

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALFA-AMİLAZ  
VE  
ALFA AMİLAZ-DEKSTRAN KONJUGATLARININ  
SPEKTROFLUOROMETRİK YÖNTEMLE İNCELENMESİ

Kimyager Melda ALTIKATOĞLU

106340

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programından  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Huriye*

Tez Danışmanı : Doç. Dr.Huriye KUZU (KARŞILAYAN)

106340

*Y. Huriye*  
Prof. Dr. Mehmet Mustafaferov Akademi

Doç. Dr. N. Kemal Doğan

İSTANBUL, 2001

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANİTASYON MERKEZİ

# İÇİNDEKİLER

	sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖNSÖZ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİ.....	2
2.1 Floresans Spektroskopisi.....	2
2.1.1 Ayna Görüntüsü Kuralı.....	3
2.1.2 Stokes Kanunu.....	4
2.1.3 Floresans Ömrü ve Kuantum Alanı.....	4
2.2 Time-Resolved Floresans.....	6
2.3 Protein Moleküllerinin Floresans Özelliklerinden Yararlanarak İncelenmesi.....	6
2.4 Elektroforez.....	8
2.4.1 Doğal Koşullarda Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	10
2.4.2 Denatüre Edici Koşullar Altında Elektroforez.....	10
2.5 $\alpha$ -Amilaz Enzimi.....	11
2.5.1 Amilaz Familyasının Etkilediği Substratlar.....	11
2.5.2 $\alpha$ -Amilazın Etki Mekanizması.....	13
2.5.3 $\alpha$ -Amilazın Molekül Yapısı ile İlgili Özellikler.....	13
2.5 Enzim-Polielektrolit Kompleksleri.....	15
3 DENEYSEL ÇALIŞMA.....	17
3.1 $\alpha$ -Amilazın İzoelektrik Noktasının Tayini.....	17
3.2 $\alpha$ -Amilazın Aktivite Tayini.....	17
3.2.1 Kullanılan Çözeltiler.....	17
3.2.2 Deneyin Yapılışı.....	18
3.2.3 Hesaplamalar.....	20
3.3 $\alpha$ -Amilazın Doğal Elektroforezi.....	23
3.3.1 pH 8,8 Ortamında Tek Jel Kullanarak Yapılan Elektroforez.....	23
3.3.1.1 Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.3.1.2 Deneyin Yapılışı.....	24
3.3.2 pH 4 Ortamında Yapılan Elektroforez.....	24
3.3.3 pH 5,5 Ortamında Yapılan Elektroforez.....	25
3.3.4 $\alpha$ -Amilazın Denatüre Edici Şartlarda Elektroforezi.....	25
3.3.4.1 Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.3.4.2 Deneyin Yapılışı.....	26
3.4 $\alpha$ -Amilazın Floresans Spektroskopisiyle İncelenmesi.....	27
3.4.1 Farklı pH'lardaki Tampon Çözeltilerde Yapılan İnceleme.....	27
3.4.2 Tampon Ortamında Farklı Sıcaklıklarda Değişimin İncelenmesi.....	28
3.5 Enzim-Polimer konjugatlarının oluşturulması.....	28
3.5.1 Enzim-polimer Konjugatlarının Aktivite Tayini.....	30
3.5.2 Dializ işlemi.....	30

3.5.3	Elektroforez İşlemi.....	31
3.5.4	Enzim / Polimer Konjugatları için 'Steady State' Floresans Çalışması.....	31
5	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	33
6	KULLANILAN CİHAZLAR ve KİMYASALLAR.....	41
	KAYNAKLAR.....	112
	ÖZGEÇMİŞ.....	115



## **SİMGE LİSTESİ**

- $E_o$  : Elektronik enerji  
 $E_v$  : Vibrasyonel enerji  
 $E_r$  : Rotasyonel enerji  
ns : nanosaniye  
 $S_o$  : Temel hal  
 $S_1$  : Uyarılmış singlet hal  
s : Saniye  
 $\varphi$  : Kuantum verimi  
 $\alpha$  : Alfa





## ŞEKİL LİSTESİ

sayfa

Şekil 2.1	Jablonski Diyagramı.....	3
Şekil 2.2	Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü.....	3
Şekil 2.3	Uyarılmayı takiben zaman aralıkları ile alınan spektrumlar.....	6
Şekil 2.4	Aromatik aminoasidlerin absorpsiyon spektrumları.....	7
Şekil 2.5	Aromatik aminoasidlerin fluoresans emisyon spektrumları.....	7
Şekil 2.6	Amiloz.....	12
Şekil 2.7	Amilopektin.....	12
Şekil 2.8	Aspergillus oryzae $\alpha$ -Amilazının aminoasid dizilişi.....	14
Şekil 3.1	$\alpha$ -Amilazın izoelektrik noktasının tayini.....	43
Şekil 3.2	$\alpha$ -Amilazın farklı pH'larda Aktivite Tayini.....	44
Şekil 3.3	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin Değişimi.....	45
Şekil 3.4	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin sıcaklık ile max. noktalardaki dalgaboylarının değişimi.....	46
Şekil 3.5	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin sıcaklık ile fluoresans ömürlerinin Değişimi.....	47
Şekil 3.6	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	48
Şekil 3.7	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin pH ile max. noktadaki dalgaboylarının değişimi.....	49
Şekil 3.8	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin pH ile fluoresans ömürlerinin değişimi.....	50
Şekil 3.9	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (300nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	52
Şekil 3.10	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin(300nm uyarımda) pH ile max noktadaki dalgaboylarının değişimi.....	53
Şekil 3.11	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (290nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	54
Şekil 3.12	Değişen sıcaklık değerlerinde, $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (290nm uyarımda) pH ile max noktadaki dalgaboylarının değişimi.....	55
Şekil 3.13	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (300nm uyarımda) sıcaklık ile	

	fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	56
Şekil 3.14	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (300nm uyarında) sıcaklık ile max noktadaki dalgaboylarının değişimi.....	57
Şekil 3.15	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (290nm uyarında) sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	58
Şekil 3.16	Farklı pH'lardaki $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin (290nm uyarında) sıcaklık ile max noktadaki dalgaboylarının değişimi.....	59
Şekil 3.17	$\alpha$ -Amilazın pH 4 ortamındaki doğal elektroforezi.....	60
Şekil 3.18	$\alpha$ -Amilazın pH 5,5 ortamındaki doğal elektroforezi.....	60
Şekil 3.19	$\alpha$ -Amilazın pH 8.8 ortamındaki doğal elektroforezi .....	60
Şekil 3.20	$\alpha$ -Amilazın SDS jel elektroforezi.....	61
Şekil 3.21	$\alpha$ -Amilaz-dekstran konjugatlarının farklı pH'lardaki aktivite tayini.....	62
Şekil 3.22	Dializ edilmiş $\alpha$ -Amilaz-dekstran konjugatlarının farklı pH'lardaki aktivite Tayini.....	63
Şekil 3.23	$\alpha$ -Amilaz-dekstran konjugatlarının pH 8.8 ortamındaki doğal elektroforezi.....	61
Şekil 3.24	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(290nm uyarında) farklı pH'larda Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	66
Şekil 3.25	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(290nm uyarında) farklı pH'larda Sıcaklık ile dalga boyu değişimi.....	65
Şekil 3.26	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(300nm uyarında) farklı pH'larda Sıcaklık ile dalga boyu değişimi.....	66
Şekil 3.27	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(300nm uyarında) farklı pH'larda Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	67
Şekil 3.28	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(290nm uyarında) farklı Sıcaklıklarda pH ile dalga boyunun değişimi.....	68
Şekil 3.29	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(290nm uyarında) farklı Sıcaklıklarda pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	69
Şekil 3.30	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(300nm uyarında) farklı Sıcaklıklarda pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	70
Şekil 3.31	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(300nm uyarında) farklı Sıcaklıklarda pH ile dalga boyunun değişimi.....	71
Şekil 3.32	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(290nm uyarında) farklı pH'larda Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	72

Şekil 3.33	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	73
Şekil 3.34	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	74
Şekil 3.35	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	75
Şekil 3.36	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	76
Şekil 3.37	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile dalga boyunun değişimi.....	77
Şekil 3.38	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	78
Şekil 3.39	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile dalga boyunun değişimi.....	79
Şekil 3.40	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	80
Şekil 3.41	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	81
Şekil 3.42	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	82
Şekil 3.43	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı pH'larda Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	83
Şekil 3.44	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	84
Şekil 3.45	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(290nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile dalga boyunun değişimi.....	85
Şekil 3.46	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile dalga boyunun değişimi.....	86
Şekil 3.47	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(300nm uyarda) farklı Sıcaklıklarda pH ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	87
Şekil 3.48	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(290nm uyarda) Sıcaklık ile floresans şiddetlerinin değişimi.....	88
Şekil 3.49	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(290nm uyarda) Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	89

Şekil 3.50	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	90
Şekil 3.51	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	91
Şekil 3.52	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	92
Şekil 3.53	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	pH ile dalga boyunun değişimi.....	93
Şekil 3.54	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	94
Şekil 3.55	Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	pH ile dalga boyunun değişimi.....	95
Şekil 3.56	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	96
Şekil 3.57	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile dalga boyunu değişimi.....	97
Şekil 3.58	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	98
Şekil 3.59	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	99
Şekil 3.60	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	100
Şekil 3.61	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	pH ile dalga boyunun değişimi.....	101
Şekil 3.62	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	102
Şekil 3.63	Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	103
Şekil 3.64	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	104
Şekil 3.65	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....	105
Şekil 3.66	Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)	
	Sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi.....	106

<b>Şekil 3.67 Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)</b>	
<b>Sıcaklık ile dalga boyunun değişimi.....</b>	<b>107</b>
<b>Şekil 3.68 Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)</b>	
<b>pH ile floresans şiddetlerinin değişimi.....</b>	<b>108</b>
<b>Şekil 3.69 Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(290nm uyarmada)</b>	
<b>pH ile dalga boyunun değişimi.....</b>	<b>109</b>
<b>Şekil 3.70 Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)</b>	
<b>pH ile floresans şiddetlerinin değişimi.....</b>	<b>110</b>
<b>Şekil 3.71 Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugatın(300nm uyarmada)</b>	
<b>pH ile dalga boyunun değişimi.....</b>	<b>111</b>



## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yanında Y.T.Ü Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü'nde çalışma hayatına başladığım andan itibaren her türlü yardımı sağlayan ve önerileriyle bana yol gösteren tez yöneticim değerli hocam Doç. Dr. Huriye KUZU'ya ;

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinin Genetik Mühendisliği Bölümü İmmunoloji Laboratuvarında bize çalışma olanağı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle bizi yönlendiren değerli hocam Prof.Dr.Mehmet Mustafaev AKDESTE ve eşi Doç.Dr.Zeynep AKDESTE'ye;

Önerileriyle bize yol gösteren ve yardımcı olan TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Genetik Mühendisliği Bölümü saygıdeğer hocası Prof.Dr. Alexander P. Demchenko'ya;

Deneysel çalışmalarım sırasında her türlü yardımı esirgemeyen TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinin Genetik Mühendisliği Bölümü İmmunoloji laboratuvarı çalışanlarından Msc. Miroslava Demchenko 'ya, Teknisyen Gazi Turgut'a, Marmara Ünivertesı Biyokimya Anabilim dalı Başkanı Doç.Dr Ayşe OGAN'a,

Ayrıca eğitim ve öğretimimde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve gösterdikleri manevi destekten dolayı sevgili Aileme;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Niştayı  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağlarından kırarak glukoz birimlerine parçalayan  $\alpha$ -amilaz enzimi(1,4- $\alpha$ -glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) gıda, deterjan, kağıt ve tekstil gibi bir çok sanayii alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.  $\alpha$ -Amilazlar substratta iç kısımdaki bağlara daha yüksek ilgi gösteren endohidrolazlardır. Molekül ağırlıkları 50.000 dolayında olan  $\alpha$ -amilazlar 478 amino asid artığı içermektedirler ve 5 adet alt ünite bulundurmaktadırlar.

Bu çalışmada, ticari önemi olan ve en çok incelenen amilaz türlerinden *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazı (TAKA) kullanıldı. Farklı pH değerlerine aktivite tayinleri yapılarak optimum pH aralığı belirlendi. SDS-PAGE elektroforezi uygulanarak enzimin alt üniteleri ve saflık durumu hakkında bilgi edinildi. Ayrıca farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen doğal elektroforez işleminde enzimin davranışları gözlemlendi. Steady-state spektrofotometre ile  $\alpha$ -Amilaz çözeltilerinin pH ve sıcaklık değerleri değiştirilerek emisyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda gözlenen maksimum noktalarında fluoresans şiddetleri okundu ve dalga boyu kaymaları kaydedildi. 'Time-Master' spektrofotometre kullanılarak farklı pH ve sıcaklıklarda TRES ve bozunma(decay) grafikleri alındı. Elde edilen emisyon bozunma grafiklerinden fluoresans ömürleri hesaplandı. Böylece enzim molekülünün çözeltideki durumu ve daha karalı olduğu koşullar hakkında bilgi edinildi.

Daha stabil bir enzim elde etmek üzere,  $\alpha$ -amilaz-Dekstran mol oranları 10,20,30 alınan enzim-polimer konjugatları yapıldı. Yukarıda belirtilen yöntemler kullanılarak konjugatların özellikleri incelendi.

Bu durumda enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerinin daha asidik bölgede olduğu görüldü. Konjugatların "steady-state" spektrofotometre ile belirlenen fluoresans karakteristiklerinin, enzim için elde edilenden farklı olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amilaz,  $\alpha$ -Amilaz-Dekstran konjugatları, fluoresans.



## **ABSTRACT**

$\alpha$ -Amylase(1,4- $\alpha$ -D-glucan 4-glucanohydrolase; E.C. 3.2.1.1.) is the endo-enzyme responsible for the random hydrolysis of the internal  $\alpha$ -1,4 linkages of amylose and amylopectin in starch.  $\alpha$ -Amylases are composed of about 478 amino acids and found to be contained of five subunits. Their molecular weight are about 50.000.

$\alpha$ -Amylases are widely used in several food processes including bread making, brewing and the production of some syrups of high fructose content. This enzyme family have been also find widespread use in detergent, paper and textile industries.

In the present work, the fluorescence characteristics of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase were investigated using steady-state and time-master spectrofluorometers. The fluoresans spectra of the enzyme solutions in different pH and temperatures were recorded. The optimum activity pH range of the enzyme was determined. SDS and natural polyacrylamide electrophoresis techniques were applied for the determination of subunits and electrophoretic behavior of the enzyme.

$\alpha$ -Amylase-Dextran conjugates where obtained using 10,20,30 mol ratios of enzyme-dextran for the increase of enzyme stability. The characteristics of conjugates where investigated using the methods mentioned above. It was observed that the maximum activity of the enzyme was shifted to acidic medium. The fluorescence results of conjugates recorded with steady-state spectrofluorometer was different than taken for enzyme.

**Keybords:** *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Amylase-Dextran conjugates, fluorescence.



## 1.GİRİŞ

Payen ve Persoz'un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi, alkol çöktürmesi ile elde etmeleri enzimoloji alanındaki önemli adımlardan biri olmuştur. Bugün amilaz olarak bilinen bu enzim, nişasta endüstrisinde önemli bir yere sahiptir.

Çok geniş bir aileden oluşan amilazların doğada fazla miktarda bulunan çeşidi  $\alpha$ -amilazlardır.  $\alpha$ -amilazlar (1,4- $\alpha$ -glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), bir çok hayvan, bitki ve protist genera denen tek hücreli mikroorganizmalarda üretilirler.  $\alpha$ -amilazlar, nişastanın fraksiyonları olan amiloz ve amilopektindeki aynı zamanda hayvan ve insanlarda karaciğerde depo görevi yapan glikojendeki  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağlarını hidrolizleyerek,  $\alpha$ -konfigurasyonunda oligosakkaridler üreten endohidrolazlardır.  $\alpha$ -Amilazlar  $\alpha$ -(1,6) glikozid bağlarına saldırırlar.

$\alpha$ -Amilazın etki mekanizması ve fizikokimyasal özellikleri enzimin kaynağına da bağlıdır. Ticari öneme sahip olan amilaz, bakteriyel  $\alpha$ -amilazdır. Literatürde açıklandığı gibi  $\alpha$ -amilazların optimum pH değeri 4-6 arasındadır(Kazuhiko,1993;Ishikava,1990). pH aktivite profiline kesin pH optimumları enzim kaynağına göre değişmektedir.  $\alpha$ -Amilazlar, bir enzim molekülü başına en az bir atom kalsiyuma sahip olan kalsiyum-metaloenzimlerdir. Kalsiyum iyonu ve substrat varlığında daha geniş bir pH aralığında kararlıdır. Saflaştırılmış  $\alpha$ -amilazlar 50°C'nin üstünde aktivitelerini hızla kaybederler.

Bu çalışmada yapılan aktivite tayinleri, elektroforez uygulamaları ve spektrofotometre ile *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazının optimum pH ve sıcaklık aralıklarıyla molekül yapısı hakkında bilgi edinildi.

Daha stabil bir enzim elde etmek üzere, *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazın yükseltgenmiş haldeki dekstran ile konjugasyonu sağlandı. Elde edilen konjugatın, saf enzime kıyasla daha asidik pH' da da aktivite gösterdiği belirlendi. Konjugatın fluorometrik özelliklerinde değişme meydana geldiği gözlemlendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Fluoresans Spektroskopisi

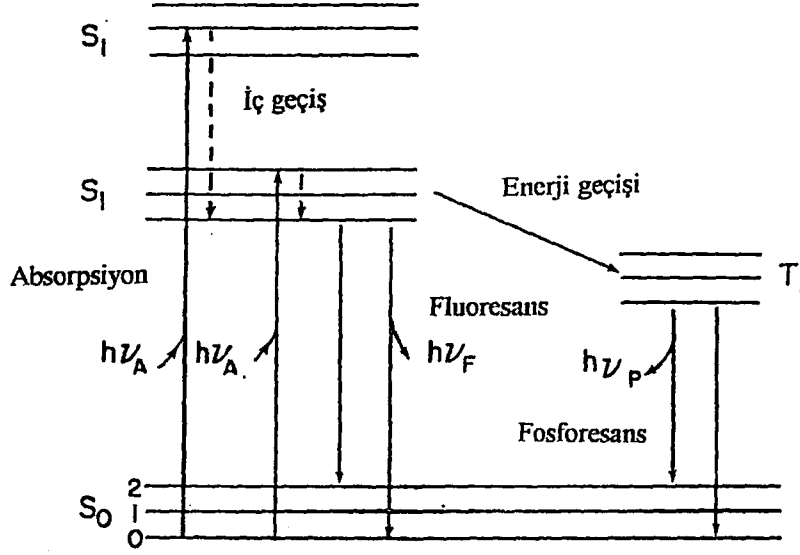
Bir molekülün enerjisi, elektronik( $E_o$ ), vibrasyonel( $E_v$ ) ve rotasyonel( $E_r$ ) enerjilerin toplamından oluşmaktadır. Her bir elektronik enerji seviyesi bir seri vibrasyonel seviye bulundurmaktadır. Vibrasyonel seviyeler de birbirine oldukça yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler içermektedir. Genel bir kural olarak, oda sıcaklığında moleküllerin çoğunun temel elektronik halin en düşük vibrasyonel seviyelerinde bulunduğu kabul edilmektedir. Moleküler orbitalde spinleri antiparalel olarak yerleşmiş elektron çiftinin durumu singlet hal olarak adlandırılır. Bu elektronların spinlerinin paralel olduğu durum ise triplet hal şeklinde ifade edilmektedir.

Işık enerjisi absorplandığında temel hal  $S_o$ ' dan yukarı doğru enerji geçişleri meydana gelmektedir. Absorpsiyon spektrumunda birbirine çok yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler arası geçişler algılanamaz. Bazı moleküllerde vibrasyonel seviyelerin yerleşimi çok karmaşık değildir. Bu moleküllerdeki vibrasyonel seviyeler absorpsiyon spektrumunda bir seri maksimum noktası şeklinde izlenebilir.

Herhangi uyarılmış (excite) halin üst vibrasyonel seviyelerinde bulunan bir elektron, fazla vibrasyonel enerjisini çevresindeki moleküller ile çarpışma sırasında verebilir. Bu işlem vibrasyonel relaksasyon olarak adlandırılmaktadır. Bir molekülün, yüksek elektronik seviyenin düşük vibrasyonel seviyesinden, düşük elektronik seviyenin üst vibrasyonel seviyelerine geçişi ise "iç geçiş" (vibrational relaxation) olarak adlandırılmaktadır(Şekil 2.1). Kural olarak molekülün en düşük uyarılmış hali  $S_1$ 'in, en düşük vibrasyonel seviyesine geçişi gerçekleşir.  $S_1$  uyarılmış halde kalma süresi (lifetime of  $S_1$  state)  $10^{-9}$  saniye dolayında iken daha üst seviyelerde  $10^{-12}$  saniye kadar olmaktadır.

Uyarılmış singlet hal  $S_1$ 'in en düşük vibrasyonel seviyesinden temel hal  $S_o$ 'ın herhangi vibrasyonel-rotasyonel seviyelerine geçişte verilen emisyon fluoresans olarak adlandırılmaktadır. Triplet halden temel hale geçişte oluşan emisyon ise fosforesans denilmektedir(Şekil 2.1). Fluoresans maddenin uyarılmış halde kalma süresi fluoresans ömrü (lifetime) şeklinde isimlendirilir. Emisyonun yüksek hızda gerçekleştiği fluoresansta ömür  $10^{-8}$ s-10ns kadardır. Fosforesansta emisyon fluoresansa göre daha uzun sürede

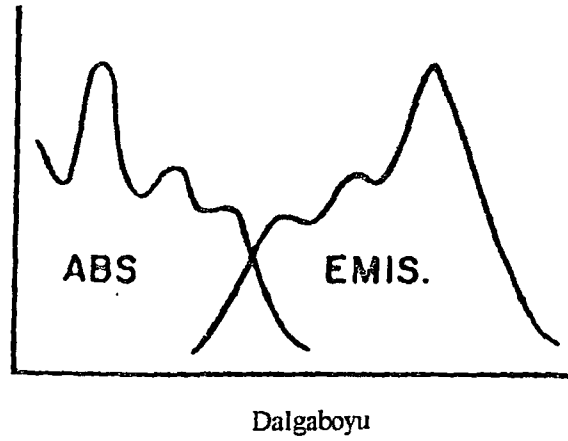
gerçekleşmekte ve ömür milisaniye düzeyinde olmaktadır(Demchenko,2000; Lakowich,1986).



Şekil 2.1. Jablonski Diyagramı

### 2.1.1 Ayna Görüntüsü Kuralı

Bir molekülün absorpsiyon spektrumu elektronik olarak uyarılmış halin vibrasyonel seviyelerini yansıtmaktadır. Genellikle elektronik uyarma vibrasyonel seviyelerin yerleşim durumunu değiştirmeden, emisyon spektrumu molekülün absorpsiyon spektrumunun ayna görüntüsüne çok yakındır(Şekil 2.2 ).



Şekil2.2 Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü.

### 2.1.2 Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, fluoresansın dalga boyu uyarın (excitation) ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Kural olarak buhar fazındaki atomlar hariç, absorpsiyona göre emisyonunda daima daha düşük dalga boylarına doğru bir kayma izlenir. Bu durum ilk defa 1852 yılında Stokes tarafından izlendiği için 'Stokes shift' adını almıştır. Solvent etkisi ve uyarılmış halde gerçekleşen reaksiyonlar nedeniyle Stokes shift daha kapsamlı boyutta gerçekleşebilir (Demchenko, 2000; Lakowicz, 1986).

Polar çözücülerdeki indollerin fluoresans spektrumları Stokes shift'in orijini konusunda önemli bilgiler vermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda, indol türevlerinin polaritesi farklı çözücülerde elde edilen fluoresans spektrumları, maksimum noktada meydana gelen Stokes shiftin çözücünün dielektrik sabiti ve kırılma indisi değerlerine bağlı olduğunu göstermektedir. (Gryczynski vd., 1975; Andrews vd., 1974; Sun ve Song, 1977; Kawski, 1974; Gladchenko ve Pikulik, 1967). Bu deneysel çalışmaların sonuçları, temel hale kıyasla eksite haldeki dipol momentte önemli ölçüde değişme meydana geldiğini göstermiştir. Stokes shifti'nin, indol molekülleri çevresinde yer alan çözücü moleküllerinin yerleşim düzeninin eksite halde hızla değişerek farklı bir durum almasından ileri geldiği sonucuna varılmıştır (Szabo ve Rayner, 1979).

### 2.1.3 Fluoresans Ömrü ve Kuantum Verimi

Kuantum verimi birim zamanda, 'steady-state' sistemde yayınlanan foton sayısının, absorplanan foton sayısına oranına denir. Hız sabitleri  $\Gamma$  ve  $k$  uyarılmış hali azaltır. Kuantum verimi,

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k) \quad (2.1)$$

formülü ile ifade edilmektedir.

Fuoresans emisyonundaki duruma bezer örnek oluşturan radyoaktif bozunmada deaktivasyonun radyasyon hızı, radyoaktif bozunma hızından daha küçük ise ( $k \ll \Gamma$ ) kuantum verimi 1'e yaklaşabilir. Hesaplamalarda kolaylık sağlaması açısından tüm olası bozunma prosesleri tek hız sabiti  $k$  ile ifade edilerek, tek bir grup olarak değerlendirilmektedir.

Fluoresans ömrü (lifetime) ise, molekülün uyarılmış halde kaldığı ortalama süredir. Genellikle bu süre 10ns dolayındadır. Ömür,

$$\tau = 1 / \Gamma + k \quad (2.2)$$

eşitliği ile verilmektedir.

Bazı moleküller  $t = \tau$  anında fotonlarını yayarlar. Bir tek eksponensiyel bozunmada  $t = \tau$  'den önce molekülün %63 'ü ve  $t > \tau$  anında da %37'si değişime uğramaktadır.

Fluoresans emisyonu gerçekleşirken, ışımaya dışında iç geçişler v.b. ile enerji kayıpları meydana gelmediğinde hesaplanan fluoresans ömrüne 'intrinsic' fluoresans ömrü denir ve

$$\tau_0 = 1 / \Gamma \quad (2.3)$$

formülü ile ifade edilir. Kuantum verimi ile fluoresans ömrü arasındaki bağlantı ise

$$Q = \tau / \tau_0 \quad (2.4)$$

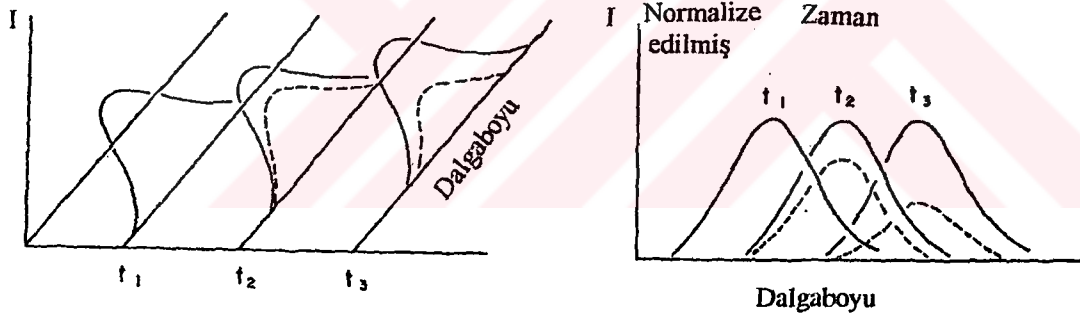
formülü ile verilmektedir (Lakowicz, 1986)

Kuantum verimi, oda sıcaklığındaki sıvı çözeltide son derece küçük değerdedir. Triplet halden singlet hale geçişler simetri nedeniyle engellenmiştir ve emisyon hızı yaklaşık  $10^3 \text{ dak}^{-1}$  veya daha küçük olmaktadır.  $k$  değeri yaklaşık  $10^9 \text{ dak}^{-1}$  olduğundan fosforesans kuantum verimi de oda sıcaklığında düşük değerdedir (Demchenko, 2000; Lakowich, 1986).

Triptofan ve triptofan türevlerinin fluoresans bozunmaları (decay) tek eksponensiyel kinetik tarzına uymaktadır. Triptofanın  $20^\circ\text{C}$ 'de fluoresans ömrü (lifetime) yaklaşık 3ns kadardır. Tek foton sayma fluoresans teknikleri (single photon counting fluorescence techniques) ile elde edilen sulu çözeltilerdeki triptofanın fluoresans bozunma grafiklerinden fluoresans ömrünün hesaplanmasında, iki eksponensiyel kinetikler kullanılmıştır. (Ranyer ve Szabo, 1978). Bu şekilde 335 nm'deki maksimum emisyon ile ilk lifetime 0,5 ns, 350 nm'deki maksimum ile diğer lifetime 3,1 dolayında bulunmuştur. Birden fazla triptofan içeren proteinlerde multi eksponensiyel kinetikler kullanılmaktadır ve bileşenlerin değeri dalga boyuna bağlıdır (Szabo ve Rayner, 1980).

## 2.2 "Time-resolved" Floresans

Floresans maddelerin emisyon dalga boyundan başka bozunma süresi ile de karakterize edilebileceği düşünülmüştür. Belirli dalga boyunda ışık enerjisi ile çok kısa zaman aralığında uyarılan floresans maddenin verdiği emisyonun zamana bağlı olarak değişmesi, yani bozunma profili elde edilmektedir. Floresans madde uyarıldığında meydana gelen reaksiyonlar (fenol ve naftolde proton kaybı), yük transfer kompleksi oluşması (antrasen ve aminler arasında), solvent dipolar relaksasyonu, çözücüye karşı duyarlılık, bir çok maddenin emisyonunun 'pulse' ile uyarılmayı takiben, zamana bağlı olarak daha büyük dalga boylarına kaymasına sebep olur(Şekil 2.3 ). Bu belirtilen sebeplerle zamana bağlı olarak gerçekleşen kayma, zaman-ayırımı floresans spektrumu 'TRES-Time Resolved Emission Spectra' ile izlenebilir. TRES spektrumu uyarılma 'pulse'ünü takiben çeşitli zamanlarda alınarak elde edilmektedir. TRES ölçümleri makromoleküllerin şekil ve durumu hakkında önemli bilgiler vermektedir(Lakowicz,1986).



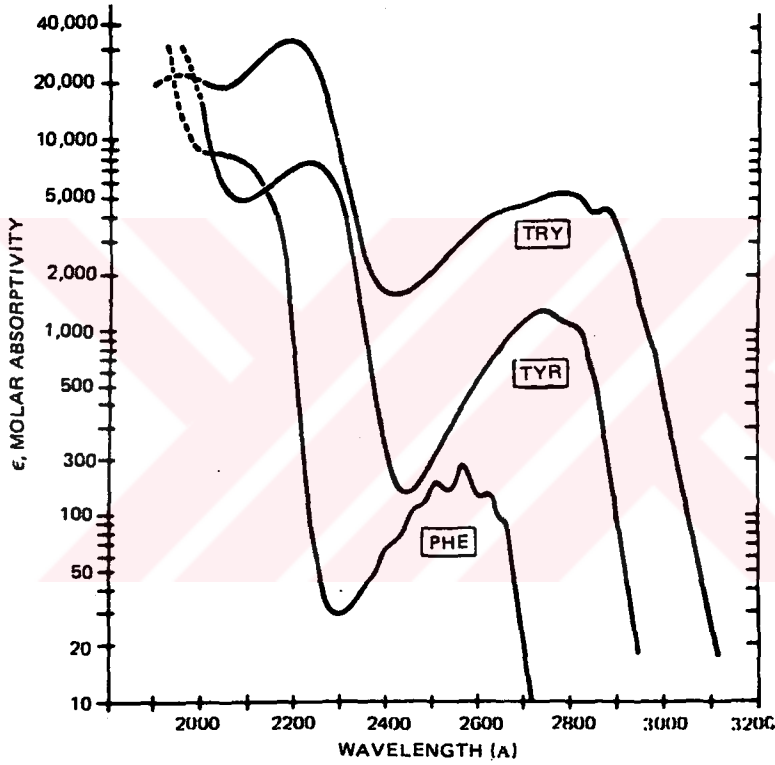
Şekil 2.3 Uyarılmayı takiben zaman aralıkları ile alınan spektrumlar

## 2.3 Protein Moleküllerinin Floresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi

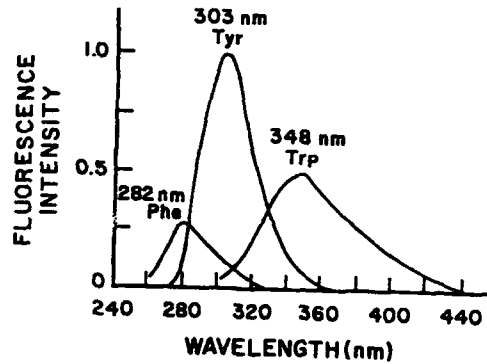
Proteinlerin yapısında floresans veren üç amino asit bulunmaktadır. Bunlar triptofan(trp) tirozin(tyr), ve fenil alanin(phe)'dir. Bu aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Ancak proteinlerde fenil alaninin kuantum verimi düşük değerde olduğundan, bu aminoasid artığından ileri gelen emisyon ihmal edilebilir olarak alınır. Floresans vermesi için proteinler genellikle 280nm dolayında dalga boyunda ışık ile uyarılmaktadırlar. Proteinlerin 280nm'de absorpsiyonu tirozin ve triptofan artıklarından ileri gelmektedir.

Proteinlerde yalnızca triptofanın verdiği fluoresansı elde etmek için 290nm'den büyük dalga boyunda uyarma yapılmalıdır (Şekil 2.4.,Şekil 2.5.).

Fluoresans spektroskopisi protein molekülünün çözeltideki durumu hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerin verdiği fluoresans çözeltinin pH değeri, çözücünün dielektrik sabiti, sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Alınan fluoresans spektrumları, protein moleküllerinin substrat ile etkileşimi, elektron alışverişi, assosiasyon reaksiyonları, denatürasyon v.b. izlenmesine de olanak tanımaktadır(Lakowicz,1986).



Şekil 2.4. Aromatik amino asitlerin absorpsiyon spektrumları



Şekil 2.5. Aromatik amino asitlerin fluoresans emisyon spektrumları



## 2.4 Elektroforez

Elektroforez, elektrik yüklü partiküllerin elektrik alanda zıt yüklü elektroda göç etmesini esas almaktadır. Pozitif yük taşıyan tanecikler katoda (negatif elektrod), negatif yük taşıyan tanecikler anoda (pozitif elektrod) doğru göç eder. Biyolojik moleküllerin ayrılmasında geniş ölçüde kullanılan bir yöntemdir. Bu göç etme bazı faktörlerden etkilenir;

- Yükün büyüklüğü: Net yük arttıkça moleküller daha hızlı hareket eder.
- Molekülün büyüklüğü: Büyük moleküller daha yavaş hareket etmeye eğilimindedir.
- Destek ortamının özellikleri: Küçük porlu destek ortamları moleküller elek gibi davranmaktadır. Destek ortamının viskozitesindeki artma, mobiliteyi ve bunun yanında adsorpsiyonu yavaşlatır.
- Elektrik alanın büyüklüğü: Voltajın artması göç hızını artırır.
- Endosmoz: Destek ortamına özgü olarak, ayrılan molekülün akışına ters yönde çözünen ve çözücü moleküllerinin hareketi ile sonuçlanır.
- Tamponun iyonik gücü: Tamponun iyonik gücü düşük olduğunda göç daha hızlı gerçekleşir.
- Sıcaklık: Sıcaklığın yükselmesi, göç hızını arttırmaktadır.

E elektrik alan şiddetinde, q yükünü taşıyan partiküle, F elektrikselsel kuvveti uygulanır.

$$F=q.E \quad (2.5)$$

Hareket sırasında bu partikül,

$$F_{\text{sürtünme}}=V.f \quad (2.6)$$

olan sürtünme kuvvetinin de etkisindedir.

$$V=\text{hız}$$

$$F=\text{sürtünme katsayısı}$$

Bu iki kuvvet birbirine zıt yöndedir. Sabit elektrik alanda bu iki kuvvet birbirini dengelediğinde ( $F_{\text{elek.}}=F_{\text{sür.}}$ ) partikül sabit hızla hareket eder.



$$q.E=V.f \quad (2.7)$$

$$V/E=\mu=q/f \quad (2.8)$$

$\mu$ =elektroforetik mobilite

Yüklü partiküllerin birbirinden ayrılması mobilitelerine bağlıdır. Yüklü moleküllerin elektrik alanda hareketi molekülün yük/kütle değeri ile ilgilidir.

İzoelektrik noktalarında (pI) protein moleküllerinin + ve - yükleri eşit olduğundan, bu moleküller belirtilen koşulda elektrik alanda hareketsiz kalırlar. İzoelektrik noktanın dışındaki pH'larda protein molekülleri + veya - elektrikle yüklenirler ve yüklerinin yoğunluğuna bağlı olarak göç ederler. Genelde örnekler, bir destek maddesi üzerinde göç ederler. Bu matriks kağıt, selüloz asetat, nişasta jeli, agaroz veya poliakrilamid jel olabilir. Proteinlerin ayrılması amacıyla bir çok elektroforez tekniği bulunmaktadır. Bunlar boyut, net yük ve hidrofobiklik gibi üç ana özelliğin birinin ya da üçünün kombinasyonunu esas almaktadır. Doğal koşullarda(native) elektroforez çözünen proteinlerin biyolojik özelliklerinin kaybolmadan analizlenmesinde kullanılır. Aktivitelerini koruyarak enzimlerin analizi doğal elektroforez ile yapılabilmektedir. Buna karşın daha sert ve denatüre edici koşullar daha az çözünen proteinlerin analizinde kullanılır. Önemli bir uygulama olan , sodyum dodesil sülfat varlığında gerçekleştirilen Poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler moleküler büyüklüğe göre ayrılır ve karakterize edilirler. Protein saflaştırılmada diğer önemli yöntem ise izoelektri noktalara göre ayırım yapan izoelektrik fokuslamadır.

Protein saflaştırmada Poliakrilamid jel Elektroforezi; protein saflığının kontrolü, fraksiyonlama, saf proteinin alt birim yapısının incelenmesi, molekül kütlesi tayini, izoelektrik nokta tayini, izoenzimlerin belirlenmesi gibi kullanım alanlarına sahiptir. Elektroforetik metodların dikkate değer dezavantajı ise, diğer saflaştırma yöntemlerine göre

daha zaman alıcı olmasıdır. Ancak son yıllarda son derece popüler olan minyatür elektroforez sistemlerinin kullanımı ile bu probleme çözüm getirilmiştir.

#### **2.4.1 Doğal Koşullarda Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)**

Makromoleküllerin ayrılmasında kullanılan yöntemler içinde en uygun olanı jel elektroforezidir. Bu elektroforezde destek maddesi jeldir. En çok kullanılan poliakrilamid jelleridir. Bu tarz ayırma proteinin yük ve boyut özelliklerine bağlıdır. Ufak moleküller daha hızlı, büyük moleküller daha yavaş hareket etmektedir. Uygun jel konsantrasyonu, proteinin boyutuna bağlı olarak seçilmelidir. Yukarıda da belirtildiği gibi, doğal elektroforez sonunda proteinlerin aktiviteleri test edilebilir. Ancak bu sistem çözünen proteinler ve elektroforez sırasında agregatlaşmayan proteinler için uygulanabilir. Bu yöntemin başlıca avantajı hızlı ve basit olmasıdır. Dezavantajı ise, düşük ayırma kapasiteli olması ve seyreltik örnek solüsyonlarının analizi için uygun olmamasıdır.

#### **2.4.2 Denatüre Edici Koşullar Altında Elektroforez (SDS-PAGE)**

SDS anyonik bir deterjandır. Proteinin net yükünü maskeler ve negatif yüklü SDS molekülleri protein molekülünü kaplar. Protein negatif yükü kaplanmış olur. Elektroforetik ayırma artık yüke göre değil sadece etkin moleküller kütleyle bağlıdır. SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler merkaptotanol, SDS-bromfenol blue ve sükröz veya gliserol içeren tamponla muamele edilirler. Merkaptotanol; proteinin tersiyer yapısını birarada tutan disülfid bağlarını indirger, SDS ise proteini denatüre ederek proteinin doğal yapısını bozar ve molekülü eksi yüklü bir kılıfla kaplar. Saf bir protein SDS jel elektroforezinde tek bant verir. Proteinin alt birimlerinin farklı kütlede olması durumunda ise birden fazla bant görmek mümkündür. Molekül kütlesi birbirine yakın olan proteinler bu yöntemle ayrılamazlar.

Bu yöntemin dezavantajı, elektroforezden sonra proteinlerin enzimatik yada biyolojik aktivitelerini yitirmeleridir. Avantajı ise proteinlerin molekül kütlelerinin tayinine olanak sağlamasıdır (Voet, 1990; Harris, ve Angel, 1989).

## 2.5 $\alpha$ -Amilaz Enzimi

$\alpha$ -Amilazın kapsamlı kullanım alanlarından biri, nişasta endüstrisidir. Nişastayı parçaladıklarından dolayı amilazlar, eczacılıkta siklo dekstrinlerin üretiminden glukoz şuruplarına kadar çeşitli üretim dallarında uygulama alanı bulmaktadırlar.

Nişasta enzimatik hidroliz ile glukoz şuruplarına dönüştürülebilir ve bu şuruplar gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılırlar. Hidroliz işlemi kimyasal olarak da yapılabilir fakat bu durumda maliyet yükselmektedir. Enzimatik hidroliz daha uygun ve etkili bir yöntem olduğundan kullanımı yaygındır. Parçalanma sırasında, "limit dekstrinler" ile birlikte fermente olan şekerler oluşmaktadır. Bazı bira türlerinin üretiminde, (light bira gibi) daha düşük karbohidrat ve daha yüksek alkol içeriğine sahip bir ürün elde etmek için, bu limit dekstrinlerin oranı düşürülmektedir.

$\alpha$ -Amilazlar bira ve maya endüstrilerden başka deterjan sanayiinde, meyva suyu üretiminde, kağıt ve kumaş endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Brzozowski and Davies, 1997).

Tekstilde çözgü iplikleri, tezgahta gergin durmaları ve aşınmalara karşı dayanıklı olmaları için nişasta gibi koruyucu bir madde ile kaplanmaktadır (Haşılama). Nişastalı haşılın sökülmesi için, nişastanın suda çözünen ürünlere parçalanmasında amilaz enzimi kullanılmaktadır (Başer, 1983).

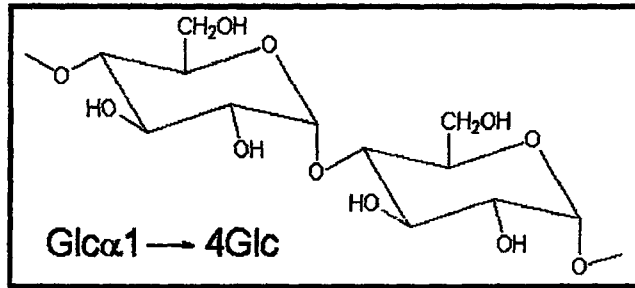
### 2.5.1 Amilaz Familyasının Etkilediği Substratlar

#### Nişasta

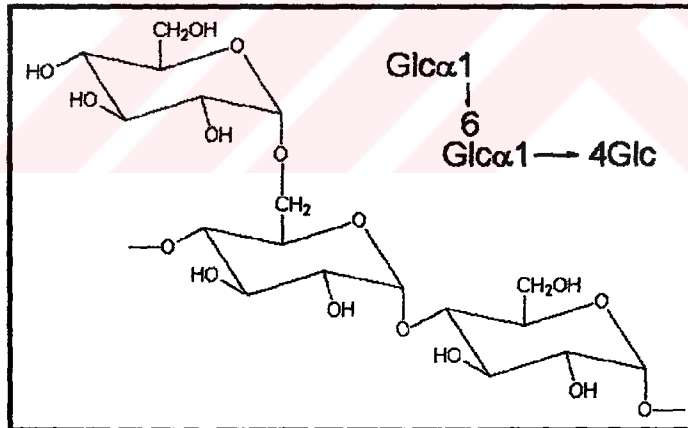
Nişasta daha çok patates gibi yumru bitkilerde ve mısır, fasulye, buğday, pirinç gibi tahıllarda bulunmakla birlikte, bütün bitki hücreleri nişasta yapma yeteneğine sahiptirler.

Nişasta iki farklı yapısal formda bulunmaktadır. Bunlardan biri amiloz diğeri ise amilopektindir.

Amiloz, nişastanın linear fraksiyonu olup  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağları ile bağlanmış durumda 1100 ile 4400 glukoz ünitesi içermektedir. Bu form tamamıyla dallanmamış uzun zincirden meydana gelmektedir. Nişastanın dallanmış fraksiyonu olan amilopektin ise;  $\alpha$ -(1,4) bağları yanında dallanma yerlerinde  $\alpha$ (1,6) bağları da bulundurmaktadır.(Beazell, 1941).



Şekil 2.6. Amiloz



Şekil 2.7. Amilopektin

## Glikojen

Hayvan hücrelerinde karbohidrat depo maddesi olan glikojen karaciğer dokusunda fazla miktarda olmakla birlikte, iskelet kaslarında da bulunmaktadır. Karaciğer hücrelerinde büyük glikojen granüllere rastlanmaktadır. Glukojen bir D-glukoz polimeridir. Glikojenin molekül yapısı amilopektine benzemekle birlikte daha sık dallanma görülmektedir.. Glukoz üniteleri

düz zincirlerde  $\alpha$ -(1,4) bağları ile, dallanma noktalarında ise  $\alpha$ -(1,6) bağları ile bağlanarak glikojen molekülünü meydana getirmektedirler(Buryan, 1991; Dordick, 1991).

### 2.5.2 $\alpha$ -Amilazın Etki Mekanizması

Alpha-Amilazlar (1,4- $\alpha$ -glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) nişastanın fraksiyonları olan amiloz ve amilopektin ile glikojen ve maltooligosakkaridlerdeki  $\alpha$ -(1,4) glikozid bağlarının hidrolizini katalizleyen bir endohidrolazdır. İç kısımdaki bağlara daha yüksek ilgi gösterirler ve uzun zincirlerde daha aktiftirler. Bu enzimin kopardığı bağların yeri sabit olmadığı için sonuçta ürünlerin bir karışımı meydana gelir (Minxie, 1994).

$\alpha$ -Amilaz mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanların karbonhidrat metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Memelilerde  $\alpha$ -amilaz tükürkte ve pankreas salgısında bulunurmaktadır. İnsandaki  $\alpha$ -amilaz, kromozom 1 üzerindeki bir multigen ailesi tarafından kodlanmakta ve tek bir polipeptit zincirinde 478 aminoasidden oluşmaktadır(Mischa,1996).

İnsanda nişastanın sindirimi birkaç aşamada gerçekleşmektedir. Başlangıçta tükürük  $\alpha$ -amilazı, polimerik nişastadaki kısa oligomerleri parçalıyarak kısmen sindirimi sağlar. Kısmen sindirilen nişasta, büyük ölçüde pankreasta sentezlenen  $\alpha$ -amilaz ile daha küçük oligosakkaridlere hidrolizlenir. Oluşan oligosakkarid karışımı maltoz, maltotrioz ve çok sayıda  $\alpha$ -(1,6) ve  $\alpha$ -(1,4) oligoglukanları içermektedir.

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

### 2.5.3 $\alpha$ -Amilazın Molekül Yapısı ile İlgili Özellikler

$\alpha$ -Amilazın molekül ağırlığı 55200 Da dolayındadır ve molekülü sıcaklığa karşı önemli ölçüde stabilite göstermektedir. Bu enzimin dikkate değer termostabilite özelliği, artan iyonik etkileşimler, azalan yüzey alanı ve iç kısımdaki artan paket etkileşimlerden ileri gelebilir.

Termo-stabil  $\alpha$ -amilazın üç boyutlu yapısı X-ray kristallografi yöntemi ile incelenmiştir. Yapının 478 aminoasit kalıntısı ve 294 su molekülü içerdiği görülmüştür. Şekil 2.7'de de

görüldüğü gibi yapısında 9 tane triptofan(trp) bulunmaktadır(Swift et.al,1991). Ayrıca  $\alpha$ -amilazın  $Ca^{2+}$  ve  $Cl^-$  iyonlarını bağlama özelliği vardır.  $\alpha$ -Amilazlar, bir enzim molekülü başına en az bir atom kalsiyuma sahip metaloenzimlerdir.  $Ca^{2+}$  iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş ve  $Ca^{2+}$  iyonunun mikromolar seviyelerinin,  $\alpha$ -amilazın yapısını stabilize etmeye yaradığı görülmüştür(Bush,1989).

ALA THR PRO ALA ASP TRP ARG SER GLN SER ILE TYR PHE  
 LEU LEU THR ASP ARG PHE ALA ARG THR ASP GLY SER THR  
 THR ALA THR CYS ASN THR ALA ASP GLN LYS TYR CYS GLY  
 GLY THR TRP GLN GLY ILE ILE ASP LYS LEU ASP TYR ILE  
 GLN GLY MET GLY PHE THR ALA ILE TRP ILE THR PRO VAL  
 THR ALA GLN LEU PRO GLN THR THR ALA TYR GLY ASP ALA  
 TYR HIS GLY TYR TRP GLN GLN ASP ILE TYR SER LEU ASN  
 GLU ASN TYR GLY THR ALA ASP ASP LEU LYS ALA LEU SER  
 SER ALA LEU HIS GLU ARG GLY MET TYR LEU MET VAL ASP  
 VAL VAL ALA ASN HIS MET GLY TYR ASP GLY ALA GLY SER  
 SER VAL ASP TYR SER VAL PHE LYS PRO PHE SER SER GLN  
 ASP TYR PHE HIS PRO PHE CYS PHE ILE GLN ASN TYR GLU  
 ASP GLN THR GLN VAL GLU ASP CYS TRP LEU GLY ASP ASN  
 THR VAL SER LEU PRO ASP LEU ASP THR THR LYS ASP VAL  
 VAL LYS ASN GLU TRP TYR ASP TRP VAL GLY SER LEU VAL  
 SER ASN TYR SER ILE ASP GLY LEU ARG ILE ASP THR VAL  
 LYS HIS VAL GLN LYS ASP PHE TRP PRO GLY TYR ASN LYS  
 ALA ALA GLY VAL TYR CYS ILE GLY GLU VAL LEU ASP GLY  
 ASP PRO ALA TYR THR CYS PRO TYR GLN ASN VAL MET ASP  
 GLY VAL LEU ASN TYR PRO ILE TYR TYR PRO LEU LEU ASN  
 ALA PHE LYS SER THR SER GLY SER MET ASP ASP LEU TYR  
 ASN MET ILE ASN THR VAL LYS SER ASP CYS PRO ASP SER  
 THR LEU LEU GLY THR PHE VAL GLU ASN HIS ASP ASN PRO  
 ARG PHE ALA SER TYR THR ASN ASP ILE ALA LEU ALA LYS  
 ASN VAL ALA ALA PHE ILE ILE LEU ASN ASP GLY ILE PRO  
 ILE ILE TYR ALA GLY GLN GLU GLN HIS TYR ALA GLY GLY  
 ASN ASP PRO ALA ASN ARG GLU ALA THR TRP LEU SER GLY  
 TYR PRO THR ASP SER GLU LEU TYR LYS LEU ILE ALA SER  
 ALA ASN ALA ILE ARG ASN TYR ALA ILE SER LYS ASP THR  
 GLY PHE VAL THR TYR LYS ASN TRP PRO ILE TYR LYS ASP  
 ASP THR THR ILE ALA MET ARG LYS GLY THR ASP GLY SER  
 GLN ILE VAL THR ILE LEU SER ASN LYS GLY ALA SER GLY  
 ASP SER TYR THR LEU SER LEU SER GLY ALA GLY TYR THR  
 ALA GLY GLN GLN LEU THR GLU VAL ILE GLY CYS THR THR  
 VAL THR VAL

Şekil 2.8. Aspergillus oryzae  $\alpha$ -Amilazının amino asid dizilişi

$\alpha$ -Amilaz proteini üç birimden(domain) oluşmuştur. En büyük boyutlu olan Domain A yaklaşık 291 amino asid artığı içermektedir ve  $\alpha$ - heliks sarmallarıyla çevrilmiş '8-stranded



paralel  $\beta$ -barrel' yapısından ibarettir. Üç aktif bölge kalıntısı olan Asp231, Glu 261 ve Asp328 Domain A'da yerleşmiştir. Cl<sup>-</sup> iyonları da aktif bölgeye bağlanmıştır. Domain A'nın ilginç özelliği 1-99 ve 169-404 kalıntılarını içeren iki polipeptit zincirinden meydana gelmiş olmasıdır. 104-206 aminoasid artığı bulunduran Domain B, Domain A'nın üçüncü  $\alpha$ -heliks ve ' $\beta$ -strand' arasına sokulmuş durumdadır. Heliks yapı küçük olmasına rağmen ilk başta  $\beta$ -yapısı oluşmuştur. Domain B'nin katlanması, Ca<sup>2+</sup> iyonlarının bağlı bulunduğu Domain A'nın  $\beta$ -barrel duvarlarına karşı bir cep oluşturmaktadır. Domain B'nin ana zincir atomları için termal faktörler, Domain A ve C'ninkilerden daha yüksektir. 297-482 aminoasid artığı içeren domain C, '8-stranded anti paralel  $\beta$ -barrel' içinde tutulur ve fazlası Domain A ile asosiyel olmuştur. Domain C farklı kaynakların  $\alpha$ -amilazları arasında en değişken olanıdır.  $\alpha$ -Amilazın kalsiyum ve klor iyonu bağlama pozisyonu Şekil2.9'da gösterilmiştir(Gary,1995;Hwank,1997).

$\alpha$ -Amilazların optimum pH'ları genellikle 4-7 arasındadır. pH aktivite profiline kesin optimum pH aralığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Saflaştırılmış  $\alpha$ -amilazlar 50°C'nin üzerinde aktivitelerini hızla kaydedirler. Bu inaktivasyon işlemi kalsiyum ve substrat etkisiyle azaltılabilir. Etkili oldukları sıcaklık aralığı ise 20-40 °C'dir.

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

## 2.6 Enzim-Polielektrolit Kompleksleri

Kimyasal enzimolojinin en önemli sorunlarından birisi enzimlerin stabilleşmesinin prensiplerinin araştırılmasıdır. Bu problemin çözülmesi tıpta, kimyasal teknolojide, gıda sanayinde, analitik amaçlar v.b. gibi geniş pratik uygulaması olan stabil enzim preparatları oluşturma açısından oldukça önemlidir. Enzimlerin stabilleşme yönteminin bulunması biyoorganik katalizörler yapmak için de güncel problemdir. Bu sahadaki araştırmaların çoğu, termostabil proteinler (enzimler) sentezlemek için yönlendirilmiştir. Ancak yapısında -SH grubu olan bazı enzimlerin (formik dehidrogenazlar-FDH, alkol-dehidrogenaz-ADH v.b.) aktifleşmesi, havanın oksijeni ile gerçekleşir. Bu enzimlerin aşırı değişkenliği, bunların pratik uygulama imkanlarını sınırlar. Buna göre -SH gruplarının oksitlenmesinin, oksitlenen sülfidril grupları ile kompleks oluşturan geçiş metal iyonlarının karışımı ile katalizlendiği

bilinmektedir. Bu durumda, konu edilen enzimlerin stabilleşmesi için metal iyonlarının bağlanması ve uygun indirgeme methodlarından yararlanılmaktadır. Bu methodlar etkilidir ancak uygulamaları evrensel değildir.

Enzimlerin stabilitesi ile ilgili problemlerin çözümü için polimerlerden yararlanılmaktadır. Sentetik polimerler protein partikülleri ile kompleks oluşturarak enzim molekülü yüzeyinde mikro örtü oluşturabilirler. Polikasyon, sülfhidril gruplarını havanın oksijeni ile oksitlenmekten korumaktadır. Enzimin polikompleks yapısında, kimyasal stabilitesine, polikasyon yükünün büyük etkisi vardır. Makromolekülün pozitif yükünün artması, PE'nin sabit uzunluğunda poliinaktifleşme periyodunun iki kat artmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda polikasyonun yapısında negatif yüklerin oluşması da enzimin kararlılığını inaktifleşme şartlarına getirmektedir.

Polikompleksin yapısında asıl rolü, polielektrolitin pozitif yükleri oynamaktadır. Protein-PE çözünebilen polikomplekslerinin yapısına uygun olarak, enzimlerin kararlılık mekanizmasının, şu şekilde olduğunu söylemek mümkündür. Polikasyon molekülü enzim partikülleri yüzeyinde pozitif yüklü bir örtü meydana getirmektedir. Bu örtü ile aynı türde yüklenmiş metal iyonlarının, elektrostatik itme kuvveti etkisi nedeniyle protein molekülüne girmesini engellenir. Sonuçta -SH gruplarının oksijen ile katalitik oksitlenme prosesi de ortadan kalkar.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMA

#### 3.1 $\alpha$ -Amilazın İzoelektrik Noktasının Tayini

0,1g satın alınan  $\alpha$ -amilaz örneği(6,6mg/ml) 10 ml destile suda çözüldü ve 0,1N NaOH çözeltisi ile titre edildi. Damlatılan her NaOH sarfiyatında çözeltinin pH değeri okundu. pH ile ilave edilen NaOH sarfiyatı arasında çizilen grafikten  $\alpha$ -amilazın izoelektrik noktası hesaplandı(Şekil 3.1).

#### 3.2 $\alpha$ -Amilazın Aktivite Tayini

##### 3.2.1 Kullanılan Çözeltiler

###### A) Tampon Çözeltiler:

- 1) a) 0,1N Sitrik asid tampon çözeltisi(19,213 g/L) hazırlandı ve pH 2,5'e ayarlandı.  
b) 6,7mM NaCl içeren 0,1N Sitrik asit tampon çözeltisi hazırlandı ve pH 2,5'e ayarlandı.
- 2) a) 0,05N Asetik asid tampon çözeltisi:  
pH 3,5; pH 4 ve pH 5 olan tampon çözeltiler hazırlandı.  
b) NaCl içeren 0,05N Asetik asid tampon çözeltisi: (6,7mM NaCl içeren tampon çözelti hazırlandı)
- 3) a) 0,05N  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi:  
pH 6; pH 7 ve pH 8 olan çözeltiler hazırlandı.  
b) 0,05N  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi: (6,7mM NaCl içeren tampon çözelti hazırlandı)
- 4) a) 0,05N Tris tampon çözeltisi:  
7,88g/L çözelti hazırlanır ve pH 9'a ayarlanır.  
b) 0,05N Tris tampon çözeltisi: (6,7mM NaCl içeren tampon çözelti hazırlandı)
- 5) a) 0,025N  $\text{NaHCO}_3$  tampon çözeltisi:  
2,1g/L çözelti hazırlanır ve 500ml çözelti pH 10, 500ml çözelti pH 11'e ayarlanır.  
b) 0,025N  $\text{NaHCO}_3$  tampon çözeltisi: (6,7mM NaCl içeren tampon çözelti hazırlandı)

**B)1.0%(W/V) Nişasta çözeltisi:**

0.25 g/ 25 ml nişasta çözeltisi yukardaki tampon çözeltiler içinde hazırlandı.Çözelti beherde karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtıldı. Kaynama noktasında 15 dakika ısıtmaya yavaş olarak ve çözelti karıştırılarak devam edildi.

**C)5.3 M Sodyum-Potasyum Tartarat:**

8ml 2M NaOH'de 11,965 g Na-K Tartarat çözülerek hazırlandı.Çözünmeyi kolaylaştırmak için yavaş ve sürekli karıştırma ile ısıtma yapıldı.Literatürde bu çözeltinin K.N'sına kadar kesinlikle ısıtılmaması konusunda uyarı bulunmaktadır.

**D)9.6mM 3,5-Dinitrosalisilikasid:**

0.4379 g 3,5-dinitrosalisilikasid 20ml destile suda çözüldü. Çözünmeyi kolaylaştırmak için yavaş ve sürekli karıştırma ile birlikte ısıtma yapıldı. Literatürde bu çözeltinin K.N'sına kadar kesinlikle ısıtılmaması kousunda uyarı bulunmaktadır.

**E)Renk Reaktif Çözeltisi:**

20ml D çözeltisine 8ml C çözeltisi yavaş olarak ve karıştırılarak eklendi. Bu çözelti renkli şişede saklanmalıdır.Çözeltinin kullanılma süresi 6 aydır.

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

0.02 g Maltoz 10ml destile suda çözünerek hazırlandı.

**G)  $\alpha$ -Amilaz Çözeltisi:**

- 1 ünite(0,0025g) amilaz 100ml. soğuk destile suda çözüldü.
- Farklı pH'larda yapılan denemeler için enzim çözeltilerinin hazırlanmasında, destile su yerine istenen pH'daki tampon çözeltiler kullanıldı.

**3.2.2 Deneyin Yapılışı**

Aktivite deneyi önce 6,7mM NaCl içeren tampon çözeltilerle yapıldı.

	<b>TEST</b>	<b>BLANK</b>
1.A) Nişasta çözeltisi	1ml.	1ml.
20°C'deki banyonun içine yerleştirilmiş 100ml'lik iki erlene alındı.		
B) Amilaz enzim çözeltisi	1ml.	.....
Aynı erlenlere ilave edilir,karıştırılır ve tam 3 dakika 20°C'lik su banyosunda bekletilir.		
C) Daha sonra renk reaktif çözeltisinden	1ml.	1ml.
D) Amilaz enzim çözeltisinden de aynı erlenlere	.....	1ml.
katılarak çözeltinin bulunduğu kaplar kapaklarıyla kapatıldı.		
Tam 15 dakika kaynama noktasındaki su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda çözeltiler oda sıcaklığına kadar soğutuldu.		
D)İşlemin devamında erlenlere destile sudan	9ml.	9ml.
eklenir. Bu işlemlerden sonra kolorimetre ile test çözeltisinin 540 nm'deki absorbanısı köre(blank'e) karşı okundu.		

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

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

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

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

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

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

### 3.2.3 Hesaplamalar

Çözelti F:

$$\begin{array}{r} 0,2 \text{ gr.} \quad 100 \text{ ml.} \\ X \quad 1 \text{ ml.} \\ \hline \end{array}$$

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

Std. 1

$$\begin{array}{r} 1 \text{ ml'de} \quad 0,002 \text{ gr maltoz} \\ 0,2 \text{ ml'de} \quad y \\ \hline \end{array}$$

$$y=0,0004 \text{ g}$$

Std. 2  $y=0,0008 \text{ g} \rightarrow 0,8 \text{ mg.}$

Std. 3  $y=0,0012 \text{ g} \rightarrow 1,2 \text{ mg.}$

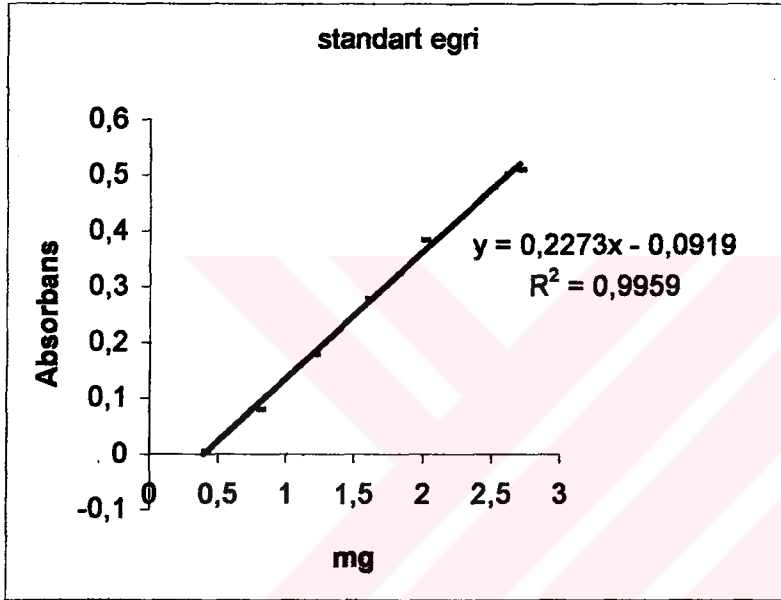
Std. 4  $y=0,0016 \text{ g} \rightarrow 1,6 \text{ mg.}$

Std. 5  $y=0,002 \text{ g} \rightarrow 2,0 \text{ mg.}$

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

1 mg maltozu açığa çıkaracak  $\alpha$ -amilaz miktarı std 2 ile std 3 arasında olmalıdır.

STANDARTLAR	ABSORBANS
Std. 1	0,003
Std. 2	0,078
Std. 3	0,177
Std. 4	0,277
Std. 5	0,382



mg	absorbans
0,4	0,003
0,8	0,078
1,2	0,177
1,6	0,277
2	0,382
2,7	0,509

Regresyon Katsayısı: 0,9959

Eğri denklemi:

$$Y=0,2273X-0,0919$$

X=1 mg maltoz için;

$$Y=0.1354=A(1\text{unite enzimin absorbansı})$$

pH 2,5 olan (6,7mM NaCl içeren) 0,1N Sitrik asit tamponu içinde hazırlanan 0,0025 g/25 ml amilaz enzim çözeltisi ve %1'lik nişasta çözeltisi ile yapılan denemede, 540nm'deki absorbans sıfır olarak okundu.

PH=3,5 olan (6,7mM NaCl içeren) 0,1N Sitrik asit tamponu içinde hazırlanan 0,0025 gr/25 ml amilaz enzim çözeltisi ve %1'lik nişasta çözeltisi ile yapılan denemede,540nm'deki absorbansı 0,020 olarak okundu.

1 ünite enzim absorbanası 0,1354  
 X 0,020

---

$$X=0,147\text{ünite}$$

Denemede 0,0025g/25 ml enzim çözeltisi kullanıldı.

2,5mg enzim 25 ml  
 X 1 ml

---

$$X=0,1 \text{ mg enzim}$$

0,1 mg 0,147 unite  
 1 mg X

---

$$X=1,47 \text{ unite/mg}$$

Aktivite:1,47 U/mg olarak hesaplandı.

PH=4 olan 0,05N CH<sub>3</sub>COOH Tamponu ile A=0,253

Aktivite:18,68 U/mg

pH=5 olan 0,05N CH<sub>3</sub>COOH Tamponu ile A=0,368

Aktivite:27,22 U/mg

PH=6 olan 0,05N NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Tamponu ile A= 0,201

Aktivite:14,89 U/mg

Yukarıda belirtilen denemeler aynı şekilde tuz içermeyen tampon çözeltilerle tekrarlandı.

Aktivite hesabında aynı şekilde yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.

	<u>A<sub>540</sub></u>	<u>Aktivite(U/mg)</u>
pH 2,5 olan enzim	sıfır	_____
pH 3,5 olan enzim	0,030	2,21
pH 4,0 olan enzim	0,496	36,63

pH 5,0 olan enzim	0,322	23,78
pH 6,0 olan enzim	0,180	13,34
pH 7,0 olan enzim	sıfır	—

Tuz içeren ve içermeyen tamponlarda bulunan aktivite değerleriyle pH arasında çizilen grafikler Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

### 3.3 $\alpha$ -Amilazın Doğal Elektroforezi

#### 3.3.1 pH 8,8 Ortamında Tek Jel Kullanarak Yapılan Elektroforez

##### 3.3.1.1 Kullanılan Çözeltiler

A) %30 Akrilamid/Bisakrilamid karışımı:

29g akrilamid ve 1g N,N'-Metilen-bis Akrilamid karıştırılır, 100ml destile suda çözülür. Bu çözelti renkli şişede 4°C’de 30 gün saklanabilir.

B) 1.5 M Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):

18.1g Tris 100ml destile suda çözülür. HCl ile pH’sı 8.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C’de saklanabilir.

C) 1M Tris-HCl çözeltisi (pH:6.8):

12.1g Tris 100 ml destile suda çözülerek pH’sı HCl ile 6.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C’de saklanabilir.

D) %10 Amonyum Persülfat (w/v):

0.1g Amonyum Persülfat 1 ml destile suda çözülür.

E) Yükleme Tamponu (Sample Buffer):

1M Tris-HCl, pH 6.8	1.0ml
Gliserin (Gliserol)	1.6ml
%0.5 (w/v) ‘bromfenol blue’	0.4ml
destile su	5 ml

F) Yürütme Tamponu (Running Buffer):

45g Tris-base ve 216g glisin karıştırıldı, ve sonra bu karışım 3 litre destile suda çözüldü. Bu çözeltilerden 600 ml alınıp 3 litreye tamamlandı.

#### G) Amilaz enzim çözeltisi

100mg enzim 5ml destile suda çözülerek, elektroforez uygulanacak olan örnek çözelti hazırlandı.

#### 3.3.1.2 Deneyin Yapılışı

pH 8,8 olan tek bir jel hazırlandı.

%10 'luk 10 ml jelin hazırlanışı:

%30 Akrilamid karışımı	3.3ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1ml
TEMED	0.004ml

\* TEMED en son konulur

Hazırlanan jel disk içine dökülerek kuyucuk tarağı yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklendi. Bundan sonra tarak çıkarıldı ve hazırlanan disk elektroforeze yerleştirilip üzerine yürütme tamponu ilave edildi. 15 µl yükleme tamponu ile 15µl enzim örneği karıştırıldıktan sonra kuyucuklara verildi. Bir kuyuya da test olarak aynı oranlarda hazırlanan BSA çözeltisi verildi. Hazırlık tamamlandıktan sonra akım uygulanarak yaklaşık bir saat beklendi. Bu sürenin sonunda disk elektroforezden çıkarılarak jel yıkanır ve boya çözeltilisine konulur. 50-60 °C'de 30 dakika beklendikten sonra "destraing buffer"da bantlar gözlenir(Şekil 3.19).

#### 3.3.2 pH 4 Ortamında Yapılan Elektroforez

3.3.1.1 bölümünde hazırlanan çözeltilere ilave olarak; 0,05M Asetik Asid çözeltisi (pH:4) hazırlandı. Yükleme tamponundan 1ml alınıp 1ml asetik asid tamponundan konuldu ve pH 4'e ayarlandı.

Yürütme Tamponu (Running Buffer),

14,4g glisin 1litre 0,05M asetik asid çözeltilisinde çözülerek hazırlandı.

%10 'luk 10 ml jelin hazırlanışı:



%30 Akrilamid karışımı	3.3ml
0,05M Asetik asid (pH 4)	2.5ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1ml
TEMED	0.004ml

Elektroforez işlemi daha önce yapıldığı gibi tekrarlandı(Şekil 3.17).

### 3.3.3 pH 5,5 Ortamında Yapılan Elektroforez

3.3.1.1 bölümünde belirtildiği gibi çözeltiler hazırlandı. İlave olarak; 0,05M Asetik Asid çözeltisi (pH:5,5) hazırlandı. Yükleme tamponundan 1ml alınıp, 1ml asetik asid tamponundan konuldu ve pH'sı 5,5 ayarlandı.

Yürütme Tamponu (Running Buffer):

14,4g glisin 1litre 0,05M asetik asid çözeltisinde çözülerek hazırlandı.

%10 'luk 10 ml jelin hazırlanışı:

%30 Akrilamid karışımı	3.3ml
0,05M Asetik asid (pH 5,5)	2.5ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1ml
TEMED	0.004ml

Elektroforez işlemi daha önce yapıldığı gibi tekrarlandı(Şekil 3.18).

### 3.3.4 $\alpha$ -Amilazın Denatüre Edici Şartlarda Elektroforezi (SDS-PAGE)

#### 3.3.4.1 Kullanılan Çözeltiler

A)%30 Akrilamid/Bisakrilamid karışımı:

29g akrilamid ve 1g N,N'-Metilen-bis Akrilamid karıştırılır, 100ml destile suda çözüldü. Bu çözelti renkli şişede 4°C'de 30 gün saklanabilir.

B)1.5 M Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):

18.1g Tris 100ml destile suda çözüldü. HCl ile pH'sı 8.8 ayarlandı. 4°C'de saklanabilir.

C) 1M Tris-HCl çözeltisi (pH:6.8):

12.1g Tris 100 ml destile suda çözülerek pH'sı HCl ile 6.8 ayarlandı. Bu çözelti 4°C'de saklanabilir.

D)%10 SDS (w/v):

Sürekli karıştırarak 10g SDS 60 ml suda çözüldü ve destile su ile 100ml'e tamamlandı.

E)%10 Amonyum Persülfat (w/v):

0.1g Amonyum Persülfat 1 ml destile suda çözüldü.

F)Yükleme Tamponu (Sample Buffer):

1M Tris-HCl,pH 6.8	1.0ml
Gliserol	1.6ml
%10 SDS	1.6ml
%0.5(w/v) bromfenol blue	0.4ml
$\beta$ -merkaptoetanol	0.4ml
destile su	8ml

G) Yürütme Tamponu (Running Buffer):

45g Tris-base,15g SDS ve 216g glisin karıştırılır,3 litre destile suda çözüldü. Bu çözeltiden 600 ml alınıp 3 litreye tamamlandı.

G) Amilaz enzim çözeltisi

100mg enzim 5ml destile suda çözülerek uygulanacak olan örnek çözelti hazırlandı.

### 3.3.4.2 Deneyin Yapılışı

A)%10 'luk 10 ml alt jelin hazırlanışı:

%30 Akrilamid karışımı	3.3ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5ml
%10 Amonyum Persülfat	0.1ml
%10 SDS	0.1ml
TEMED	0.004ml
Destile su	4.0ml

(TEMED en son konulur)

B)%5'lik 5ml üst lejin hazırlanışı:

%30 Akrilamid karışımı	0,83ml
1.0M Tris (pH 6.8)	0,63ml
%10 SDS	0.05ml
%10 Amonyum Persülfat	0.05ml
Destile su	3.4ml
TEMED	0,005ml

(TEMED en son konulur)

Alt jel ve üst jel disk içine dökülerek kuyucuk tarağı yerleştirilir ve jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklenir. Sonra tarak çıkarılır ve disk elektroforeze yerleştirilir, üzerine hazırlanan yürütme tamponu konulur. 15 µl yükleme tamponu ile 15 µl enzim örneği karıştırılıp S-S bağlarını kırmak için birkaç dakika 95 °C'deki su banyosunda tutulur ve kuyucuklara verilir. Bir kuyuyada test olarak aynı şekilde hazırlanan BSA çözeltisi konulur. Sonra akım uygulanarak yaklaşık 1 saat beklenir. Bu sürenin sonunda disk elektroforezden çıkarılarak jel yıkanır ve boya çözeltisine konulur. 50-60 °C'de 30 dakika beklendikten sonra destiraing buffer'da bantlar gözlenir (Şekil 3.20).

### 3.4 α-Amilazın Floresans Spektrofotometresiyle İncelenmesi

#### 3.4.1 Farklı pH'lardaki tampon çözeltilerde yapılan inceleme

0.05M CH<sub>3</sub>COOH çözeltisinden pH 3,4,5 olan tamponlar; 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden pH 6,7,8 olan tamponlar; 0.05 M Tris çözeltisinden pH 9 olan tampon ve 0.025 M NaHCO<sub>3</sub> çözeltisinden pH 10,11 olan tamponlar hazırlandı.

A) Bu tamponlar içinde ayrı ayrı hazırlanan 1g/25ml enzim çözeltisinden 5ml alınıp 3 ml tampon ilave edildikten sonra kabaca pH ayarlaması yapıldı ve yine tampon çözeltisi ile hacim 10 ml'ye tamamlandı. İşlem tamamlandığında son pH değeri tekrar ölçüldü ve kaydedildi. Farklı pH'larda hazırlanan enzim çözeltilerinin (değişen sıcaklıklarda) 'time-master' spektrfluorometre ile 298nm uyarımda TRES (Time Resolved Emission Spectra) ve 'decay' spektrumları alındı. TRES'den maksimum noktadaki floresans şiddet değerleri okundu ve yine bu noktalardaki decay spektrumlarından yararlanarak floresans ömürleri hesaplandı. Bu değerler ile çözelti pH'ları arasında çizilen grafikler Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8'da verilmiştir.

B)Yine bu tamponlarda ayrı ayrı hazırlanan farklı pH'lardaki enzim çözeltilerinin 280 nm'deki absorbans değerleri okunarak, floresans çalışması için  $A_{280} = 0,05-0,15$  olan örnekler hazırlandı. Bu amaçla, yani absorbansı yaklaşık 0,1 olan örneklerin elde edilmesi için, tamponlarda 1g/25ml olarak hazırlanan çözeltilerden 150 $\mu$ l alınıp 5ml'ye tamamlandı. Spektrofluorometrede(Steady State) bu örneklerin 290nm ve 300 nm uyarma yapılarak değişen sıcaklıklarda emisyon spektrumları alındı. Maksimum dalga boyundaki floresans şiddetleri kaydedildi. Floresans şiddetleriyle pH arasında ve maksimum noktaların dalga boylarıyla pH arasında grafikler çizildi(Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16).

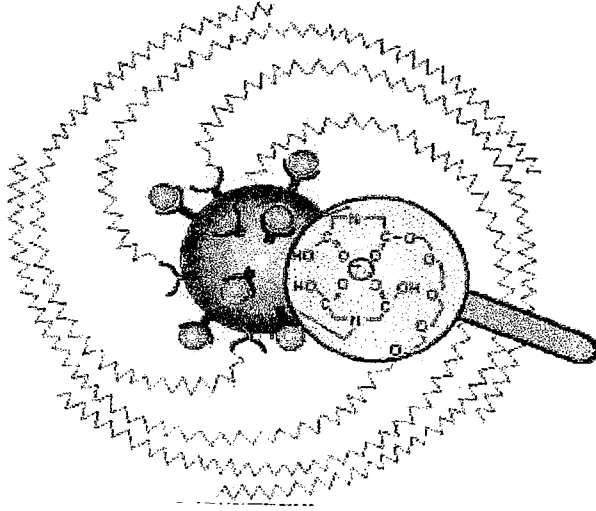
#### 3.4.2 Tampon ortamında farklı sıcaklıklarda değişimin incelenmesi

A)Yukarda verildiği gibi, farklı pH'lardaki tampon çözeltiler içinde hazırlanan ve 280 nm'deki absorbansı yaklaşık 0,1 olan enzim çözeltileri hazırlandı. Spektrofluorometre(Steady State) ile, 10,20,30,37,40,45,50,55,60,65°C sıcaklıkta, 290 nm ve 300 nm'de uyarma yapılarak emisyon spektrumları alındı.Yine maksimum noktadaki floresans şiddetleri ile sıcaklık, ve ayrıca maksimum nokta dalga boyu ile sıcaklık arasında grafikler çizildi(Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12).

B)Farklı pH'lardaki tampon çözeltiler içinde hazırlanan 1g/25ml enzim çözeltilerinden 400 $\mu$ l alınıp tampon çözelti ile 4ml'e tamamlandı (10 kat seyrelttik). Değişen sıcaklık değerlerinde (10,20,30,37,40,45,50,55,60,65°C) 298nm uyarda zamanayırımlı (TRES) floresans spektrumları alındı. Bu spektrumlardaki maksimum dalgaboyu ile bu dalga boyundaki floresans şiddetleri okundu ve floresans ömür (lifetime) hesabı yapıldı. Sıcaklığa karşı emisyon şiddetler ile floresans ömürleri arasında grafikler çizildi(Şekil3.3,Şekil 3.4,Şekil 3.5).

#### 3.5 Enzim-Polimer konjugatlarının oluşturulması

Dekstran sülfatın sudaki çözeltisine  $\text{NaIO}_4$  eklendikten sonra karışım 20 °C'de 5 saat karıştırıldı. Elde edilen yükseltgenmiş ürün 24 saat dializ işlemine bırakıldı. Soğutarak kurutma ile (liyofilizatör) aldehid grupları bulunduran polimer elde edildi.



Periyodat ile yükseltgenmiş dekstran

Aldehid grupları bulunduran dekstran ile konjugat oluşturmak üzere, enzim/polimer mol oranları 10,20 ve 30 olarak alındı. Bu işlemler için gerekli enzim miktarları aşağıda verildiği gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{\text{protein}}}{n_{\text{polimer}}} = \frac{c_{\text{prot}} \cdot MA_{\text{pol}}}{c_{\text{pol}} \cdot MA_{\text{prot}}}$$

$$c_{\text{pol}} = 0,1\text{g}/100\text{ml} = 1\text{g}/\text{ml}$$

$$MA_{\text{pol}} = 500000$$

$$MA_{\text{prot}} = 50000$$

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{c_{\text{prot}} \cdot 500000}{1 \cdot 50000} = 10$$

$$c_{\text{prot}} = 1\text{mg}/\text{ml} \text{ (olması gereken miktar)}$$

$c_{\text{protein(enz)}}$	mol oranı
1mg/ml	10
2mg/ml	20
3mg/ml	30

$\alpha$ -Amilaz örneğinin protein içeriği % 16,5 olduğu için,

$$c_1 = 1 \cdot 100/16,5$$

$$= 6,06 \text{ mg/ml}$$

$$c_2 = 2 \cdot 100/16,5$$

$$= 12,12 \text{ mg/ml}$$

$$c_3 = 3 \cdot 100/16,5$$

$$= 18,18 \text{ mg/ml}$$

$C_{\text{protein}}$	mol oranı
6,06 mg/ml	10
12,12 mg/ml	20
18,18 mg/ml	30

Bu konsantrasyonlarda hazırlanan enzim çözeltilerinden 1ml alındı ve aldehid grupları bulunduran polimer çözeltisinden de (2mg/ml) 1ml eklendi. Reaksiyon içeriği sürekli karıştırma ile 20 °C'de 8 saat beklendi. Aldehidin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondensasyon reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu, bir shiff bazı olan enzim-polimer konjugatı elde edildi.

### 3.5.1 Enzim-polimer Konjugatlarının Aktivite Tayini

Enzim-polimer konjugatlarının, daha önce satın alınan saf enzim için uygulanan yöntemde olduğu gibi farklı pH'lardaki aktiviteleri tayin edildi. Ortamın pH değerine bağlı olarak aktiviteler aşağıdaki tabloda verildiği gibi elde edildi.

pH	AKTİVİTE		
	$n_{\text{prot.}}/n_{\text{pol.}}$		
	10	20	30
2,5	0	0	0
3	16,46	15,58	14,77
4	21,49	24,29	17,20
5	20,82	25,18	14,25
7	0	0	0

Aktivite ile pH arasında çizilen grafikler Şekil 3.21'de gösterilmiştir.

### 3.5.2 Dializ işlemi

Satın alınan amilaz enziminin içerisinde %16.5 protein ve %83.5 tuz bulundurduğu belirlendi. Enzim örneğinin içindeki tuzu uzaklaştırmak için dializ yapıldı. Bunun için önce aşağıda verilen a ve b fosfat tamponları hazırlandı.

a) 27,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 400ml H<sub>2</sub>O

b) 52,2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 600ml H<sub>2</sub>O

b çözeltisinin tamamı alınıp üzerine a çözeltisi eklenerek pH 7,2'e ayarlandı. Bu hazırlanan fosfat tamponundan 20 ml alınıp 5ml'ye tamamlanarak tuzsuz PBS tamponu elde edildi. Enzim örneği ve 10,20,30 mol oranlarında hazırlanan enzim-polimer konjugatları dializ membranına konuldu. Bu membranların iki ucu bağlanarak tuz içermeyen PBS tamponu içine bırakıldı ve karıştırma sağlanarak +4°C'deki soğuk odada bir gece bekledildi.

Diyaliz edilmiş enzim örneğinin ve enzim-polimer konjugatlarının aktiviteleri ise aşağıdaki tabloda verildiği gibidir. Aktivite ile pH arasında çizilen grafikler de Şekil 3.22'de verilmiştir.

pH	AKTİVİTE			Enzim örn.
	$n_{prot}/n_{pol.}$			
	10	20	30	
2,5	0	0	0	0
3	7,82	9,08	14,69	44,23
4	15,87	20,82	19,56	39,80
5	7,60	11,44	17,06	31,24
7	0	0	0	4,06

### 3.5.3 Elektroforez İşlemi

Farklı oranlardaki enzim-polimer konjugatları ve standart olarak enzim örneğinin pH 8.8 ortamındaki elektroforezi, daha önce enzim örneklerine uygulandığı gibi yapıldı. Enzim-polimer mol oranlarına göre bağlanan ve bağlanmayan protein varlığı hakkında bilgi edinildi(Şekil 3.23).

### 3.5.4 Enzim / Polimer Konjugatları için 'Steady State' Floresans Çalışması

Dializli ve dializsiz enzim-polimer konjugatlarının, 280 nm'deki absorbansları yaklaşık 0.1 olacak şekilde farklı pH'lardaki tamponlar içinde çözeltileri hazırlandı. Spektrofluorometre(Steady State) ile, ayrı ayrı her örneğin 10,20,30,37,40,45,50,55,60,65°C sıcaklık değerlerinde, 290 nm ve 300 nm'de uyarma yapılarak emisyon spektrumları alındı.

Bu spektrumlardan yararlanarak maksimum noktadaki fluoresans şiddetleri ile sıcaklık, ve ayrıca maksimum noktadaki dalga boyu ile sıcaklık arasında grafikler çizildi. Aynı grafikler pH'ya bağlı olarak da alındı(Şekil 3.24-70).





#### 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

1. Deneysel çalışmaya *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilazının izoelektrik noktası tayin edilerek başlandı.  $\alpha$ -Amilazın 0,1N NaOH ile titrasyonu sonunda çizilen titrasyon eğrisinden pI değeri yaklaşık 6,5 olarak belirlendi(Şekil 3.1).

2. Farklı pH'lardaki tampon çözeltilerde satın alınan, %16,5 protein ve %83,5 tuz içeren saf enzimin aktivite değerlerini tayin etmek üzere denemeler yapıldı(Sigma Quality Test Control Procedure). Aktivite tayini için literatürde verilen yöntem dikkate alınarak, enzim örnekleri (%83,5 tuz içeren) 6,7mM NaCl içinde çözülerek, denemeler bir de bu koşulda farklı pH'lardaki çözeltilerde tekrarlandı. Elde edilen aktivite değerleri ve kullanılan tampon pH'ları arasında grafikler çizildi. Böylece  $\alpha$ -amilazın optimum pH aralığı belirlendi. Ek olarak tuz eklenmeyen (yani 6,7 mM NaCl'de çözülmeyen) tamponlar ile yapılan denemelerde  $\alpha$ -amilaz pH 4'de maksimum aktivite gösterirken, tuz eklenen tamponlarda bu değer pH5'de olduğu gözlemlendi(Şekil 3.2).

3. Denatüre edici koşullarda (SDS-PAGE) yapılan elektroforez işleminde literatürdeki gibi  $\alpha$ -amilaza ait 5 bant görüldü(Kazuhika, vd. 1993). Bu da  $\alpha$ -amilazın 5 alt ünitesi (subunit) olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca farklı pH'larda poliakrilamid jel kullanılarak yapılan doğal elektroforezde enzimin davranışı incelendi. Amilaz enziminin pH 8.8 ortamına ilgisinin en fazla olduğu görüldü(Şekil 3.19).

4. Farklı pH'larda tamponlar kullanılarak hazırlanan  $\alpha$ -amilaz çözeltilerinin 10,20,30,37,40,45,50,55,60,65°C sıcaklıklarında 'steady-state' spektrofloreometrede 290 ve 300 nm dalga boylarında uyarma ile emisyon spektrumları elde edildi. Alınan spektrumların maksimum noktalarındaki floresans şiddetleri ve bu noktaların bulunduğu dalga boyları okundu. Çözeltilerin pH değerleri ile floresans şiddetleri ve yine pH değerleri ile kaydedilen dalga boyları arasında grafikler çizildi(Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16). Ayrıca çözeltilerin sıcaklıkları ile floresans şiddetleri ve ek olarak bu sıcaklıklar ile maksimum noktaların bulunduğu dalga boyları arasında grafikler elde edildi(Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12).

5. 'Time Master' spektrofloreometre kullanılarak, yukarıda belirtilen çözeltilerin 298nm dalga boyunda uyarma yapılarak TRES spektrumları ve bozunma(decay) grafikleri alındı.

TRES emisyonlarının maksimum noktasının bulunduğu dalga boylarında uyarma yapılarak elde edilen bozunma grafiklerinden fluoresans ömürleri(lifetime) hesaplandı. Çözeltilerin pH değerleri ile TRES spektrumlarının maksimum noktalarındaki fluoresans şiddetleri ve ayrıca bu pH değerleri ile elde edilen fluoresans ömürler arasında grafikler çizildi(Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8). Çözeltilerin sıcaklıkları ile fluoresans şiddetleri ve ayrıca bu sıcaklıklar ile maksimum noktaların bulunduğu dalga boyları arasında grafikler elde edildi(Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5).

İncelenen *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilaz enzimi dokuz adet triptofan içermektedir. Bu triptofanların molekülde bulunduğu yere, dolayısıyla ortamın pH'sı ya da sıcaklığı değiştiğinde molekülün aldığı forma bağlı olarak, bu amino asitlerin bulunacağı konuma göre fluoresans spektrumlarında farklılıklar olması beklenir(Chadborn, 1999). Hazırlanan  $\alpha$ -amilaz çözeltilerinde triptofan fluoresansı esas alınarak, steady-state ve time-master spektrofotometre ile elde edilen sonuçların birbirini desteklediği görüldü. 'steady state' fluoresans spektrumlarında pH değerlerinde sağa kaymalar(red shift) enzim molekülünün su ile daha fazla oranda temasta olduğunu, sola kaymalar( blue shift) ise molekülün ve bulundurduğu triptofanların su ile temasının azaldığını göstermektedir. Emisyon spektrumlarının şiddetlerindeki azalma veya artmalar ile de suyun 'quenching' etkisi, dolayısıyla molekülün yayılma veya toparlanma durumu izlenmiştir(Chadborn, 1999; Szabo, 1980).

A) 290 nm uyardıma, 'Steady state' spektrofotometre ile alınan sonuçlar:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Bütün sıcaklıklarda pH'nın artmasıyla dalga boyunda azalma yani sola doğru kayma gözlemlendi. Bu da molekülün yumaklaşması, suyla temasının azalması anlamına gelmektedir. Fluoresans şiddeti ise pH 5 değerinde bir maksimuma ulaştıktan sonra düşmeye başladı. PH 7'de en düşük değere ulaştı ve bu pH'dan sonra tekrar hızla artış gösterdi.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

pH 7 ve pH 9'da sıcaklık artmasıyla dalga boyunda kayma gözlenmedi. PH 3 ve pH 5'de sıcaklık artmasıyla dalga boyunda sağa doğru bir kayma gerçekleşti. PH 7 ve pH 9'da formda fazla bir değişme olmadığı, pH 3 ve pH 5'de ise sıcaklık artmasıyla molekülde açılma ve suyla daha fazla temas olduğu söylenebilir. Fluoresans şiddetinde ise pH 3,5,7 değerlerinde yavaş olarak düşme gözlenirken, pH 9'da denatürasyon nedeniyle olmalı ki, hızladüşme meydana geldi(Chadborn, 1999; Szabo, 1980).

B) 300 nm uyarda, 'Steady state' spektrofotometre ile alınan sonuçlar:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

290nm uyardakine benzer şekilde pH'nın artmasıyla birlikte dalga boyunda azalma yani sola doğru kayma oldu. Floresans şiddeti de 290 nm uyardaki ile aynı sonuçları verdi.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

pH 3,7,9 değerlerinde sıcaklığın artmasıyla dalga boyunda hemen hemen kayma gözlenmedi. PH 5'de ise 50°C'de dalga boyunda ani bir artma yani sağa doğru kayma (molekülde açılma) meydana geldi. Floresans şiddeti ise 290 nm uyardakine benzer sonuçlar verdi.

C) 'Time-master' spektrofotometre ile alınan TRES sonuçları:

Hemen her sıcaklıkta, pH 5 - 7 arasında floresans şiddetinde maksimum bir artış ve bu pH'lardan sonra düşme gözlendi. Sıcaklığın artmasıyla ise her pH değerinde düzenli bir düşme oldu. Bu durum denatürasyonla birlikte şiddet de azalma şeklinde değerlendirilebilir.

37°C'ye kadar bütün pH'larda dalga boyunda kayma gözlenmedi fakat bu sıcaklıktan sonra ani bir düşme oldu. PH 3 değerinde 30°C'den sonra emisyon gerçekleşmedi.

Floresans ömür ise, pH'nın artmasıyla birlikte hemen her sıcaklıkta önce pH 5-7 dolayında bir maksimuma ulaşma ve sonra azalma gösterdi. Maksimum ömür 37°C'den sonra bazen sağa, bazen sola kaymalar gösterdi. Bu da 37°C'den sonra denatürasyon olarak yorumlanabilir. Kabaca floresans ömrün sıcaklık artışı ile azaldığı söylenebilir.

### **Enzim-polimer konjugatlarının incelenmesi**

$\alpha$ -Amilaz ve aldehit grupları bulunan polimer arasında gerçekleştirilen reaksiyon sonucu farklı mol oranlarında (10,20,30) enzim-polimer konjugatları elde edildi.

Enzim örneği ve enzim-polimer konjugatları, içeriğinde bulunan tuzu uzaklaştırmak amacıyla dializ yapıldı.

6. Dializsiz ve dializli enzim-polimer konjugatları ile dializ edilen enzim örneğinin, farklı pH değerlerindeki aktiviteleri tayin edildi. Enzim örneğinin daha önce yapılan aktivite

taininde pH 3 değerinde sıfır aktivite alınırken; konjugat oluşturduktan sonra enzimin pH 3 değerinde de iyi bir aktivite verdiği görüldü(Şekil 3.21).

Dializli enzim örneğinin aktivitesinde de artma gözlendi. Aynı Şekilde dializli konjugatlarda da aktivitenin olduğu pH aralığı genişledi. Ayrıca dializli enzim rneği pH 7'de de, az da olsa bir aktivite gösterdi(Şekil 3.22).

7. Farklı mol oranlarında hazırlanan enzim-polimer konjugatlarının, en uygun ortam olduğu belirlenen pH 8.8 ortamında doğal elektroforezlerine bakıldı.Şekil 3.23'de grldği gibi en iyi bağlanmanın olduğu 10 oranında silik bir bant, 20 oranında bağlanmayan protein varlığından dolayı daha koyu bir bant, 30 oranında ise daha fazla bağlanmayan protein olduğundan en belirgin bant görüldü.
8. Farklı pH'lardaki tamponlar kullanılarak hazırlanan dializli ve dializsiz enzim-polimer konjugatlarının 10,20,30,37,40,45,50,55,60,65°C sıcaklıklarında 'steady-state' spektrofloreometrede 290 ve 300 nm dalga boylarında uyarma ile emisyon spektrumları elde edildi. Alınan spektrumların maksimum noktalarındaki fluoresans Şiddetleri ve bu noktaların bulunduğu dalga boyları okundu. zltelerin pH değerleri ile fluoresans Şiddetleri ve yine pH değerleri ile kaydedilen dalga boyları arasında grafikler çizildi. Ayrıca zltelerin sıcaklıkları ile fluoresans Şiddetleri ve ek olarak bu sıcaklıklar ile maksimum noktaların bulunduğu dalga boyları arasında grafikler elde edildi(Őkil 3.24-70).

A) 290 nm uyarda, 'Steady state' spektrofloreometre ile alınan sonular:

Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugat iin:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Bütün sıcaklıklarda pH'nın artmasıyla dalga boyunda pH 5'e kadar bir azalma yani sola doğru kayma (blue shift) pH 5'den sonra artma ve pH 7'den sonra tekrar azalma gözlendi. Genel anlamda sola doğru kayma göründü(Chadborn, 1999). Bu da molekülün yumaklaşması, suyla temasının azalması anlamına gelmektedir. Fluoresans Şiddeti ise pH 5 değerinde bir maksimuma ulaştıktan sonra düşmeye başladı. PH 7'de en düşük değere ulaştı ve bu pH'dan sonra tekrar hızla artış gösterdi.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

Bütün pH'larda 55°C'ye kadar dalga boyunda belirgin bir kayma gözlenmedi. Bu sıcaklıktan sonra dalga boyunda az miktarda sağa doğru bir kayma gerçekleşti. Floresans şiddetinde ise pH 3,5,7 değerlerinde yavaş olarak düşme gözlenirken pH 9'da denatürasyon nedeniyle olmalı ki, hızla düşme meydana geldi.

Enzim-polimer mol oranı 10 alınan dializli konjugat için:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Dalga boyu kayması konusunda dializ edilmeyen konjugatla benzer bir değişme olduğu görüldü. Yani genel manada sola doğru kayma olduğu suyla temasın azaldığı söylenebilir. Floresans şiddeti ise pH 5'e kadar artış sonra azalma şeklinde gerçekleşti.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

pH 3 değerinde sıcaklık artmasıyla dalga boyunda değişme olmadı. pH 5,7,9'da ise 55°C'den sonra hızla bir artış yani sağa kayma gözlemlendi. Floresans şiddetinde de bütün pH'larda sıcaklık artışı ile düşme gözlemlendi.

Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugat için:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

55°C'ye kadar bütün sıcaklıklarda dalga boyunda pH 7'e kadar artma sonra azalma gözlemlendi. 55,60,65°C'lerde ise denatürasyondan dolayı olmalı ki değişim buna benzer fakat daha düzensiz görülmektedir. Floresans şiddetleri ise yine aynı sıcaklıklarda pH 5'de bir maksimum verdikten sonra pH 7'ye kadar azaldı, bu pH'dan sonra tekrar hızlı bir artış gösterdi. 55,60,65°C'lerde durum yine denatürasyonu göstermektedir.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

Sıcaklık arttıkça pH 3,5,7'de 50°C'ye kadar dalga boyunda bir değişme olmadı, bu sıcaklıktan sonra sağa doğru kayma gözlemlendi. pH 9'da ise 30°C'ye kadar sağa kayma, sonra sola kayma gerçekleşti. Floresans şiddetinde de bütün pH'larda sıcaklık artışı ile düşme gözlemlendi.

Enzim-polimer mol oranı 20 alınan dializli konjugat için:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Bütün sıcaklıklarda dalga boyu pH 5'e kadar azaldı, bu pH'dan sonra artmaya başladı. Floresans şiddetlerin de aynı şekilde pH 5'e kadar azalma sonra artma gözlemlendi.

**-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:**

pH 5,7,9 da dalga boyunda 37°C'ye kadar yavaş bir azalma yani sola kayma oldu. pH 3 de ise sıcaklık artışıyla sürekli sağa kayma gözlemlendi. Floresans şiddetleri de sıcaklık artışıyla azalma gösterdi.

**Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugat için:****-pH'ya bağlı olarak değişme:**

55°C'ye kadar bütün sıcaklıklarda dalga boyunda pH 5'e kadar azalma sonra artma gözlemlendi. 55,60,65°C'lerde ise, pH 5'den sonra hızla ani bir artma ve pH 7'den sonra tekrar hızla azalma oldu. Floresans şiddetler de bütün sıcaklıklarda pH arttıkça genel manada bir artma gerçekleşti.

**-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:**

pH 3,7,9'da sıcaklık arttıkça genel olarak dalga boyunda azalma yani sola kayma meydana geldi. Ancak pH 7'de 50°C'den sonra hızla sağa doğru kayma oldu. pH 5 de ise 37°C'ye kadar yavaş bir sağa kayma sonra azalma ile sola kayma ve 55°C'den sonra tekrar sağa kayma gerçekleşti. Floresans şiddetlerde de, bütün pH'larda sıcaklık artışı ile birlikte azalma gösterdi.

**Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugat için:****-pH'ya bağlı olarak değişme:**

Bütün sıcaklıklarda dalga boyunda pH 5'de bir maksimum verdikten sonra hızla azalmaya başladı. pH 7'den sonra tekrar artma oldu. Floresans şiddetler de pH'nın artmasıyla artma, pH 7'den sonra yavaş bir azalma görüldü. 60 ve 65°C'lerde şiddetteki değişme kaybolmaya başladı.

**-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:**

Bütün pH'larda sıcaklık artışıyla dalga boyunda belirgin bir kayma gözlenmedi. 50°C'den sonra sağa doğru bir kayma oldu. Floresans şiddetinde ise sıcaklık artışı ile birlikte azalma görüldü.

A) 290 nm uyarımda, 'Steady state' spektrofluorometre ile alınan sonuçlar:

**Enzim-polimer mol oranı 10 alınan konjugat için:**



**-pH'ya bağlı olarak değişme:**

Bütün sıcaklıklarda pH'nın artmasıyla dalga boyunda pH 5'e kadar bir azalma yani sola doğru kayma (blue shift) pH 5'den sonra artma gözlemlendi. Floresans şiddeti ise pH 5'e kadar pek bir değişme olmazken bu pH'dan sonra hızla artma meydana geldi.

**-Sıcaklığa bağlı olarak değişim:**

Dalga boyunda ve floresans şiddetindeki değişmede, 290nm uyarımda ki ile aynı sonuçlar elde edildi.

**Enzim-polimer mol oranı 10 alınan diyalizli konjugat için:****-pH'ya bağlı olarak değişme:**

Dalga boyunda ve floresans şiddetindeki değişmede, 290nm uyarımda ki ile aynı sonuçlar elde edildi.

**-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:**

Sıcaklık arttıkça pH 3,5,7'de dalga boyunda artış yani sağa kayma oldu. pH 9'da denatürasyondan olmalı ki 60°C'ye kadar azalma(sola kayma) sonra artma (sağa kayma) gerçekleşti. Floresans şiddetinde de bütün pH'larda sıcaklık artışı ile düşme gözlemlendi.

**Enzim-polimer mol oranı 20 alınan konjugat için:****-pH'ya bağlı olarak değişme:**

55°C'ye kadar bütün sıcaklıklarda dalga boyunda pH 7'e kadar azalma sonra artma gözlemlendi. 55,60,65°C'lerde ise, pH 5'de bir maksimum olmadığından dalga boyu sıfıra düştü. Floresans şiddetler de yine aynı sıcaklıklarda pH 5'de bir maksimum sonra azalma ve pH 7'den sonra tekrar artış gözlemlendi. 55,60,65°C'lerde ise, pH 5'de bir minimum verdikten sonra artmaya başladı.

**-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:**

Sıcaklık arttıkça pH 3,5,7'de dalga boyunda fazla bir değişme olmazken pH 5'de 50 °C'den sonra hızlı bir düşme gözlemlendi. Floresans şiddetinde de bütün pH'larda sıcaklık artışı ile düşme gözlemlendi.

**Enzim-polimer mol oranı 20 alınan diyalizli konjugat için:**

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Dalga boyundaki değişmede, 290nm uyarımda ki ile aynı sonuçlar elde edildi. Floresans şiddetler de pH 5'e kadar yavaş bir azalma sonra artma ve pH 7'den sonra da hızla düşme gözlemlendi.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

Sıcaklık arttıkça pH 3,5,7 de dalga boyunda sağa kayma, pH 9 da ise 45°C'ye kadar sağa doğru sonra sola doğru kayma gözlemlendi. Floresans şiddetler ise, 290nm uyarımdaki ile aynı sonuçları verdi.

Enzim-polimer mol oranı 30 alınan konjugat için:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Bütün sıcaklıklarda dalga boyunda pH 'nın artmasıyla artma gözlemlendi. pH 5'den sonra yavaş bir azalma ve sonra tekrar artma oldu. 65°C de denatürasyon sebebiyle olmalı ki pH 7'den sonra düşme görüldü. Floresans şiddetler ise, 290nm uyarımdaki ile aynı sonuçları verdi.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

Sıcaklık arttıkça pH 5,7,9 da dalga boyunda sağa kayma olurken, pH 3 de ise bir değişme olmadı. Floresans şiddetlerinde ise artan sıcaklık ile birlikte azalma görüldü.

Enzim-polimer mol oranı 30 alınan dializli konjugat için:

-pH'ya bağlı olarak değişme:

Bütün sıcaklıklarda dalga boyunda pH 5'e kadar azalma sonra pH 7'e kadar artma ve bu pH'dan sonra tekrar azalma gözlemlendi. Floresans şiddetler ise, 290nm uyarımdaki ile aynı sonuçları verdi.

-Sıcaklığa bağlı olarak değişme:

pH 5ve 9 da sıcaklık artışıyla dalga boyunda çok az bir azalma yani sola kayma olurken pH 3 ve 7 de yavaş bir artma yani sağa kayma oldu. Floresans şiddetler ise, 290nm uyarımdaki ile aynı sonuçları verdi.



## 5. KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASAL MADDELER

### 5.1 Kullanılan Cihazlar

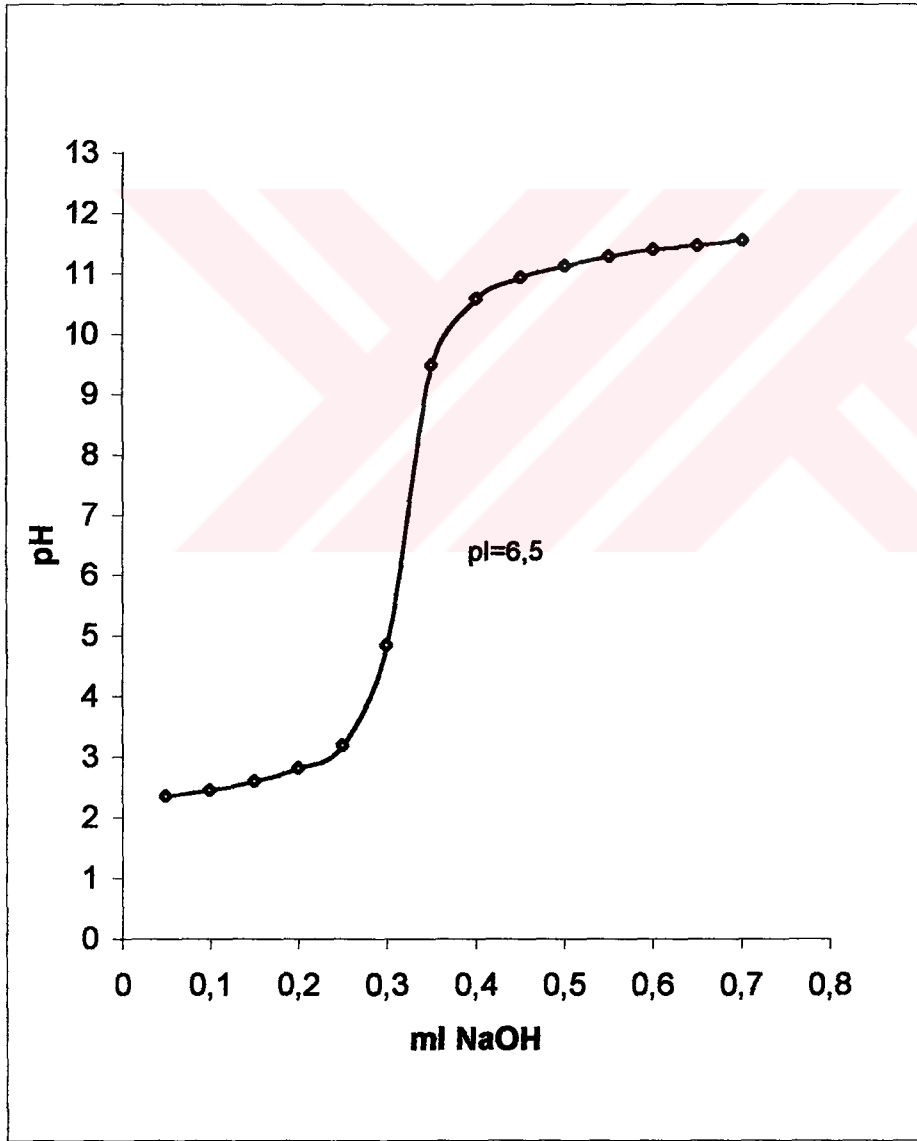
- “Time Master” PTI C71 model spektrofotometre(YTÜ)
- “Quanta Master” PTI marka spektrofluorometre(TÜBİTAK)
- Aktivite tayininde Clifton marka çalkalamalı su banyosu(YTÜ)
- UV-Vis Spektrofotometre, Philips PU 8700 UV-visible, Küvet 10-10,45 mm Hellma, 100-QS(YTÜ)
- Cary 3Bio UV-Visible Spektrofotometre(TÜBİTAK)
- Bio-Rad marka mini protean Elektroforez(TÜBİTAK)
- “Gel Driver” Jel Kurutucu EC355 E-C Apparatus Corporation(TÜBİTAK)
- Cyber Scan marka pH metre(YTÜ)
- Schott CG840 model pH metre(TÜBİTAK)
- Jenway 6061 model Kolorimetre(YTÜ)
- Analitik Terazı Agust Sauter D-7470(YTÜ)
- Kermanlar RCA marka magnetik karıştırıcı(TÜBİTAK)
- Volac marka Dijital Mikro-pipet seti(YTÜ)

## 5.2 Kullanılan Maddeler

*Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amilazı, NaOH, Sitrik asid, Asetik asid, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Tris, nişasta, Sodyum-Potasyum Tartarat, 3,5-Dinitrosalisilikasid, Maltoz standartı, NaCl, Akrilamid, Bisakrilamid, Amonyum Persülfat, Gliserin, Bromfenolblue, Glisin, Temed, SDS,  $\beta$ -Merkaptoetanol, Dekstan sülfat, NaIO<sub>4</sub>, Fosfat tamponu, PBS

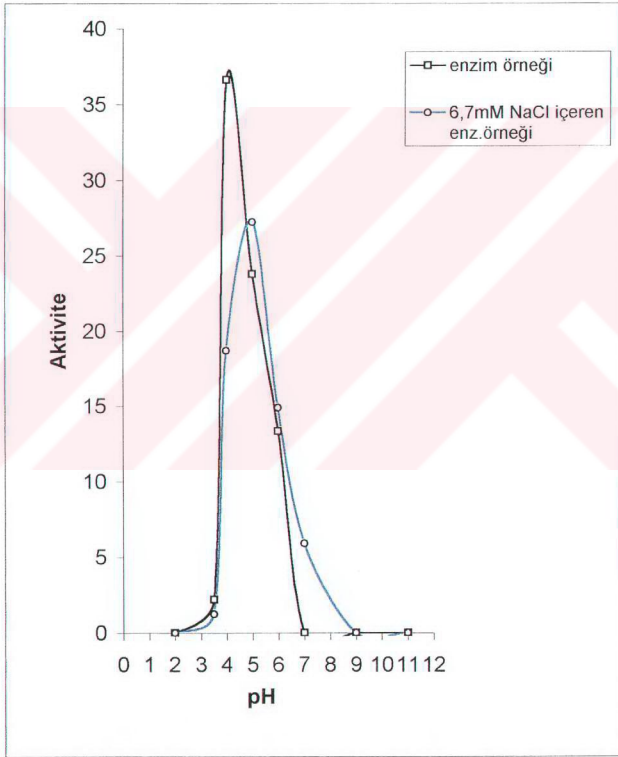


NaOH(ml)	pH
0,05	2,35
0,1	2,45
0,15	2,6
0,2	2,81
0,25	3,18
0,3	4,83
0,35	9,46
0,4	10,57
0,45	10,92
0,5	11,12
0,55	11,27
0,6	11,39
0,65	11,46
0,7	11,54



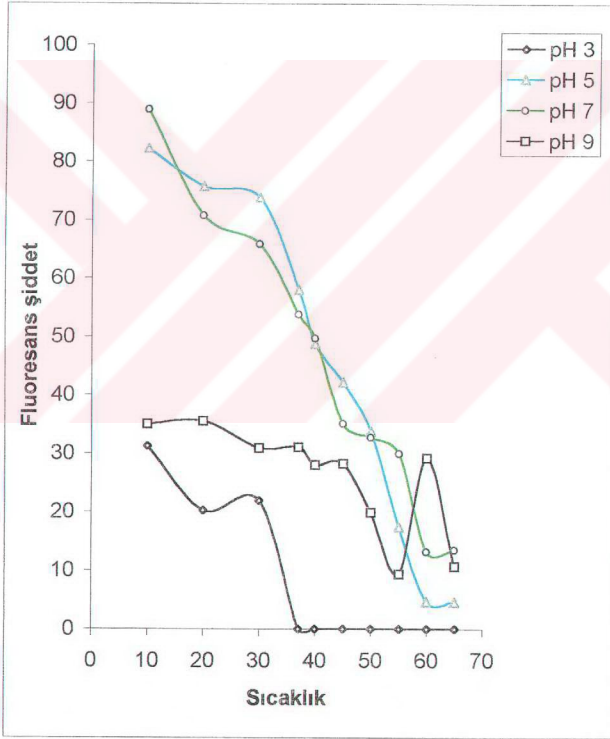
Şekil 3.1 Alfa-Amilazın izoelektrik noktasının tayini için 0,1N NaOH ile titrasyonu (0,1g enzim/10ml des. Su)

pH	Aktivite(U/mg)	Aktivite (NaCl içeren)
2	0	0
3,5	2,21	1,25
4	36,63	18,68
5	23,78	27,22
6	13,34	14,89
7	0	5,9
9	0	0
11	0	0



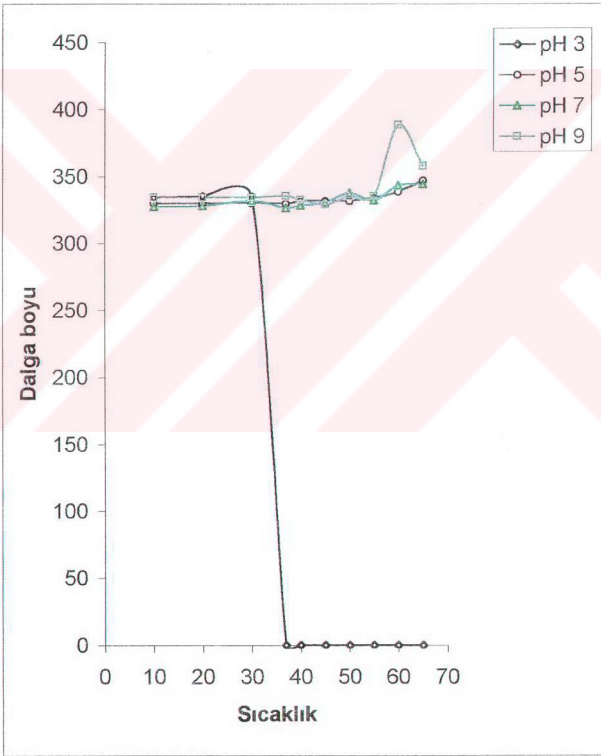
Şekil 3.2 Alfa-Amilazın farklı pH'larda aktivite tayini

sıcaklık	Fluoresans şiddet(pH 3)	Fluoresans şiddet(pH 5)	Fluoresans şiddet(pH 7)	Fluoresans şiddet(pH 9)
10	31,21	82,16	88,78	34,98
20	20,24	75,63	70,64	35,47
30	21,87	73,73	65,68	30,81
37	0	57,84	53,69	31,02
40	0	48,64	49,63	27,97
45	0	42,06	35,025	28,17
50	0	33,68	32,71	19,85
55	0	17,36	29,9	9,34
60	0	4,64	13,11	29,19
65	0	4,53	13,44	10,65



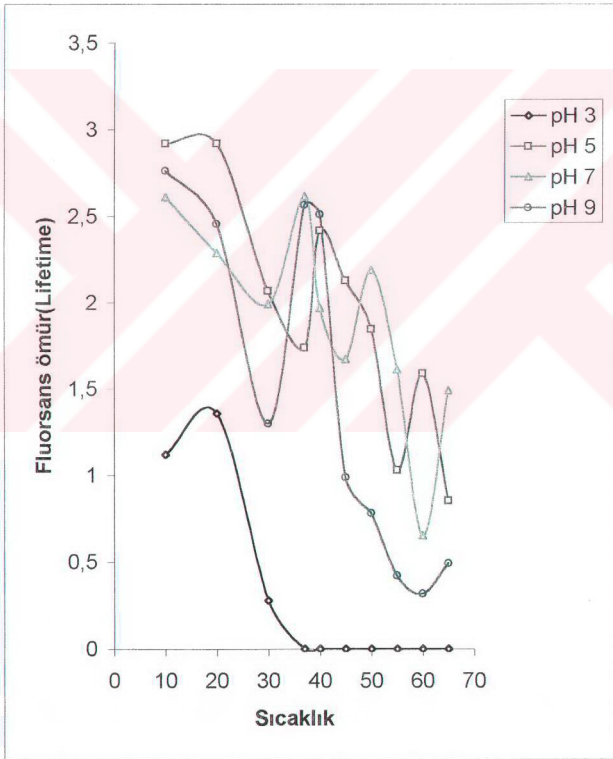
Şekil 3.3 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin sıcaklık ile floresans şiddetlerinin değişimi (Time-Master spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	max dalga boyu (pH 3)	max. dalga boyu (pH 5)	max. dalga boyu (pH 7)	max. dalga boyu (pH 9)
10	334,25	329,7	327	334
20	335,25	329,5	327,5	334
30	335	329,7	331,25	334
37	0	329,5	326	335
40	0	331	327,75	332
45	0	331,5	330	328,5
50	0	331,25	337	335
55	0	333,75	331,75	335
60	0	338,25	343	388,25
65	0	346,75	343,75	357,5



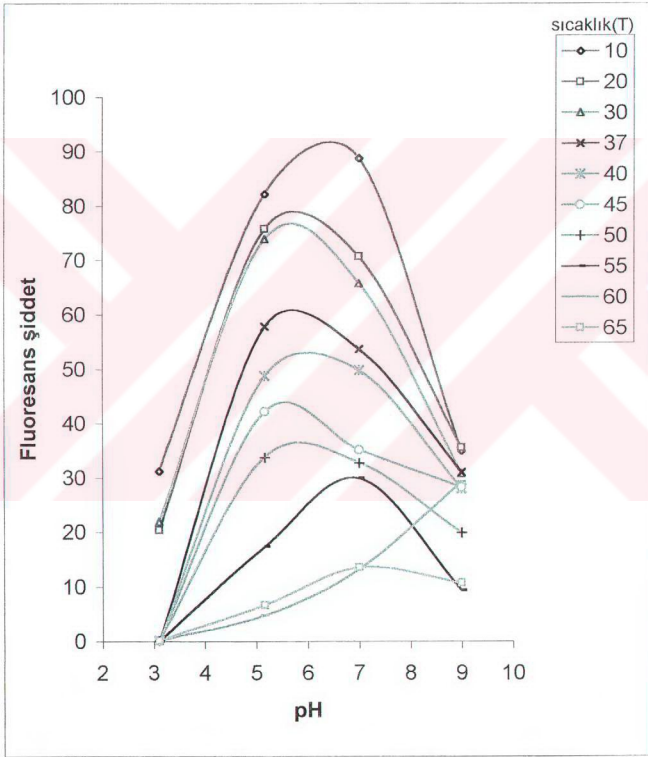
Şekil 3.4 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Time-Master spektrofluorometreden yararlanarak)

sıcaklık	fluoresans ömür (pH 3)	fluoresans ömür (pH 5)	fluoresans ömür (pH 7)	fluoresans ör (pH 9)
10	1,118	2,916	2,606	2,759
20	1,358	2,915	2,282	2,452
30	0,279	2,064	1,987	1,297
37	0	1,735	2,61	2,561
40	0	2,413	1,965	2,506
45	0	2,125	1,669	0,985
50	0	1,843	2,183	0,78
55	0	1,027	1,61	0,418
60	0	1,587	0,65	0,315
65	0	0,853	1,489	0,491



Şekil 3.5 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin sıcaklık ile floresans ömürlerinin değişimi (Time-Master spektrofluorometreden yararlanarak)

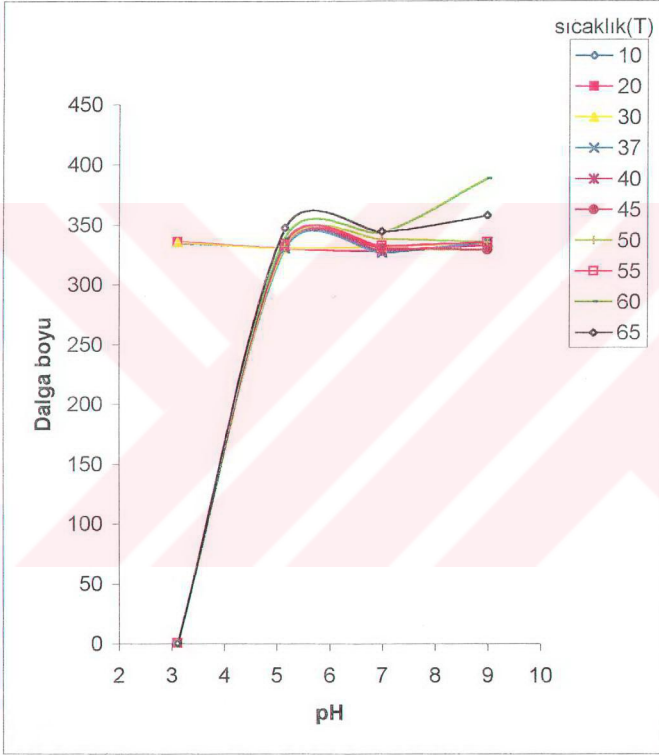
pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,11	31,21	20,24	21,87	0	0	0	0	0	0	0
5,16	82,16	75,63	73,73	57,84	48,64	42,06	33,68	17,36	4,64	6,52
7	88,78	70,64	65,68	53,69	49,63	35	32,71	29,9	13,11	13,44
9	34,98	35,47	30,81	31,02	27,97	28,17	19,85	9,34	29,19	10,65



Şekil 3.6 Değişen sıcaklık değerlerinde, alfa-amilaz çözeltilerinin pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Time-Master spektrofloreten yararlanarak)

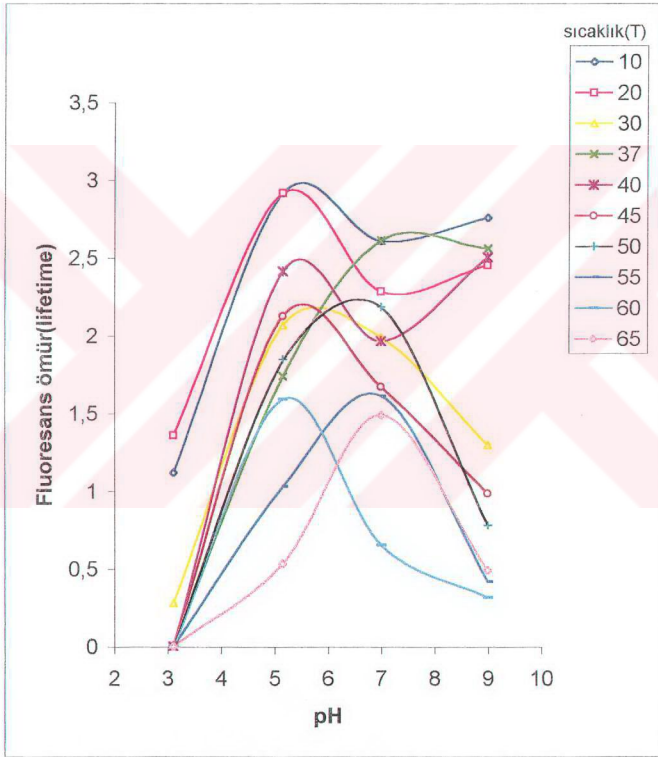


pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,11	334,3	335,3	335	0	0	0	0	0	0	0
5,16	329,7	329,5	329,7	329,5	331	331,5	331,25	333,8	338,3	346,75
7	327	327,5	331,25	326	327,8	330	337	331,8	343	343,8
9	334	334	334	335	332	328,5	335	335	388,2	357,5



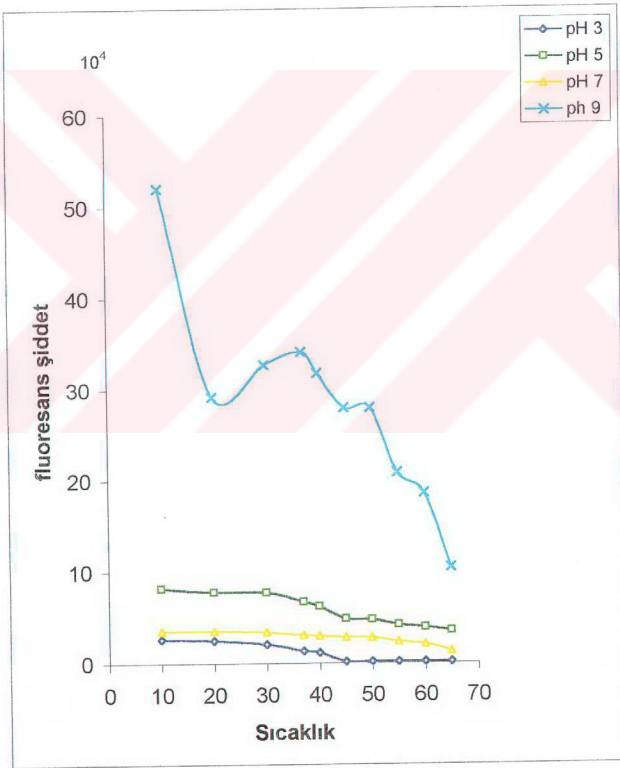
Şekil3.7 Değişen sıcaklık değerlerinde,alfa-amilaz çözeltilerinin pH ile maksimum noktadaki dalga boylarının değişimi (Time-Master spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,11	1,118	1,358	0,279	0	0	0	0	0	0	0
5,16	2,916	2,915	2,064	1,735	2,413	2,125	1,843	1,027	1,587	0,532
7	2,606	2,282	1,987	2,61	1,965	1,669	2,183	1,61	0,65	1,489
9	2,759	2,452	1,297	2,561	2,506	0,985	0,78	0,418	0,315	0,491



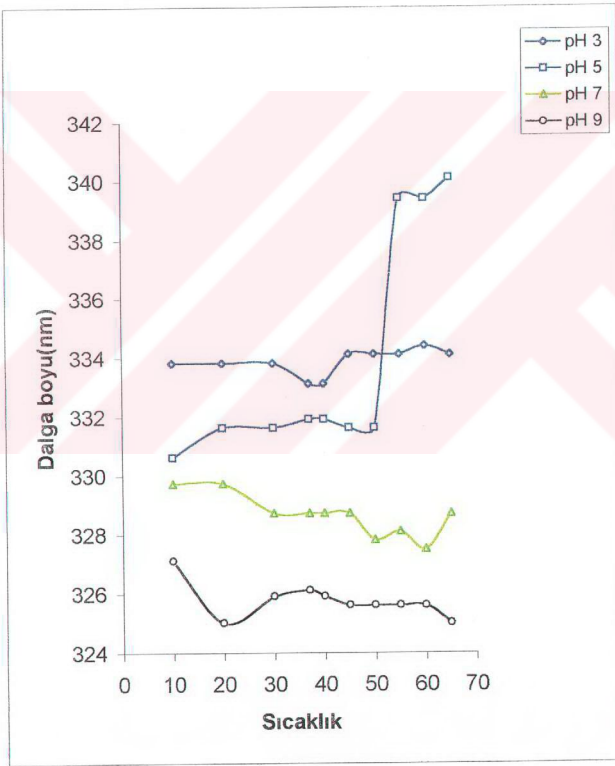
Şekil 3.8 Değişen sıcaklık değerlerinde, alfa-amilaz çözeltilerinin pH ile fluoresans ömürlerinin değişimi (Time-Master spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	2,549	8,139	3,457	51,95
20	2,438	7,695	3,457	29,09
30	2,023	7,69	3,325	32,59
37	1,264	6,631	3,013	34,01
40	1,054	6,14	2,91	31,64
45	0,0858	4,748	2,771	27,87
50	0,0858	4,666	2,702	27,87
55	0,0748	4,093	2,286	20,78
60	0,072	3,848	2,009	18,51
65	0,0717	3,438	1,247	10,39



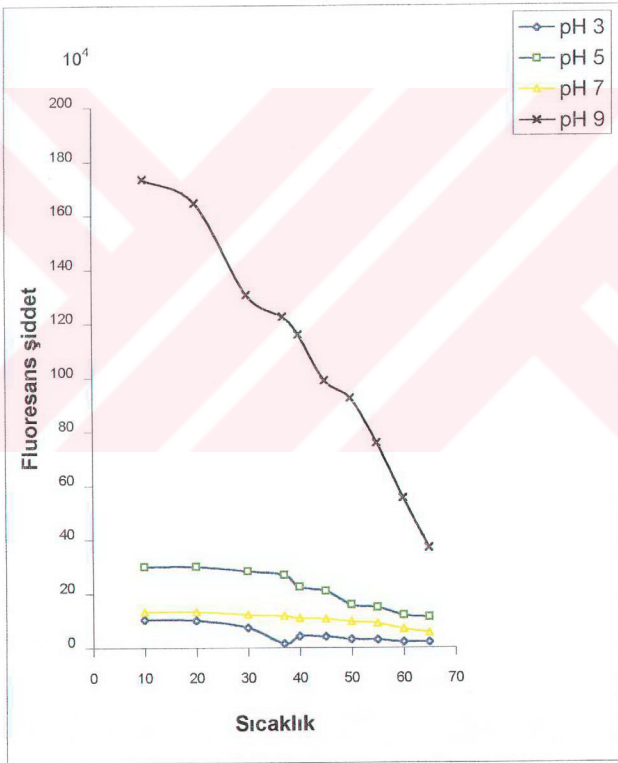
Şekil 3.9 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin( 300nm uyarımda) sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	333,8	330,6	329,7	327,1
20	333,8	331,6	329,7	325
30	333,8	331,6	328,7	325,9
37	333,1	331,9	328,7	326,1
40	333,1	331,9	328,7	325,9
45	334,1	331,6	328,7	325,6
50	334,1	331,6	327,8	325,6
55	334,1	339,4	328,1	325,6
60	334,4	339,4	327,5	325,6
65	334,1	340,1	328,7	325



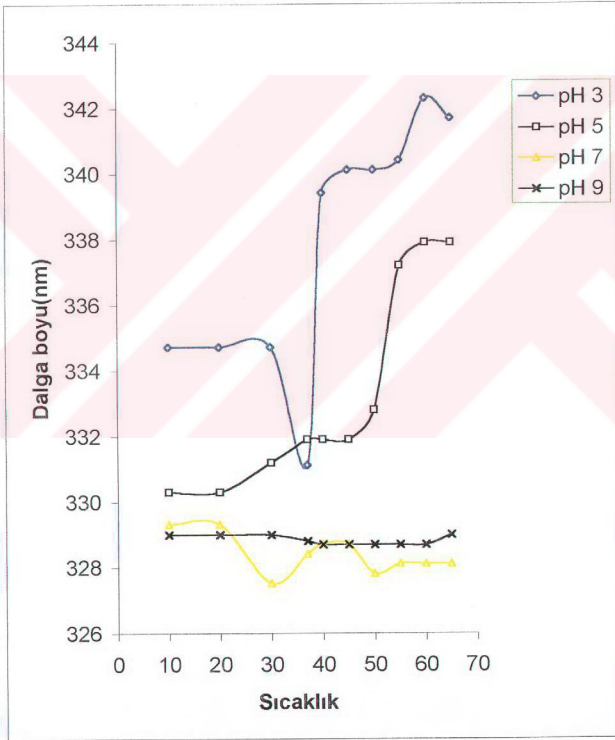
Şekil 3.10 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin( 300nm uyardırda) sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değışimi (Steady-state spektrof luorometreden yararlanarak)

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	10,09	29,8	12,95	173,3
20	9,864	29,8	12,95	164,4
30	7,121	28	11,85	130,4
37	1,264	26,61	11,43	122,3
40	3,99	22,1	10,53	115,7
45	3,741	20,63	10,25	98,71
50	2,854	15,55	9,327	92,1
55	2,715	14,49	8,659	75,57
60	1,94	11,71	6,581	55,1
65	1,912	11,13	5,438	36,84



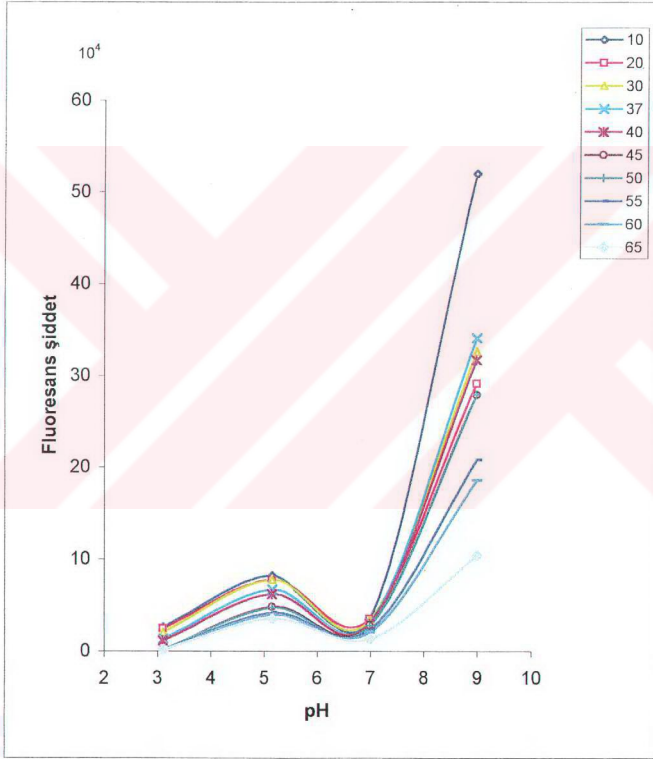
Şekil 3.11 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin( 290nm uyarda) sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	334,7	330,3	329,3	329
20	334,7	330,3	329,3	329
30	334,7	331,2	327,5	329
37	331,1	331,9	328,4	328,8
40	339,4	331,9	328,7	328,7
45	340,1	331,9	328,7	328,7
50	340,1	332,8	327,8	328,7
55	340,4	337,2	328,1	328,7
60	342,3	337,9	328,1	328,7
65	341,7	337,9	328,1	329



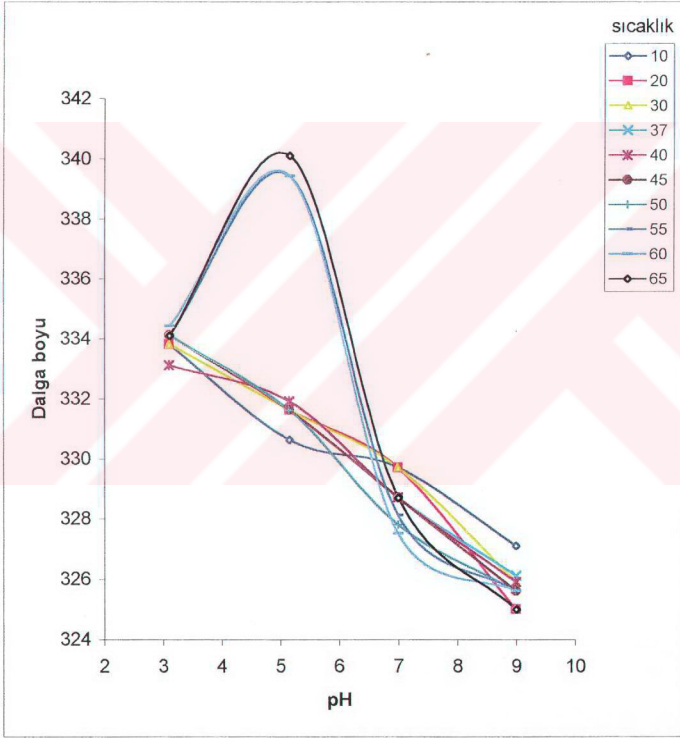
Şekil 3.12 Farklı pH'lardaki alfa-amilaz çözeltilerinin (290nm uyardırda) sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

		Fluoresans şiddetler									
pH	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	
3,11	2,549	2,438	2,023	1,264	1,054	0,0858	0,0858	0,0748	0,072	0,0717	
5,16	8,139	7,695	7,69	6,631	6,14	4,748	4,666	4,093	3,848	3,438	
7	3,457	3,457	3,325	3,013	2,91	2,771	2,702	2,286	2,009	1,247	
9	51,95	29,09	32,59	34,01	31,64	27,87	27,87	20,78	18,51	10,39	



Şekil 13.13 Değişen sıcaklık değerlerinde, alfa-amilaz çözeltilerinin (300nm uyarımada) pH ile fluoressans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofloreometreden yararlanarak)

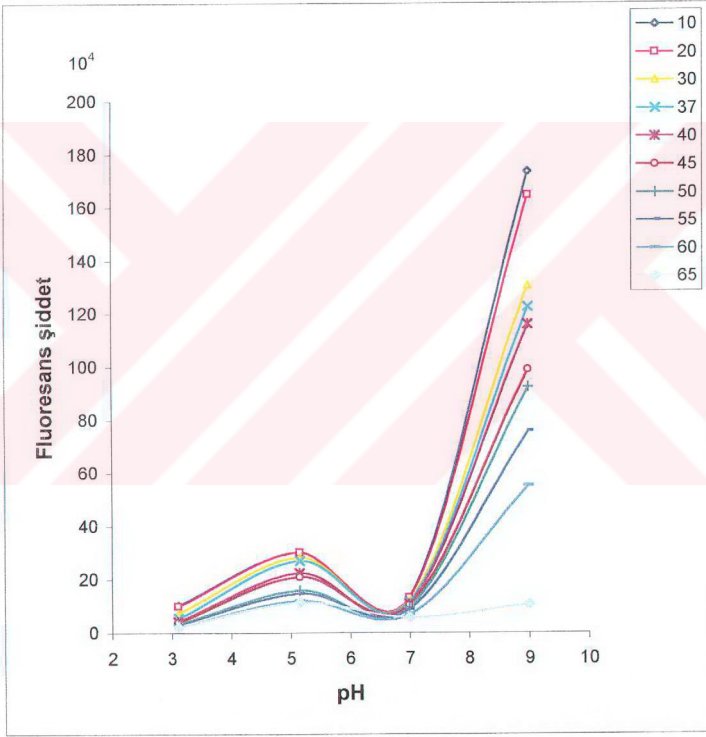
pH	Max. Noktadaki Dalga boyları										
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	
3,11	333,8	333,8	333,8	333,1	333,1	334,1	334,1	334,1	334,4	334,1	
5,16	330,6	331,6	331,6	331,9	331,9	331,6	331,6	339,4	339,4	340,1	
7	329,7	329,7	329,7	328,7	328,7	328,7	327,8	328,1	327,5	328,7	
9	327,1	325	325,9	326,1	325,9	325,6	325,6	325,6	325,6	325	



Şekil3.14 Değişen sıcaklık değerlerinde,alfa-amilaz çözeltilerinin(300nm uyardırda) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değışimi (Steady-state spektrofiorometreden yararlanarak)

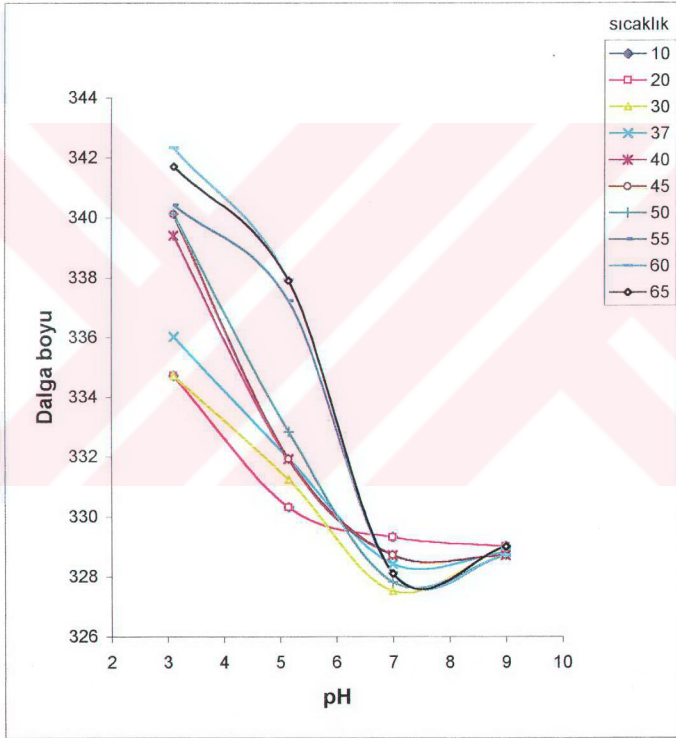


pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,11	10,09	9,864	7,121	5,154	3,99	3,741	2,854	2,715	1,94	1,912
5,16	29,8	29,8	28	26,61	22,1	20,63	15,55	14,49	11,71	11,13
7	12,95	12,95	11,85	11,43	10,53	10,25	9,317	8,659	6,581	5,438
9	173,3	164,4	130,4	122,3	115,7	98,71	92,1	75,57	55,1	10,39

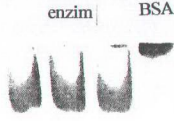


Şekil3.15 Değişen sıcaklık değerlerinde,alfa-amilaz çözeltilerinin(290nm uyarımada) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

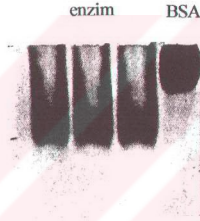
pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,11	334,7	334,7	334,7	336	339,4	340,1	340,1	340,4	342,3	341,7
5,16	330,3	330,3	331,2	331,9	331,9	331,9	332,8	337,2	337,9	337,9
7	329,3	329,3	327,5	328,4	328,7	328,7	327,8	328,1	328,1	328,1
9	329	329	329	328,8	328,7	328,7	328,7	328,7	328,7	329



Şekil3.16 Değişen sıcaklık değerlerinde, alfa-amilaz çözeltilerinin (290nm uyarımada) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)



Şekil 3.17  $\alpha$ -Amilazın pH 4 ortamındaki doğal elektroforezi

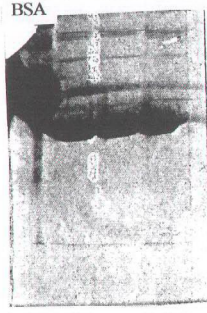


Şekil 3.18  $\alpha$ -Amilazın pH 5,5 ortamındaki doğal elektroforezi

enzim



Şekil 3.19  $\alpha$ -Amilazın pH 8.8 ortamındaki doğal elektroforezi



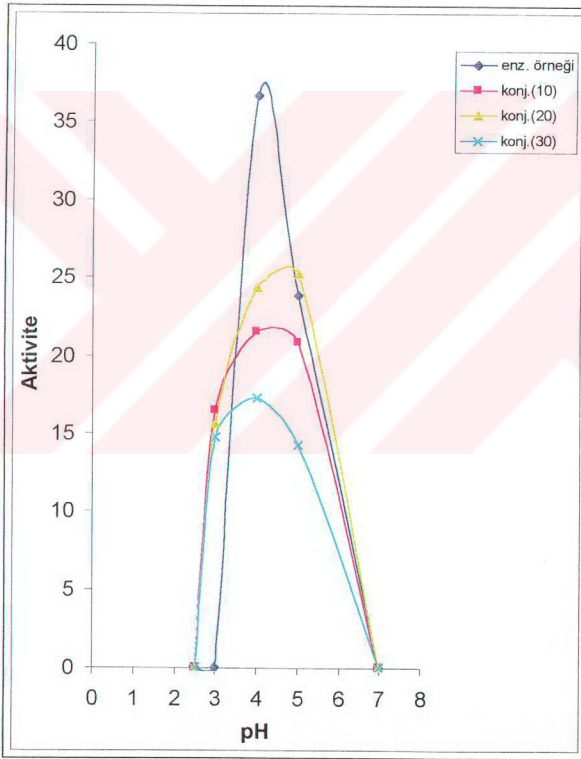
Şekil 3.20  $\alpha$ -Amilazın SDS jel elektroforezi

enz.  
örn. 10 20 30



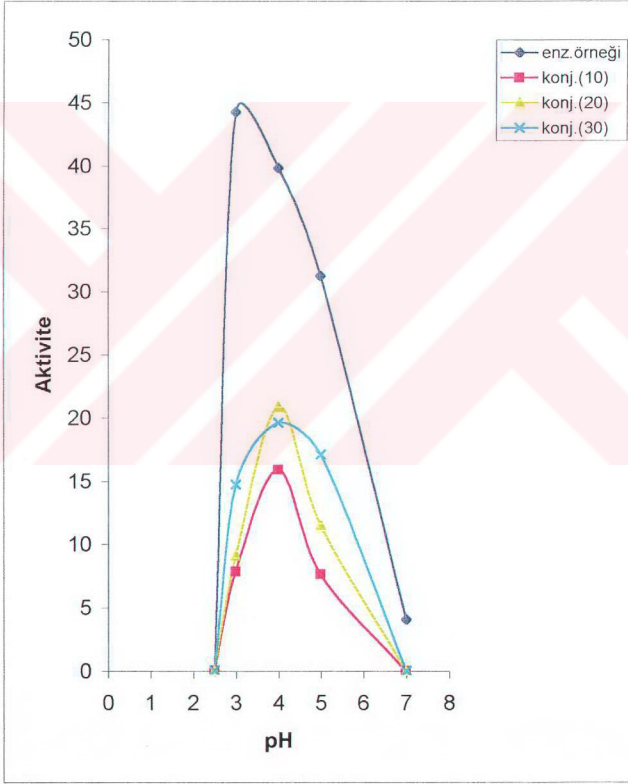
Şekil 3.23  $\alpha$ -Amilaz-dekstran konjugatlarının pH 8.8 ortamındaki doğal elektroforezi

pH	AKTİVİTE		
	$n_{prot.}/n_{pol.}$		
2,5	10	20	30
3	0	0	0
4	16,46	15,58	14,77
5	21,49	24,29	17,2
7	20,82	25,18	14,25



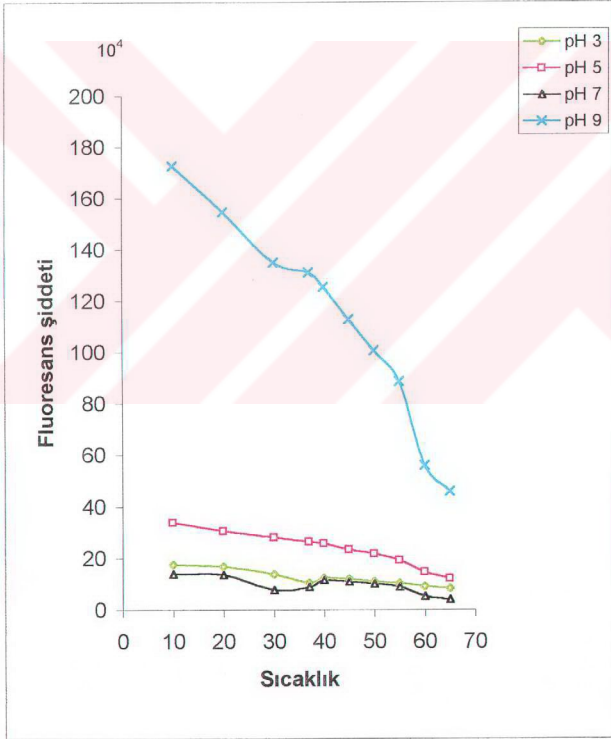
Şekil 3.21 Enzim/Polimer mol oranları 10,20,30 olan konjugatların ve enzim örneğinin farklı pH'lardaki aktivite tayini

pH	AKTİVİTE			AKTİVİTE Enzim örn.
	$n_{\text{parç}}/n_{\text{pol.}}$			
	10	20	30	
2,5	0	0	0	0
3	7,82	9,08	14,69	44,23
4	15,87	20,82	19,56	39,8
5	7,6	11,44	17,06	31,24
7	0	0	0	4,06



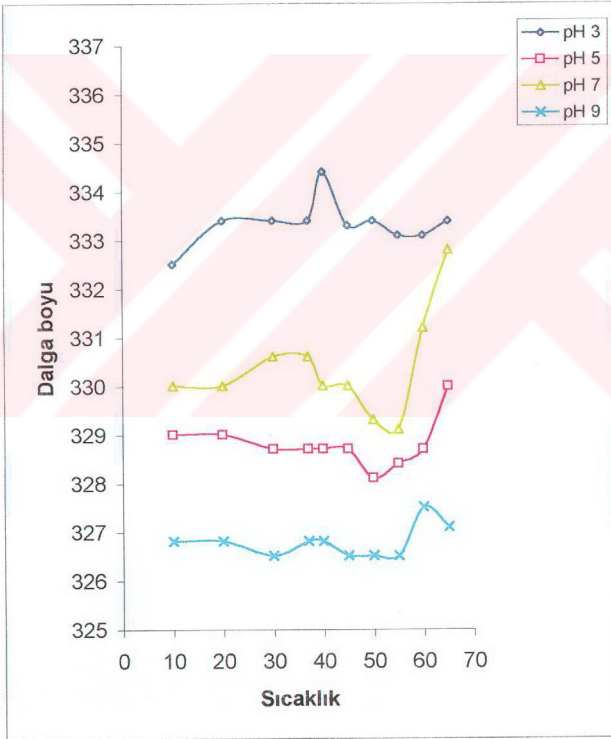
Şekil 3.22 Dializ edilen, enzim/polimer mol oranları 10,20,30 olan konjugatların ve enzim örneğinin farklı pH'lardaki aktivite tayini

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	17,33	33,53	13,81	172,4
20	16,42	30,32	13,44	154,4
30	13,55	27,87	7,591	134,6
37	10,13	26,08	8,819	130,8
40	12,04	25,41	11,56	125,2
45	11,69	23,05	10,87	112,4
50	10,63	21,44	9,924	100,4
55	9,975	18,91	8,778	88,32
60	8,816	14,45	5,126	55,73
65	8,111	11,9	3,98	45,81



Şekil 3.24 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(290nm uyarımda) farklı pH'larda,sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

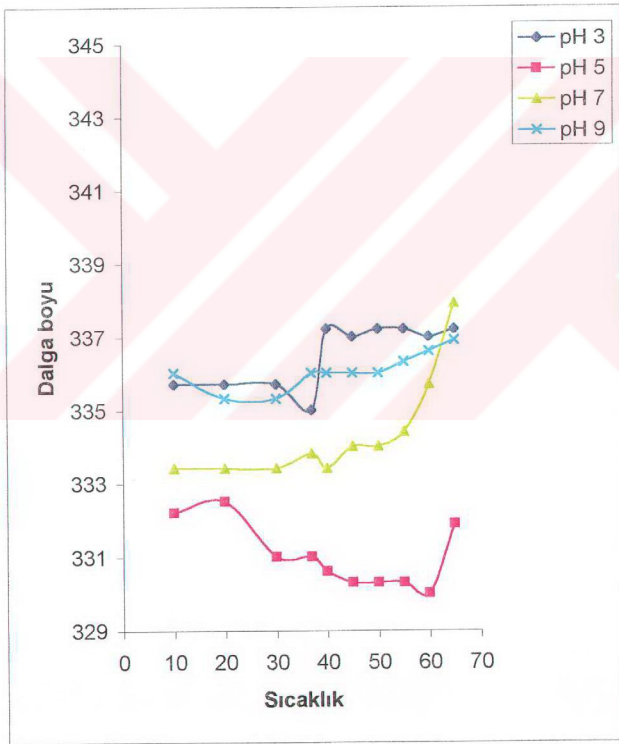
Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	332,5	329	330	326,8
20	333,4	329	330	326,8
30	333,4	328,7	330,6	326,5
37	333,4	328,7	330,6	326,8
40	334,4	328,7	330	326,8
45	333,3	328,7	330	326,5
50	333,4	328,1	329,3	326,5
55	333,1	328,4	329,1	326,5
60	333,1	328,7	331,2	327,5
65	333,4	330	332,8	327,1



Şekil 3.25 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(290nm uyarmada) farklı pH'larda, sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,max.noktadaki dalga boyundaki değişme

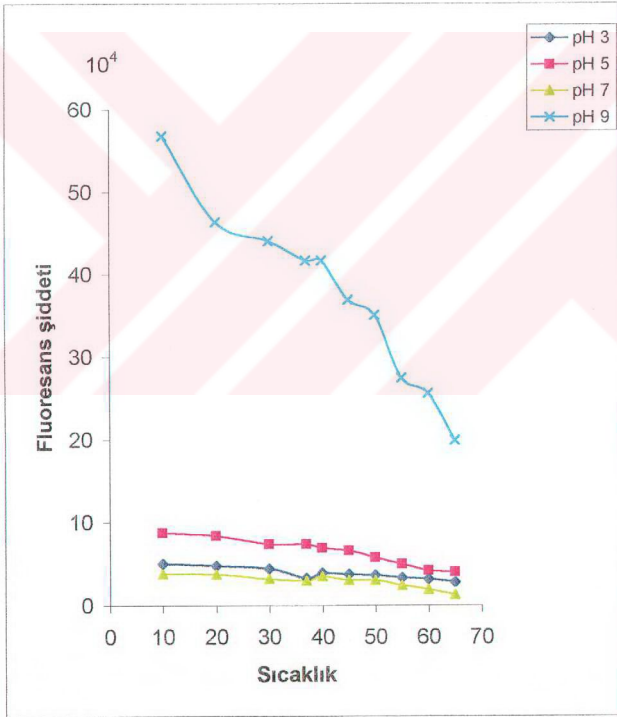


Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	335,7	332,2	333,4	336
20	335,7	332,5	333,4	335,3
30	335,7	331	333,4	335,3
37	335	331	333,8	336
40	337,2	330,6	333,4	336
45	337	330,3	334	336
50	337,2	330,3	334	336
55	337,2	330,3	334,4	336,3
60	337	330	335,7	336,6
65	337,2	331,9	337,9	336,9



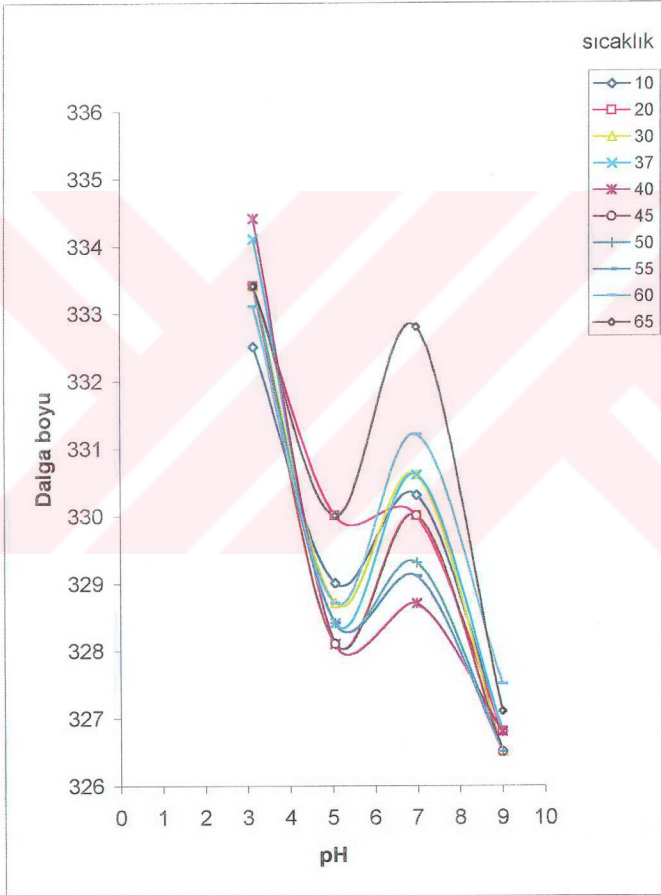
Şekil 3.26 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın(300nm uyarımda) farklı pH'larda, sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, mak.noktadaki dalga boyundaki değişme

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	4,937	8,69	3,703	56,68
20	4,685	8,312	3,662	46,28
30	4,332	7,273	3,089	43,92
37	3,224	7,273	2,884	41,56
40	3,829	6,801	3,416	41,56
45	3,678	6,518	2,925	36,84
50	3,577	5,668	2,925	34,95
55	3,275	4,912	2,311	27,39
60	3,123	4,155	1,864	25,5
65	2,72	3,967	1,247	19,84



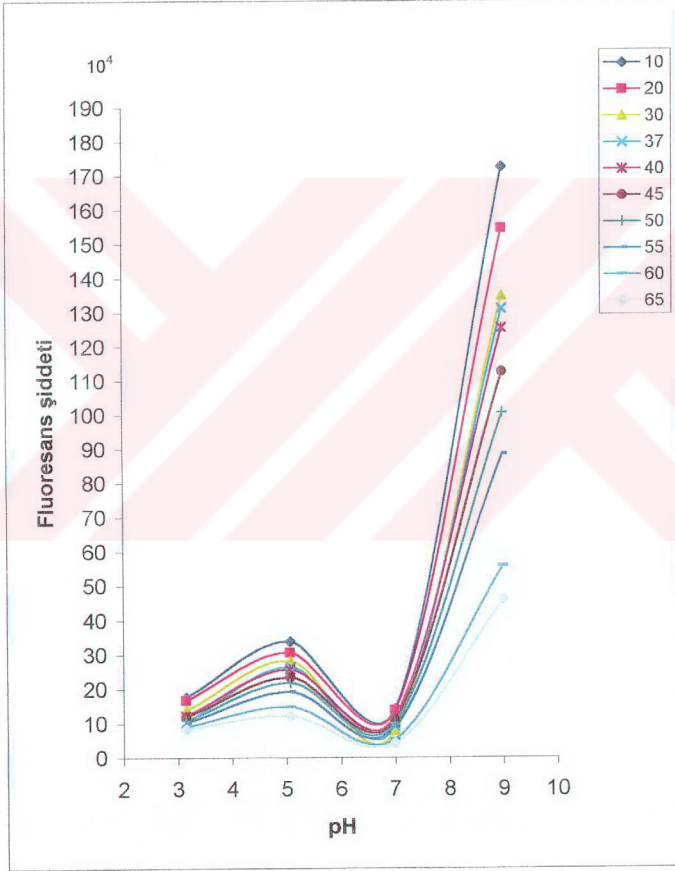
Şekil 3.27 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 300nm uyardırda) farklı pH'larda,sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları										
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	
3,16	332,5	333,4	333,4	334,1	334,4	333,4	333,4	333,4	333,1	333,1	333,4
5,08	329	330	328,7	328,4	328,1	328,1	328,4	328,4	328,4	328,7	330
7	330,3	330	330,6	330,6	328,7	330	329,3	329,1	331,2	331,2	332,8
9,01	326,8	326,8	326,5	326,8	326,8	326,5	326,5	326,5	327,5	327,5	327,1



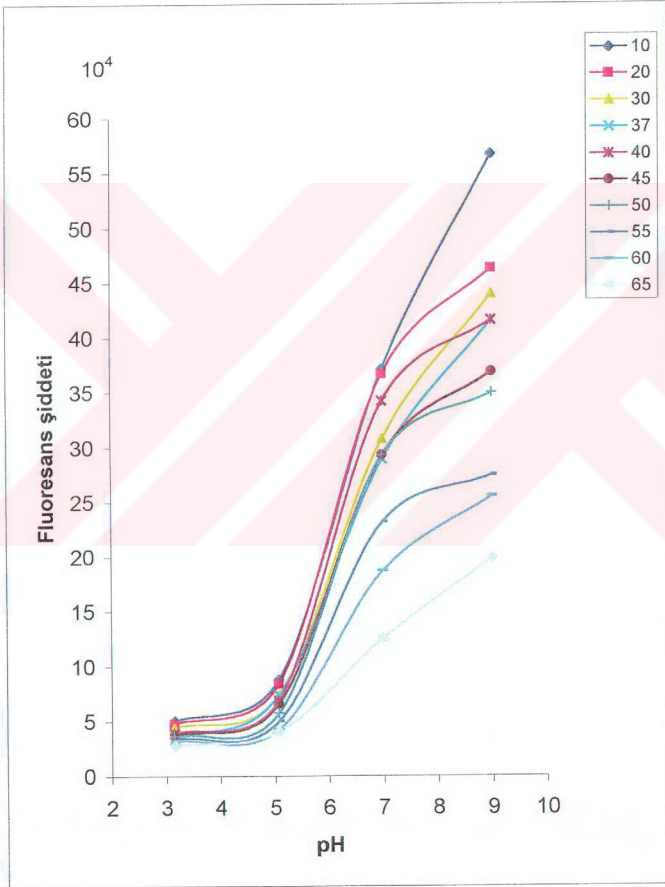
Şekil 3.28 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 290nm uyardırda) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoeresans spektrumlarında, maks. noktanın bulunduğu dalga boyundaki değişme

pH	Fluoresans şiddetleri									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	17,33	16,42	13,55	10,13	12,04	11,69	10,63	9,975	8,816	8,111
5,08	33,53	30,32	27,87	26,08	25,41	23,05	21,44	18,91	14,45	11,9
7	13,81	13,44	7,591	8,819	11,56	10,87	9,924	8,778	5,126	3,98
9,01	172,4	154,4	134,6	130,8	125,2	112,4	100,4	88,32	55,73	45,81



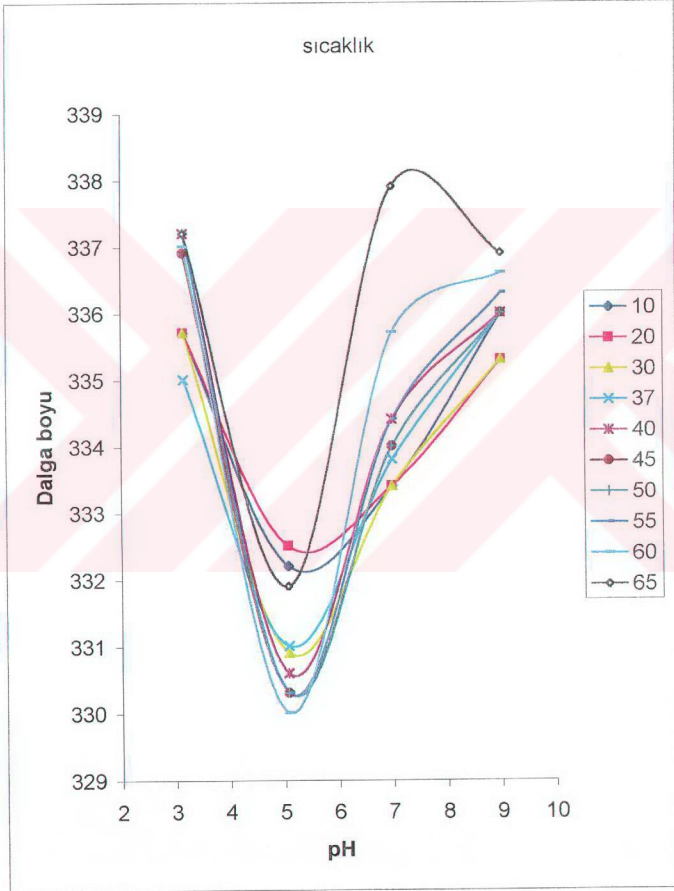
Şekil 3.29 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 290nm uyardırda) farklı sıcaklıklarda, pH değıştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, fluoresans şiddetlerinin değışimi

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	4,937	4,685	4,332	3,224	3,829	3,678	3,577	3,275	3,123	2,72
5,08	8,69	8,312	7,273	7,273	6,801	6,518	5,668	4,912	4,155	3,967
7	37,03	36,62	30,69	28,84	34,16	29,25	29,25	23,11	18,64	12,47
9,01	56,68	46,28	43,92	41,56	41,56	36,84	34,95	27,39	25,5	19,84



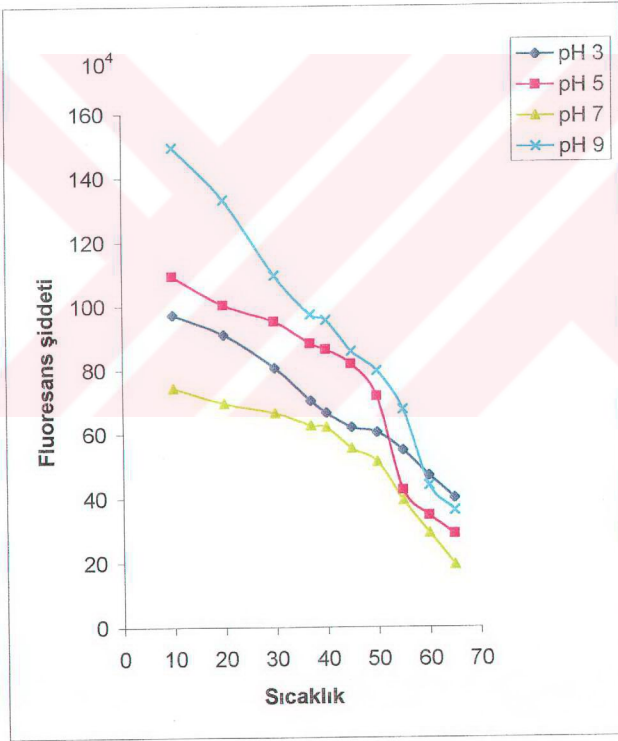
Şekil 3.30 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 300nm uyardırda) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	335,7	335,7	335,7	335	337,2	336,9	337,2	337,2	337	337,2
5,08	332,2	332,5	330,9	331	330,6	330,3	330,3	330,3	330	331,9
7	333,4	333,4	333,4	333,8	334,4	334	334	334,4	335,7	337,9
9,01	336	335,3	335,3	336	336	336	336	336,3	336,6	336,9



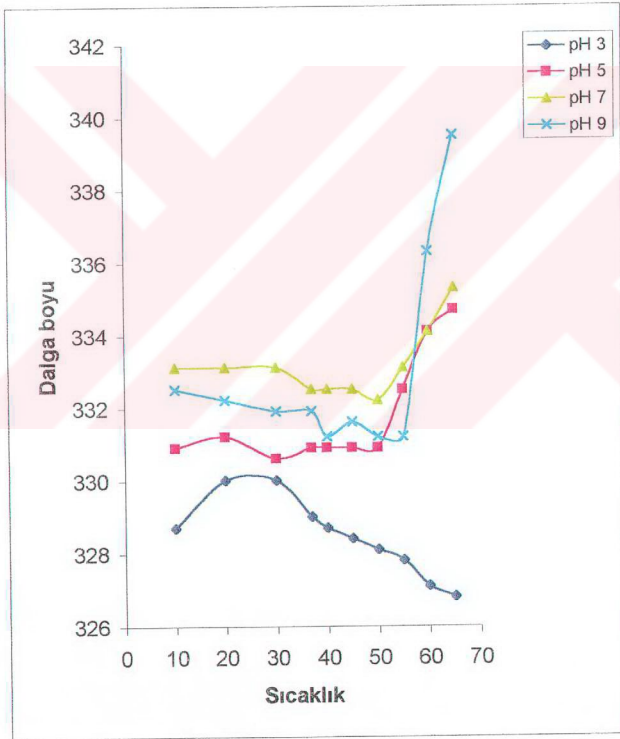
Şekil 3.31 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın (300nm uyarımda) farklı sıcaklıklarda pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, mak. noktanın bulunduğu dalga boyundaki değişme

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	97,07	109,1	74,16	149,4
20	90,72	100,1	69,32	133
30	80,4	94,91	66,3	109,3
37	70,09	87,96	62,47	97,01
40	66,39	86,15	61,86	95,37
45	61,89	81,61	55,21	85,55
50	60,3	71,64	51,18	79,41
55	54,75	42,32	39,09	67,54
60	46,81	34,46	29,02	43,8
65	39,94	28,72	19,14	36,02



Şekil 3.32 Enzim/Polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(290nm uyarmada) farklı pH'larda,sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

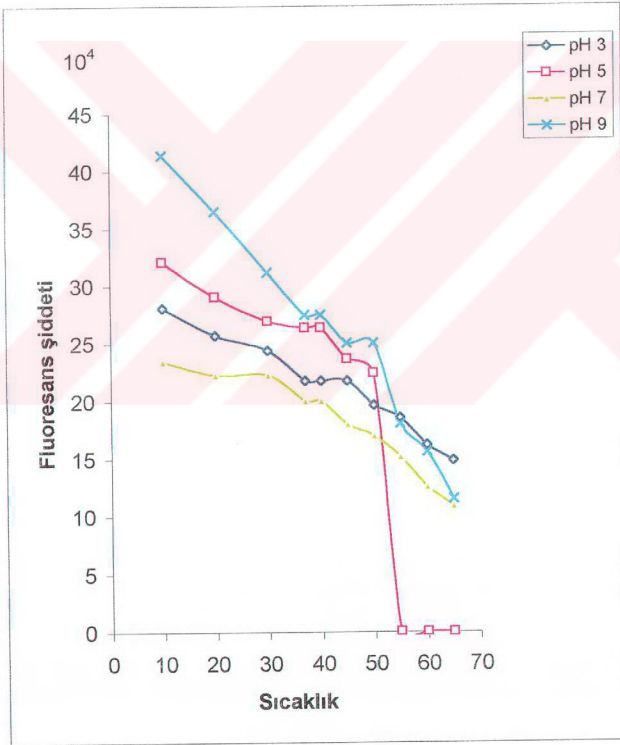
Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	328,7	330,9	333,1	332,5
20	330	331,2	333,1	332,2
30	330	330,6	333,1	331,9
37	329	330,9	332,5	331,9
40	328,7	330,9	332,5	331,2
45	328,4	330,9	332,5	331,6
50	328,1	330,9	332,2	331,2
55	327,8	332,5	333,1	331,2
60	327,1	334,1	334,1	336,3
65	326,8	334,7	335,3	339,5



Şekil 3.33 Enzim/Polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(290nm uyardmada) farklı pH'larda, sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluorensans spektrumlarında, mak.noktadaki dalga boyundaki değişme

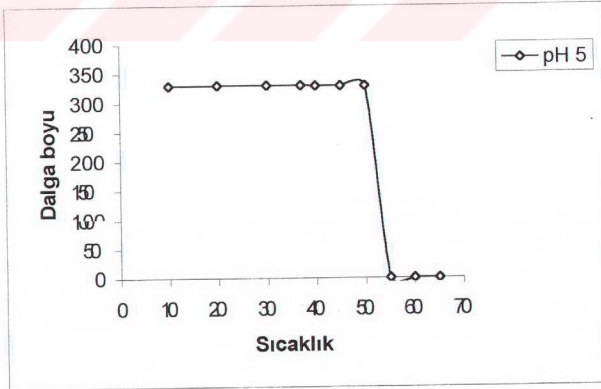
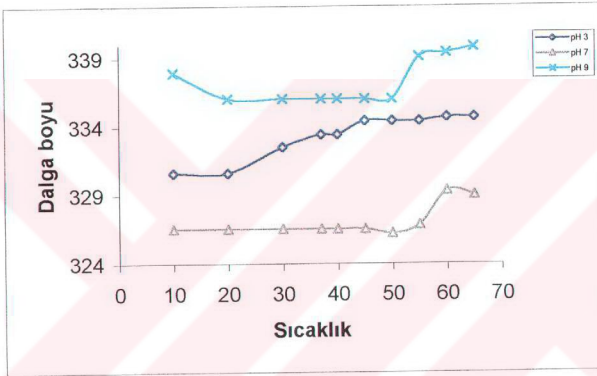


Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	28,04	32,04	23,38	41,34
20	25,65	29,02	22,17	36,43
30	24,33	26,9	22,17	31,11
37	21,69	26,3	19,95	27,42
40	21,69	26,3	19,95	27,42
45	21,69	23,58	17,93	24,97
50	19,57	22,37	16,93	24,97
55	18,51	0	15,11	18,01
60	16,13	0	12,49	15,55
65	14,81	0	10,88	11,46



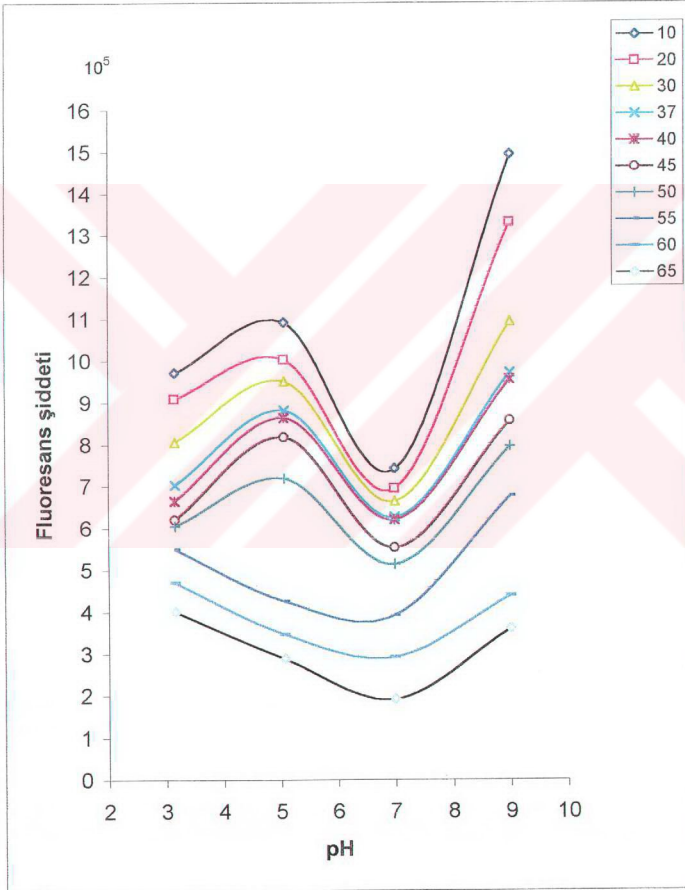
Şekil 3.34 Enzim/Polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(300nm uyarımda) farklı pH'larda,sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	330,6	329	326,5	337,9
20	330,6	329,7	326,5	336
30	332,5	329,7	326,5	336
37	333,4	329,7	326,5	336
40	333,4	329,3	326,5	336
45	334,4	329,3	326,5	336
50	334,4	329	326,2	336
55	334,4	0	326,8	339,1
60	334,7	0	329,3	339,4
65	334,7	0	329	339,8



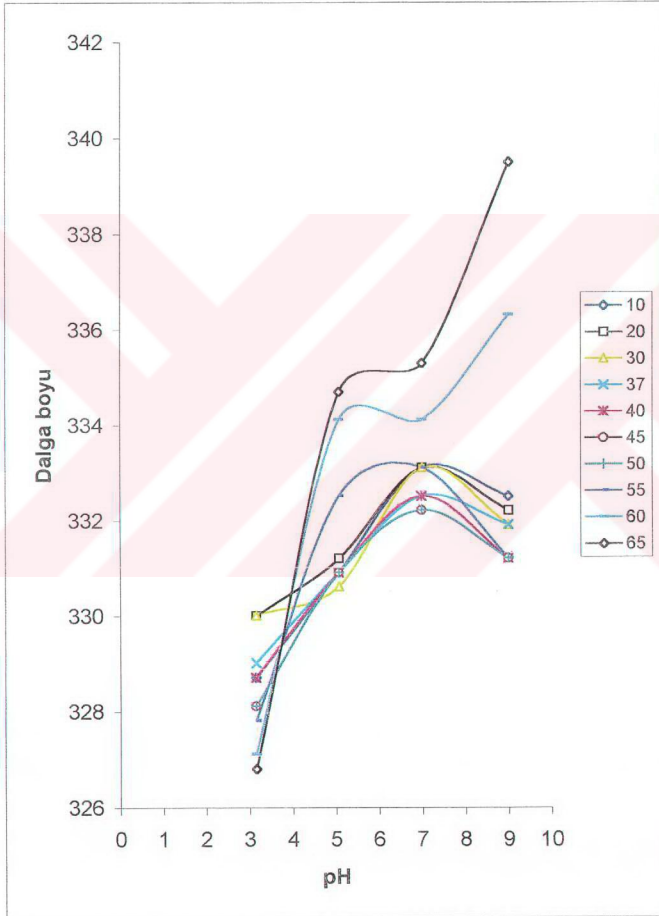
Şekil 3.35 Enzim/Polimer mol oranı 20 alınan konjugatın(300nm uyarmada) farklı pH'larda, sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,max.noktadaki

	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	9,707	9,072	8,04	7,009	6,639	6,189	6,03	5,475	4,681	3,994
5,08	10,91	10,01	9,491	8,796	8,615	8,161	7,164	4,232	3,446	2,872
7	7,416	6,932	6,63	6,247	6,186	5,521	5,118	3,909	2,902	1,914
9,01	14,94	13,3	10,93	9,701	9,537	8,555	7,941	6,754	4,38	3,602



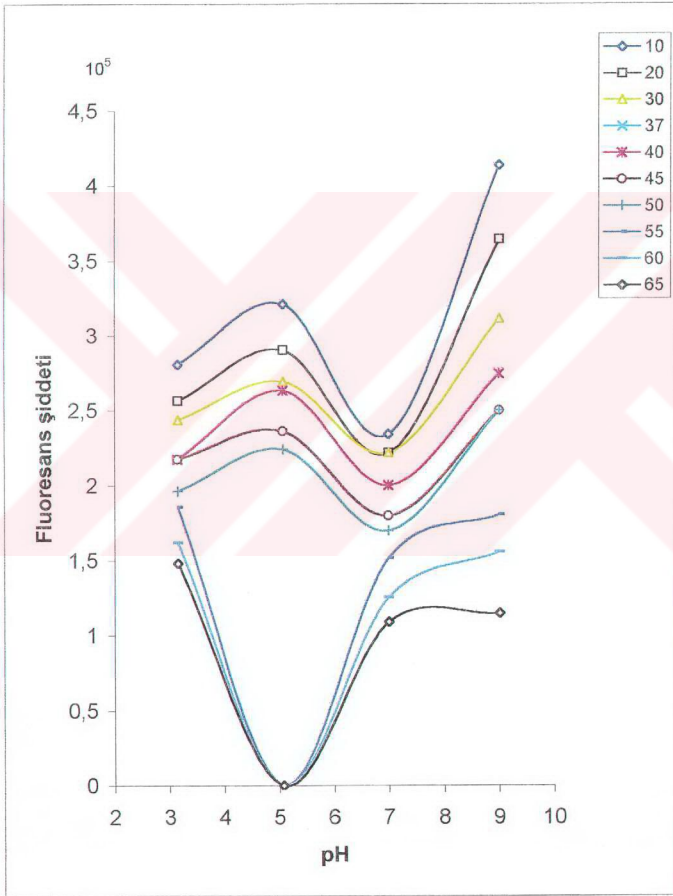
Şekil 3.36 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 290nm uyarımda) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	328,7	330	330	329	328,7	328,4	328,1	327,8	327,1	326,8
5,08	330,9	331,2	330,6	330,9	330,9	330,9	330,9	332,5	334,1	334,7
7	333,1	333,1	333,1	332,5	332,5	332,5	332,2	333,1	334,1	335,3
9,01	332,5	332,2	331,9	331,9	331,2	331,6	331,2	331,2	336,3	339,5



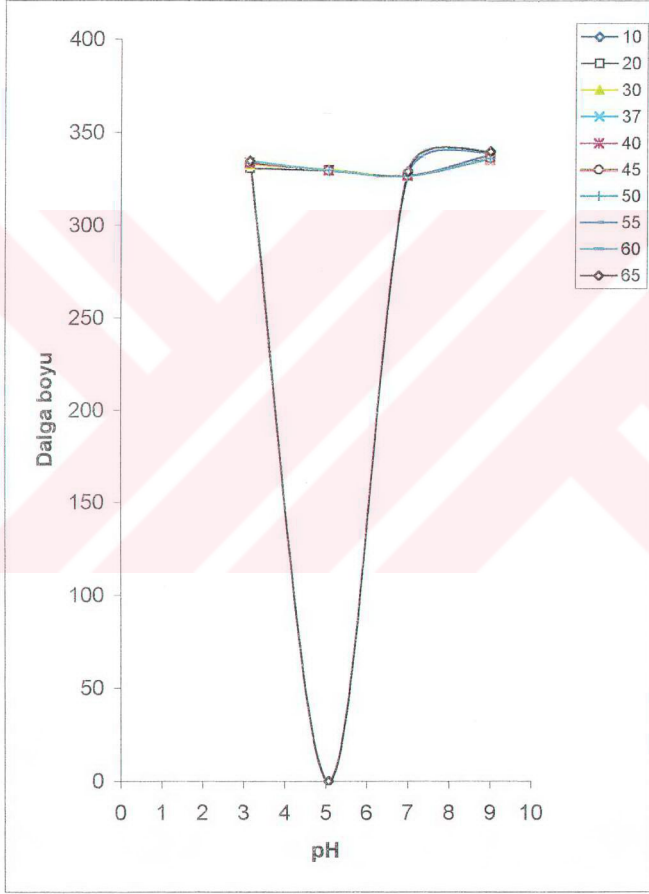
Şekil 3.37 Enzim/Polimer mol oranı 20 alınan konjugatın( 290nm uyarmada) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, mak. noktanın bulunduğu dalga boyundaki değişme

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	2,804	2,565	2,433	2,169	2,169	2,169	1,957	1,851	1,613	1,481
5,08	3,204	2,902	2,69	2,63	2,63	2,358	2,237	0	0	0
7	2,338	2,217	2,217	1,995	1,995	1,793	1,693	1,511	1,249	1,088
9,01	4,134	3,643	3,111	2,742	2,742	2,497	2,497	1,801	1,555	1,146



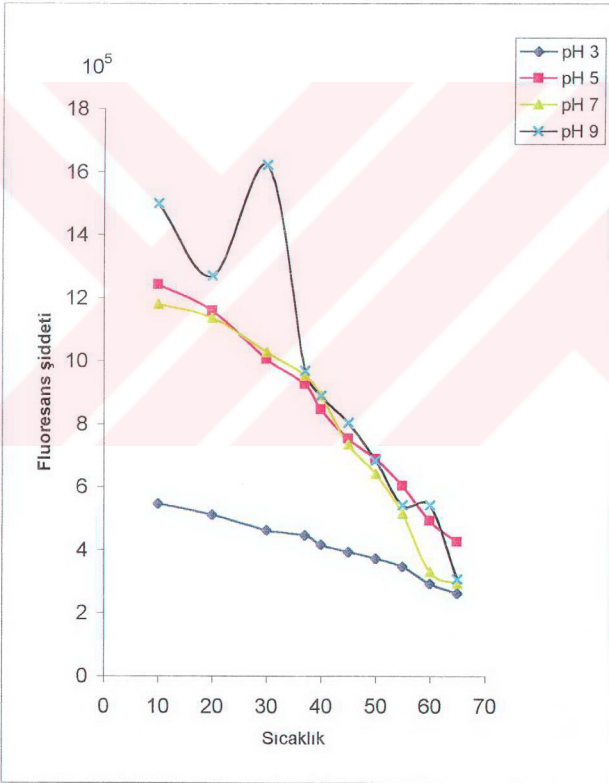
Şekil 3.38 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 300nm uyarımda) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	330,6	330,6	332,5	333,4	333,4	333,4	334,4	334,4	334,7	334,7
5,08	329	329,7	329,7	329,3	329,3	329,3	329,3	0	0	0
7	326,5	326,5	326,5	326,5	326,5	326,5	326,2	326,8	329,3	329
9,01	337,9	336	336	336	336	336	336	339,1	339,4	339,8



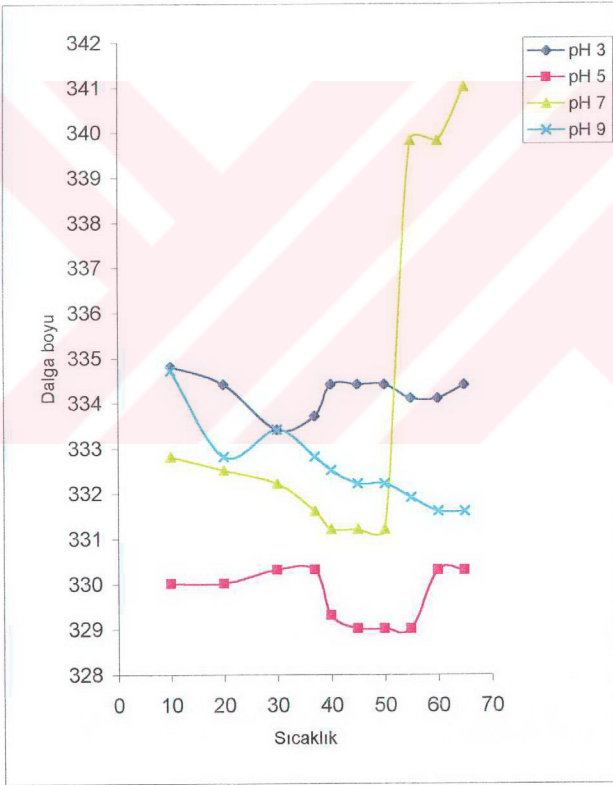
Şekil 3.39 Enzim/Polimer mol oranı 10 alınan konjugatın( 300nm uyarmada) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, mak. noktanın bulunduğu dalga boyundaki değişme

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	5,446	12,4	11,78	14,98
20	5,098	11,57	11,34	12,69
30	4,606	10,04	10,26	16,2
37	4,446	9,247	9,509	9,66
40	4,142	8,451	8,879	8,882
45	3,911	7,516	7,336	8,023
50	3,708	6,892	6,392	6,836
55	3,462	6,026	5,132	5,403
60	2,911	4,918	3,275	5,403
65	2,616	4,26	2,928	3,07



Şekil 3.40 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(290nm uyarımda) farklı pH'larda,sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoescans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

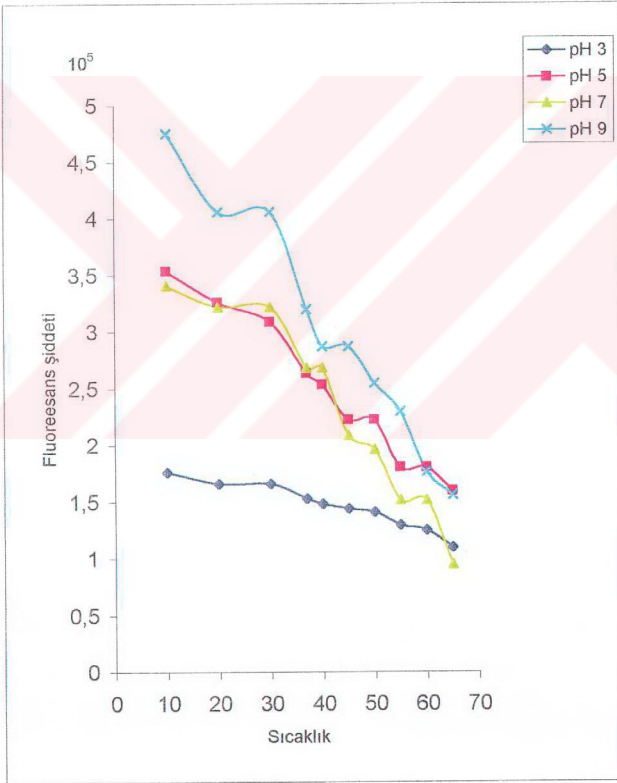
Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	334,8	330	332,8	334,7
20	334,4	330	332,5	332,8
30	333,4	330,3	332,2	333,4
37	333,7	330,3	331,6	332,8
40	334,4	329,3	331,2	332,5
45	334,4	329	331,2	332,2
50	334,4	329	331,2	332,2
55	334,1	329	339,8	331,9
60	334,1	330,3	339,8	331,6
65	334,4	330,3	341	331,6



Şekil 3.41 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(290nm uyarımda) farklı pH'larda, sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, mak.noktadaki dalga boyundaki değişme

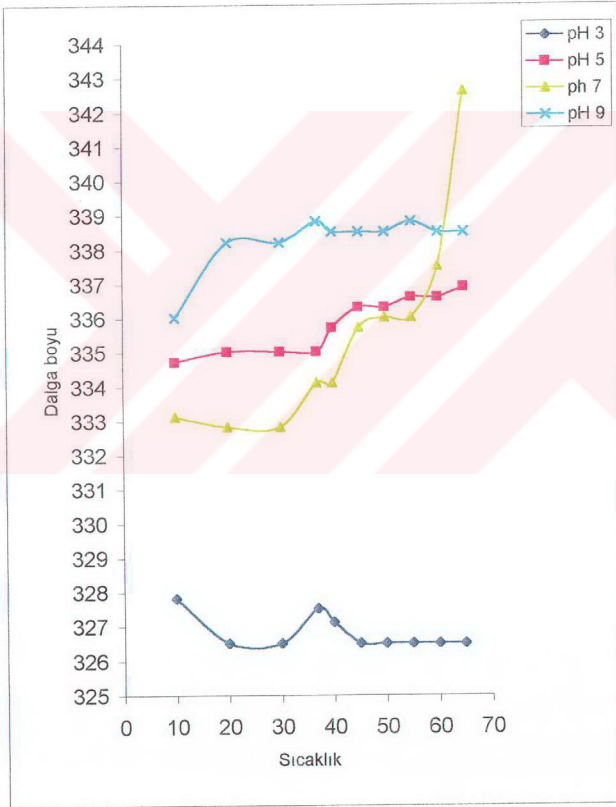


Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	1,753	3,533	3,401	4,748
20	1,651	3,256	3,212	4,052
30	1,651	3,082	3,212	4,052
37	1,521	2,632	2,676	3,193
40	1,477	2,528	2,676	2,865
45	1,434	2,217	2,078	2,865
50	1,405	2,217	1,956	2,538
55	1,289	1,801	1,511	2,292
60	1,246	1,801	1,511	1,76
65	1,095	1,593	0,944	1,555



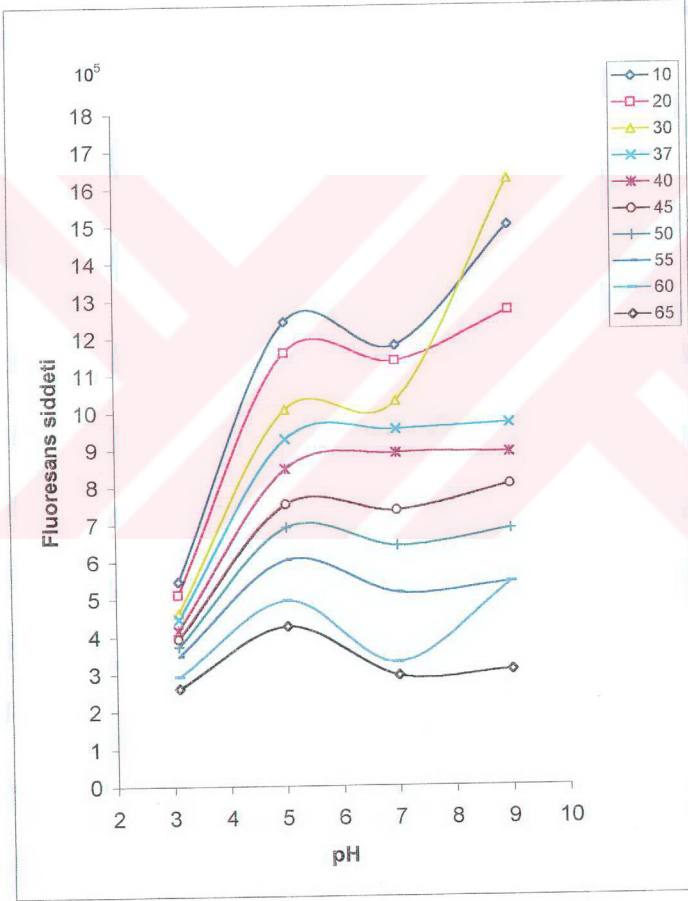
Şekil 3.42 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın( 300nm uyarımda) farklı pH'larda,sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	327,8	334,7	333,1	336
20	326,5	335	332,8	338,2
30	326,5	335	332,8	338,2
37	327,5	335	334,1	338,8
40	327,1	335,7	334,1	338,5
45	326,5	336,3	335,7	338,5
50	326,5	336,3	336	338,5
55	326,5	336,6	336	338,8
60	326,5	336,6	337,5	338,5
65	326,5	336,9	342,6	338,5



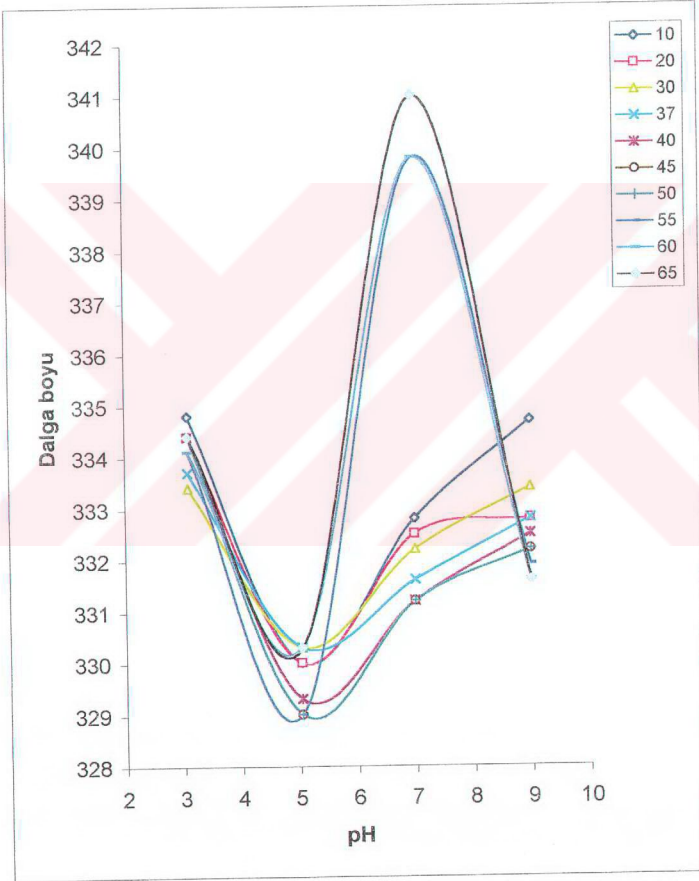
Şekil 3.43 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın(300nm uyarımda) farklı pH'larda, sıcaklık değiştirilerek alınan 'steady-state' fluorensans spektrumlarında,mak.noktadaki dalga boyundaki değişme

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	5,446	5,098	4,808	4,446	4,142	3,911	3,708	3,462	2,911	2,616
5,04	12,4	11,57	10,04	9,247	8,451	7,516	6,892	6,026	4,918	4,26
7	11,76	11,34	10,26	9,509	8,879	7,336	6,392	5,132	3,275	2,928
9	14,98	12,69	16,2	9,66	8,882	8,023	6,836	5,403	5,403	3,07



Şekil 3.44 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın( 290nm uyarımda) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,fluoresans şiddetlerinin değişimi

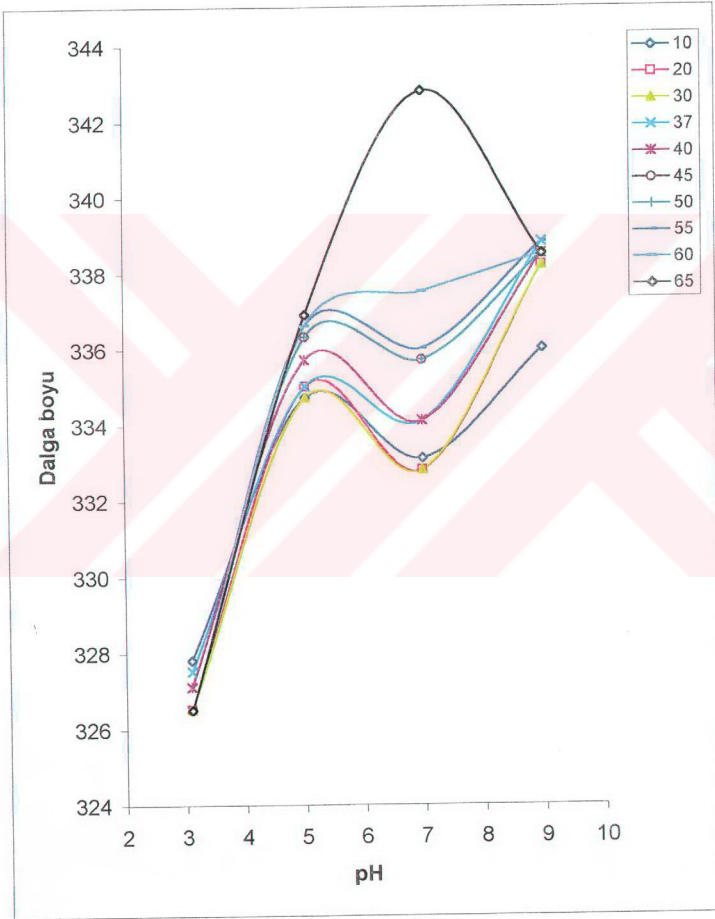
pH	Max. Noktadaki Dalga boyları										
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	
3,1	334,8	334,4	333,4	333,7	334,4	334,4	334,4	334,4	334,1	334,1	334,4
5,04	330	330	330,3	330,3	329,3	329	329	329	329	330,3	330,3
7	332,8	332,5	332,2	331,6	331,2	331,2	331,2	339,8	339,8	341	341
9	334,7	332,8	333,4	332,8	332,5	332,2	332,2	331,9	331,6	331,6	331,6



Şekil 3.45 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın( 290nm uyardırma) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında, mak. noktanın bulunduğu dalga boyundaki değişme

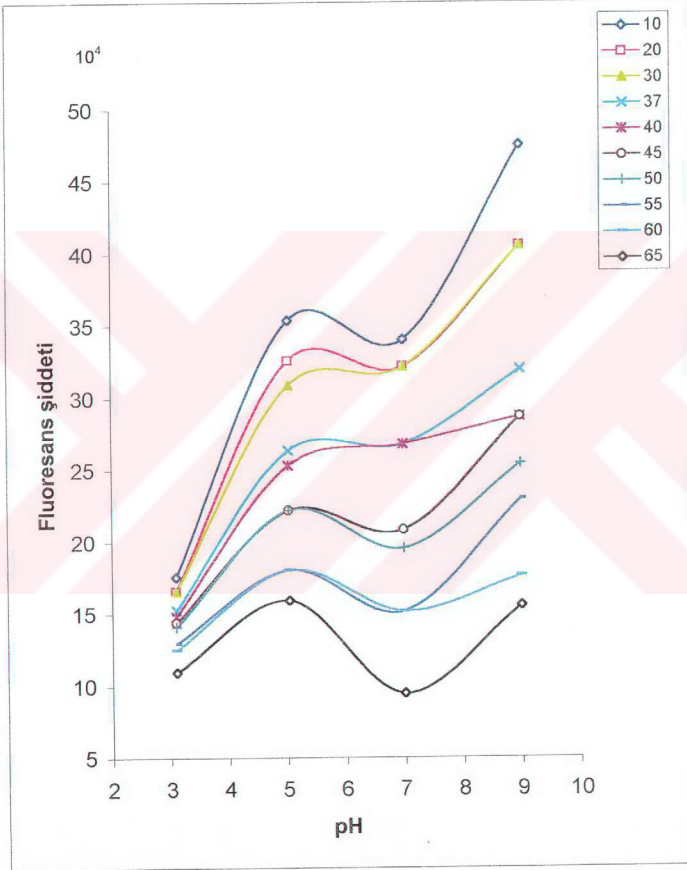
## Max. Noktadaki Dalga boyları

pH	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	327,8	326,5	326,5	327,5	327,1	326,5	326,5	326,5	326,5	326,5
5,04	334,7	335	334,7	335	335,7	336,3	336,3	336,6	336,6	336,9
7	333,1	332,8	332,8	334,1	334,1	335,7	336	336	337,5	342,8
9	336	338,2	338,2	338,8	338,5	338,5	338,5	338,8	338,5	338,5



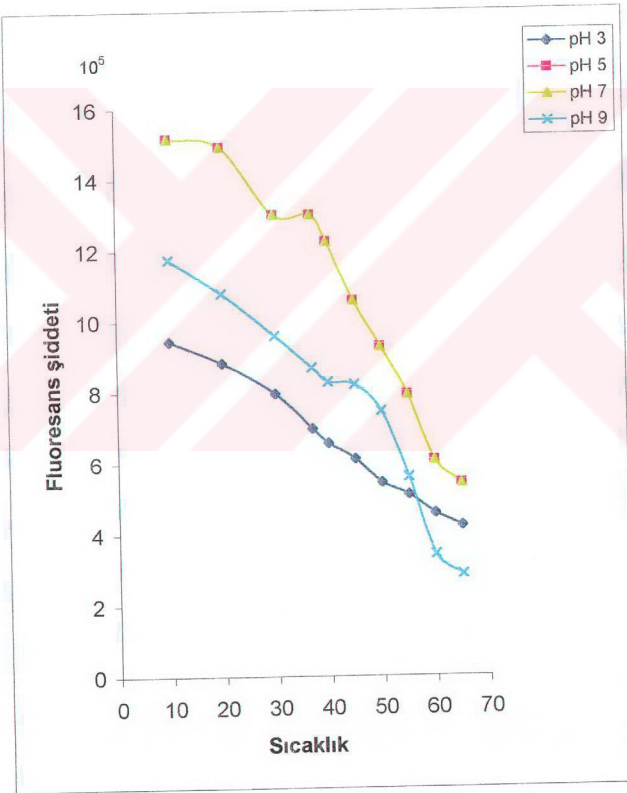
Şekil 3.46 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın( 300nm uyarmada) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoresans spektrumlarında,mak. noktanın bulunduğu dalga boyundaki değişme

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	17,53	16,51	16,51	15,21	14,77	14,34	14,05	12,89	12,46	10,95
5,04	35,33	32,56	30,82	26,32	25,28	22,17	22,17	18,01	18,01	15,93
7	34,01	32,12	32,12	26,76	26,76	20,78	19,52	15,11	15,11	9,446
9	47,48	40,52	40,52	31,93	28,65	28,65	25,38	22,92	17,6	15,55



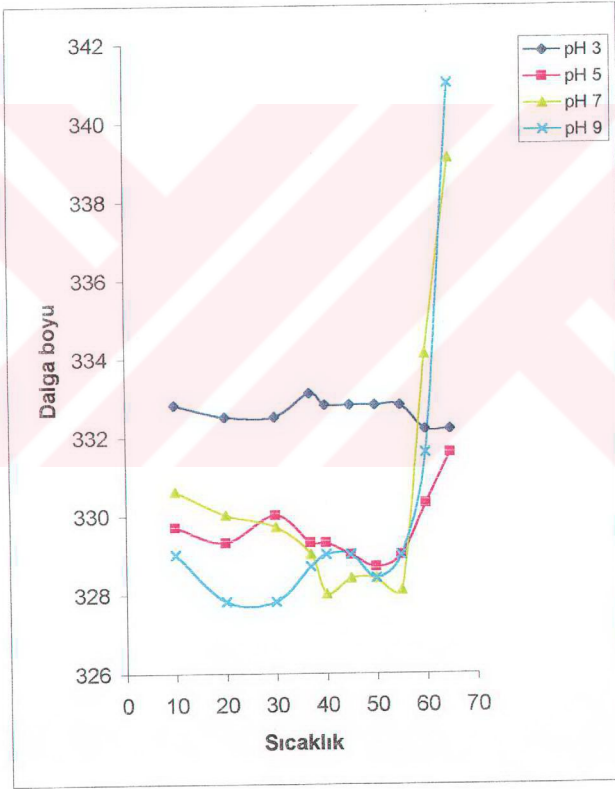
Şekil 3.47 Enzim/Polimer mol oranı 30 alınan konjugatın( 300nm uyarımda) farklı sıcaklıklarda, pH değiştirilerek alınan 'steady-state' fluoerans spektrumlarında, fluoerans şiddetlerinin değişimi

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	9,421	15,14	14,69	11,74
20	8,806	14,9	13,84	10,77
30	7,935	12,98	12,32	9,572
37	6,952	12,98	11,89	8,659
40	6,542	12,22	11,21	8,249
45	6,096	10,56	10,06	8,186
50	5,416	9,251	8,894	7,431
55	5,088	7,9	7,786	5,573
60	4,559	6,058	5,32	3,401
65	4,207	5,403	3,657	2,834



Şekil 3.48 Farklı pH'larda 10 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının( 290nm uyarımda) sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

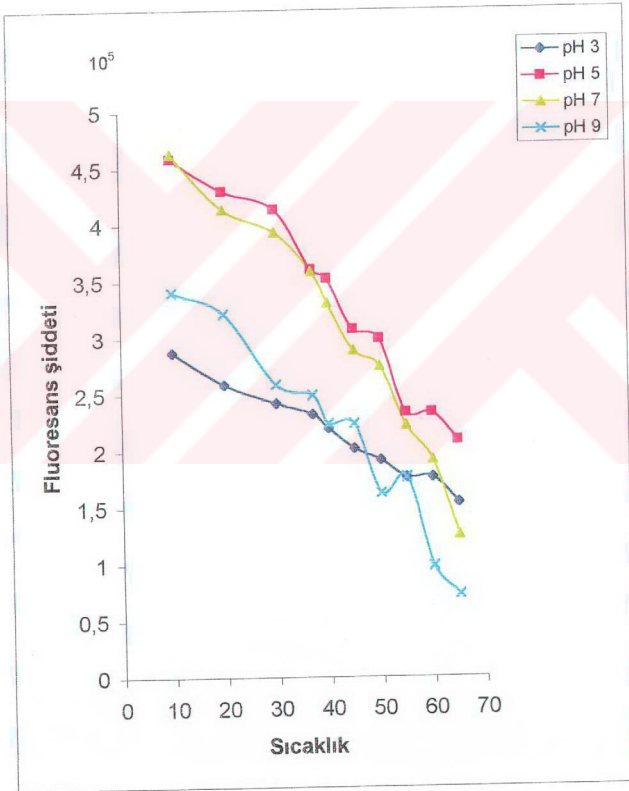
Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	332,8	329,7	330,6	329
20	332,5	329,3	330	327,8
30	332,5	330	329,7	327,8
37	333,1	329,3	329	328,7
40	332,8	329,3	328	329
45	332,8	329	328,4	329
50	332,8	328,7	328,4	328,4
55	332,8	329	328,1	329
60	332,2	330,3	334,1	331,6
65	332,2	331,6	339,1	341



Şekil 3.49 Farklı pH'larda 10 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının(290nm uyarmada) sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

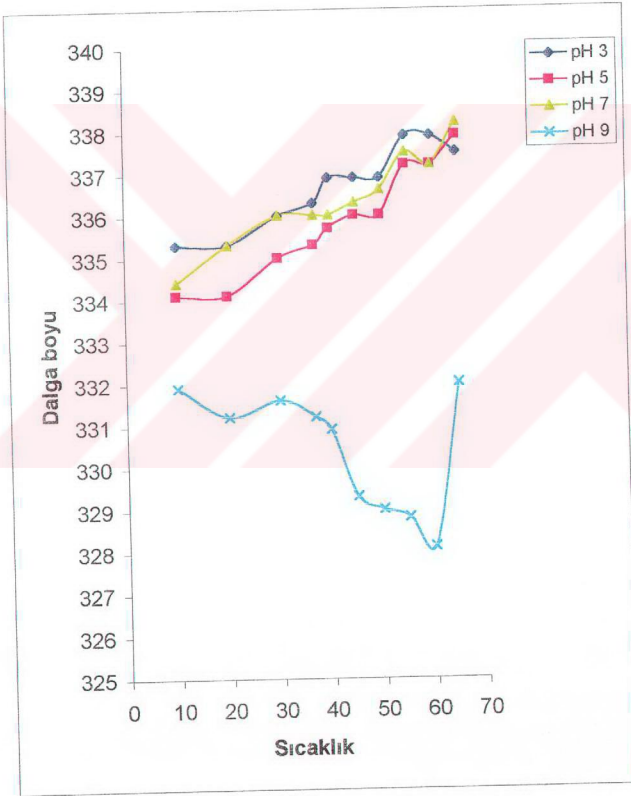


Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	2,872	4,584	4,625	3,401
20	2,584	4,298	4,134	3,212
30	2,418	4,134	3,929	2,582
37	2,317	3,602	3,58	2,487
40	2,192	3,52	3,301	2,236
45	2,015	3,07	2,882	2,236
50	1,914	2,988	2,743	1,621
55	1,763	2,333	2,217	1,763
60	1,763	2,333	1,912	0,976
65	1,537	2,088	1,247	0,724



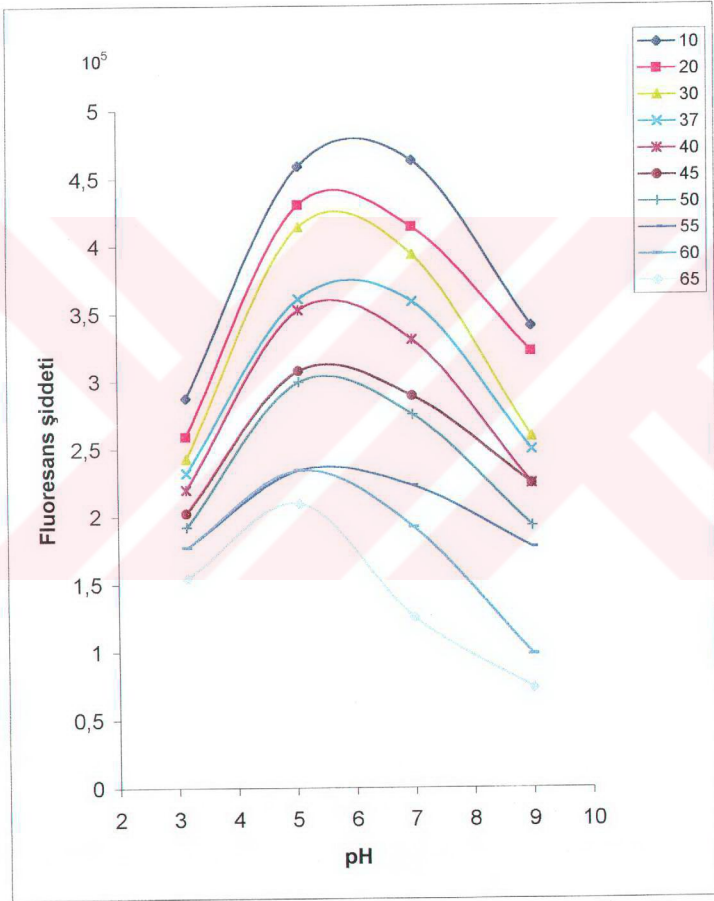
Şekil 3.50 Farklı pH'larda 10 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının( 300nm uyarımda) sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	335,3	334,1	334,4	331,9
20	335,3	334,1	335,3	331,2
30	336	335	336	331,6
37	336,3	335,3	336	331,2
40	336,9	335,7	336	330,9
45	336,9	336	336,3	329,3
50	336,9	336	336,6	329
55	337,9	337,2	337,5	328,8
60	337,9	337,2	337,2	328,1
65	337,5	337,9	338,2	332



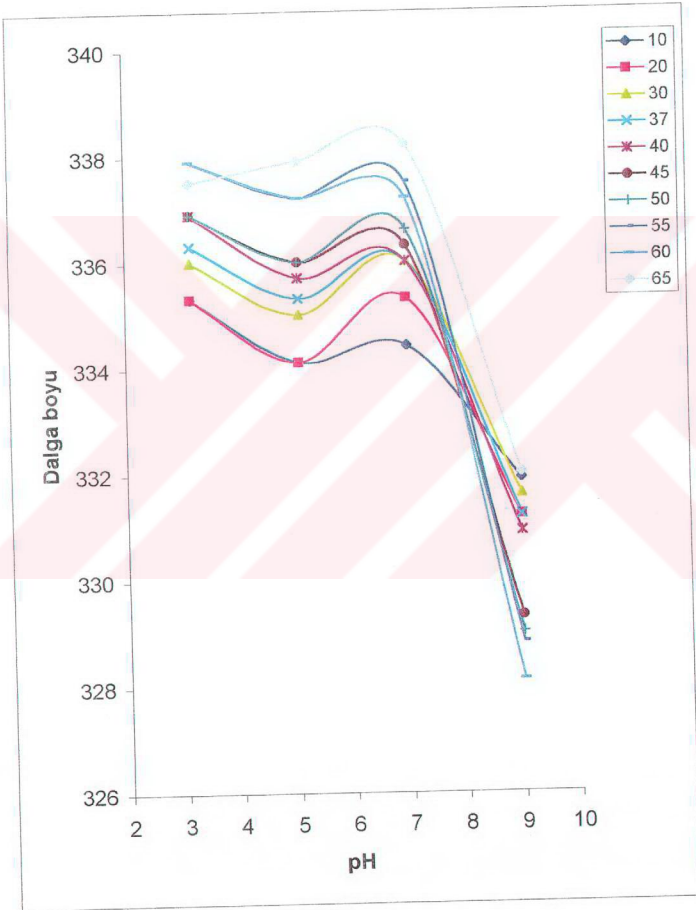
Şekil 3.51 Farklı pH'larda 10 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının(300nm uyarında) sıcaklık ile max.noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotrometreden yararlanarak)

pH	Fluoresans şiddetleri									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	2,872	2,584	2,418	2,317	2,192	2,015	1,914	1,763	1,763	1,537
5,08	4,584	4,298	4,134	3,602	3,52	3,07	2,988	2,333	2,333	2,088
7	4,625	4,134	3,929	3,58	3,301	2,882	2,743	2,217	1,912	1,247
9,01	3,401	3,212	2,582	2,487	2,236	2,236	1,921	1,763	0,976	0,724



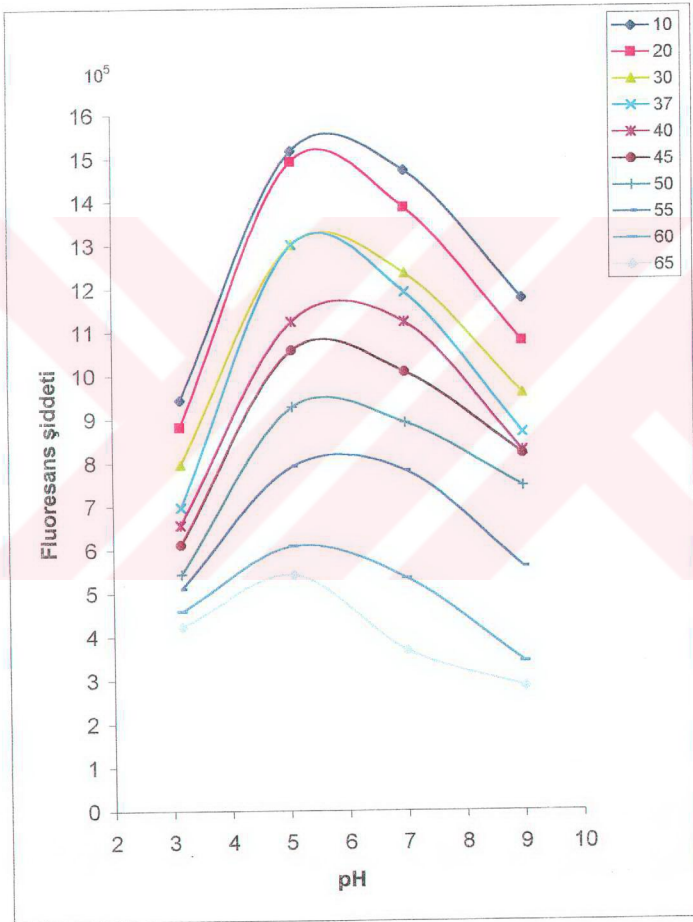
Şekil 3.52 Değişen sıcaklık değerlerinde, 10 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (300nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları										
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	
3,16	335,3	335,3	336	336,3	336,9	336,9	336,9	337,9	337,9	337,5	
5,08	334,1	334,1	335	335,3	335,7	336	336	337,2	337,2	337,9	
7	334,4	335,3	336	336	336	336,3	336,6	337,5	337,2	338,2	
9,01	331,9	331,2	331,6	331,2	330,9	329,3	329	328,8	328,1	332	



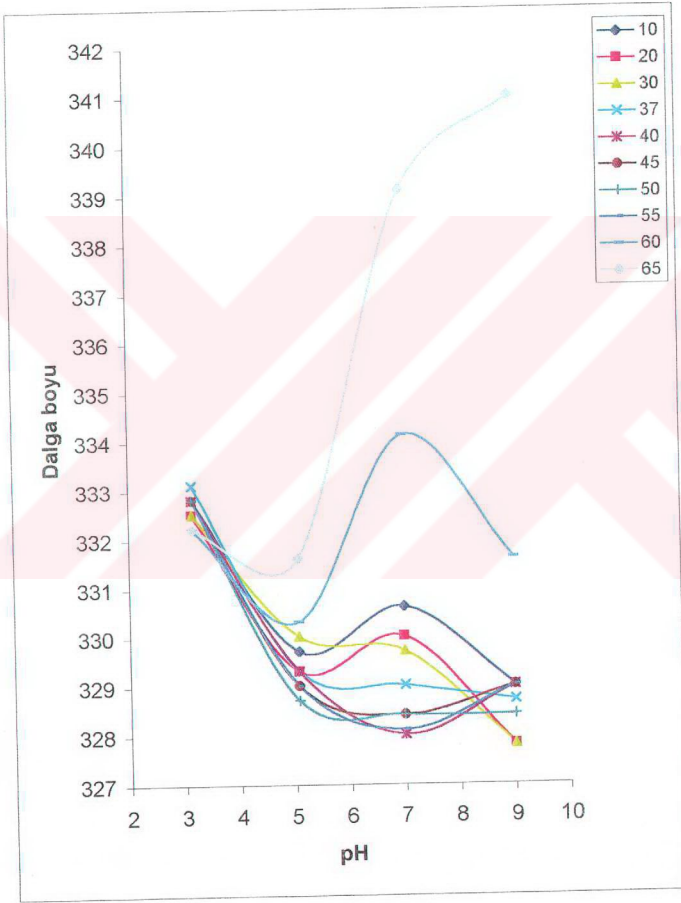
Şekil 3.55 Değişen sıcaklık değerlerinde,diyazirli enzim-polimer konjugatlarının(300nm uyardıma) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değışimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	9,421	8,806	7,935	6,952	6,549	6,096	5,416	5,088		4,559
5,08	15,14	14,9	12,98	12,98	11,22	10,56	9,251	7,9		6,058
7	14,69	13,84	12,32	11,89	11,21	10,06	8,894	7,786		5,32
9,01	11,74	10,77	9,572	8,659	8,249	8,186	7,431	5,573		3,401



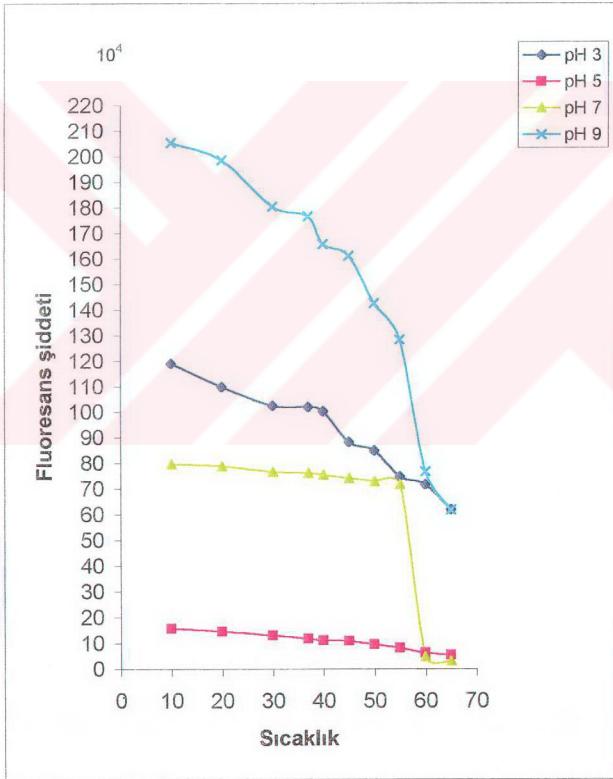
Şekil 3.54 Değişen sıcaklık değerlerinde,diyализli enzim-polimer konjugatlarının(290nm uyardmada) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofometreden yararlanarak)

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları										
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	
3,16	332,8	332,5	332,5	333,1	332,8	332,8	332,8	332,8	332,8	332,2	332,2
5,08	329,7	329,3	330	329,3	329,3	329	328,7	329	330,3	331,6	331,6
7	330,6	330	329,7	329	328	328,4	328,4	328,1	334,1	339,1	339,1
9,01	329	327,8	327,8	328,7	329	329	328,4	329	331,6	341	341



Şekil 3.55 Değişen sıcaklık değerlerinde, diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (290nm uyarımda) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

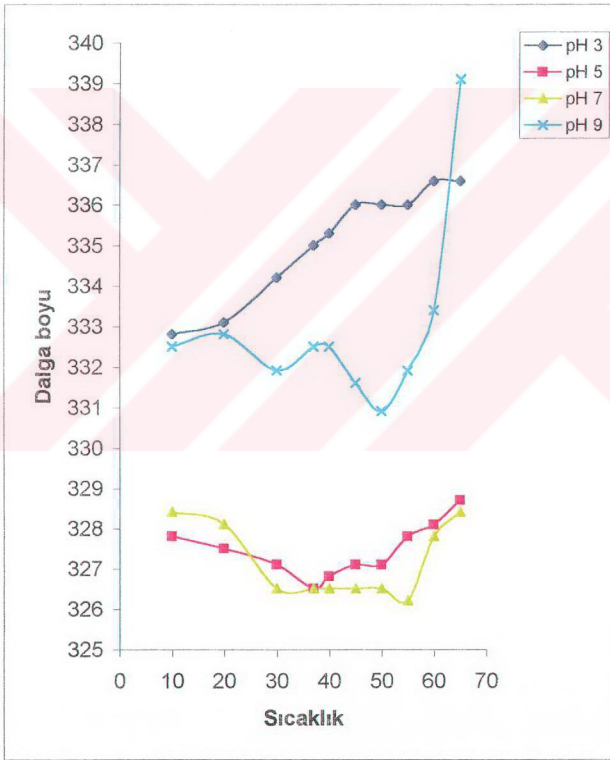
Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	118,7	15,52	79,35	205,2
20	109,6	14,28	78,52	198,4
30	102,2	12,78	76,38	180,2
37	101,7	11,51	75,95	176,3
40	100	10,89	75,2	165,5
45	88,11	10,71	73,97	161
50	84,79	9,301	72,79	142,3
55	74,53	7,979	71,62	128,1
60	71,49	6,171	4,637	76,51
65	61,86	5,378	3,085	61,78



Şekil 3.56 Farklı pH'larda 20 oranındaki diyazilzi enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi ( 290nm uyarımda) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)



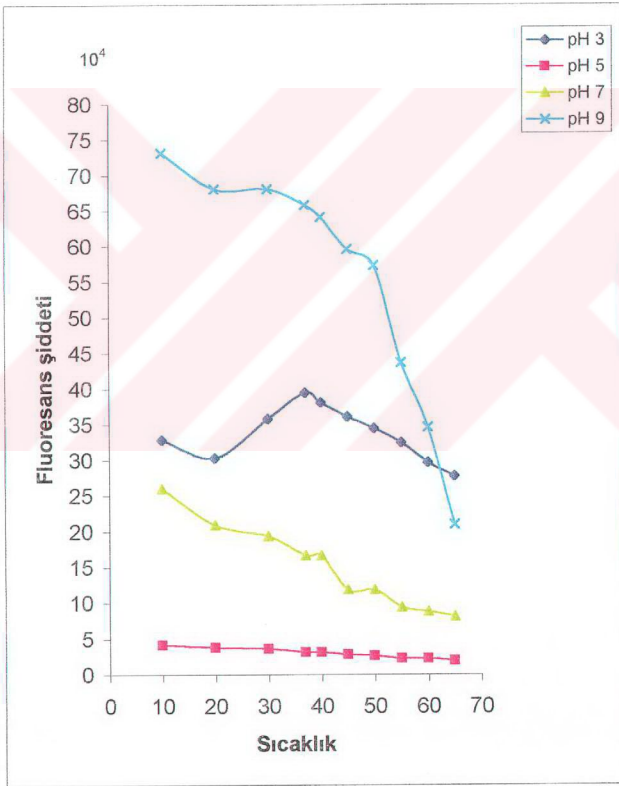
Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	332,8	327,8	328,4	332,5
20	333,1	327,5	328,1	332,8
30	334,2	327,1	326,5	331,9
37	335	326,5	326,5	332,5
40	335,3	326,8	326,5	332,5
45	336	327,1	326,5	331,6
50	336	327,1	326,5	330,9
55	336	327,8	326,2	331,9
60	336,6	328,1	327,8	333,4
65	336,6	328,7	328,4	339,1



Şekil 3.57 Farklı pH'larda 20 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (290nm uyarda) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

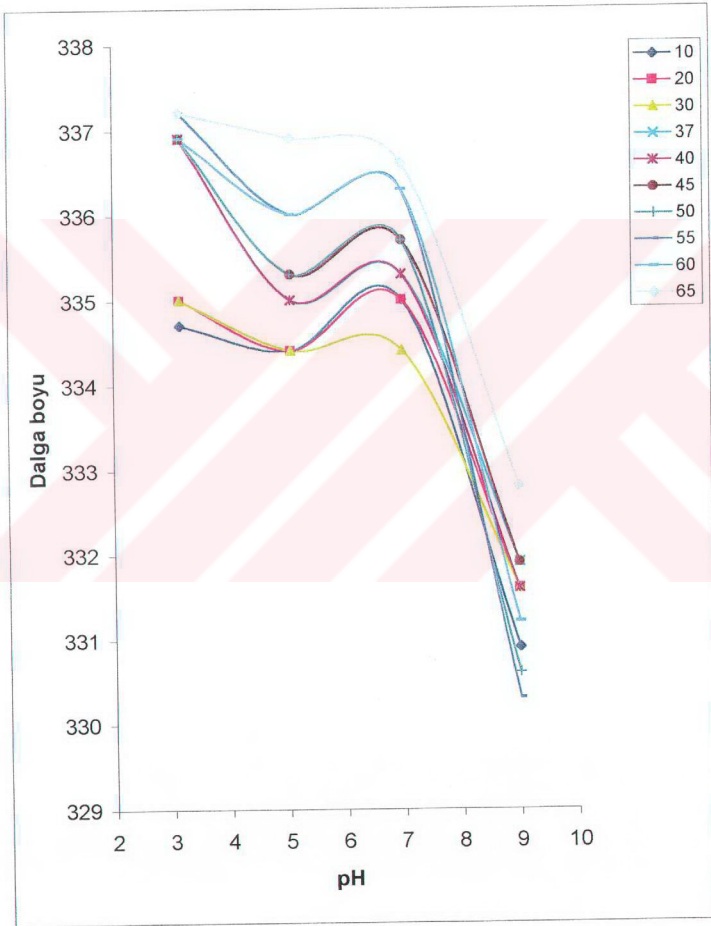


Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	32,75	4,055	25,92	73,11
20	30,23	3,747	20,85	68,01
30	35,68	3,526	19,24	68,01
37	39,35	3,042	16,57	65,74
40	37,96	3,042	16,57	64,04
45	36,02	2,777	11,75	59,51
50	34,36	2,601	11,75	57,24
55	32,42	2,204	9,372	43,64
60	29,65	2,203	8,783	34,57
65	27,75	1,94	8,088	20,97



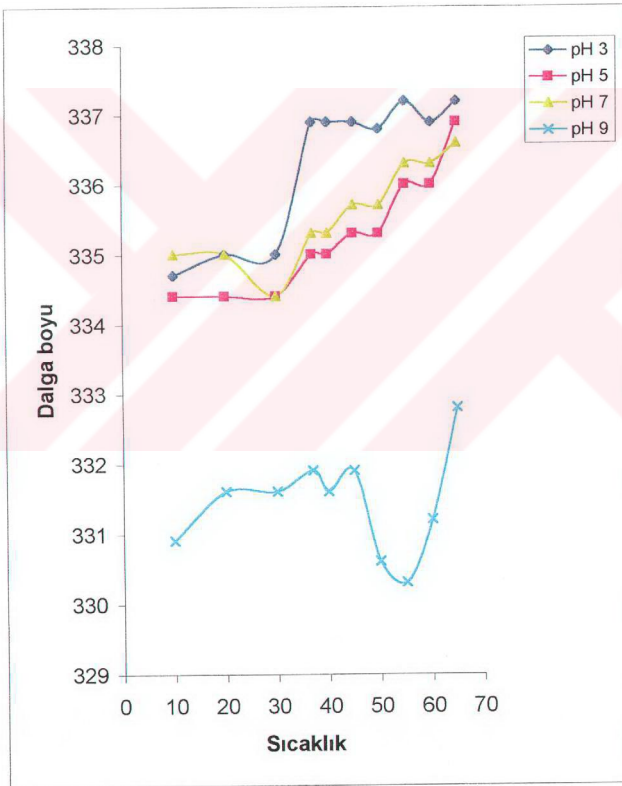
Şekil 3. 58Farklı pH'larda 20 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi ( 300nm uyarımda) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	334,7	335	335	336,9	336,9	336,9	336,9	337,2	336,9	337,2
5,08	334,4	334,4	334,4	335	335	335,3	335,3	336	336	336,9
7	335	335	334,4	335,3	335,3	335,7	335,7	336,3	336,3	336,6
9,01	330,9	331,6	331,6	331,9	331,6	331,9	330,6	330,3	331,2	332,8



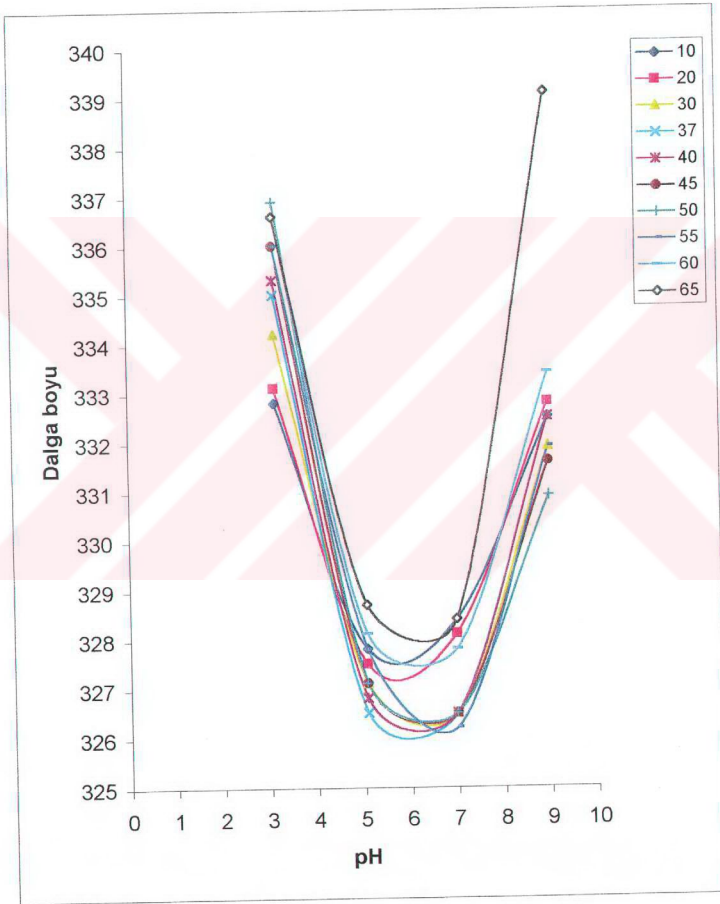
Şekil 3.59 Değişen sıcaklık değerlerinde, 20 oranındaki diyazilzi enzim-polimer konjugatlarının (300nm uyarımda) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	334,7	334,4	335	330,9
20	335	334,4	335	331,6
30	335	334,4	334,4	331,6
37	336,9	335	335,3	331,9
40	336,9	335	335,3	331,6
45	336,9	335,3	335,7	331,9
50	336,8	335,3	335,7	330,6
55	337,2	336	336,3	330,3
60	336,9	336	336,3	331,2
65	337,2	336,9	336,6	332,8



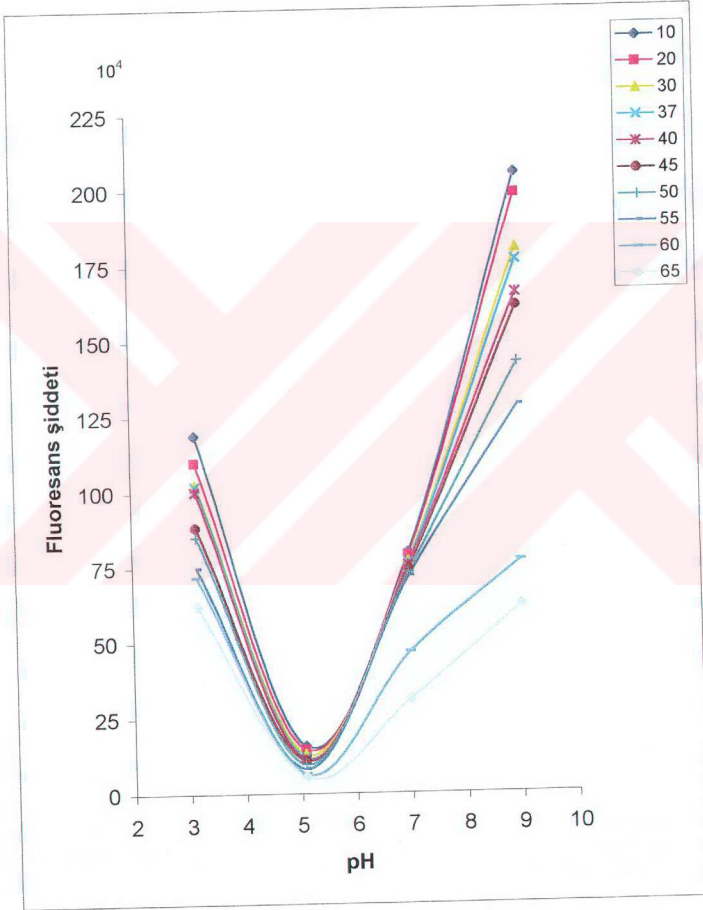
Şekil 3. 60 Farklı pH'larda 20 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (300nm uyarımda) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Max. Noktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	332,8	333,1	334,2	335	335,3	336	336,9	336	336,6	336,6
5,08	327,8	327,5	327,1	326,5	326,8	327,1	327,1	327,8	328,1	328,7
7	328,4	328,1	326,5	326,5	326,5	326,5	326,5	326,2	327,8	328,4
9,01	332,5	332,8	331,9	332,5	332,5	331,6	330,9	331,9	333,4	339,1



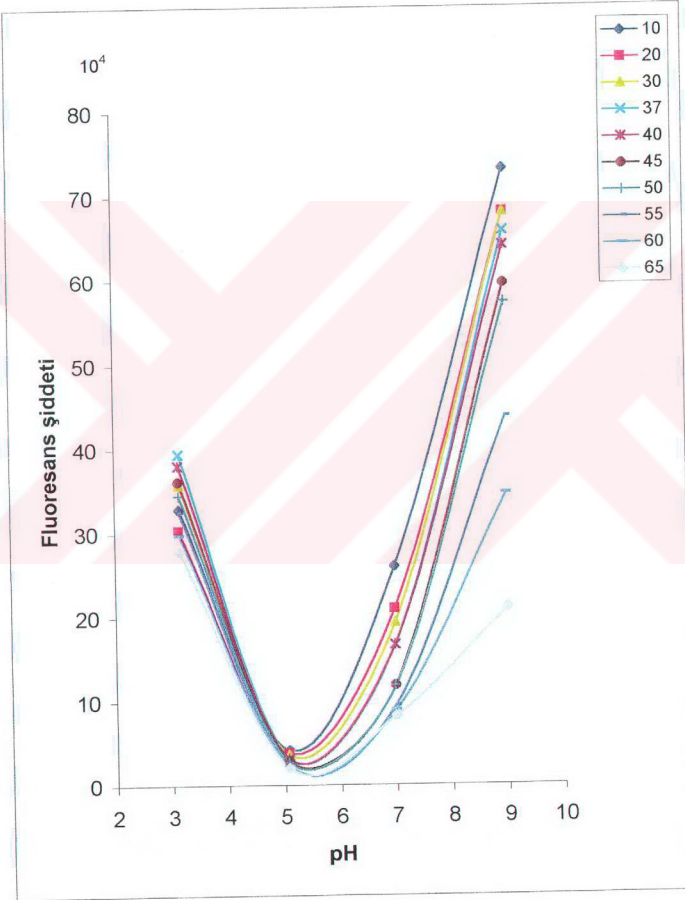
Şekil3. 61 Değişen sıcaklık değerlerinde, 20 oandaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (290nm uyarımda) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	118,7	109,6	102,2	101,7	100	88,11	84,79	74,53	71,49	61,86
5,08	15,52	14,28	12,78	11,51	10,89	10,71	9,301	7,979	6,171	5,378
7	79,35	78,52	76,38	75,95	75,2	73,97	72,79	71,62	46,37	30,85
9,01	205,2	198,4	180,2	176,3	165,5	161	142,3	128,1	76,51	61,78



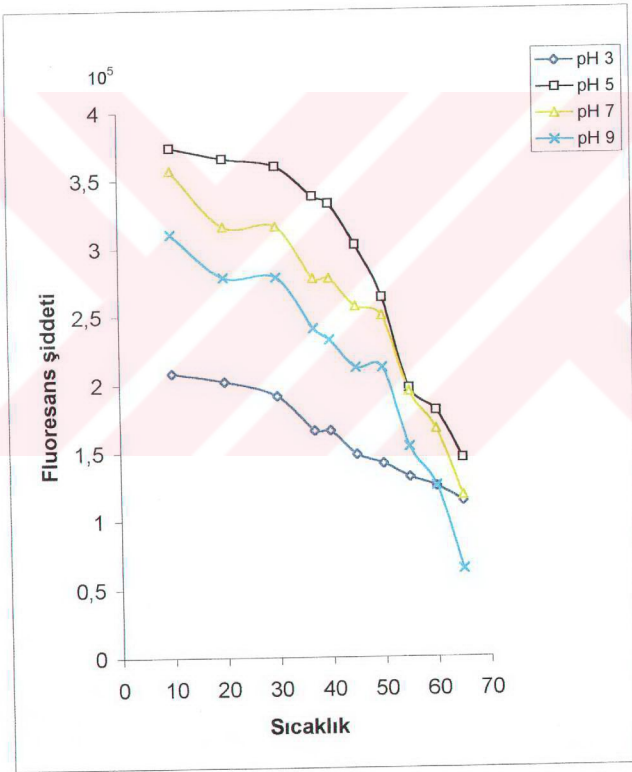
Şekil 3.62 Değişen sıcaklık değerlerinde, 20 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (290nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Fluoresans şiddetler										
pH	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,16	32,75	30,23	35,68	39,35	37,96	36,02	34,36	32,42	29,65	27,75
5,08	4,055	3,747	3,526	3,042	3,042	2,777	2,601	2,204	2,204	1,94
7	25,92	20,85	19,24	16,57	16,57	11,75	11,75	9,372	8,783	8,088
9,01	73,11	68,01	68,01	65,74	64,04	59,51	57,24	43,64	34,57	20,97



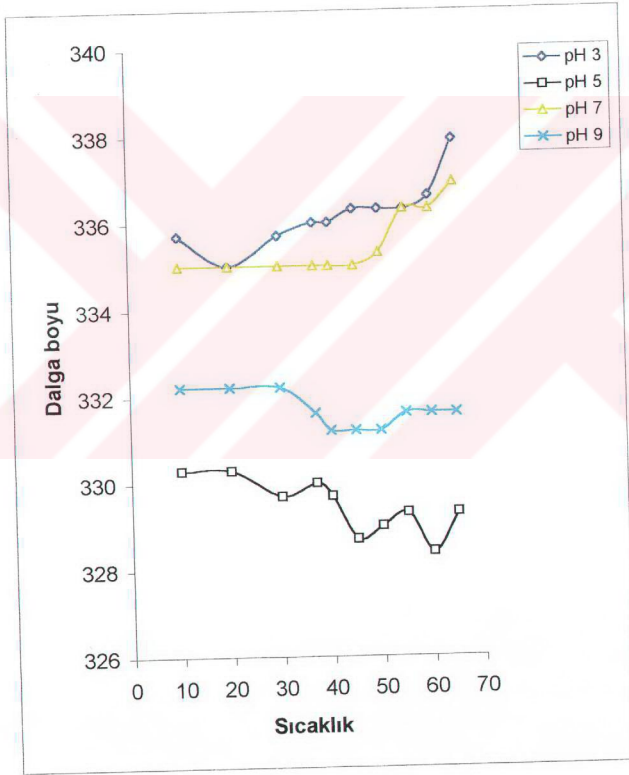
Şekil 3.63 Değişen sıcaklık değerlerinde, 20 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (300nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	2,077	3,741	3,567	3,099
20	2,013	3,657	3,152	2,781
30	1,906	3,602	3,152	2,781
37	1,652	3,38	2,771	2,404
40	1,652	3,325	2,771	2,317
45	1,477	3,02	2,563	2,115
50	1,413	2,632	2,494	2,115
55	1,31	1,967	1,94	1,535
60	1,242	1,801	1,662	1,246
65	1,135	1,452	1,178	0,637



Şekil 3.64 Farklı pH'larda 30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi ( 300nm uyarmada) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

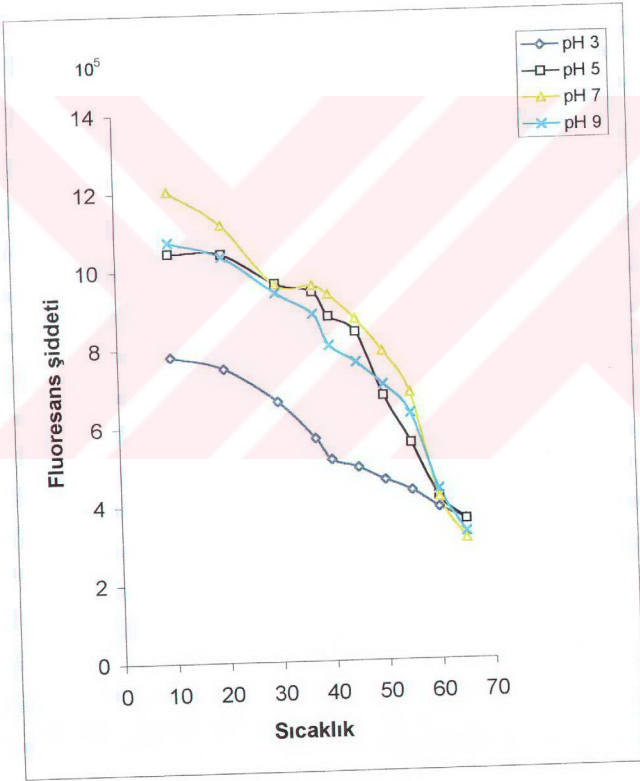
Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	335,7	330,3	335	332,2
20	335	330,3	335	332,2
30	335,7	329,7	335	332,2
37	336	330	335	331,6
40	336	329,7	335	331,2
45	336,3	328,7	335	331,2
50	336,3	329	335,3	331,2
55	336,3	329,3	336,3	331,6
60	336,6	328,4	336,3	331,6
65	337,9	329,3	336,9	331,6



Şekil 3. 65 Farklı pH'larda 30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (300nm uyarımda) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

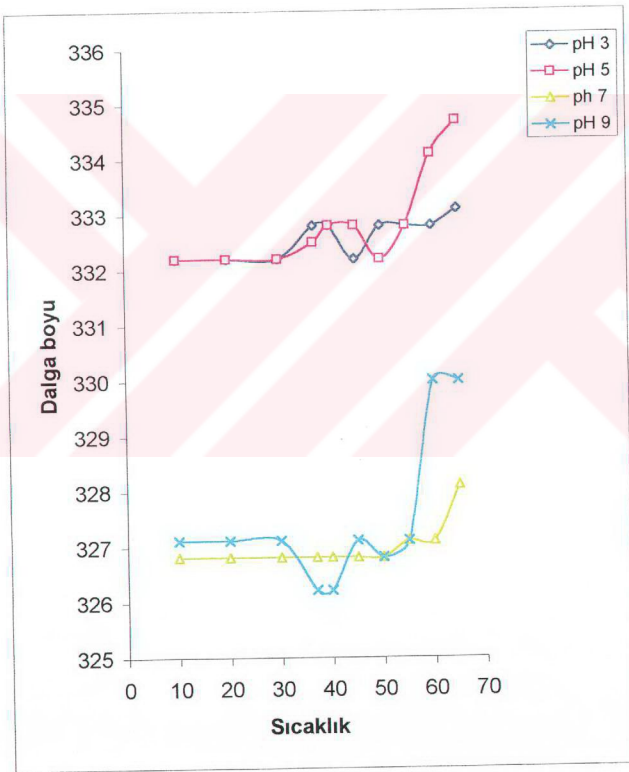


Sıcaklık	Fluoresans şiddetleri			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	7,793	10,45	12,02	10,72
20	7,472	10,42	11,15	10,34
30	6,616	9,642	9,594	9,385
37	5,662	9,41	9,559	8,835
40	5,117	8,781	9,317	8,024
45	4,903	8,368	8,693	7,589
50	4,582	6,733	7,862	7,01
55	4,292	5,514	6,788	6,257
60	3,854	4,128	4,122	4,316
65	3,554	3,542	3,048	3,215



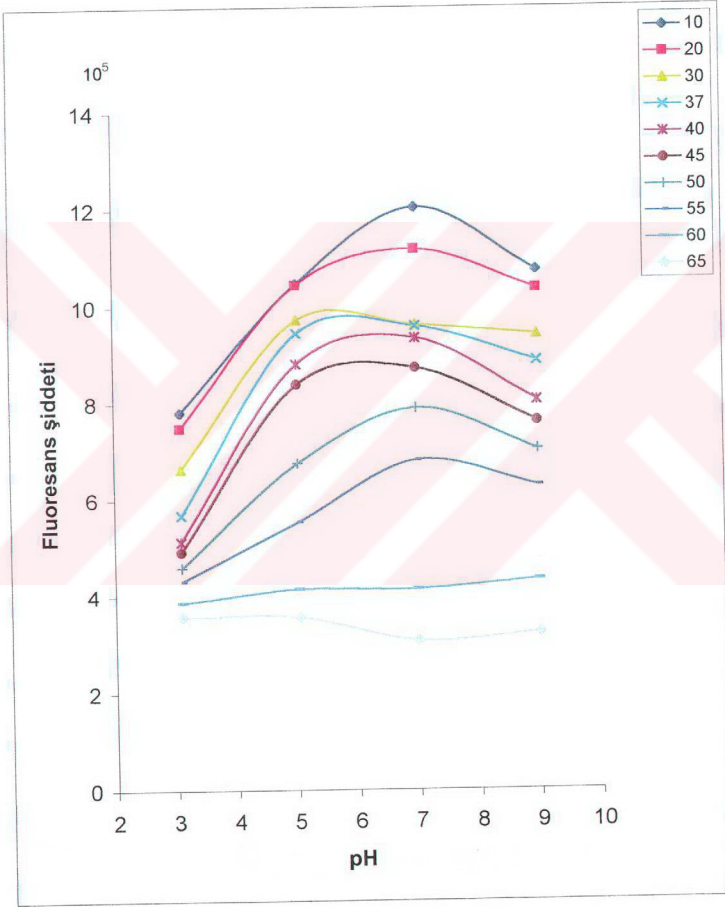
Şekil 3. 66Farklı pH'larda 30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile fluoresans şiddetlerinin değişimi ( 290nm uyardırma) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

Sıcaklık	max. noktadaki dalga boyları			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
10	332,2	332,2	326,8	327,1
20	332,2	332,2	326,8	327,1
30	332,2	332,2	326,8	327,1
37	332,8	332,5	326,8	326,2
40	332,8	332,8	326,8	326,2
45	332,2	332,8	326,8	327,1
50	332,8	332,2	326,8	326,8
55	332,8	332,8	327,1	327,1
60	332,8	334,1	327,1	330
65	333,1	334,7	328,1	330



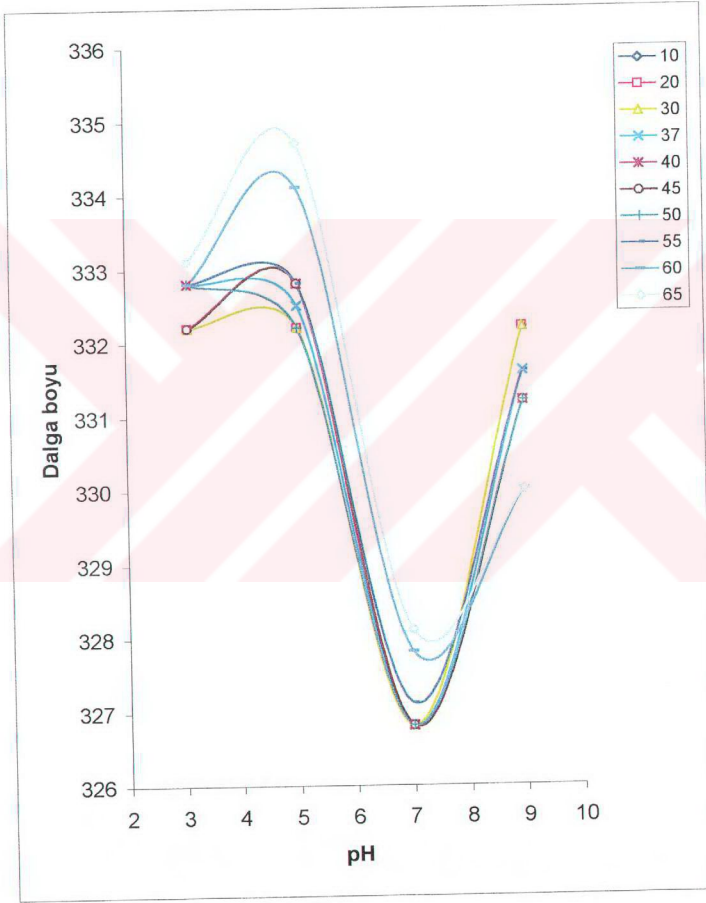
Şekil 3. 67Farklı pH'larda 30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının sıcaklık ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (290nm uyardırma) (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	7,793	7,472	6,616	5,662	5,117	4,903	4,582	4,292	3,854	3,554
5,04	10,45	10,42	9,692	9,421	8,781	8,368	6,733	5,514	4,128	3,542
7	12,02	11,15	9,594	9,559	9,317	8,693	7,862	6,788	4,122	3,048
9	10,72	10,34	9,385	8,835	8,024	7,589	7,01	6,257	4,316	3,215



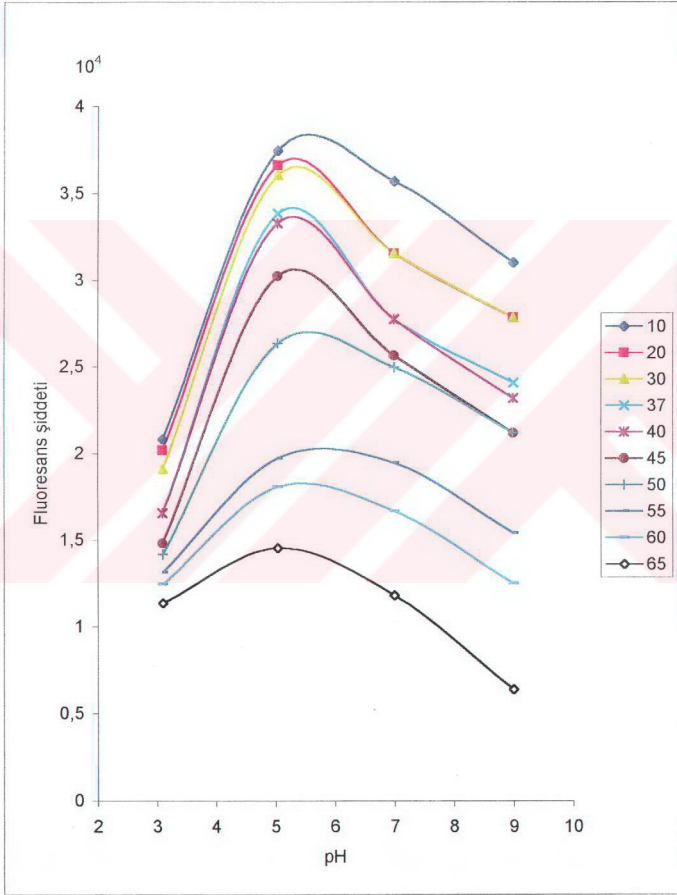
Şekil 3. 68Değişen sıcaklık değerlerinde,30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının(290nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Max. Nuktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	332,2	332,2	332,2	332,8	332,8	332,2	332,8	332,8	332,8	333,1
5,04	332,2	332,2	332,2	332,5	332,8	332,8	332,2	332,8	334,1	334,7
7	326,8	326,8	326,8	326,8	326,8	326,8	326,8	327,1	327,8	328,1
9	332,2	332,2	332,2	331,6	331,2	331,2	331,2	331,6	330	330



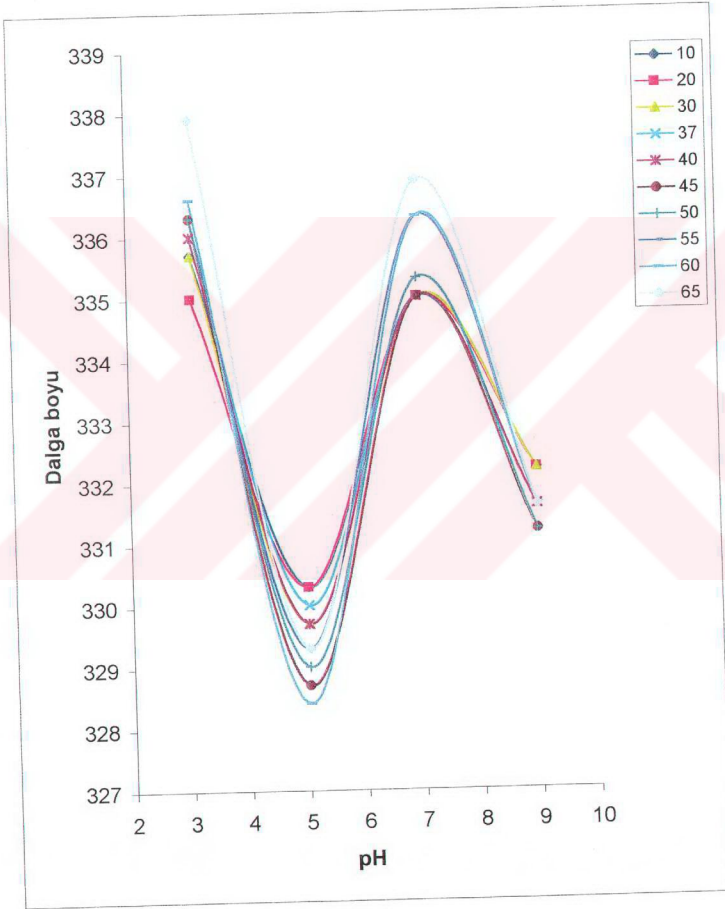
Şekil 3. 69Değişen sıcaklık değerlerinde,30oanındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının(290nm uyarımda) pH ile max. noktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofloreten yararlanarak)

pH	Fluoresans şiddetler									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	2,077	2,013	1,906	1,652	1,652	1,477	1,413	1,31	1,24	1,135
5,04	3,741	3,657	3,602	3,38	3,325	3,02	2,632	1,967	1,801	1,452
7	3,567	3,152	3,152	2,771	2,771	2,563	2,494	1,94	1,662	1,178
9	3,099	2,781	2,781	2,404	2,317	2,115	2,115	1,535	1,246	0,637



Şekil 3. 70 Değişen sıcaklık değerlerinde, 30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (300nm uyarımda) pH ile fluoresans şiddetlerinin değişimi (Steady-state spektrofotometreden yararlanarak)

pH	Max. Nuktadaki Dalga boyları									
	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
3,1	335,7	335	335,7	336	336	336,3	336,3	336,3	336,6	337,9
5,04	330,3	330,3	329,7	330	329,7	328,7	329	329,3	328,4	329,3
7	335	335	335	335	335	335	335,3	336,3	336,3	336,9
9	332,2	332,2	332,2	331,6	331,6	331,2	331,2	331,6	331,6	331,6



Şekil 3.71. Değişen sıcaklık değerlerinde, 30 oranındaki diyalizli enzim-polimer konjugatlarının (300nm uyarımada) pH ile max. nuktadaki dalga boylarının değişimi (Steady-state spektrofometreden yararlanarak)



## KAYNAKLAR

- Andrews, L.J. ve Forster, L.S., (1974) Photochem. Photobiol., 19, 353.
- Başer, İ., (1983), Tekstil Kimyası ve Teknolojisi, İ.Ü. Mühendislik Fak. Kimya Bölümü, İstanbul.
- Battle, N., Carbonell, J.V., Sendra, J.M., (2000) Biotechnology and Bioengineering, 70:5, 544-552.
- Beazell, J.M., (1941), "A Reexamination of the role of the stomach in the digestion of carbohydrates and protein", American Journal of Physiology 132: 42-50.
- Behnke, C.A., Yee, V.C., Trong, I., Petersen, L.C., Stenkamp, R.E., Kim, S., Reeck, G.R. ve Teller, D.C., (1998) Biochemistry, 37, 15277-15288.
- Brzozowski, A. M., Davies, G. J., (1997), 'Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose, at 2Å resolution', Biochemistry, 36, 10837-10845.
- Brzozowski, A. M., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Frantzen, H.B., Svendsen, A., Borchert, T.V., Dauter, Z., Wilson, K.S., ve Davies, G.J., (2000) Biochemistry, 39, 9099-107.
- Buryan, P., (1991) Food Science and Technology, Oxford: Blackwell.
- Bush, D.S., Sticher, L., Huystee, R., Wanger, D., Jones, R.L., (1989), 264(32), 19392-19398.
- Chadborn, N., Bryant, J., Bain, A.J. ve O'Shea, P., (1999) Biophysical Journal, 76, 2198-2207.
- Dauter, Z. et al., (1999), 'X-ray structure of the "maltogenic" alpha amylase from *Bacillus stearothermophilus*, Novamyl: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution'. Biochemistry, 38, 8385-8392.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegant, G., Huber, R. ve Gaillardin, C., (2000) J. Mol. Biol., 301, 1041-1057.
- Demchenko, A.P., (2000), Fluorescence Probes in Molecular and Cellular Biophysics, Lecture 1, TÜBİTAK, Marmara Research Center, Gebze.
- Dordick, J., (1991) Biocatalysts for Industry, Plenum Press, New-York.
- Gary, D.B., Yaogand, L., Stephen, G.W., (1995), Protein Science, 4:1730-1742, USA.
- Gladchenko, L.F. ve Pikulik, L.G., (1967) Zh. Priki. Spektrok., 6, 355.
- Gomez, L., ve Villalonga, R., (2000) Biotechnology Letters, 22, 1191-1195.
- Gryczynski, I. ve Kawski, A., (1975) Z. Naturforsch. A, 30, 287.
- Harris, E.L.V. ve Angel, S., (1989) "Protein Purification Methods a Practical Approach", Oxford University Press, New-York.

Hawang, K.Y., Song, H.K., Chang, C., Lee, S.Y., Kim, K.K., Choe, S., Sweet, R.M., Suh, S.W., (1997), *Molecular Cell*, 7(2), 251-258.

Howell, E., (1985) *Enzyme Nutrition: The Food Enzyme Concept*, Wayne, NJ, Avery Publishing Group, Inc.

Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., Nakatani, H., ve Honda, K., (1993), *Biochemistry*, 32, 6259-6265.

Ishikawa, K., Matsui, I., Honda, K., ve Nakatani, H., (1990), *Biocemistry*, 29, 7119-7123.

Koukiekolo, R., Berre-Anton, V., Desseaux, V., Moreau, Y., Rouge, P., Marchis-Mouren, G., and Santimone, M., (1999) *Eur. J. Biochem.* 265,20-26.

Kawski, A., (1974) *Chimia*, 28, 715.

Lakowich, J.R., (1986), *Principles of Fluorescance Spectroscopy*, Chapler 1, plenum Press, New York.

Lee, J. ve Parulekar, S.J., (1993) *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 1142-1150.

Lehtio, J., Teeri, T.T., ve Nygren, P.A., (2000), *Proteins*, 41:316-322.

Machuis, M., Wiegand, G., and Huber, R., (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 545-559.

Machius, M., Vertesy, L., Huber, R. ve Wiegant, G., (1996) *J. Mol. Biol.*, 260, 409-421.

Minxie, Q., Richard, H., Georges, B., Emile, D., Françoisa, P., *Biochemistry*, 33:6284-6294.

Mischa, M., Lazslo, V., Robert, H., Georg, W., (1996), *Journal of Molecular Biology*, 260:409-421.

Mustafäev, M., (1996) "Biyopolimerler", Gebze: MAM, KOCAELİ.

Parmila, J., (1995) *Biotechnology Letters*, 17:5, 503-506.

Pietruszka, N., Galaev, I.Yu., Kumar, A., Brzozowski, Z.K. VE Mattiasson, B., (2000) *Biotechnol.*, 16, 408-415.


Prochaska, L.J.; Piekutowski, W.V. (1994), "On the synergistic effects of enzymes in food with enzymes in the human body. A literature survey and analytical report." *Medical Hypotheses* 42: 355-62.

Rayner, D.M., ve Szabo, A.G., (1978), *Can. J. Chem.*, 56, 743.

Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., (1988) *J. Biol. Macromol.*, 10, 305-310.

Schwimmer, S., (1981), *Source Book of Food Enzymology*, Westport CT, The AVI Publishing Company, Inc.



- Siemiarczuk, A., (2000), Fluorescence probes in Molecular and Cellular Biophysics, Lecture 1, TÜBİTAK, Marmara Research Center, Gebze.
- Sun, M. ve Song, P. (1977) Photochem. Photobiol., 25, 3.
- Swift, H.J., Brady, L., Defwenda, Z.S., Dodson, J., Turkenburg, J.P., (1991), Acta Crystallogr., Sct. B V. 47, 535.
- Szabo, A.G. ve Rayner, D.M., (1980) Journal of the American Chemical Society, 102:2, 554-563.
- Voet, D. ve Voet, J.G., (1990) "Biochemistry", John Wiley and Sons Inc., New-York.
- Yamashita, H., Nakatani, H. ve Tonomura, B., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1202, 129-134.
- 

**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum tarihi	01.06.1977	
Doğum yeri	Malatya	
Lise	1992-1994	Malatya Lisesi
Lisans	1994-1998	Yıldız Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	1998-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

**Çalıştığı kurum(lar)**

2000-Devam  
ediyor

YTÜ Fen-Edebiyat Fak. Araştırma Görevlisi