimizasyonu açısından önemli avantajlar sunar.

α -Amilazlar aktivitelerini sürdürebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duymalarından dolayı, metallerin, alkali metallerin, potansiyel inhibitörlerin ve iyonik ve non-iyonik deterjanların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -amilazı ile metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında 2 mM, 5 mM, 10 mM nihai konsantrasyonlarda, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. α -Amilaz'ın aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Na^{+} , K^{+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 2 mM, 5 mM, 10 mM şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Mg^{+2} , Ca^{+2} metal iyonları enzimin aktivitesini sırasıyla %20, %28 oranında artırdı. Bu aktivasyonun sebebi substrat bağlanma yarığının ikincil bağlanma bölgesine bağlanan Ca^{+2} iyonlarının etkisinden kaynaklanıyor olabilir. 1 mM konsantrasyonundaki K^{+} , Na^{+} metal iyonu enzimin aktivitesini sırasıyla %10, %11 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} α -amilazın aktivitesini %100 oranında inhibe etti. Metal iyonları, aktif bölgede veya substrat bağlanma bölgelerinde yer alan bazı önemli amino asit kalıntıları ile etkileşime girebilir, bu da aktivitede azalmaya yol açan bir konformasyonel değişikliğe neden olabilir. 10 mM konsantrasyonundaki EDTA α -amilazın aktivitesini %64 oranında inhibe etti. α -Amilaz bir metalloprotein olduğu için EDTA'nın inhibisyon etkisi vardır. EDTA ligandında polioksietilen köprülerindeki oksijen donör atomları bulunmadığından EDTA ortamda bulunan sodyum veya potasyum iyonları ile etkileşim yaparak kompleksleme meydana getirir ve inhibisyon etkisi ortaya koyar. 2 mM konsantrasyonundaki EGTA ve DTT sırasıyla %55 ve %79 oranında enzimin aktivitesini inhibe etti. Deterjanların arasında, non-iyonik deterjanlar, %1 konsantrasyonlarındaki Triton X-100 ve Tween-20 α -amilazın aktivitesini sırasıyla %18, %22 oranında inhibe ederken ve iyonik deterjan SDS, enzimin aktivitesinde %90 oranında inhibisyon gösterdi. Triton X-100 iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir. Non-iyonik deterjanlar, yüksüz hidrofilik baş gruplarına sahiptir. Tween-20 yağ asidi ester kısmı ve uzun bir polietilen oksit zinciri içeren polisorbate yüzey aktif maddesidir. Genellikle nazik yüzey aktif maddesidir, proteini çözünürleştirmede etkilidirler. Triton X-100 ve Tween-20 enzimin hidrojen bağı yapma yeteneğini azaltabileceği ve üç boyutlu yapı

üzerinde değişimlere neden olabileceğinden dolayı inhibisyon etkisi göstermiştir. SDS'in enzim inhibisyonu, etkili bir yüzey aktif maddedir. İyonik deterjanlar, hidrofobik bir zincir ve yüklü bir baş grubundan oluşur. Proteinler içindeki ve arasındaki kovalent olmayan bağları bozarak onları denatüre eder ve doğal konformasyonları ile işlevlerini kaybetmelerine neden olur. Proteinin yükünü maskeler. Böylece, SDS, izoelektrik noktalarına (pI) bakılmaksızın tüm proteinlere genel bir negatif yük ekler. Sert anyonik deterjan olmasından, iyonik bağlarını, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri bozabilme özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. SDS, enzimin hidrofobik bölgeleri ile reaksiyona girerek, enzimin 3 boyutlu yapısını modifiye ederek, enzim inaktivasyonuna neden olur. %5 konsantrasyonundaki DMSO %98 oranında enzimin aktivitesini korur ve %5 konsantrasyonundaki metanol, etanol, bütanol, propanol, enzimin aktivitesini sırasıyla, %94,7, %95,2, %89, %95,7 oranlarında inhibe etti. *Anoxybacillus sp.* AH1 α -Amilazının aktivitesinin Mg^{+2} ve Ca^{+2} varlığında önemli miktarda arttığı, Zn^{+2} ve Cu^{+2} 'nin ise önemli miktarda enzimin çalışmasını inhibe ettiğini, EDTA metal iyonu şelatörü olmasından dolayı aktiviteyi azalttığı görülmüştür (Acer ve ark. 2016). *Anoxybacillus sp.* IB- α -amilazın Mo^{+2} , K^{+} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} varlığında aktivitesinin arttığı Hg^{+2} , Pb^{+2} varlığında ise aktiviteyi koruyamadığı, Ni^{+2} , Zn^{+2} varlığında da önemli bir inhibe edici etki gözlenmiş, SDS ve şelatör EDTA varlığında ise kararlılığını korumuştur (Hauli, 2013). *Anoxybacillus sp.* KP1 1,5 mM Mn^{+2} enzim aktivitesi % 123 oranında artmış, 1,5 mM Hg^{+2} varlığında ise güçlü bir şekilde enzim inhibe olmuş, SDS %1 varlığında da % 89 enzim aktivitesinde inhibisyon gözlenmiştir (Matpan Bekler, 2014). *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 amilazının Ca^{+2} varlığında % 21 oranında aktivitesini arttırdığı, fakat enzim Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} %5, %29, %57 ve %64 oranında aktivitesinin azaldığı ve enzimin Hg^{+2} varlığında ise tamamen inhibe olduğu ilaveten DTT, PMSF, PCMB, SDS ve EDTA'nın enzim aktivitesinin % 3, % 4, %12, %27 ve %77 oranında azalmasına sebep olduğu gözlenmiştir (Matpan Bekler, 2021). *Bacillus cereus* α -amilazının aktivitesini $MnCl_2$ % 4 oranında arttırdığı fakat EDTA'nın ise inhibe ettiği gözlemlendi (Annamalai, 2011). Bu sonuçlara bakılarak çalışmamız taranan literatürle uyumlu olduğu söylenir.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'dan elde edilen α -amilazın pH kararlılığı incelendi ve pH 8,0-9,0 alkali ortamlarda kararlı olduğu gözlemlendi. *Anoxybacillus ayderensis* FMB1 α -amilazın pH 5,0-10,0 arasında kararlı olduğu gözlenmiştir (Matpan Bekler, 2021). *Anoxybacillus gonensis* Z4'dan saflaştırılan α -amilazın pH 5,5 – 9,5 arasında oldukça kararlı olduğu bulunmuştur (Baltaş, 2012). *Anoxybacillus sp.* YIM 342 saflaştırılan α -amilaz enzimi

pH 8,0-9,0'da % 80 kararlı olduğu görülmüştür (Acer ve ark. 2016). *Anoxybacillus sp.* SK3-4 α -amilazının pH 6,0-9,0'da kararlı olduğu görülmüştür (Kahar, 2016). *Geobacillus sp.* IIPTN α -amilaz enzimi pH 5,0-10,0 arasında kararlıdır (Dheeran, 2010). *Geobacillus stearothermophilus* SR74 α -amilaz enzimi pH 6,0-8,0 arasında kararlı olduğu belirlenmiştir (Gandhi ve ark.2015). *Bacillus licheniformis* CUMC305 α -amilaz enzimi pH 7,0-9,0 aralığında % 100, pH 10,0 %95 pH 6,0, pH 5,0, pH 4,0, pH 3,0'te sırasıyla % 84, 74, 68, ve 50 aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Krishnan, 1983). *Bacillus subtilis* DR8806 α -amilaz enzimi pH 4,0-9,0 aralığında oldukça yüksek kararlılık göstermiştir. (Emtenani ve ark. 2015) *Bacillus subtilis* KCC103 α -amilaz enzimi pH 5,0-7,0 aralığında oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir (Nagarajan, 2006).Taradığım literatürün çalışmamızla uyumlu olduğu söylenebilir. α -Amilazın asit ve alkali pH dayanıklı bir enzim olduğu için endüstride kullanışlı uygun bir enzim olduğunu söyleyebiliriz. Bu pH dayanıklılığı, özellikle deterjan, gıda ve biyoteknoloji sektörlerinde geniş bir uygulama yelpazesi sunar.

Tablo 5. Bazı mikroorganizmalarda α -amilazın biyokimyasal özellikleri

Mikroorganizma	Moleküler ağırlık	Optimum sıcaklık	Optimum pH	Kaynaklar
<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4	50 kDa	70 °C	pH5,5-10,5	(Baltaş, 2012)
<i>Anoxybacillus sp.</i> YIM 342	68 kDa	60 °C	pH9	(Zhang ve ark. 2016)
<i>Anoxybacillus beppuensis</i> TSSC-1	43 kDa	80 °C	pH7	(Kikani ve Singh, 2012)
<i>Anoxybacillus sp.</i> SK3-4	50 kDa	70 °C	pH8	(Kahar ve ark. 2016)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> HRO10	58 kDa	80 °C	pH5,5	(Ezeji ve Bahl, 2006)
<i>Anoxybacillus sp.</i> AH1	85 kDa	60 °C	pH6,5-9	(Acer ve ark. 2016)
<i>Geobacillus sp.</i> IIPTN		80 °C	pH5,5-8,5	(Dheeran, 2010)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> SR74	59 kDa	65 °C	pH7	(Gandhi ve ark. 2015)
<i>Bacillus megaterium</i> MD-1	-	40 °C	pH8	(Fincan, 2022)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	-	60-65 °C	pH8	(Hmidet, 2019)
<i>Bacillus subtilis</i>	52 kDa	70 °C	pH7	(Pavithra, 2014)
<i>Bacillus sp.</i> KR-8104	59 kDa	75-80 °C	pH3,5	(Sajedi, 2005)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BH072	68 kDa	60 °C	pH7	(Du, 2018)
<i>Bacillus subtilis</i> DR8806	76 kDa	70 °C	pH5	(Emtenani ve ark. 2015)
<i>Anoxybacillus sp.</i> KP1	-	60 °C	pH8	(Matpan Bekler, 2014)
<i>Anoxybacillus karvacharensis</i> K1	69 kDa	55 °C	pH6,5	(Ghevondyan, 2024)
<i>Bacillus simplex</i>	140 kDa	60 °C	pH8	(Muniasamy, 2024)

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'den elde edilen rekombinant α -glukosidazın molekül ağırlığı yaklaşık 50 kDa olarak bulundu. *Bacillus sp.* AHU 2001 α -glukosidazın molekül ağırlığı 91,3 kDa olduğu (Saburi, 2015), *Bacillus amyloliquefaciens* α -glukosidazın molekül ağırlığı 27 kDa olduğu (Urlaub, 1978), *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KPI071 α -glukosidazın molekül ağırlığı 62 kDa olduğu (Suzuki, 1992), *Bacillus sp.* SAM1606 α -glukosidazın molekül ağırlığı 68,88 kDa olduğu (Nakao, 1994), *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 α -glukosidazın molekül ağırlığı 45 kDa olduğu (Ezeji ve Bahl, 2006), *Geobacillus thermodenitrificans* α -glukosidazın molekül ağırlığı 43 kDa olduğu (Cihan ve ark. 2010), *Geobacillus sp.* strain HTA-462 α -glukosidazın molekül ağırlığı 68,9 kDa olduğu (Zhang, 2019), *Bacillus pseudofirmus* 703 α -glukosidazın molekül ağırlığı 64 kDa olduğu (Wang ve ark. 2017), *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 α -glukosidazın molekül ağırlığı 65,23 kDa olduğu (Takii, 1996), *Geobacillus toebii* E134 iki suşdan saflaştırılan edilen α -glukosidazın molekül ağırlığı 45 ve 65 kDa olduğu (Cihan, 2012) yapılan bir diğer çalışmalarda bulunmuştur. Çalışmamızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü. Bu uyum, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T den elde edilen α -glukosidazın karakterizasyonunun doğruluğunu ve güvenilirliğini desteklemektedir. Molekül ağırlığı, enzimin fonksiyonel özelliklerini ve potansiyel uygulama alanlarını belirlemede önemli bir faktördür.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T elde edilen rekombinant α -glukosidazın optimum pH'sının 8,0 olduğu belirlendi. Yapılmış olan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre *Geobacillus sp.* A333 α -glukosidazın optimum pH 6,8 olduğu (Cihan A., 2009), *Geobacillus* HTA-462 α -glukosidazın optimum pH'sının 9,0 olduğu (Zhang, 2019), *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006 α -glukosidazın optimum pH'sının 5,0-6,0 (Suzuki, 1976) olduğu, *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glukosidazın optimum pH 7,0 olduğu (Suzuki Y, 1992), *Bacillus pseudofirmus* 703 α -glukosidazın optimum pH'sını 7,0 olduğu (Wang ve ark. 2017), *Geobacillus thermodenitrificans* F84a α -glukosidazın optimum pH'sını 7,0 olduğu (Cihan ve ark. 2010), *Bacillus amyloliquefaciens* α -glukosidazın optimum pH'sını 6,8 olduğu (Urlaub, 1978) bulunmuştur. Bu sonuçlara bakılarak α -glukosidazın optimum pH bakımından taradığım literatürle uyumlu olduğu belirlendi. Bu uyum, enzimin farklı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini artırır. Özellikle, pH 8,0 gibi alkali koşullarda kararlılık göstermesi, deterjan ve biyoteknoloji sektörlerinde önemli avantajlar sunabilir.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazının aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 40-80 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde incelendi. Elde edilen sonuçlara göre enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık 60 °C olarak belirlendi. Taradığım literatürde göre *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glukosidazın optimum sıcaklığının 81 °C olduğu (Suzuki Y., 1992), *Bacillus pseudofirmus* 703 α -glukosidazın optimum sıcaklığının 40 °C (Wang ve ark. 2017), *G. thermodontitificans* F84a α -glukosidazın optimum sıcaklığının 60 °C olduğu (Cihan, Ozcan, Tekin, ve Cokmus, 2010), *Bacillus amyloliquefaciens* α -glukosidazın optimum sıcaklığının 38 °C olduğu (Urlaub, vd., 1978), *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 α -glukosidazın optimum sıcaklığının 55 °C olduğu (Ezeji ve Bahl, 2006), *Geobacillus* sp. A333 α -glukosidazın optimum sıcaklığının 60 °C olduğu (Cihan A. vd., 2009) belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak α -glukosidazın optimum sıcaklığı bakımından taradığım literatürle uyumlu olduğu belirlendi. Bu uyum, enzimin yüksek sıcaklıklarda etkinliğini koruyabilmesi nedeniyle, özellikle gıda işleme ve biyoyakıt üretimi gibi yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel süreçlerde kullanılabilirliğini artırır.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazının aktivitesinin substrat konsantrasyonuyla olan ilişkisini belirlemek amacıyla protein konsantrasyonu sabit tutularak değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. *p*NPG substratı için elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. *p*NPG substratı olarak kullanıldığında K_m : 0,5 mM ve V_{max} : 22 mmol/min 1205 U/mg değerleri hesaplandı. Bu sonuçlar, enzimin substratına karşı yüksek bir afinitesi olduğunu ve maksimum hızda etkili bir şekilde çalışabildiğini gösterdi. K_m ve V_{max} değerleri, enzimin kinetik özelliklerini anlamada ve potansiyel uygulama alanlarını belirlemede önemli rol oynamaktadır.

Tablo 6. Mikroorganizmaların α -glukosidazlarının K_m ve V_{max} değerleri

Mikroorganizma	K_m	V_{max}	Kaynaklar
<i>P. furiosus</i>	0,26 mM	287 U/mg	(Costantino, 1990)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	2,99 mM	66,62 mmol/min	(Wang, 2017)
<i>Geobacillus</i> sp. HTA-462	2,321 mM	306,3 U/mg	(Zhang, 2019)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> HRO10	17 mM	23 mol/min/mg	(Ezeji ve Bahl, 2006)
<i>Bacillus thermoamyloliquefaciens</i> KP1071	0,56 mM	-	(Suzuki, 1992)
<i>Aspergillus niger</i>	0,34 mM	-	(Kita, 1991)
<i>Bacillus thermoglucosidius</i> KP 1006	0,23 mM	183 μ mol/mg/min	(Suzuki, 1976)
<i>Geobacillus</i> sp. A333	1,38 mM	2,96 U/ml/min	(Cihan, 2009)
<i>Geobacillus</i> sp. A343	0,85 mM	27,47 U/ml/min	(Cihan, 2009)

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazının ısı kararlılığını incelemek amacıyla, potasyum fosfat (100 mM, pH 8,0) içindeki saf enzim, 60 °C 'de farklı sürelerde inkübe edildi ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Enzimin 60 °C 'de yarılanma ömrünün 20 dk olduğu belirlendi. 37 °C inkübe edilen enzimin 7 gün sonunda aktivitesinin %50 koruyabildiği belirlendi. +4 °C 'de inkübe edilen enzimin bir ay sonunda aktivitesinin %88'ini koruyabildiği belirlendi. *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 α -glukosidazı 60 °C 30 dk inkübasyon sonucunda %70 aktiviteye sahipken, 70 °C 20 dk inkübasyonda aktivitesinin %3,7 olduğu bulunmuştur (Ezeji ve Bahl, 2006). *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006 α -glukosidazı, 60 °C inkübe edildiğinde kararlı olan enzimin, 72 °C 'den daha yüksek sıcaklıklarda hızlı bir şekilde inaktive olduğu gözlenmiştir (Suzuki, 1976). *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glukosidazın yarılanma ömrünün 81 °C 'de 10 dk olduğu belirlenmiştir (Suzuki, Yonewaza, Hattori, ve Takii, 1992). *Geobacillus thermodenitrificans* F84a α -glukosidazın 35 °C 'de 15 saat pH 4,5 inkübe edildiğinde %58 pH 11,0 'de inkübe edildiğinde %83 aktivite göstermiştir (Cihan ve ark. 2010). *Bacillus amyloliquefacins* α -glukosidazın 50 °C 'de inkübe edildiğinde aktivitesi hızlıca azaldığı ve kalan aktivitenin %24 olduğu belirlenmiştir (Urlaub, 1978). *Bacillus pseudofirmus* α -glukosidazın 30-40 °C arasında 30 dk inkübe edildiğinde aktivitesini korurken 50 °C 30 dk inkübe edildiğinde aktivitesini hızlı bir şekilde kaybettiği gözlenmiştir (Wang ve ark. 2017). Çalışmamızın taradığım literatürle uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. Bu uyum, enzimin farklı sıcaklık koşullarında kararlılığını ve potansiyel endüstriyel uygulamalar için uygunluğunu gösterir.

Tablo 7. Bazı mikroorganizmalarda α -glukosidazın biyokimyasal özellikleri

Mikroorganizma	Moleküler ağırlık	Optimum sıcaklık	Optimum pH	Kaynaklar
<i>Pyrococcus furiosus</i>	125 kDa	105-115 °C	pH 5-6	(Costantino, 1990)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	64 kDa	40 °C	pH7	(Wang ve ark. 2017)
<i>Geobacillus sp.</i> HTA-462	—	65 °C	pH7	(Zhang, 2019)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> HRO10	45 kDa	55 °C	pH6,5-7,5	(Ezeji ve Bahl, 2006)
<i>Bacillus thermoamyloliquefaciens</i> KP1071	62 kDa	81 °C	pH7	(Suzuki, 1992)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84a	—	60 °C	pH7	(Cihan ve ark. 2010)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27 kDa	38 °C	pH6,8	(Urlaub ve ark. 1978)
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	64 kDa	60 °C	pH7	(Karaoglu, 2024)

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazın pH kararlılığını belirlemek için, potasyum fosfat tamponu (100 mM, pH 6,0-8,0) içinde 60 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Bunun sonucunda pH 6,0-8,0 arasında yarı ömrünün yaklaşık 20 dk olduğu belirlendi. Analizler sonucunda *Geobacillus* sp. A333 α -glukosidazın pH 4,5-10,0 (Cihan, 2009) arasında aktivitesini koruduğu bulunmuştur. *Geobacillus* HTA-462 α -glukosidazı pH 6,0-9,0 arasındaki pH'larda inkübe edildiğinde, aktivitesinin %75'den fazlasını koruduğu gözlenmiştir (Zhang, 2019). *Geobacillus toebii* E134 α -glukosidazının pH 4,5 – 11,0 arasındaki pH'larda 15 saat 35 °C'de inkübe edildiğinde %45–60 oranında aktivite göstermiştir (Cihan, 2012). *Bacillus amyloliquefacins* α -glukosidazı 11 °C'de 24 saat inkübe edildiğinde, pH 6,2-7,0 arasında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Urlaub, 1978). Bu sonuçlar, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -glukosidazın pH kararlılığı açısından taradığım literatürle uyumlu olduğunu ve geniş bir pH aralığında etkinliğini koruyabildiğini göstermektedir. Bu özellik, enzimin çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini artırır.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazın metal iyonlarının ve bunun yanında bazı kimyasalların aktivitesine etkileri araştırıldı. α -Glukosidazın aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Na^{+} , K^{+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarına 2 mM, 5 mM, 10 mM nihai konsantrasyonlar oluşacak miktarda ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Fe^{+2} Mg^{+2} , Ca^{+2} iyonları α -glukosidaz aktivitesini sırasıyla %21, %11,9, %14 oranında artırdığı gözlemlendi. Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} iyonlarının α -glukosidazın aktivitesini sırasıyla %90, %100, %88 oranında inhibe etti. 1 mM Na^{+} α -glukosidazın aktivitesini %5 oranında artırırken 5 mM konsantrasyonundaki Na^{+} enzimin aktivitesini %50 oranında inhibe etti. 1 mM konsantrasyonundaki K^{+} α -glukosidazın aktivitesini %28 oranında inhibe etti. Metallerin enzimler üzerine etkisi incelendiğinde üç temel fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir. Metaller enzimlerin katalitik merkezinde hizmet edebilir, bir bağlayıcı grup olarak enzim-substrat kompleksi oluşumunda görev alabilir ve bir başka enzimin, enzim sistemi üzerindeki etkisini antagonize ederek, fizyolojik etkisini sürdürmesi için gerekli olabilir. Bununla birlikte, enzimler, çözelti içerisinde su dışında protein ve substrata bağlanmak için metallere ihtiyaç duyabilir. Enzimlerin katalitik aktivitesi; metalin kütlesine, iyonik yüküne, iyonik yarıçapına (sulu çözeltilerdeki iyonik yarıçap farklı olabilir), yayılma oranına, elektriksel alanda hareketine, çözeltideki metalik iyonların hidratlarının konfigürasyonuna ve kararlılığına

bağlı olarak değişiklik göstermektedir. 1 mM konsantrasyonundaki EDTA α -glukosidazın aktivitesini %93,5 oranında korudu. α -Glukosidaz metalloenzim olmadığı, EDTA'nın inhibisyon etkisi olmaması veya farklı konsantrasyonlarda metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde anlamlı farklılık oluşturmamasından da anlaşılmaktadır. EDTA ligandında ise polioksietilen köprülerindeki oksijen donör atomları bulunmadığından EDTA ortamda bulunan sodyum veya potasyum iyonları ile etkileşim yapamayarak, kompleksleme meydana gelmeyebilir ve inhibisyon etkisi ortaya koymayabilir. 10 mM konsantrasyonundaki DTT α -glukosidazın aktivitesini %100 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. %2 konsantrasyonundaki Triton X-100 ve Tween-20 sırasıyla α -glukosidazın aktivitesini %57, %64 oranında inhibe etti. İyonik deterjan SDS α -glukosidazın aktivitesini %99 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Triton X-100 iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir. Non-iyonik deterjanlar, yüksüz hidrofilik baş gruplarına sahiptir. Tween-20 yağ asidi ester kısmı ve uzun bir polietilen oksit zinciri içeren polisorbitat yüzey aktif maddesidir. Genellikle nazik yüzey aktif maddesidir, proteini çözünürleştirmede etkilidirler. Triton X-100 ve Tween-20 enzimin hidrojen bağı yapma yeteneğini azaltabileceği ve üç boyutlu yapı üzerinde değişimlere neden olabileceğinden dolayı inhibisyon etkisi göstermiştir. SDS tarafından enzimin inhibisyonun sebebi, sert anyonik deterjan olmasından, iyonik bağlarını, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri bozabilme özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. SDS, enzimin hidrofobik bölgeleri ile reaksiyona girerek enzimin üç boyutlu yapısında modifikasyona neden olarak enzimin inaktivasyonuna neden olur. %5 konsantrasyonundaki DMSO enzimin aktivitesini %80 oranında korudu. %5 konsantrasyonlarındaki Metanol, Etanol, Butanol, Propanolde enzimin aktivitesini sırasıyla %95, %98,5, %68, %95 oranlarında inhibe etti. Yapılan diğer çalışmalarda *Geobacillus thermodenitrificans* F84a α -glukosidazın %0,5 SDS, 2 mM EDTA ile inkübe edildiği zaman % 91 oranında aktivite gözlenirken, Hg^{+2} varlığında güçlü bir şekilde inhibisyon görüldüğü ve 60 °C inkübasyondan sonra %10 etanol varlığında %16 oranında aktivite tesbit edildiği rapor edilmiştir. (Cihan, Ozcan, Tekin, ve Cokmus, 2010) *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 α -glukosidazın EDTA (2 mM, 5 mM, 10 mM) ile inkübe edildiği zaman sırasıyla %100, %91, %77 bağlı aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. (Ezeji ve Bahl, 2006) *Geobacillus* sp. A333 ve *Geobacillus* sp. A343 α -glukosidazın 2 mM EDTA varlığında inhibe etmediği ve Ca^{+2} , Mg^{+2} varlığında da inhibisyon gözlenmediği belirlenmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12016 α -glukosidazın 2 mM EDTA varlığında önemli miktarda aktiviteyi etkilemediği, Hg^{+2} varlığında güçlü bir şekilde inhibisyon

görüldüğü, Cu^{+2} varlığında aktivitesinin %36 oranında inhibisyon görüldüğü ve Ca^{+2} , Mg^{+2} varlığında inhibisyon gözlenmediği belirlenmiştir (Cihan, 2009). *Bacillus pseudofirmus* Ca^{+2} , Mg^{+2} varlığında da inhibisyon gözlenmediği, ilaveten aktiviteyi arttırdığı, Zn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} varlığında da %50, %85 ve %10 inhibe ettiği, EDTA varlığında kayda değer oranda aktiviteyi etkilemediği ve SDS varlığında ise tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir (Wang, 2017). Elde ettiğimiz sonuçlar taranan literatürle uyumludur.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'nin α -amilazının CLEA metodu kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. Buna göre % 96'lık Amonyum sülfatta +4 °C 30 dk presipitasyondan sonra 5 mM glutaraldehit ile oda ısısında 2 saat inkübasyon immobilizasyon için optimal şartlar olarak tespit edildi. İmmobilize edilen α -amilazın aktivitesi için optimum koşullardan sıcaklıkta bir değişim (70 °C) gözlenmezken, optimum pH 8,0 dan 9,0 yükselmiştir. Bu değişim, enzimin aktif bölgesindeki mikroçevre içindeki asidik veya basık amino asit dizi iyonizasyonundaki değişiklikten dolayıdır (Sangeetha, 2008). Buna ilaveten glutaraldehitte çapraz bağlanma sırasında bazik rezidüler arasında yeni etkileşimlerin olduğu düşünülmektedir. Isıl kararlılığı 70 °C'de 150 dk olarak gözlenmiştir. pH kararlılığı pH 8,0-10,0 arasında gözlenmiştir. α -Amilazın spesifik aktivitesi, K_m :0,9 mg/ml ve V_{max} :35 U/mg olarak bulundu. İmmobilize edilmeden önceki spesifik aktivitesi, K_m :1,14 mg/ml ve V_{max} : 31 U/mg olarak belirlenmişti. Spesifik aktivitedeki bu değişim enzimin aktif bölgesinin subsrata doğru uygun bir biçimde yönlenmesini immobilizasyonun kolaylaştırması sebebi ile olabilir. (Aytar, 2008) İmmobilize olan α -amilazın spesifik aktivitesi artmıştır. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği 9 döngü boyunca devam etmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında *Bacillus amyloliquefacins* α -amilaz enzimini immobilize etmek için kullanılan CLEA metodu %70 doyurulmuş amonyum sülfat ile saf olmayan α -amilaz enzimine eklenerek presipite edilmiş, final konsantrasyonu %2 (v/v) oranında glutaraldehit ilave edilerek karışım 20 °C'de 6 saat 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Böylece enzim %100 verimlilikle immobilize edilirken, pH 7,0 olan optimum pH, immobilize edildikten sonra pH 6,0, optimum sıcaklığı 45 °C iken immobilize edildikten sonra 60 °C'ye yükselmiş buna ilaveten 4 döngü boyunca yeniden kullanılabilirliği devam etmiştir (Talekar, Waingade, Gaikwad, Patil, ve Nagavekar, 2012). *Bacillus licheniformis* α -amilazını immobilize etmek için kullanılan CLEA metodunda tert-butanol presipitasyon ajanı olarak seçilmiştir ve optimal immobilizasyon şartları için 5 mM glutaraldehit kullanılmış 1:2 oranında BSA ile 12 saat inkübe edilerek, 2-3 °C'de çapraz-bağ oluşumu gerçekleşmiştir. CLEA metodu kullanılarak yapılan immobilize enzimde çok küçük por

büyüklüğü substratı azalmasına neden olan difüzyon oranı sınırlandırıcı faktör olmasından dolayı BSA kullanmıştır. İmmobilize edilen enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığı etkilenmezken, yarıömrü 115 dk (serbest enzim 43 dk) olarak rapor edilmiştir, bunlara ilaveten yeniden kullanılabilirliği 10 döngüye % 76 oranında aktivite ile devam etmekte olduğu rapor edilmiştir. İmmobilize edilen enzimin K_m :1,34 mg/ml iken 1,09 mg/ml olarak ve V_{max} : 5,35 mol/min iken 3,12 mol/min olarak değişmiştir (Torabizadeh ve ark. 2014). Bu çalışmalar, farklı mikroorganizmaların α -amilaz enzimlerinin immobilizasyonu için kullanılan yöntemlerin ve koşulların, enzimlerin aktivite, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik özelliklerini nasıl etkilediğini gösterir. *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T nin α -amilazı, CLEA metodu ile immobilize edildiğinde, enzim aktivitesinde ve kararlılığında belirgin iyileşmeler gözlenir. Bu tür iyileşmeler, endüstriyel uygulamalarda enzimlerin daha verimli ve ekonomik bir şekilde kullanılmasına olanak tanır. Ayrıca, immobilizasyon sonrası enzimlerin pH ve sıcaklık gibi optimum koşullarında meydana gelen değişiklikler, enzimlerin farklı proseslerde daha geniş bir yelpazede kullanılabilmesini sağlar. Bu tür araştırmalar, biyoteknoloji alanında enzim mühendisliği ve uygulamaları için önemli bilgiler sunar.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazın enziminin CLEA metodu kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. İmmobilizasyon için optimum şartlar belirlendi. Buna göre saflaştırılan enzim %96 amonyum sülfat çözeltisinde 4 °C’de 30 dk presipite edildikten sonra karışımın üzerine 5 mM glutaraldehit ilave edilip oda ısısında 2 saat inkübe edildiğinde %98 verimlilikle immobilize olmaktadır. Enzimin optimum sıcaklığı 60 °C iken immobilize edildikten sonraki optimum sıcaklığı 55 °C’ye düşmüştür. İmmobilizasyon prosedürünün, enzimatik konfigürasyonunu ısı değişiminden kaynaklanan bozulmadan veya hasardan koruyamadığı görülmektedir (Sangeetha, 2008). İmmobilize glukosidazın optimum pH’sı 8,0, ısı kararlılığı 55 °C 20 dk ve pH kararlılığı ise pH 7,0-10,0 olarak belirlendi. Spesifik aktivitesi K_m :0,66 mM ve V_{max} :811 U/mg olarak değişmiştir. Spesifik aktivitedeki bu değişim immobilizasyonun enzimin aktif bölgesinin substrata doğru uygun olmayan bir biçimde yönlenmesine neden olmuştur. Yeniden kullanılabilirlik 3 döngüde kalmıştır. Bu sonuçlar, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -glukosidaz enziminin immobilizasyonunun bazı avantajlar sağlarken, aynı zamanda bazı sınırlamalar da getirdiğini gösterir. İmmobilizasyon sonrası optimum sıcaklığın düşmesi, enzimin ısıya karşı daha hassas hale geldiğini işaret ederken, spesifik aktivitedeki değişim, enzimin substrata erişiminde zorluklar yaşadığını düşündürür. Yeniden kullanılabilirliğin sadece 3 döngü ile

sınırlı kalması, endüstriyel uygulamalar için daha fazla optimizasyon gerektirir. Bu tür çalışmalar, enzimlerin farklı koşullar altında nasıl davrandığını anlamak ve daha verimli immobilizasyon teknikleri geliştirmek için önemlidir. Gelecekteki araştırmalar, enzim stabilitesini artırmak ve yeniden kullanılabilirliği iyileştirmek için farklı çapraz bağlayıcılar veya destek materyallerinin kullanmasını ve keşfini gerektirebilir.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'nin rekombinant α -amilaz ve α -glukosidazının birlikte CLEA metodu kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. Immobilizasyon için optimum şartlar belirlendi. Buna göre %96 lık amonyum sülfatta +4 °C'de 30 dk presipitasyondan sonra 5 mM glutaraldehit ilave ederek 3 saat oda ısısında bekletmek immobilizasyonun optimum şartları olarak belirlendi. Immobilize edilen α -amilaz ve α -glukosidazın aktivitesi için optimum sıcaklık 55 °C, immobilize edilmeyen enzim karışımlarının optimum sıcaklığı 55 °C olarak belirlendi. Immobilize edilen ve edilmeyen enzim karışımlarının optimum pH'ları 7,4 olarak sabit kaldı. Isıl kararlılığı serbest enzim karışımı 120 dk %54 ve immobilize edilen α -amilaz ve α -glukosidazın 150 dk %65 aktiviteye sahip olarak gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada α -amilaz ve α -glukosidazın birlikte immobilize olmasıyla sinergistik bir etki ortaya çıkardığı ileri sürülmüştür (Ezeji ve Bahl, 2006). Bu sonuçlar, enzimlerin kombi-CLEA'lar olarak birlikte immobilizasyonunun, bu aktif konformasyonu parçalamak için serbest enzim karışımına göre çok daha fazla enerji gerektiren termal denatürasyona karşı daha belirgin bir koruma kazandıracağını gösterdi. pH kararlılığı pH 8,0-10,0 arasında gözlemlendi. Immobilize enzimlerin yeniden kullanılabilirliği 9 döngü boyunca devam etti. Yapılan çalışmalara bakıldığında "combi-CLEA'lar" ticari olarak mevcut olan üç enzim α -amilaz, glukoamilaz ve pullulanaz immobilize edildiği, üç enzimin amonyum sülfat presipitasyonunu takiben 40 mM glutaraldehit konsantrasyonunda 4,5 saatte immobilize edildiği, ortaklaşa immobilize edilen enzimlerin optimum sıcaklığının 65-75 °C, optimum pH'sının 6,0-7,0 belirlendiği rapor edildi. Birlikte immobilize olan enzimlerin yeniden kullanılabilirliği 5 döngü boyunca devam etmiştir (Talekar ve ark. 2013). Bu tür sinerjistik etkiler, enzimlerin daha verimli kullanılmasını sağlayarak biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir rol oynayabilir. Gelecekteki araştırmalar, farklı enzim kombinasyonlarının ve immobilizasyon koşullarının optimize edilmesiyle bu avantajların daha da artırılabilceğini gösterir. Bu, özellikle gıda, ilaç ve biyoyakıt üretimi gibi alanlarda önemli uygulamalara yol açabilir.

5. SONUÇLAR

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'den elde edilen α -amilazın molekül ağırlığı, SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık 50 kDa olarak bulundu.

İnceleme sonucunda *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T'den elde edilen α -amilazın ve optimum pH 8 ve optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlendi. α -Amilazın 70 °C'de 120 dk inkübe edildiğinde aktivitesinin %46'sını koruduğu belirlendi.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -amilazının K_m = ve V_{max} değerlerinin sırasıyla, 1,14 mg/ml ve V_{max} = 31 U/mg olduğu belirlendi.

Metal iyonları ve inhibe edici ajanların etkisi incelendiğinde, Mg^{+2} ve Ca^{+2} metal iyonları, *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T α -amilazın aktivitesinde %20, % 28 oranında artış meydana getirirken, 1 mM konsantrasyonundaki K^+ , Na^+ metal iyonu enzimin aktivitesini sırasıyla %10, %11 oranında aktiviteyi inhibe ettiği gözlemlendi. Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} seviyelerde enzimi tamamen inhibe ettiği gözlemlendi. Deterjanların arasında, non-iyonik deterjanlar olan Triton X-100 ve Tween-20 enzimin aktivitesi üzerinde %18, %22 ve iyonik deterjan olan SDS'in enzimin aktivitesi üzerinde %90 oranında inhibe edici etki gösterdiği gözlemlendi. 2 mM konsantrasyonundaki EDTA, EGTA ve DTT ile α -amilazın aktivitesi üzerine sırasıyla %64, %55 ve %79 oranında inhibe etkisi gözlemlendi. %5 konsantrasyonundaki DMSO %98 oranında enzimin aktivitesini korudu ve %5 konsantrasyonlarındaki metanol, etanol, bütanol, propanol, enzimin aktivitesini sırasıyla, %94,7, %95,2, %89, %95,7 oranlarında inhibe etti.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'nin α -amilazın pH kararlılığını incelendi ve pH 8,0-9,0 aralığında alkali ortamlarda kararlı olduğu belirlendi.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T'nin rekombinant α -glukosidazının SDS-PAGE analizi ile molekül ağırlığı yaklaşık 50 kDa olarak bulundu.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T elde edilen rekombinant α -glukosidazın optimum pH'sının 8,0 ve optimum sıcaklığının 60 °C olduğu belirlendi.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazın kinetik parametreleri incelendiğinde, K_m = ve V_{max} değerlerinin sırasıyla, K_m : 0,5 mM ve V_{max} : 22 mmol/min olduğu hesaplandı.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazının ısı kararlılığı incelendiğinde 60 °C'de 20 dk inkübe edilen enzimin aktivitesini yarıladığı belirlendi. Yine 60 °C

sıcaklıklarda inkübasyon sonucunda pH 6,0-8,0 aralığında 20 dk inkübe edilen enzimin aktivitesini yarılacağı belirlendi.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazının metal iyonlarının ve bunun yanında bazı kimyasalların aktivitesine etkileri araştırıldı. Fe^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} iyonları α -glukosidaz aktivitesini sırasıyla %21, %11,9, %14 oranında artırdığı gözlemlendi. Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} iyonlarının α -glukosidazın aktivitesini sırasıyla %90, %100, %88 oranında inhibe etti. 1 mM Na^{+} α -glukosidazın aktivitesini %5 oranında artırırken 5 mM aktiviteyi %50 oranında inhibe etti. 1 mM konsantrasyonundaki K^{+} α -glukosidazın aktivitesini %28 oranında inhibe etti. 1 mM konsantrasyonundaki EDTA α -glukosidazın aktivitesini %93,5 oranında korudu. 10 mM konsantrasyonundaki DTT α -glukosidazın aktivitesini %100 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. %2 konsantrasyondaki Triton X-100 ve Tween-20 sırasıyla α -glukosidazın aktivitesini %57, %64 oranında inhibe etti. İyonik deterjan SDS α -glukosidazın aktivitesini %99 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. %5 konsantrasyonundaki DMSO enzimin aktivitesini %80 oranında korudu. %5 konsantrasyonlarındaki Metanol, Etanol, Butanol, Propanolde enzimin aktivitesini sırasıyla %95, %98,5, %68, %95 oranlarında inhibe etti.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -amilazının CLEA metodu kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. Buna göre % 96 lık amonyum sülfatta +4 °C'de 30 dk'da presipitasyondan sonra 5 mM glutaraldehit ile oda ısısında 2 saat inkübasyonun immobilizasyon için optimal şartları oluşturduğu tespit edildi. İmmobilize edilen α -amilazın aktivitesi için optimum koşullardan sıcaklıkta (70 °C) bir değişim gözlenmezken, optimum pH, 8,0'den 9,0'a yükseldi. Isıl kararlılığı 70 °C'de 150 dk olarak gözlemlendi. pH kararlılığı pH 8,0-10,0 arasında gözlemlendi. α -Amilazın spesifik aktivitesi, K_m :0,9 mg/ml ve V_{max} :35 U/mg olarak gözlemlendi. İmmobilize edilmeden önceki spesifik aktivitesi, K_m 1,14 mg/ml ve V_{max} :31 U/mg olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği 9 döngü boyunca devam etmiştir.

Anoxybacillus flavithermus 2641^T α -glukosidazının CLEA metodu kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirildi. İmmobilizasyon için optimum şartlar belirlendi. Buna göre saflaştırılan enzim %96 amonyum sülfat çözeltisinde 4 °C'de 30 dk presipite edilip karışımın üzerine 5 mM glutaraldehit ilave edilerek oda ısısında 2 saat inkübe edildiğinde %96 verimlilikle immobilize oldu. Enzimin optimum sıcaklığı 60 °C iken immobilize edildikten sonraki optimum sıcaklığı 55 °C'ye düştü. İmmobilize glukosidazın optimum pH'sı 8,0, ısı kararlılığı 55 °C'de 20 dk ve pH kararlılığı ise pH 7,0-10,0 olarak ölçüldü.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada termofilik bakteri *Anoxybacillus flavithermus* 2641^T suşundan rekombinant α -amilaz ve α -glukosidaz enzimi saflaştırıldı. α -amilaz ve α -glukosidaz enzimi ayrı olarak ve birlikte olarak CLEA metod kullanılarak immobilize edildi ve biyokimyasal özellikleri karakterize edildi.

Gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisinde kullanılan enzimlerin ısıl kararlılığının yüksek ve asidik veya bazik ortamlara karşı dirençli olması gereklidir. Bu sebeble zorlu kimyasal şartlarda kararlı enzim için mutasyon çalışmaları yapılabilir.

Deterjan endüstrisinde kullanımı için α -amilazımızın okside edici ajanlara karşı kararlılığını artırmak için mutasyon çalışmaları yapılabilir.

Enzimlerin termal kararlılığını ve K_m 'sını geliştirmeye yönelik mutasyon çalışmaları ile enzimlerin verimlilikleri arttırılabilir. Bu tür mutasyon çalışmaları, enzimlerin endüstriyel uygulamalarda daha geniş bir yelpazede kullanılmasına olanak tanır. Ayrıca, enzimlerin spesifik substratlara olan afinitesini artırarak, daha yüksek dönüşüm oranları elde edilebilir ve bu da süreçlerin maliyet etkinliğini artırabilir.

CLEA metod yerine farklı immobilizasyon yöntemleri adsorpsiyon metodu, kovalent bağlanma methodu, silika partiküllere immobilizasyon metodu uygulanarak değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Albert, H. a. (1998). Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *Journal of applied microbiology*, 865-874.
- Andrades, A. a. (2017). Amylase zymography. *Zymography: Methods and Protocols*, 301--308.
- Annamalai, N. a. (2011). Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant alpha-amylase from *Bacillus cereus*. *Indian journal of microbiology*, 424-429.
- Aytar, B. S. (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 125-131.
- Aytar, B. S. (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 125--131.
- Baltas, N. a. (2016). Purification and characterization of extracellular alpha-amylase from a thermophilic *Anoxybacillus thermarum* A4 strain. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, e16160346.
- Baltaş, N. (2012, Mayıs 7). *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan ekstracellüler alpha amilaz. KTÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Bano, S. a. (2011). Purification and characterization of novel alpha-amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech*, 255-261.
- BeMiller, J. N. (2009). *Starch: chemistry and technology*. Academic press.
- Bertoldo, C. a. (2001). Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods in enzymology* (s. 269--290). Elsevier.
- Brock, T. D. (1985). Life at high temperatures. *Science*, 132--138.
- Buisson, G. a. (1987). Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *The EMBO journal*, 3909-3916.
- Burrell, M. (2003). Starch: the need for improved quality or quantity—an overview. *Journal of experimental Botany*, 451-456.
- Calvo-Mndez, C. a.-C. (2004). Partial purification and biochemical characterization of a soluble aglucosidase II-like activity from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*, 123128Tremblay.

- Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1233-1239.
- Dalal, S. a. (2007). Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 128--132.
- De Macario, E. C. (2000). Stressors, stress and survival: overview. *Frontiers Biosci*, d780--786.
- Dheeran, P. a. (2010). Characterization of hyperthermostable alpha-amylase from *Geobacillus* sp. IPTN. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1857--1866.
- Du, R. a.-C. (2018). Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent alpha-amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *International journal of biological macromolecules*, 1151--1156.
- Engelhardt, H. a. (1998). Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer--cell wall interactions. *Journal of structural biology*, 276-302.
- Far, B. E. (2020). Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 350.
- Fincan, S. A. (2014). Purification and characterization of thermostable alpha-amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate polymers*, 144-150.
- Ghevondyan, D. a.-K. (2024). Detergent-resistant alpha-amylase derived from *Anoxybacillus karvacharensis* K1 and its production based on whey. *Scientific reports*, 12682.
- Goh, K. M., Kahar, U. M., Chai, Y. Y., Chong, C. S., Chai, K. P., Ranjani, V., . . . Chan, K.-G. (2013). Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 1475-1488.
- Gopinath, S. C. (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. s. 1272193.
- Gupta, R. a. (2003). Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 1599--1616.
- Gurung, N. a. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 329121.
- Haki, G. a. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 17-34.
- Hauli, I. a. (2013). Isolation and identification of a novel thermo-alkaline, thermostable, SDS and chelator resistant amylase producing *Anoxybacillus* sp. *IB-A from hot spring of Bakreswar, West Bengal (India): First report. Pelagia Research Library*, 202-2012.

- Hayashida, S. a. (1988). Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting alpha-amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Applied and environmental microbiology*, 1516--1522.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical journal*, 309-316.
- Hmidet, N. a. (2019). Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by *Bacillus methylotrophicus* DCS1: application as detergent additive. *Biodegradation*, 247--258.
- Hussain, I. a. (2013). A Review of the Microbiological Aspect of alpha-amylase Production. *International Journal of Agriculture \& Biology*, 5.
- Iftikhar Hussain, I. H. (2013). A review of the microbiological aspect of alpha-amylase production.
- Jung, D.-H. a.-H.-H.-J.-K.-S. (2013). One-pot bioconversion of sucrose to trehalose using enzymatic sequential reactions in combined cross-linked enzyme aggregates. *Bioresource technology*, 801--804.
- Kadziola, A. a.-i. (1994). Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. *Journal of molecular biology*, 104-121.
- Kahar, U. M.-G. (2016). Immobilization of alpha-Amylase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 on ReliZyme and Immobead Supports. *Molecules*, 1196.
- Karaoglu, H. a. (2024). Modeling and evaluation of the sucrose-degrading activity of recombinantly produced oligo-1, 6-glucosidase from *A. gonensis*. *Preparative Biochemistry \& Biotechnology*, 273--281.
- Kita, A. a. (1991). Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and biological chemistry*, 2327-2335.
- Krishnan, T. a. (1983). Purification and characterization of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology*, 430-437.
- Kristjansson, J. K. (1989). Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trend Biotechnol*, 349-353.
- Levitzki, A. a. (1974). The allosteric activation of mammalian alpha-amylase by chloride. *European Journal of Biochemistry*, 171-180.
- Lu, Z. a. (2014). Identification and characterization of a novel alkaline alpha-amylase Amy703 belonging to a new clade from *Bacillus pseudofirmus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 783--793.
- Mafakher, L. a. (2023). Alpha-amylase immobilization; methods and challenges. *Pharmaceutical Sciences*, -.

- Malhotra, R. a. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 378-384.
- Marco, J. B.-F. (1996). Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* alpha-amylase produced by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 746-752.
- Matijovsyte, I. a. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 142--148.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 426--428.
- Mizuno, K. a. (1992). Starch branching enzymes from immature rice seeds. *The Journal of Biochemistry*, 643-651.
- Mok, S.-C. a.-H. (2013). Crystal structure of a compact alpha-amylase from *Geobacillus thermoleovorans*. *Enzyme and microbial technology*, 46--54.
- Moll, D. a. (2002). S-layer-streptavidin fusion proteins as template for nanopatterned molecular arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14646-14651.
- Mosi, R. a. (1997). Trapping and characterization of the reaction intermediate in cyclodextrin glycosyltransferase by use of activated substrates and a mutant enzyme. *Biochemistry*, 9927-9934.
- Muniasamy, R. a. (2024). Sustainable production and preparative purification of thermostable alkaline alpha-amylase by *Bacillus simplex* (ON754233) employing natural deep eutectic solvent-based extractive fermentation},. *Scientific Reports*, 481.
- Nagarajan, D. R. (2006). Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming alpha-amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 591-597.
- Nakao, M. a. (1994). Purification and characterization of a *Bacillus* sp. SAM1606 thermostable alpha-glucosidase with transglucosylation activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 337-343.
- Nashiru, O. a. (2001). Novel alpha-glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *BMB Reports*, 347-354.
- Noll, K. (2013). Thermophilic bacteria. *Elsevier*.
- Ölmez, S. (2017). *Nevşehir Kozalaklı kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin izolasyonu, İdentifikasyonu Bacillus licheniformis SO7' den Amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. ATAÜNİ., Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

- Pavithra, S. a. (2014). Starchy substrates for production and characterization of *Bacillus subtilis* amylase and its efficacy in detergent and breadmaking formulations. *Starch-Starke*, 976--984.
- Pavkov-Keller, T. a. (2011). The structure of bacterial S-layer proteins. *Progress in molecular biology and translational science*, 73-130.
- Payen, A. a. (1833). Memoir on diastase, the principal products of its reactions, and their applications to the industrial arts. *Annales de Chimie et de Physique*, 73--92.
- Puspasari, F. a. (2013). Raw starch--degrading alpha-amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Journal of applied microbiology*, 108-120.
- Saburi, W. a. (2015). Biochemical properties and substrate recognition mechanism of GH31 alpha-glucosidase from *Bacillus* sp. AHU 2001 with broad substrate specificity. *Biochimie*, 140-148.
- Sajedi, R. H.-M. (2005). A Ca-independent alpha-amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 666--671.
- Sangeetha, K. a. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 314-319.
- Sidhu, G. a. (1997). Strain improvement for the production of a thermostable alpha-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 525--530.
- Sivaramakrishnan, S. a. (2006). alpha-Amylases from Microbial Sources--An Overview on Recent Developments. *Food Technology & Biotechnology*, 2.
- Şahinkaya, M. (2023, 11 2). *Jiangella aurantiaca* enkapsülün sisteminin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu. KTÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Taboada-Puig, R. a. (2011). Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresource technology*, 6593--6599.
- Takii, Y. a. (1996). *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 alpha-glucosidase specific for alpha-1, 4 bonds of maltosaccharides and alpha-glucans shows high amino acid sequence similarities to seven alpha-D-glucosylhydrolases with different substrate specificity. *Applied microbiology and biotechnology*, 629-634.
- Talekar, S. a. (2012). Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase. *Journal of Biochemical Technology*, 349--353.
- Tramice, A. a. (2009). Enzymatic transglycosylation. *Encyclopedia of industrial biotechnology*, 1st edn. Wiley, Hoboken, 1-15.

- Velasco-Lozano, S. a.-G.-D.-T. (2016). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement--a review. *Biocatalysis*, 166--177.
- Volesky, B. a. (1984). Microbial enzymes: production, purification, and isolation. *Critical reviews in Biotechnology*, 119-146.
- Whitaker, R. J. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 976--978.
- Yamaguchi, H. a. (2018). Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions. *Catalysts*, 174.
- Zobel, H. (1988). *Molecules to granules: a comprehensive starch review*. Wiley Online Library.



8. EKLER

Ek 1

Anoxybacillus flavithermus 2641^T ait amilaz geninin DNA dizisi aşağıda verilmiştir.

TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGGATGAAACGTGTATTT
CGCGCGCTACTTATTTTTGTTTTGTTGTTGTCCGTGACGGCGCCAGTAAG
TGCGAAAACAGAGCGAACGTGGCAAGATGAACGCGTATATTTTTATTATGG
TCGACCGTTTTCAATAATGGGAATCCGAAAAATGATTATGAAGTGAACGTG
CATGATCCGAAAGCATATCACGGTGGCGATTGCAAGGCATTATTGACAA
GCTCGACTACATAAAAGGAATGGGCTTTACAGCCATTTGGCTCACGCCGA
TTTTTGGCAACGAAAAAGGCGGATATCACGGCTATTGGATTGAAGACTTT
TACAAAGTAGAAGAGCATTTTCGGAACGCTCGATGATTTCAAACGGCTTGT
GAAAGAAGCGCATAAGCGCGATATGAAAGTCATTTTAGATTTTGTGTCA
ACCATACAGGCTACAACCATCCGTGGCTAAATGATCCGGCGAAAAAAGAG
TGGTTTCATGAGAAAAAGACATTTTTTAATTGGGCGAATCAACAAGAAGT
CGAAAACGGTTGGTTGTTTGGTCTCCCTGATTTAGCGCAAGAAAATCCAG
AAGTGAAAGCGTATTTATTTGATGTGCGAAAATGGTGGATTCAACAAACG
GATATTGACGGATATCGGTTAGATACGGTCAAACATGTGCCGAAATGGTT
TTGGGACAAGTTTGCTACAGAAGTGAATTCAGTGAAACAAACCTTTTCCC
CCCGGAGACATATGGCACGACAATCCACGTATGGATAAGAAAACGCGGAC
GCACGAGATTGACACACTAAGCGATTTCCATTTTACAAAAAACC CGCAC
CTACTCTTCCAAACGTGATCAATCGCTTGAACCGCTTTTCCAACGTATGG
AAGCGAAACGAGGCTTTTTATGACCGTCCGTATCTGCTTGGCACGTTTTT
AGATAATCATGATACGGTTCGGTTTACACGATTAGCCTTGCAAAATCGCA
TCAATCCGGTGACGCGTTTAAACTAGGATTGACGTATTTGTTTTCCGCA
CCGGGTATTCCGATTATGTACTATGGAACGGAAATTGCCCTTGATGGCGG
AGAAGATCCAGACAACCGTCGTCTCATGAACTTCCGCACCGATAAAGAGC
TGGTTGATTATGTGACAAAGCTTGGTGAATTGCGCGAGAAGCTTCCATCG
CTTCGTCGCGGCGATTTTGAATTGCTTTATGAAAAAGACGGCATGGCACT
TTTTAAACGAACGTACGAGAAGGAAACGACGGTAATTGCGATTAAACAATA
CGTCAAAAACGCAAAAAGTGACGCTCGATGACGAATTAGAACAAGGAAAA
GAATTGCGTGGGTTGCTTGCGGGGGATTTAGTGCGCAGCAAAGACGGCAA
GTACGATATCATTTTAGATCGCGAAACGGCAGAAATTTATGTACTTGCGC
CAAAAACAGGATTAAACATTCCGTTTCATCGCGGCACTTGTTGCGGTATAT
ACGGCATTCGGTCTATTTTTTATACTTCGCGCGTAAACGAAAAGCATCACT
CGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA
AGAAGCGATGCATCGACA

Anoxybacillus flavithermus 2641^T ait amilazının amino asit dizisi aşağıda verilmiştir.

Ek 2

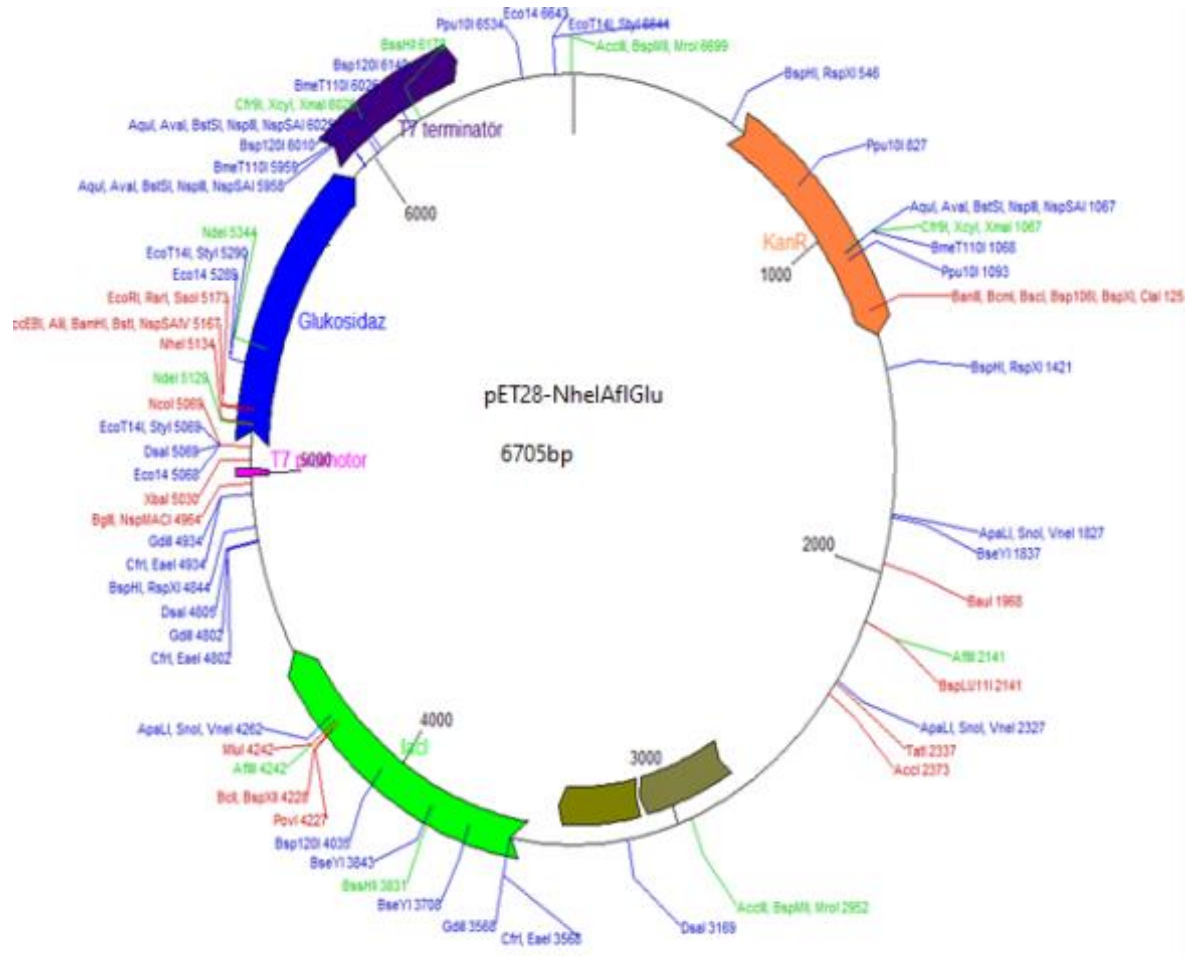
Anoxybacillus flavithermus 2641^T ait glukosidaz geninin DNA dizisi aşağıda verilmiştir.

ATGGACAAAGCCGGGGATATGGAAACGTTTGATCGGTTGCTTTCTGAGGT
GCATAAACGCGGAATGAAATTAATTATGGACCTTGTCGTGAACCATACAT
CCGATCAACATCCTTGGTTTCTTGAATCTCGTTTCGTCAAAAGACAATCCG
AAACGCGACTGGTACATATGGCGCGACAAACCGAATAACTGGCGCTCGTA
CTTTACTCCATCCGCATGGGAATATGATGAAAACACAGGACAATATTATT
TCCATTCTGTTTGCGGTAGAACAGCCGGATTTGAACTGGGAAAACGAAGAC
GTTTCGCGAAGAAATTTATAAAATGATGCGTTTTTGGTTAGATAAAGGAAT
TGATGGGTTCCGTTTAGACGCCATTGCCTTACCCGCAAAGCCTGACGGAT
TCCCAGATGCCGAAAATCCGTATGACATTCGTTATTTAACAAACAATCCA
GGCGTGCATGATTATTTAAAAGAAATGAATGAAAAAGTATTAAAACATTA
TGATATTTTCACAGTCGGGGAAGTCGCTTTCGTGTCGCCAGAAGAAGGAT
TAAAATATGTCGGGGAAGACCGAAACGAGCTACATACCCTCTTCACTTTG
AAGTTTGCAGACGAAATGCCGACATGGGACCCGATTCGTTTTAAACAGATT
CAAAACGTTGGTACAAAAGATTGTGGGGCAAAGGGTGGAACTCGCAGTTT
TTAACAATCCCAACCTACGCGAAAAGTGACCGCCTACGGAAACAAAAACA
ATTCGCGTCAATCACCAAATTGTCCCTCCCTCGGGCTACTTTCCCGGAAA
CCCAATTTTTTTAGGGGGAAAATGGTGGGAGGGGCCCAATTTCCCCCCCCG
GGAAACCCATTTTCGGAAAAAAAATGGGGGAAGGCCCAGGACCCCAAAAA
AGTGAAAATTTCTCTACCCCCGATTTTGCACCCGGTGGGGGAAAAAAA
CGGATTTTCCGGGGCCCTGTTTAGGAGAAAATAAAAAATAAAAAGTGGGG
CGCGCCGTTTTTTTTAAAACTTTACCAAAAAACCGGGGGGGGGGGTTTT
TTTTAAAAAATAACAAACCAAAAGAGGGGGGCGTTTTATAATAAAAAAAT
TGCGCAAGCAACATGCCGTTATGGTGTACGGAACGTTCCGCGATTTTTTCG
GAAAATGATCCGTACATTTACGCTTACACGCGCGAGCTCGATGGCGTTTCG
TTGGCTCATCGTCTTAAACCATTGCGACAACGACAACGTATATGAGTTGC
CAGAAGAGCTTGCTTCGGCTCACCGCCATCTTTTGCTCGGCAATTATACA
GATGTAAAAGAAGAAGGCACAACGCTTTATATGCGTCCGCACGAAGCAAG
AATGTATGCATTACAA

Anoxybacillus flavithermus 2641^T ait glukosidazının aminoasit dizisi aşağıda verilmiştir.

MDKAGDMETFDRLLESEVHKRGMKLIMDLVVNHTSDQHPWFLESRSSKDNP
KRDWYIWRDKPNNWRSYFTPSAWEYDENTGQYYFHSFAVEQPDNLWENED
VREEIYKMMRFWLDKGIDGFRDLAIALPAKPDGFPDAENPYDIRYLTNNP
GVHDYLLKEMNEKVLKHYDIFTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNELHTLFTL
KFATKCRHGTRFVLNRFKTLVQKIVGQVELAVFNNPNLREKEPPTETKT
IRVNHQIVPPSGYFPGNPIFHGENWEGPNFPFGKTHFGKMGEGPGPQK
SENFYLPFRCTRWGKKNGFSGALFRRNKKIKSGARRFFKNFTKKPGGGGF
FKKITNQKRGAFFYNKKIAQATCRYGVRNVPRFFGKSVHLRLHARARWRS
AHLKPLRQRQRIVARRACFGSPPSFARQLYRCKRRRRHNALYASARSKNV
CIT

Ek 2'nin devamı



ÖZGEÇMİŞ

2000-2004 yılları arasında, Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nden lisans eğitimini aldı. 2007-2009 yılları arasında, KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2018 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı.

Yayınlar

- Uçar, F., Karkucak, M., and **Alemdaroğlu, E.**, Capkin, E., Yücel, B., Sönmez, M., Tosun, M., Karaca, A. (2012). HLA-DRB1 allele distribution and its relation to rheumatoid arthritis in eastern Black Sea Turkish population. *Rheumatology international*. 32. 1003-1007. doi:[10.1007/s00296-010-1792-8](https://doi.org/10.1007/s00296-010-1792-8)
- Uçar, F., Çapkin, E., Karkucak, M., Yücel, B., Sönmez, M., Alver, A., Kaklıkaya, N., Tosun, M., **Alemdaroğlu, E.**, Solak, M. (2011). Associations of HLA-DRB1 alleles with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in northern east part of Turkey. doi:[10.1111/j.1756-185X.2011.01604.x](https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01604.x)
- Yucel, B., Sumer, C., and Gok, I., Karkucak, M., **Alemdaroglu, E.**, Ucar, F. (2020). Associations between cytokine gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population. *Northern Clinics of Istanbul*. 7. 6. doi: [10.14744/nci.2020.70845](https://doi.org/10.14744/nci.2020.70845)

Bildiriler

- Alemdaroğlu, E.**, Beldüz, A.O., Ay Şal F., Çolak, D.N. (2024). Immobilisation of α -Amylase from *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T by CLEA method. II. International Apiteraphy and Nature Congress. May 8-10, Trabzon/Turkey. *Poster*
- Alemdaroğlu, E.**, Beldüz, A.O., Ay Şal F., Güler, H.İ. (2024). Immobilisation of α -Amylase and α -Glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T by combi-CLEA method. V. International Enzyme and Bioprocess Days. August 27-29, İzmir/Turkey. *Poster*

Projeler

- TÜBİTAK KBAG 117Z932. Beldüz A.O. (Yürütücü), Güler H.İ., Kolaylı S., Yıldız O., Pektaş S. (RTEÜ), **Alemdaroğlu E.** (Bursiyer), Demircan O. (Bursiyer), Şahinkaya M. (Bursiyer), Özer A. (Doktora Sonrası Bursiyer), Ay Şal F. (Doktora Sonrası Bursiyer), Propolis Ekstraktlarından HIV-1-Revers Transkriptaz İnhibitörlerinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu. 01.06.2018-01.10.2021
- TÜBİTAK KBAG 118Z494, Doğal Ürünleri Modifiye Ederek Kanseri Önleyici Potansiyellerini Arttıracak Özgün β -Glukosidaz Tasarımı, Uluslararası, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 23.10.2020 - 15.10.2021, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.10.2019 - 15.10.2021