

***E.COLI* (MK79) REKOMBİNANT SUŞU İLE
 α -AMİLAZ ÜRETİM ORTAMININ İNCELENMESİ**

Zümra BAKICI TANAYDIN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI

KASIM-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***E.COLI* (MK79) REKOMBİNANT SUŞU İLE
 α -AMİLAZ ÜRETİM ORTAMININ İNCELENMESİ**

Zümra BAKICI TANAYDIN

Tez Yöneticisi:
Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2012

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***E.COLI* (MK79) REKOMBİNANT SUŞUİLE
 α -AMİLAZ ÜRETİM ORTAMININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Müh. Zümra BAKICI TANAYDIN
(08218102)

Ana Bilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Proses ve Reaktör Tasarımı ABD

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15.10.2012

Tezin Savunulduğu Tarih : 05.11.2012

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI (F.Ü)**

Diğer Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN (F.Ü)**

Yrd. Doç. Dr. Ramazan ORHAN (F.Ü)

KASIM-2012

ÖNSÖZ

Tez konumun seçilmesinde ve planlanmasında, literatür bilgilerinin toplanmasında, deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuçların değerlendirilmesi aşamasında bilgi, deneyim, anlayış ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. M.Şaban TANYILDIZI'na sonsuz teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar esnasında büyük yardımını gördüğüm Sayın Arş. Gör. Veyis SELEN hocama; mikroorganizmanın teminindeki yardım ve ilgileri için Sayın Prof. Dr. Dursun ÖZER' e ; her zaman yanımda olan arkadaşlarıma teşekkür etmeyi büyük bir görev sayarım.

Bitmek tükenmek bilmeyen emeğini nasıl ödeyeceğimi bilemediğim canım annem Şaziye BAKICI'ya ve öğrenim hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, beni her zaman destekleyen, sevgilerini hep hissettiğim tüm aileme teşekkür ederim.

Ayrıca tez yazımı esnasında yardımını esirgemeyen, her sıkıntıda yanımda olan ve hayatımın armağanı olarak gördüğüm eşim Mehmet TANAYDIN'a çok teşekkür ederim.

ZÜMRA BAKICI TANAYDIN
ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
TABLolar LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER LİSTESİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	3
1.1.1. Enzimlerin Özellikleri.....	3
1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	5
1.1.3. Enzim Kaynakları.....	6
1.1.4. Enzim kaynaklarının Karşılaştırılması.....	7
1.2. Amilazlar.....	8
1.2.1. Amilazın Tarihçesi.....	8
1.2.2. Amilazların Sınıflandırılması.....	9
1.2.3. α - Amilazlar ve Etki Mekanizmaları.....	10
1.2.4. α -Amilaz Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	11
1.2.5. α -Amilaz Enziminin Kullanıldığı Alanlar.....	13
1.3. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	15
1.3.1. Rekombinant DNA teknolojisinin Uygulama Alanları.....	18
1.4. Rekombinant “ <i>Escherichia coli</i> ”.....	19
1.5. Cevap Yüzey Metodu, (RSM).....	20
1.5.1. Deneyisel Dizayn.....	22
1.5.2. Dizayn Taramaları.....	23
1.5.3. Plackett-Burman Tarama Dizaynı.....	23

1.6. Kaynak Özetleri.....	25
1.6.1. Vitreoscilla Hemoglobin (VHb) Uygulamaları.....	26
2. MATERYAL ve METOT.....	28
2.1. Mikroorganizma	28
2.1.1. Bakteri Üretim Besiyerleri ve Koşulları.....	28
2.2. Yapılan analizler	29
2.2.1. Enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	31
2.2.1. Deneysel Tasarım ve İstatiksel Analiz.....	32
3. BULGULAR.....	34
3.1. Merkezi Kompozit Dizayn (CCD).....	37
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	54
5. ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
EKLER.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***E.COLİ* (MK79) REKOMBİNANT SUŞU İLE
 α -AMİLAZ ÜRETİM ORTAMININ İNCELENMESİ**

Zümra BAKICI TANAYDIN

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

2012, sayfa : 62

VHb, heterolog hücrelere yüksek oksijen alım yeteneği ve daha iyi çoğalma karakteristikleri kazandırması ile bilinen bir prokaryotik hemoglobindir. VHb'nin popülaritesinin ve yaygın olarak bakterilerde kullanılmasının sebebi özellikle düşük oksijen konsantrasyonlarının negatif etki yarattığı birçok biyoüretim olayında bu proteinin potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle VHb'nin üretimi belli oksijen seviyesine bağlı olan α -amilaz üzerindeki potansiyelinin araştırılması başlıca hedefler arasındadır. Bu amaçla *vgb* ve *amy* (pMK79) taşıyan *E.coli* rekombinantı α -amilaz üretimi için ortam bileşenleri ve ortam koşullarının optimum değerleri incelenmiştir.

Bu çalışmada α -amilaz üretimi için optimum ortam koşulları (pH, fermantasyon sıcaklığı, çalkalama hızı, aşı miktarı) ve ortam bileşimi (glukoz, nişasta, pepton, Na_2HPO_4 ,

YE, KH_2PO_4 , NH_4Cl , CaCl_2) aktivite üzerine etkileri cevap yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca fiziksel ortam olarak başlangıç pH'sı , karıştırma hızı, sıcaklık ve aşılama miktarının da aktivite üzerine etkileri incelenerek optimum koşullar elde edilmiştir. Deneysel tasarımlar Design Expert (6.0) programı kullanılarak yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda α -amilaz aktivitesini maksimum yapan ortam koşulları ve ortam bileşenleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz, Mikrobiyal enzim üretimi, *Escherichia coli*, Rekombinant DNA Teknolojisi, Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)

ABSTRACT

MASTER THESIS

***E. COLI* (MK79) WITH RECOMBINANT STRAIN INVESTIGATION OF α -AMYLASE PPRODUCTION ENVIRONMENT**

Zümra BAKICI TANAYDIN

Fırat University

Gradute School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemical Engineering

2012, sayfa:62

VHb is prokaryotic hemoglobin which is known for its ability to make heterologous cells gain high oxygen uptake and better reproduction characteristics. VHB is thought to have a potential especially in bioproduction cases where low concentrations of oxygen has a negative effect and that's the reason for the popularity and its common usage in bacteria. For this reason, investigation of VHb's potential on the production of α -amylase which is dependent to a certain level of oxygen among the main targets. For this purpose, media components and optimum media conditions for the production of VGB, and Amy (pMK79) carrying *E. coli* recombinant α -amylase was investigated.

In this study the optimum conditions (pH, the fermentation temperature, agitation speed, the amount of vaccine), and the composition of the media (glucose, starch, peptone,

Na₂HPO₄, YE, KH₂PO₄, NH₄Cl, CaCl₂) were determined for the production of α -amylase by using the response surface methodology . In this study, peptone, Na₂HPO₄, YE, KH₂PO₄, NH₄Cl, CaCl₂, starch and glucose concentrations were chosen as independent variables while the activity has been chosen as the dependent variable. In addition, optimum conditions were obtained by investigating the effects of the initial pH, the mixing speed, temperature and the amount of vaccination on the activity. Experimental designs were performed by using the Design Expert (6.0) methoh and the results were evaluated. It was determined the optimum conditions and media components α -amylase activity by this study.

Keywords : α -Amylase, Microbial production of enzymes, *Escherichia coli*, Recombinant DNA technology, Responce surface methody.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Bakterilerin LB sıvı besiyerinde üretilmeleri.....	29
Şekil 2.2. Enzim üretiminde takip edilen yol	30
Şekil 3.1. Gliserin,M9 ve LB ortamlarında zamanla mikroorganizmasına bağlı olarak değişimi ve pH'nın değişimi	34
Şekil 3.2. Gliserin, M9 ve LB ortamlarında zamanla enzim aktivitesinin değişimi...	35
Şekil 3.3. NaCl ile diğer parametrelerin etkileşimi.....	43
Şekil 3.4. PO_4^{3-} iyonu diğer parametrelerin etkileşimi.....	44
Şekil 3.5. NH_4Cl ile diğer parametrelerin etkileşimi.....	45
Şekil 3.6. $MgSO_4.H_2O$ ile diğer parametrelerin etkileşimi.....	46
Şekil 3.7. $CaCl_2$ iyonu ile glikozun etkileşimi	46
Şekil 3.8. Fermantasyon ortam bileşenlerinin birbirleriyle olan etkileşimleri.....	52
Şekil 3.9. Optimum şartlarda α -amilaz aktivitesinin zamanla değişimi.....	53

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar.....	8
Tablo 1.2. Amilazların uygulama alanları	14
Tablo 1.3. Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri	17
Tablo 2.1. Luria-Bertani(LB) ortamının içeriği.....	28
Tablo 2.2. M9 ortamının içeriği.....	28
Tablo 2.3. Gliserinli ortam içeriği.....	29
Tablo 3.1. Plackett-Burman dizaynında kullanılan bağımsız değişkenlerin değer aralıkları tablosu.....	35
Tablo 3.2. Tahmin edilen ve deneysel olarak tayin edilen α -amilaz aktivite değerleri içeren PB dizayn matrisi.....	36
Tablo 3.3. PB dizaynıyla elde edilen lineer denklemin ANOVA sonuçları ...	36
Tablo3.4.Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....	37
Tablo 3.5. Merkez Kompozit Dizayn deney tablosunda bulunan değişkenler ve incelenen aralıklar	38
Tablo 3.6. Önemli olan yedi değişken için 41 sıralı CCD dizayn matrisi ve deneysel olarak belirlenen enzim aktivite değerleri.....	39
Tablo 3.7.Amilaz üretiminde ikinci dereceden (quadratic) cevap yüzey modelinin amilaz üretimi için ANOVA sonuçları.....	40
Tablo3.8.Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....	42
Tablo 3.9. MKD ortam tasarımının optimizasyon sonucu.....	47
Tablo3.10. Merkezi Kompozit Dizayn deney tablosunda bulunan değişkenler ve İncelenen aralıklar.....	48
Tablo 3.11. İncelenen dört bağımsız değişkenin ortam bileşen değerleri.....	48
Tablo3.12.Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....	49
Tablo 3.13.Amilaz üretiminde ikinci dereceden (quadratic) cevap yüzey modelin amilaz üretimi için ANOVA sonuçları.....	50

KISALTMALAR LİSTESİ

YE	: Yeast Ekstrakt
T	: Sıcaklık
KH	: Karıştırma hızı
pH	: Başlangıç pH'sı
MO	: Mikroorganizma
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i> JM103 (pMK79)
PBD	: Plackett-Burman Dizaynı
CCD	: Central Kompozit Dizayn
MKD	: Merkez Kompozit Dizayn
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
DNA	: Deoksiribonükleik Asit

1. GİRİŞ

Enzimler canlı hücrelerde üretilen ve organizmadaki tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesini sağlayan, bunları düzenleyen ve protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir (Pekin, 1983; Sarıkaya,1995). Enzimler; kimyasal yapıları, görevleri, hücreden bağımsız olarak etki gösterebildikleri ve diğer bazı özellikleri aydınlatıldıktan sonra çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Telefoncu, 1997).Önceleri bilinçsiz olarak ekmek, peynir, bira gibi bazı gıda maddelerinin yanı sıra çeşitli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde de kullanılmıştır (Pazarlıoğlu, 1997). Enzimlerin ayrıca kimya endüstrisinde ve biyolojik savaşta da kullanım alanı bulunmaktadır. Endüstride kullanılan bu enzimler genellikle diğer kaynaklara göre daha avantajlı olan mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir (Pazarlıoğlu,1997). Mikrobiyal enzimlerden ise α -amilaz enzimi gıda endüstrisinde, meyve suyu endüstrisinde, deterjan endüstrisinde ve tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pazarlıoğlu,1997; Telefoncu,1997;Sarıkaya,1995).

α -Amilaz enziminin endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak başlanmıştır (Sarıkaya,1995). Bugün α -amilaz enzimi üretiminde kullanılan diğer mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas*, *Saccharophila*, bazı *Bacillus* ve *Clostridium* türleri ve alt türleri sayılabilir. Fungal α -amilazlar sıcaklığa, bakteriyel α -amilazlara göre daha çok duyarlı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel α -amilazlar oluşturmaktadır. Bu enzim hayvan ve bitkilerde bulunmasına rağmen endüstriyel olarak mikroorganizmadan elde edilmektedir. Bu bağlamda, günümüzde endüstriyel enzimlerin % 60'ı rekombinant teknolojilerin bir sonucudur (Sarıkaya,1995).

Düşük doğal ekspresyon seviyeleri, birçok enzimin doğal kaynaklarından izole edilmesini ve çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte, bu teknik zorluğun üstesinden gelinmektedir. Günümüzde, temel olarak, fonksiyonu bilinen veya bilinmeyen herhangi bir enzimi kodlayan gen veya cDNA izole edilebilmekte ve uygun bir ekspresyon sistemine klonlanabilmektedir. Bugün, birçok enzim gerek endüstriyel anlamda ve gerekse akademik anlamda olsun rekombinant olarak

üretilebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi enzim üretiminde, rekombinant olmayan enzimlere göre 2 önemli avantaja sahiptir;

- Kaynak kullanımı probleminin çözülmesi: Bazı enzimlerin doğal ortamlarında düşük konsantrasyonlarda üretilmesi, bu enzimlerin büyük miktarlarda üretilme zorluğunu arttırmakta veya imkânsız hale getirmektedir. Uygun ekspresyon sistemlerinin kullanımı ile bu problem aşılmaktadır.

- Kaynak güvenliği probleminin çözülmesi: Birçok enzim, doğada tehlikeli veya patojenik türler tarafından üretilirler. Bu durum, ham maddelerin bu organizmalardan elde edilmesini zorlaştırmakta ve elde edilecek son üründe zehirli bileşenlerin var olma ihtimalini artırmaktadır. Patojen ve zehirli olmayan konakçı bir hücrede rekombinant üretim yardımıyla bu zorlukların üstesinden gelinebilmektedir (Walsh, 2002).

α -Amilaz üretiminde de sınırlayıcı faktörlerin başında büyüme ortamında oksijen seviyesindeki dalgalanmalar gelmektedir. Yüksek (atmosferik) ve düşük (mikroaerobik) oksijen şartlarında enzimin sentezi baskılanırken, belli kritik oksijen konsantrasyonlarında ise enzim üretimi indüklenmektedir. Ortam oksijen seviyesindeki dalgalanmaları kontrol etmek için geleneksel olarak eksojen kaynaklı oksijen transfer yöntemi kullanılmaktadır. *Vitreoscilla hemoglobini* (VHb) son yıllarda keşfedilen ilk prokaryotik hemoglobin olup, bu proteinin çeşitli endüstriyel proseslerdeki kullanım potansiyeli ancak son yıllarda anlaşılabilmiştir. Bu bağlamda, özellikle düşük oksijen konsantrasyonlarının negatif etki yarattığı birçok biyoüretim olayında bu proteinin potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında, heterolog hücrelere yüksek oksijen alım yeteneği ve daha iyi çoğalma karakteristikleri kazandırması ile bilinen VHb'nin α -amilaz üzerindeki potansiyelinin araştırılması başlıca hedefler arasındadır. Bu amaçla *vgb* ve *amy* (pMK79) taşıyan *Escherichia coli* rekombinantı ile α -amilaz üretimi çalışılmıştır.

1.1. Enzimler

Bugünkü modern enzim teknolojisi 1874’de Danimarkalı kimyager Christan Hansenin, kurutulmuş sığır midelerinden renet enzimi tuz ekstraksiyonu ile elde etmesiyle başlamıştır. Bu preparat, endüstriyel amaçla üretilmiş ve nispeten saf olan ilk enzimdir. Enzim üretimi daha önceden yapılmış uzun evrimsel işlemler sonucu ulaşılmıştır. Enzimler, yağ enzim açısından sebze olarak ya da ekmek yapımı gibi çeşitli amaçlarla kullanılan mikroorganizmalar olarak, insanlığı tarafından yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Enzimlerin antik çağlarda peynir yapımında kullanıldığına ilişkin ipuçları da vardır. M.Ö. 800 yılı civarında yazılmış olan ünlü İlyada ve Odessi epik şiirinden oğlak ya da koyun midelerinin ki bunlarda sığır midesinde bulunan enzimin aynısı bulunmakta, peynir yapımında kullanıldığı anlaşılmaktadır (Sağıroğlu, 1999).

Enzimler doğal katalizörler olarak işlev görerek hücre içerisinde oluşan tepkimelerin hızını belirleyen, tepkimeye girdiklerinde ilk hallerinde tepkimeden çıkan ve bütün canlı organizmalarda bulunan büyük protein molekülleridir (Kılıç, 2002).

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alırken, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını inanılmaz boyutlarda hızlandırırlar. Enerji açısından normal koşullarda hiç gerçekleşemeyecek ya da çok yavaş gerçekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip bir değişikliğe uğramadan çıktığı için sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak enzimlerin de belli bir ömrü olduğu için gerçekte bu durum böyle değildir (Sağıroğlu,1999).

1.1.1. Enzimlerin Özellikleri

Biyokatalizör olan enzimler hücre içerisinde üretilmelerine rağmen birçok kez hücre dışına salınarak aktivitelerine devam ederler. Enzimlerin bu özellikleri endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarının yolunu açmıştır. Enzimin aktivasyonu, sahip olduğu katalitik yapısından kaynaklanmakta olup aktivasyonunu reaksiyon esnasında enzim tüketilmeksizin gerçekleşir.

Enzimin etki gösterdiği maddeye ‘substrat’ adı verilir ve enzimin adlandırılmaları etkilediği maddenin isminin sonuna –az(-ase) eki getirilerek yapılır. Bütün enzimlerin şifresi genler üzerindedir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür.

Doğada her metabolik reaksiyon enzimler tarafından kontrol edilir. Enzim tepkimeye girdiğinde değişikliğe uğramaz ve yapısını korur, başka bir substrat ile tekrar reaksiyona girer. Kimyasal katalizör maddelerin büyük çoğunluğu birçok reaksiyonu katalizleyebilir. Fakat bunlar genellikle hem özgül hem de seçici değildirler. Buna rağmen enzimler oldukça seçici olup spesifik olarak katalize ederler. Enzimlerin bu özellikleri, enzim molekülünün şeklinden kaynaklanır. Enzim substrat ilişkisi ‘kilit-anahtar’ uyumu ile açıklanmaktadır.

Enzimlerin bazıları iki farklı kısımdan oluşur. Büyük protein moleküllerinden oluşan kısmına apoenzim ve aktivite göstermek için gereksinme duydukları kompleks organik moleküllere koenzim (organik ya da inorganik kısım) denir. Koenzim kısmının organik olduğu durumlarda, bu kısmın apoenzime kovalent bağlarla bağlanması söz konusu ise prostetik grup olarak adlandırılır. Koenzim de (vitaminler olabilir) apoenzim de tek başına işlevsel değildir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş olan gruplara kofaktör veya aktivatör adı verilmektedir. Koenzim ve apoenzim birlikteliğine holoenzim denir. Örneğin tükürükteki amilaz nişastayı yalnız klor iyonlarının (Cl^-) bulunduğu ortamda parçalayabilir. Canlı büyümesinde bulunan elementler, mangan (Mn^{+2}), bakır (Cu^{+2}), çinko (Zn^{+2}), demir (Fe^{+2}) ve diğer elementler bu enzimatik işlevlerde aktivatör olarak kullanılır (Aehle,2004).

Bir enzim molekülü genel anlamda globüler (suda çözünebilen) yapıda bulunur ve molekül içi veya arası bağlar ile sekonder ya da tersiyer yapıda tutulur. Proteinlerin bu yapıları sıcaklık ve pH daki değişiklikler ile bozulabilir. Bu nedenle, enzimlerin katalitik aktivitesi pH ve sıcaklığa karşı hassastır. Sıcaklığın yükselmesi, reaksiyona girecek moleküllerin kinetik enerji ile yüklenmesini sağlar. Bu da etkileşime girecek moleküllerin reaksiyon için karşılaşma şansını artırır.

Enzimler olağanüstü katalitik aktiviteye sahip moleküllerdir. Her enzimin katalitik aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Buna ‘optimal sıcaklık’ denir. Bu değerden yüksek sıcaklıklarda enzim yapısı molekül içi veya arası bağların kopması sonucu bozulmaya başlar. Aynı zamanda her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı (optimum pH) mevcuttur. Bu, enzimin molekül yapısının pH daki değişime bağlı olarak

etkilenmesinden kaynaklanmaktadır. Bazı maddeler ise enzimlerin aktif bölgelerinin tutulması sonucu enzimin deformasyonunu sağlayarak, katalitik aktivitesini düşürebilir. Bazen tamamen durdurabilir. Bu tür maddelere ‘inhibitör’ adı verilir (Aehle,2004).

1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Her enzimin 4 rakamlı bir numarası vardır. Örneğin; 3.6.1.3. "ATP fosfohidrolaz" da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir. Buna göre enzim sınıfları şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Redoks tepkimelerini katalizler.

- **Dehidrogenazlar:** Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.
- **Oksidazlar:** Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.
- **Redüktazlar:** Substratı bir redüktör aracılığıyla indirgeyen enzimlere denir. Örneğin asetaldehit redüktaz, asetaldehiti alkole redükler.

- **Transhidrogenazlar:** Bir molekülden diğerine hidrojen taşıyarak onu redüklerler.
- **Hidroksilazlar:** Substratlarına bir hidroksil ya da su molekülü katan enzimlere denir, örneğin, fenilalanine hidroksilaz bir hidroksil grubunu fenilalanine ekleyerek onu tirozine dönüştürür.

2. Transferaz Enzimler: Hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil , amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar. Dekarboksilazlar: Karboksilik asitlerden CO₂ çıkmasını sağlarlar.

3. Hidrolaz Enzimler: Su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptit, asit anhidrit ve glikozidik bağlarına etki ederler.

- **Esterazlar:** Ester bağını yıkan enzimlerdir (lipaz, ribonükleaz, fosfataz, pirofosfataz, glikozidaz).
- **Proteazlar:** Peptit bağını yıkan enzimlerdir (proteaz).

4. Liazlar: Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir, örneğin C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır. Aynı şekilde C-O ve C-N bağını yıkanlar da vardır.

5. İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Örneğin razemaz, epimeraz.

6. Ligazlar (Sentetazlar): Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını; örneğin amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlarlar.

1.1.3. Enzim Kaynakları

Doğada bulunan enzim kaynaklarını başlıca 3 grupta toplayabiliriz. Hayvansal enzimler, bitkisel enzimler, mikrobiyal enzimlerdir.

Hayvansal Enzimler: Hayvanlardan sağlanan bazı enzimler özel kullanım alanlarında bazı avantajlar sağlayabilir. Bu enzimler hayvanların atılan veya değerli olan organlarından elde edilir. Örneğin pankreas çok zengin bir enzim kaynağıdır. Buradaki proteinin %23 tripsinojen, %10-14 kimotripsojendir. Hazmı kolaylaştıran ve pankreatin olarak isimlendirilen amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimleri içerir.

Rennet olarak bilinen kimosin peynir üretiminde, sütün koagülasyonunda kullanılan asit proteazdır. Bu enzim süttten kesilmemiş danaların midesinden elde edilmektedir. Pepsin, proteolitik bir enzim olup domuzların mide mukozasında bulunmaktadır. Sığır karaciğerinden elde edilen katalaz ise bir peroksidaz enzimi olup, organizmada oluşan H_2O_2 'i parçalayarak hücrenin zarar görmesini önler. Domuz pankreasından tripsin, kimotripsin at karaciğerinden alkodehidrogenaz üretilmektedir.

Bitkisel Enzimler: Bitkiler de birçok enzime kaynak olmuştur. Tropik bölgelerde uzun zamandan beri kullanılan eti yumuşatma etkisine sahip ve çok yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan papaya bitkisi proteaz ailesinden papain enzimi üretimi için yetiştirilmektedir. Ayrıca, fisin enzimi incir ağacı sütünden, bromealin enzimi ananas meyvesinden ve diğer bazı bitkilerin öz suyundan bol miktarda enzim izole edilmektedir. Bu bitkilerin en önemli avantajı içerdikleri özsuların kolaylıkla alınabilmesidir.

Hayvansal ve bitkisel kaynakların bazı temel dezavantajları vardır. Enzim ekstraksiyonunda kullanılan hayvansal dokular sınırlıdır ve taleplerin ani olarak değişmesine cevap veremez. Ayrıca gerekli olan işçilik daha fazladır. Bitkisel kaynaklı enzimlerde ise kaynaklar sezona ve iklimlere bağlı olarak değişmektedir (Rehm vd., 1987).

Mikrobiyal Enzimler: Mikrobiyal hücreler enzim kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve onlar birçok avantaj sağlarlar. Büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca mikroorganizmaların ikilenme süreleri çok kısa olduğundan üretim prosesleri kolaylıkla pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir (Telefoncu,1997).

1.1.4. Enzim Kaynaklarının Karşılaştırılması

Enzim üretiminde kullanılan kaynaklar değerlendirildiğinde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin teknolojik ve ekonomik yönden hayvansal ve bitkisel hücrelerden elde edilenlere göre daha avantajlı olduğu belirtilmiştir (Topal, 1985).

Ayrıca mikrobiyal hücrelerin dışında hayvan ve bitki hücreleri de laboratuvar ölçeğinde bazı özel enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ancak bu endüstriyel ölçekte başarılı olma ihtimali azdır. Bitki hücreleri mikrobiyal hücrelerden çok daha yavaş olarak büyümektedirler. Bu durumda kültür ortamının kontaminasyon şansı artmaktadır. Hayvan hücreleri ise bir çok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması, hayvanların ve hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınmasında katı kısıtlamaların uygulanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan hastalıkların hayvanlar ve hayvansal dokular vasıtasıyla bir ülkeden diğerine yayılması büyük endişelere sebep olmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlerin üretilmesinde karşılaşılan bu sorunlar mikrobiyal kökenli enzimlere olan ilginin arttırmasını sağlamıştır (Godfrey ve West, 1996). Yapılan araştırmalara göre bitki ve hayvan hücrelerinden elde edilen üretimini devam ettirebilmek mikrobiyal fermantasyonla elde edilen enzim maliyetinden 1000 kat daha fazla maliyet gerektirmektedir (Topal, 1985).

Fermantasyon prosesinin esnekliği ve çok yönlülüğü sütü koagüle eden renin enziminin üretiminde görülmüştür. Bu amaçla buzağı midelerinden renin ve proteinaz içeren enzimler ekstrakte edilmektedir. 1950'lerde daha az sayıda kesim yapılmakla beraber daha fazla peynir yapılmaya başlanmış ve peynir mayası kıtlığı görülmüştür. Bunun üzerine mikrobiyal substituentini bulmak amacıyla 921 mikrobiyal tür test edilip ve *Endothia Parasitica* küfünün enzimi ürettiği belirlenmiştir. Başka bir tarama sonucunda *Mucor pusillus* mikroorganizması bulunmuştur. Halen sütü koagüle eden enzimler fermantasyonla üretilenler ve domuz ile sığır pepsini içeren buzağı reneti karışımıyla ticari bir yarış halindedir.

Bir fermantasyon işlemesi talebin seviyesine göre uygun ölçekte dizayn edilebilir. Bu işletmeler çeşitli ürünler için kullanılabilir ve taleplerin değişmesiyle başka ürünler üretilir. 1970'lerin başında temizlikte kullanılan proteinaza olan talep aniden düşüp aynı zamanlarda nişasta proseslerinde kullanılan enzime olan talep artmıştır. Böylece proteinaz üretiminde kullanılan işletmeler amilolitikoksidaz üretecek şekilde düzenlenmiştir.

Benzer reaksiyonları katalizleyen farklı kaynaklardan elde edilen enzimler genellikle farklı özellikler gösterirler. Bu farklılıktan dolayı bazı kaynaklar tercih edilebilir. Örneğin; tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde 3 tip α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Bunlar pankreas, bakteri ve malttan elde edilen amilazlardır.

Tablo 1.1.'den yararlanarak bakteriyel kaynaklı enzimlerin kullanılma nedenlerini şöyle açıklayabiliriz (Sarıkaya, 1995);

- Isıya dayanıklı olmaları,
- Geniş bir pH aralığında çalışmaları,
- Haşıl alma işlemini kısa sürede tamamlayabilmeleridir.

Tablo 1.1. Amilazların etkili olduğu pH ve sıcaklıklar (Sarıkaya, 1995)

α -amilaz cinsi	En uygun pH	En uygun sic., °C	Etkili olduğu pH	Etkili olduğu sic., °C
Pankreas	6.8	50-55	4.5-9.0	60-65
Malt	4.6-5.2	60-65	2.1-8.1	85
Bakteri	5.4-7.0	60-65	2.0-9.0	90 ve üstü

Bu çizelgeden yararlanılarak bakteri kaynaklı amilazların kullanılma nedenleri; ısıya dayanıklı olmaları, geniş pH aralığında çalışabilmeleri ve haşıl alma işlemini çok kısa sürede tamamlayabilmeleridir.

1.2. Amilazlar

1.2.1. Amilazın Tarihçesi

Amilaz enziminin buğday nişastası üzerinde parçalayıcı bir etkisi olduğu 1811 yılında Kirchoff tarafından belirlenmiştir. Ancak parçalama etkeni amilaz tanımlanamamıştır. Benzer etkinin insan tükürüğü ile elde edilebileceği 1831 yılında Leuch tarafından bulunmuştur. Bernflend ise 1951'de tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğinin, 1833'de Payen ve Persoz'unise malttan nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. Ancak günümüzde tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak bilinmektedir (Sarıkaya, 1995).

Amilazlar glikoz birimlerinden oluşan nişasta ve benzer polimer moleküllerini parçalayarak, glikoz ünitelerinden meydana gelen daha küçük polimerler ve dekstrinler gibi ürünleri oluşturan hücre dışı enzimlerdir. Bu enzimler doğada hayvanlar ve bitkiler tarafından da üretilmelerine rağmen, mikrobiyal kaynaklı olanlar kontrollü koşullarda kısa sürede ürün vermesinden dolayı endüstriyel alanda asıl kaynağı oluşturmaktadırlar (Fogarty,1983).

Karbonhidrazların en önemli kaynağını *Bacillus* oluşturmaktadır. Bir karbonhidraz olan α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Radley.,1976; Aira vd.,1983). α -Amilazlar, nişastanın α -1,4 glikozit bağlarına etki ederek glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Nişasta, çok sayıda glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş dallanmış polissakkarit bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Lee,1996).

1.2.2. Amilazların Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği'nin yaptığı sınıflandırmaya göre α -amilaz, eter hidrolaz grubunda yer almaktadır ve α -1,4 glukanglukanohidrolaz (E.C.3.2.1.19) olarak adlandırılmaktadır (Telefoncu, 1997).

Amilazlar endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki kategoriye ayrılabilirler.

➤ Endoamilazlar

Endoamilazlar, nişasta ve glikojendeki α -1,4 bağlarını farklı uzunluklarda düz ya da dallanmış oligosakkarit oluşturacak şekilde hidrolize ederler. Çoğu α -amilaz saf kristal şeklinde üretilmektedir. Endoamilazlara örnek olarak *Aspergillus oryzae*, *B.subtilis*, pankreas ve malttan elde edilenler verilebilir. Endoamilazların moleküler ağırlıkları, sıcaklık stabiliteleri, optimum aktivite gösterdikleri pH aralıkları ve hidrolitik özelliklerinin farklı olduğu anlaşılmıştır. Bundan dolayı α -amilazlar zincir uzunlukları birbirinden farklı olan oligosakkaritler meydana getirirler. Nişastanın tamamen ve çabuk parçalanabilmesi için prejelatinizasyona ihtiyaç vardır. Bakteriyel α -amilaz jelatinize haldeki nişastayı

normal nişastaya göre 300, mantar α -amilazı 100 kat daha hızlı parçalar (John ve Sons, 1998).

➤ Ekzoamilazlar

İntraselüler Enzimler: İntraselüler enzimler düşük moleküler ağırlığa sahip substratlar üzerinde etkilidirler (John, 1987).

Ekstraselüler Enzimler: Önemli ekstraselüler enzimlerin hemen hepsi, yüksek moleküler ağırlığa sahip substratları parçalayan hidrolazlardır (Madsen vd.,1973).

1.2.3. α -Amilazlar ve Etki Mekanizmaları

α -Amilaz enzimleri, bağlı polizomlar üzerinde sinyal peptid adı verilen öncül bir protein ile birlikte sentezlenir. Sinyal peptidler hidrofobik karakterlidirler. Bu peptidler α -amilaz enziminin nereye yönlendirileceğini belirlemektedir. α -Amilaz ilgili bölgeye geldikten sonra sinyal peptidler proteazlar aracılığıyla enzim bünyesinden ayrılır ve serbest kalan enzim de dışarı salgılanır. Ancak enzimin hücre duvarı boyunca mı yoksa spesifik kanallar vasıtasıyla mı salgılandığı henüz tam olarak bilinmemektedir. α -Amilaz enzimlerinin sentezi nişasta ya da daha düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritler varlığında uyarılır. α -Amilazlar nişasta moleküllerindeki amiloz zincirlerinin 1,4 bağlarına geliş güzel etki ederler. İlk etkinin helezonlar arasına düşen 1,4 glikozidik bağlara olduğu kabul edilmektedir. Bu şekilde zincir parçalara ayrılır ve bu kısalmış parçalar yeniden enzim tarafından etkilenir. Son ürün olarak 1/10'u glikoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışım meydana gelir. Enzim amilopektin molekülünün hidrolizinde 1,6 glikozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki gösterememektedir. Amilopektin hidrolizi sonucunda glikoz ve maltoza ilave olarak bir seri dallı sınır dekstrinler oluşmaktadır. Dört veya daha fazla glikoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glukoz bağlarının tümünü içermektedir (Sarıkaya, 1995). Belli sayıda glikoz ünitesi kalınca dallanma noktasına amilazlar etki edemediğinden bu dekstrinlere sınır dekstrin denmektedir. Ancak bu noktada etkili enzim amiloglukozidazdır (Yazgan ve Aksoy, 1983).

1.2.4. α -Amilaz Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Amilazlar nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden ekstraselüler enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen (Taylor ve Leach, 1995); kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger*, *A.oryzae*, *A.candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas*, *Saccharophila*, bazı *Clostridium* ve *Bacillus* türleri ve alt türleri gelmektedir. Fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel α -amilazlara göre daha çok duyarlı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel α -amilazlar oluşturmaktadır (Sarıkaya, 1995).

Enzim protein yapısında olduğundan enzim aktivitesini etkileyen faktörler; pH, sıcaklık gibi bazı etkenlerdir. α -Amilazların optimum pH aralığı enzimin elde edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir (Wong, 1995). Örneğin *Myxococcus coralloides*'nin ürettiği α -amilazın optimum pH değeri 6.5'dir (Farez-Vidal vd., 1992). *Bacillus* α -amilazları ise genel olarak 5.5-8.0 pH aralığında stabil olup, optimum aktivite gösterdikleri pH 4.8-6.5 arasında bulunmaktadır.

Bacillus türlerinin ürettiği α -amilazların pH'ları arasında da farklılıklar bulunmaktadır. Buna göre; *B. subtilis* α -amilazı pH 5.8-6.0 (Sarıkaya, 1995), *B. licheniformis* α -amilazı pH 5.5-7.0 arasında (Wong, 1995), *B. amyloliquefaciens* α -amilazı pH 5.9' da, *B. coagulans* α -amilazı pH 7.5-8.5 arasında optimum aktivite göstermektedir (Sarıkaya, 1995). Bazı *Bacillus* türlerinin ise alkalik (Boyer ve Ingle, 1972.; Sarıkaya, 1995) ya da asidik α -amilaz ürettiği saptanmıştır (Sarıkaya, 1995). *B. alkalophilis subspecies halodurans* için optimum pH 9.2 ve *B. coagulans* R3 için bu değer 10.5 (Bezberuah vd., 1991) olarak belirlenirken, *B. acidocalderus* 104-Ia için 4.0-5.0 arasında olduğu bulunmuştur (Sarıkaya, 1995). *Aspergillus oryzae* için optimum pH değeri ise 4.8-5.0 arasındadır. *Thermococcale* α -amilazlarının optimum pH aralığı 3.5-9 arasındadır (Levenque vd., 2000). *Clostridium thermosulfurogenes* SV 9 için bu değer 6.5-7.5 arasında değişmektedir (Swany ve Seenayya,1996).

Çeşitli kaynaklardan elde edilen α -amilazların en iyi aktivite gösterdikleri sıcaklık derecelerinde de farklılık bulunmaktadır. *Myxococcus coralloides*'den elde edilen α -amilazının en iyi aktivite gösterdiği optimum sıcaklık derecesi 28-45 °C (Farez-Vidal vd., 1992,1995), *B. acidocaldarius* α -amilazı için optimum sıcaklık değeri 30-60 °C, *B. subtilis*

α -amilazı için bu değer 40-65°C (Sarıkaya, 1995), *Bacillus* sp. JF suşu için 85-95°C (Jin vd., 2001), *B. amyloliquefaciens* α -amilazı için 30-37 °C'dir (Syu ve Chen, 1997). α -amilaz kullanılarak nişasta işlenirken, sıcaklık 105°C ve üzerine çıkmaktadır. Bu gibi işlemler sonucunda enzim geri dönüşsüz olarak termal inaktivasyona uğradığından enzimde aktivite kaybı olmaktadır.

B.licheniformis α -amilazının ise 100 °C üzerinde bile aktivite gösterdiğinden endüstride sık sık kullanılmaktadır (Wong, 1995; Sarıkaya, 1995).

Sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesine etkili faktörlerin yanı sıra çeşitli metal iyonlarının da aktiviteyi etkilediği araştırmalarla belirlenmiştir. Enzim, aktivite gösterebilmek için Ca^{++} iyonlarına ihtiyaç duyan bir metallo proteindir. Kalsiyum, aşırı pH ve sıcaklıklarda pepsin, tripsin ve papain gibi proteazlara karşı enzimi dayanıklı kılmaktadır. α -amilazın katalitik aktivitesi için gerekli olan bu metalin enzime bağlanma gücü enzim kaynağına bağlıdır (Sarıkaya, 1995). Klor iyonu da enzim stabilizasyonu için gereklidir. Ayrıca Cl^- iyonu enzim aktivatörüdür. Enzim aktivitesini artıran bu gibi iyonların yanı sıra bazı iyonlar ve maddeler enzim aktivitesini olumsuz etkilemektedir. Örneğin; Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Pb^{+2} gibi ağır metaller enzimi inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra üre ve diğer amid ayraçları α -amilazı inhibe etmektedir. *M. coralloides* suşunun ürettiği α -amilaz ise Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} , Pb^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , EDTA ve glutaraldehit tarafından güçlü şekilde inhibe edilirken, Ni^{+2} ve Cd^{+2} enzime daha az etki etmektedir. Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , karboimid ve fenilmetilsülfonilflorid etki etmemektedir (Farez-Vidal vd., 1992).

α -Amilaz enzimlerinin çoğunun moleköl ağırlığı yaklaşık olarak 45000-60000 dalton arasındadır ve genellikle enzim proteinin amino asit kompozisyonunda büyük farklılık yoktur. Örneğin; *Bacillus stearothermophilus* α -amilazlarının moleköl ağırlığı 48000 dalton iken *Bacillus subtilis* α -amilazlarının moleküllerinin ağırlığı 50000 daltondur (Sarıkaya, 1995). Bunun yanı sıra Kochhar ve Dua'nın (1990) *B. amyloliquefaciens*'ten elde ettikleri α -amilazın moleköl ağırlığı 68000 daltondur. Farez- Vidal ve arkadaşları ise *Myxococcus coralloides*'den elde ettikleri α -amilazın moleköl ağırlığını ise 22500 dalton olduğunu görmüşlerdir (Farez-Vidal vd., 1995).

1.2.5. α -Amilaz Enziminin Kullanıldığı Alanlar

α -Amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya’da tekstil endüstrisinde haşıl alma işlemi için ticari amaçla üretilmiştir. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilir. Bu işleme haşılama (sizing) denmektedir. Kumaş dokunduktan sonra kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması işlemine ise haşıl alma (desizing) denmektedir (Sarıkaya, 1995). Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Haşıl alma işleminde bakteriyel kaynaklı α -amilaz kullanımı tercih edilmektedir.

Daha sonraki yıllarda α -amilaz enzimi nişasta işleme endüstrisinde nişasta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmıştır. 1959 yılında ise α -amilaz ve amilo glikozidaz kullanılarak nişastadan toz ve kristal dekstrozun endüstriyel üretimine başlanmıştır (Sarıkaya, 1995).

α -Amilaz enziminin diğer bir kullanım alanı ise fırıncılık ürünleridir. Ekmek yapımında gerek fermantasyon gerekse pişirme sırasında ekmeğin kabarmasını, hacim kazanmasını sağlayan CO₂ gazıdır. Maya fermantasyonunun gerçekleştirilmesi her şeyden önce ortamda yeterli miktarda fermente olabilir şekerin varlığına bağlıdır. Ancak unlarda maya faaliyeti için gerekli fermente olabilir şeker miktarı çok düşük (% 0.1-0.5), nişasta miktarı ise çok yüksektir. Amilaz enzimleri unda mevcut bulunan nişastayı (% 4-10) ve jelatinize olmuş nişastayı parçalayarak fermente olabilir şekerleri oluşturmaktadırlar.

Ancak α -amilaz sağlam buğdaydan çekilen unda çok az miktarda bulunmaktadır. Yine unda bulunabilecek α -amilaz miktarı un verimine bağlı olarak değişmektedir. Ülkemizde buğday, özellikle Orta Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde kurak şartlarda yetiştirilmektedir (Sarıkaya, 1995).

Buğdayların olgunlaşma devresinin sıcak ve kurak geçmesi ve bu şartlarda hasat edilmesi, protein miktar ve kalitesini artırırken α -amilaz aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla hasat mevsiminde yağmur altında kalmamış silolama şartlarında çimlenmeye yüz tutmamış buğday örnekleri, normal öğütme işlemiyle düşük ve yetersiz α -amilaz aktivitesi göstermektedir. Bu durum ekmeklik unlarda önemli bir problem teşkil etmektedir. Kaliteli ekmek üretimi için optimum α -amilaz aktivitesi düşme sayısı olarak 220 (200-250) amilograf pik viskozitesi olarak 500 B.U.(Brabender Unit)’dur. Hâlbuki Türkiye buğdaylarında çeşitli araştırma sonucuna göre tespit edilen α -amilaz aktivitesi

düşme sayısı olarak 320-350, 315-449, 193-448 B.U. olarak tespit edilmiştir (Elgün ve Ertugay, 1995). Dekstrojenik bir enzim olan α -amilazların filizlenmemiş sağlam buğdaylarda yeterli miktarda olmaması onların mayalı fermantasyon ürünlerinin imalinde kullanılması halinde α -amilaz takviyesini zorunlu kılmaktadır (Elgün ve Ertugay, 1995).

Tablo 1.2. Amilazların uygulama alanları (Atlas 1994).

Kullanılan endüstri	Kaynak		Uygulaması
	<i>Bacillus</i>	<i>Apegillus</i>	
Alkol	+	+	Sakkarifikasyon için malt ilavesinden önce nişastanın sıvılaştırılması için
Piştirme maddesi		+	Fermente edilebilir karbonhidratların oranının artırılması.
İçki	+		Arpanın hazırlanması, sıvılaştırıcı ilavesi
İçki		+	Hububatların fermentesini kolaylaştırmak, bira özelliklerinin modifikasyonu
Yem	+		Yemlerde arpanın enzimatik olarak işlenmesinin geliştirilmesi.
Deterjan	+		Yıkamada temizleme gücünün artırılması
Kağıt	+		Kağıdın yazma kalitesini arttırmak için şeker üretmeksizin nişastanın sıvılaştırılması
Tekstil	+		Yüksek sıcaklıklarda sürekli haşılama
Şeker	+		Glikoz, früktoz ve maltoz üretiminde özsuda bulunan nişastayı parçalayarak filtrasyonu geliştirmek

İspirto üretiminde de yine aynı amaçla α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Elgün vd., 1995). Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller α -amilaz enzimi ve amiloglukozoksidaz enzimleri ile muamele edilmektedir (Sarıkaya, 1995).

Meyve suyu endüstrisinde de özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında α -amilaz kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyve halen nişasta içermektedir. Bu durum ise meyve sularında bulanıklığa yol açmaktadır. Bu sorun ortama α -amilaz ilave edilerek giderilebilmektedir (Sarıkaya, 1995).

α -Amilazların diğer bir kullanım alanı ise deterjan üretimidir. Enzimler deterjan katkısı olarak ilk kez 1913 yılında Alman kimyacı Otto Röhm tarafından kullanılmıştır. Bu amaçla günümüzde enzim üreticileri sıvı ve toz her tip deterjan için farklı formüllendirilmiş proteazlar üretmektedirler. Proteazlara ek olarak α -amilaz, selülaz ve lipaz gibi enzimler de deterjanlara katılmaktadır. Ayrıca proteazlar dışında lipazlar, selülazlar ve α -amilazların da

yaygın kullanılmasının desteklenmesi deterjan sektöründeki enzimlerin farklı bakış açıları kazanmasına neden olacaktır (Telefoncu, 1997).

1.3. Rekombinant DNA Teknolojisi

Moleküler genetik araştırma tekniklerinin gelişmesi araştırmacılara farklı kaynaklardan yani organizmalardan gelen DNA moleküllerinin in vitroda (hücrelerin ait oldukları organizmaların dışında yapay ortamlar içinde yetiştirilmeleri veya bulunmaları) birleştirilebilme olanağı sağlamıştır. Farklı kaynaklardan gelen moleküllerin birleştirilmesi ile oluşan DNA moleküllerine rekombinant DNA denir. Rekombinant DNA üzerinde restriksiyon endonükleaz analizleri, DNA dizileme ve yönlendirilmiş mutasyon gibi genetik analiz ve manipülasyonlar gerçekleştirilebilir. Bütün bu işlemleri yapmak için kullanılan tekniklerin tamamına rekombinant DNA teknolojisi denir. (Ekici vd., 2006).

DNA ile ilgili işlemler onun izolasyonu, çoğaltılması diziliş sırasının analizi belli yabancı DNA'nın plazmid ya da faj gibi taşıyıcı (vektör) aracılığı ile prokaryot ya da ökaryot konakçı hücreye konulması ve faaliyetinin temini yani transkripsiyon ve translasyon sürecinden sonra proteine dönüşme şeklinde gruplanabilir.

Yaygın kullanılan konakçı hücre *E.coli* dir. Yabancı DNA çoğaltılıp, saflaştırılır ve DNA diziliş sırası belirlenir. Yabancı DNA'nın gen ürünü büyük ölçülerde protein olarak üretilmesi sağlandığında işlem tamamlanmış olur (URL-1).

Rekombinant DNA teknolojisi doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin yapay yolla bir araya getirilmesidir. Bu teknoloji 6 temel safayı içerir.

1. Doku ya da hücrelerden DNA izole edilmesi (Genomik DNA)
2. Bu DNA moleküllerinin RE (Restriksiyon Endonükleazlar) denilen özel enzimlerle kesilmesi.
3. RE ile işlem görmüş DNA moleküllerinin vektör adı verilen taşıyıcı moleküllere yüklenmesi.
4. Vektör ve taşıdığı molekülün faaliyet göstereceği konakçı hücreye nakli (Transformasyon).
5. Konakçı hücre ve kendi genomu çoğalırken bu arada aktarılan DNA'da çoğalacağından DNA molekülünün klonlanmasının sağlanması.
6. Klonlanmış DNA'nın konakçı hücreden izole edilip incelenmesi.

Bunları sırasıyla inceleyelim;

1. Doku ya da hücrelerden DNA izole edilmesi (Genomik DNA): Gen yalıtımı veya izolasyonu, rekombinant DNA teknolojisinde, bir canlıya herhangi bir genin istenen yön ve biçimde yeni bir düzenleme içine sokulmasındaki ilk aşamadır. İşlem için değişik yollar kullanılabilir. Bu yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

- Genellikle kullanılan yöntemlerden biri, bir canlıdan yalıtılan ve saflaştırılan DNA moleküllerini, çift zincirli yapılarını bozmadan parçalamaktır. Çoğaltılması istenilen gen parçaları bu parçalardan birinin içinde bulunur. DNA'nın parçalanması için bazı mekanik (kontrollü çalkalama, ultrason uygulaması gibi) yöntemlerden yararlanılmakla birlikte, günümüzde en başarılı sonuçlar kesme enzimleri (restriksiyon endonükleazlar) ile sağlanmaktadır.

- Diğer yöntem ise DNA kopyasının (cDNA) eldesidir. Bunun için hücrelerden klonlanması amaçlanan genin transkripsiyon ürününü de içeren RNA yalıtılır. Daha sonra ters (revers) transkriptaz enzimiyle bu RNA moleküllerinin tamamlayıcısı olan DNA kopyaları çıkarılır. Meydana gelen RNA/DNA melezinin RNA kısmı enzimin ribonükleaz H aktivitesiyle hidroliz edilip yok edilir, daha sonra DNA polimeraz aktivitesiyle cDNA çift zincirli hale getirilir. Bu yöntem özellikle ökaryotik genlerin prokaryotlarda klonlanmasında kullanılmaktadır.

- Son yıllarda çok başarılı sonuçlar sağlayan başka bir yöntem de, Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) ile gen yalıtımıdır. 1986 yılında geliştirilen PCR yöntemi DNA moleküllerindeki istenilen gen bölgesinin canlı hücre içine sokulmadan yalıtılıp çoğaltılmasına olanak verir. Genomdan seçilen küçük miktardaki bir gen bölgesinin bile milyonlarca kopyası bu yöntemle yapılabilir. Bunun için sadece bu dizinin, en azından bir kısmının önceden biliniyor olması gerekmektedir. PCR ürünü DNA'lar klonlamanın yanı sıra dizi analizi, hastalık tanısı, genetik tarama gibi çeşitli amaçlar için de kullanılabilir. PCR, rekombinant DNA teknolojisinin etkinliğini ve gücünü arttırmış, hatta bazı yöntemlerin yerini almıştır.

2. Restriksiyon enzimleri ve seçimi: Belli bir gen diziliminden hedef DNA parçasının ayrılmasını sağlamak üzere kullanılan yöntem DNA moleküllerinin uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesikli mikro-reaktörlerde enzimatik tepkimelerle kesilmesidir.

Bakteriler tarafından yabancı DNA'ları yok etmek için sentezlenen bu enzimlerin diğer endonükleazlardan en önemli farkları DNA'da daima belli hedef dizinleri seçebilmeleri ve hep aynı dizinde özgül ve özgün kesme yapabilmeleridir. Endonükleaz enzimleri, nükleik asitler arasındaki fosfodiester bağlarını keserler. Etkilerine göre üç farklı restriksiyon enzim sınıfı bulunmaktadır. Bunlar; endonükleaz I, endonükleaz II ve endonükleaz III enzimleridir.

Bunlardan endonükleaz enzimi II grubunda olanlar gen klonlanmasında kullanılmaktadır. Bu enzimler DNA'nın genellikle dört ile sekiz adet baz içeren kısmını seçerler ve hedef dizini tanıyarak kesme yaparlar. Yaptıkları kesme biçimine göre küt (blunt) ya da yapışkan (sticky) uç DNA parçaları oluşur. Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri Tablo 1.3'de gösterilmiştir.

Tablo 1.3. Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri (Selen, 2008)

Enzim	Mikroorganizma	Hedef dizin	Yapışkan/Küt Uç Kesim
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Yapışkan
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Yapışkan
BglII	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Yapışkan
PvuI	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Yapışkan
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Küt
HindIII	<i>Haemophilus influenzae R_d</i>	AAGCTT	Yapışma

3. Vektör adı verilen taşıyıcı moleküllere yüklenmesi: Belirli bir uzunluktaki bir DNA parçası veya bir genin intronlar koparıldıktan sonra cDNA'sını kapsayan DNA parçası klonik DNA üzerinde daha detaylı genetik çalışmalar yapmak için bu DNA'lar genellikle vektörler üzerine nakledilir. Plazmidler, bakteriyofajlar, fagemidler, virüsler veya yeast yapay kromozomları vektör olarak kullanılmaktadır. Vektörler üzerine yerleştirilen bu DNA parçalarının polimeraz zincir yöntemi ile uygun primerler kullanılarak kopya sayılarını çoğaltmak mümkündür (Gözükara, 2001).

4. Vektör ve taşıdığı molekülün faaliyet göstereceği konakçı hücreye nakli

5. Gen çoğaltımı (Klonlaması): Moleküler klonlama veya gen klonlaması, rekombinant DNA moleküllerinin uygun bir konak hücreye sokularak orada çoğaltılması işlemine verilen addır.

Rekombinant DNA teknolojisi genelde, bir organizmadan elde edilen ve içinde istenilen geni taşıyan DNA parçalarının, taşıyıcı özellikte bir DNA molekülüne bağlanarak rekombinant DNA (cDNA) oluşturulması, rekombinant DNA moleküllerinin uygun bir konak hücreye sokularak orada çoğaltılmasını kapsayan bir süreci izlemektedir. Bu sürecin tanımlanmış bir DNA dizisinin yalıtımı (izolasyonu) ve daha sonrasında bunun birçok kopyasını in vivo koşullarda üretme aşamalarını kapsayan kısmı ise gen klonlamasıdır.

Klonlama, çoğunlukla gen içeren DNA parçalarının kuvvetlendirilmesi için kullanılır. Bunun yanında DNA'nın promotorlar, kodlanmamış diziler, kimyasal sentezlenmiş oligonükleotitler gibi kısımlarını ve nadiren kırılmış DNA'yı kuvvetlendirmek için de kullanılabilir.

Bu süreçte konak hücreler çoğaldıkça rekombinant DNA molekülleri yavru hücrelere geçerler ve yavru hücrelerde de kopya sayılarını arttırmaları. Çok sayıda hücre bölünmesini takiben oluşan bir klonda hücrelerin her birinde istenilen geni taşıyan cDNA moleküllerinin bir ya da daha fazla sayıda kopyası bulunur. Buna göre, gen klonlaması (ya da DNA klonlaması) tek bir genden kökenlenen ve hepsi birbirinin aynı olan bir DNA popülasyonu elde etmektedir. Bu teknolojiyle ayrıca çoğu kez klonlanmış bir genin kendisi için yeni konakta ifade edilmesinin sağlanmasıyla ürünün eldesi de amaçlanmaktadır (URL-2).

1.3.1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Uygulama Alanları

Rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları özellikle genetik mühendisliği ve biyoteknolojide kullanılmaktadır. Dünya nüfusunun %3-5'nin genellikle tedavi olanağı bulunmayan kalıtsal hastalıklardan etkilendiği bilinmektedir. Bu alandaki en büyük ümit ve beklenti genetik bozuklukların gen aktarımı yöntemleriyle düzeltilmesi ya da etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesidir. Kısa zamanda çok geniş bir uygulama alanı bulan bu yöntemin gerçek değeri önümüzdeki yıllarda çok daha iyi anlaşılacaktır.

Bugün rekombinant teknolojisi ile üretilen pek çok ürün tıpta ve çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. İnsan insülin hormonu, insan büyüme hormonu, eritropoitein,

interleukinler, interferon antikuagulantlar, kan faktörleri, aşılar ve büyüme faktörlerini bu arada saymak mümkündür.

Örneğin; eritropoitein molekül ağırlığı 51.000 dalton olan bir protein hormonudur. Böbrek bozukluğu olan insanlar bu hormon bakımından etkilidir ve anemi görülmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen enzimler deterjan, şeker ve peynir üretiminde kullanılmaktadır. Bu teknoloji ile üretilen bazı proteinler besin katkı maddesi, ilave besi maddesi aroma ve parfüm olarak sanayi ve ekonomide kullanılmaktadır. Gen mühendisliği ile üretilen bazı enzimler yağ ve mineral üretiminde, yağların hidrolize edilmesinde ve artık maddelerin defoksifiye edilmesinde kullanılmaktadır. Aynı teknoloji ile üretilen bazı bitkiler ise böceklerle ve hastalıklara karşı daha dirençli olmakta ve bu yolla meyve ve sebze verimi artırılmaktadır. Bugün pek çok cinayet rekombinant DNA teknolojisinin geliştirdiği teknikle çözülmektedir. Suç mahalinde bulunan bir saç teli suçlu olduğu düşünülen insanlarla karşılaştırılarak gerçek suçluyu ortaya çıkarmak mümkündür.

Gelecek yıllarda milyarlarca dolar ve iş imkânları rekombinant DNA teknolojisi içinde yatmaktadır. Bu nedenle ülkemizde bu teknolojiye gerekli önem verilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır (Gözükara, 2001).

1.4. Rekombinant “*Escherichia coli*”

Genelde *E.coli* kısaltması ile veya **koli basili** olarak bilinen *Escherichia coli*, memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan faydalı bakteri türlerinden biridir.

E.coli, pediatri ve bakteriyolog olan Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarında keşfedilmiştir ve adını ondan alır; *coli*, "kalın bağırsaktan" demektir. *E. coli*, genel olarak bakteri biyolojisinin anlaşılması amacıyla üzerinde sıkça çalışılmış bir model organizma olmuştur.

E.coli, biyolojik sınıflandırmada bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler ailesinde yer alır. Bakteri çubuk şeklinde olup, boyutları 1-2 µm uzunluğunda ve 0.1-0.5 µm çapındadır.

E.coli gram-negatif (Gram boyama prosedürü sırasında kristal viyola boyasını tutmayan bakterilerdir) bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır.

Klonlama tekniklerinde en yaygın ve basit olarak kullanılan *E.coli*'den oldukça yararlanılmaktadır. *E.coli*'nin kullanılmasındaki ana nedenler; kontrol edilebilir olması, ucuza mal edilmesi, kısa sürede çoğalması ve DNA yapısındaki gen haritasının tamamen biliniyor olmasıdır. Ayrıca antibiyotiklere olan direnç özelliğiyle de pratikte kolaylık sağlamaktadır.

1.5. Cevap Yüzey Yöntemi, (CYY)

Cevap Yüzeyi Yöntemleri ilk olarak 1951 yılında Box ve Wilson tarafından tanımlanmış ve geliştirilmiştir. Box ve Wilson mümkün olan en az sayıda gözlem değeri ile cevap yüzeyi üzerinde cevap değişkeninin maksimum değerini aldığı noktaya ulaşılması amaçlanan deneme düzenlerini ortaya koymuşlardır. Bazı deneme düzenlerini karşılaştırılmış ve kompozit denemeleri tanımlamışlardır (Mead ve Pike, 1975).

Cevap Yüzeyi yöntemleri model regresyon analizi yardımıyla oluşturulur. Bir faktörün ana etkisinin veya integrasyon etkisinin cevap değişkeninin değerlerinde ne derece önemli bir etkiye sahip olduğuna regresyon katsayıları yardımıyla karar verilir. Cevap yüzeyleri yönteminde ilk adım cevap değişkeni üzerinde etkisi olduğu düşünülen faktörleri ve sahip oldukları düzeyleri belirlemektir. Regresyon modelini oluşturmak için kurulacak olan deneme düzenlerini genellikle bu iki kıstas belirler.

Cevap Yüzeyi 40 yıldan fazla bir zamandır birçok bilim dalında başarı ile kullanılmaktadır. Yanıt yüzeyi kullanarak iki veya daha fazla faktörün; örneğin zaman sıcaklık ve ikisinin birlikte kalite kriterleri üzerine etkilerini araştırıp optimum değerleri bulunabilir. Sonuçlar üç boyutlu grafik halinde veya kontur haritası olarak ifade edilebilir (Joglekar ve May, 1987). Oldukça az sayıda deneysel kombinasyon kullanılarak gerçekte test edilmeyen faktör değeri ve bunların kombinasyonları hakkında tahmin yapılabilir. Klasik metotlar buna cevap veremezken Cevap Yüzeyi Yöntemi başarılı bir şekilde cevap verebilmektedir (Walker ve Parkhurst, 1984).

Box ve Wilson (1951), mümkün olan en az sayıda gözlemi kullanarak maksimum sonucun elde edileceği yanıt yüzeyi noktasını bulmayı amaçlayan desen şekillerini tartışmışlardır. Konuyla ilgili olarak farklı deneme desenlerinin etkinliğinin karşılaştırılması olarak karışık desen fikri Box ve Wilson tarafından ortaya konmuştur.

Box ve Draper (1959) yanıt yüzeylerin araştırılmasında ilgili desen seçiminde etken olabilecek farklı nedenleri tartışmışlardır. Box ve Draper (1959,1963) RSM yöntemine ilişkin yanlış model tanımlamış olmalarına rağmen RSM yönteminin ne kadar etkin olduğunu değerlendirmeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda yanlış model tanımlanması durumunda sapmanın önemli olduğu ve kullanıcının ciddi şekilde model seçerken bunu dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur.

Şans örneklerini oluşturan bireyler üzerinde yapılan gözlemler genellikle çeşitli faktörlere bağlı olup bunlarla gözlemler arasındaki bağıntıların incelenmesi için Cevap Yüzey Yöntemi geliştirilmiştir.

Bir faktörün üç seviyesi denendiğinde bunlara ait verim değerleri düz hat şeklinde veya parabolik olarak değişir. Parabolik etki varyans analizinde quadratik etki olarak ifade edilir.

RSM, ürün deseni ve geliştirilmesinde oldukça önemli bir araçtır. Örneğin 3 değişik parametrenin üç farklı faktörün (bağımsız değişkenin) muhtemel bütün kombinasyonları test edilecekse $3^3 = 27$ deneme yapılmalıdır. Fakat RSM deseni kullanılarak bu çalışma 15 denemede test edilip sonuca varılabilir (Walker ve Parkhurst,1984).

RSM’de araştırmacılar genellikle şunlarla ilgilenirler;

1. Denemeye alınmayan faktör kombinasyonları için cevabı tahmin edilebilecek uygun bir fonksiyonun oluşturulması.
2. Bağımlı değişken fonksiyonunu optimum yaparak bağımsız değişkenlerin değerlerinin bulunması. Problemin optimizasyon safhası, cevabı maksimum yapan $X_1, X_2, \dots, X_n$ bağımsız değişkenlerinin bulunmasını içerir.

Cevap Yüzeyin oluşturma amacı, tüm faktör uzayında belirli özellikleri sağlayan bir bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmektir. Eğer uyum sağlanan fonksiyon ilgilenilen bölgeyi yeterli bir şekilde temsil ediyorsa, uyumu sağlanan yüzeyin analizi sonucunda oluşturulan eşitlik gerçek değeri büyük bir olgunluk derecesiyle tahmin etmemizi sağlar. Bu amaçla çalışmalarda;

$$Y=f(X_1, X_2, \dots, X_n) + \epsilon \quad (1.1)$$

eşitliği esas alınır. Burada Y bağımlı yanıt değişkeni, f bağımsız değişkenler olarak bilinen kantitatif değişkenler olan $X_1, X_2, \dots, X_n$ ’in yanıt fonksiyonu ve ϵ de tesadüfi hata terimi olmaktadır.

1.5.1. Deneysel Dizayn

Deneysel dizayn olarak da bilinen istatistiksel deneysel dizayn en az sayıda deneyle maksimum bilgi elde etmek için deneylerin nasıl planlanacağı ve yapılacağıının metodolojisidir. Deneysel dizayn, deneysel verilerin toplanması için bir seri araçtır. Deneysel dizaynın avantajları şöyle sıralanabilir.

- Deneysel hataların etkisini azaltır.
- Kontrol edilmesi gereken önemli parametreleri ve kontrol edilmesine ihtiyaç olmayan önemsiz parametrelerin belirlenmesine yardım eder.
- Çok önemli olan etkileşimlerin ölçümüne yardım eder.
- Deney parametrelerinin incelenen aralıkları içinde en iyi sonucun araştırılmasına ve verilerin ekstrapolasyonuna imkan sağlar.
- Değişkenlerin birbirleriyle ilişkilerinin nasıl olduğunu tanımlayan grafiklerin çizilmesine ve optimum ürün veren değişkenlerin değerlerini belirlemeye imkan sağlar.

Deneysel dizayn bir çok alanda uygulanmaktadır. Bunlardan biri; değişkenler arasındaki ilişkileri araştırmak ve çok sayıda değişkenden önemli olanları belirlemektir.

İstatistiğe dayanan tüm prensipler güvenilir metot tarafından kanıtlanmış ve deneme, hatalarla desteklenmiştir. Kalite, nitelik ve tutarlığı etkileyen değişkenleri anlamak için denemelere mantıklı yaklaşım gerekir. Çözüm deneylerin dizaynıdır. Bir çok proses boyunca uygulanan deneysel dizayn anahtar bir role sahiptir. Bu prosesler bir çok faktör tarafından etkilenen kompleks sistemlerdir. Deneysel dizayn bu sistemleri için optimum formülasyonu ve işlem koşullarını belirler ve öncelikli ilişkilerin anlaşılmasını sağlar. Tek faktör yaklaşımı, faktörler arasındaki etkileşimleri göz önüne almadığından dolayı etkili değildir.

İstatistiksel deneysel dizayn sahip olduğu sayısız avantajlarıyla optimum cevabın belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Bir veya daha fazla cevap üzerine birkaç bağımsız değişkenin potansiyel etkisinin olduğu deneysel durumlarda uygulanır. Cevap değişkeni deneysel çıktı olarak gözlenirken deneylerin dizaynında bağımsız değişkenler kontrol edilir. Eşzamanlı değişkenlerin değiştirilmesi, zamanla tek bir değişkenin değiştirildiği duruma göre daha etkin sonuçlar verir. Değişkenler arasında etkileşimler değişik deneyler

yapılmadıkça görülemeyen problemlere neden olabilir. Deneysel dizaynın üstünlüğü birkaç faktörün eşzamanlı değiştirilmesi ve her bir faktörün bağımsızca değerlendirilebilmesidir.

İstatiksel deneysel dizayn deney yaparak geliştirmede detaylı bir deneysel plan yapmak için etkin bir prosedürdür. İyi seçilmiş dizayn verileri deneysel çalışmalar için maksimum miktarda bilgi elde edilebilir. Çoğu deneysel dizayna göre birkaç yaygın basamak vardır. İlk olarak çözülecek problemin belirlenmesidir. Prosesi etkileyen faktörlerin belirlenmesi ikinci aşamadır. Üçüncü olarak farklı kombinasyonlarda faktörlerin deneysel çalışmada incelenmesidir. Son olarak da en iyi sonuç veren kombinasyonun seçilebilmesidir.

1.5.2. Dizayn Taramaları

Bir veya daha fazla cevap üzerine çok fazla sayıda potansiyel etkiye sahip faktörlerin en önemli olanının belirlenmesi gereken durumlarda, uygulanan dizayn tarama deneysel olarak isimlendirilir. Bu daha ileride araştırılacak faktörlerin sayısını azaltacaktır. Daha ayrıntılı deneylerde maddi kaynaklarının ve zamanın etkin şekilde değerlendirilmesi için önemli olmayan parametrelerin eliminasyonu önce yapılabilir. Dizayn tarama birçok avantaja sahiptir; belirli değişkenlerin alt ve üst limit kontrol değerlerini belirleyerek prosesin geliştirilmesine yardım eder. İşlemler daha ekonomik bir yol ile etkin faktörler belirlenerek tekrar düzenlenebilir. Başka bir özelliği ise sonuçlar anlaşılabilir ve değerlendirilebilir bilgileri elde eden yapısal bir yaklaşım yoluyla geliştirilebilir. Sonuçlar matematiksel ifadeler olarak anlaşılabilir bir tarzda etkin olarak değerlendirilebilir.

Tarama deneylerinin stratejisi aşağıdaki gibidir;

1. Tarama deneylerinde ihtiyaç duyulan belirlemeleri yapmak,
2. Deney maliyeti ile kazanılan bilgileri göz önüne alarak deney sayısının belirlenmesi,
3. Bütün değişkenlerin fizibilite yapılması.

1.5.3. Plackett-Burman Tarama Dizaynı

Popüler bir tarama dizaynı 1946'da R.L. Plackett ve J.P. Burman tarafından geliştirilen Plackett-Burman Dizaynı'dır. Bu dizayn akıllıca kararlar alınsın diye sistem üzerine parametrelerin etkisini incelemek amacıyla oluşturulan, kalite kontrol prosesini geliştirmek

için tasarlanılır. Ortogonal dizileri tasarlayan Plackett-Burman dizaynı, tarama için kullanılmaktadır. Bu yöntem küçük dizaynlarda tüm ana etkilerin tarafsız bir tahminini verir. Değişik sayıda ‘n’ faktöriyel ‘n+1’ adet Plackett-Burman dizayn deneyinde taranabilir. Karakteristik özelliği örnek sayısının 4’n katları şeklinde olmasıdır. Bu dizaynın temel avantajı belli faktörlerin etkilerini hesaplamak için minimum sayıda gözleme ihtiyaç duymasıdır.

Plackett-Burman’ın en önemli dezavantajı örtüşen numunelerin çok kompleks olmasıdır. Her bir temel etki, bu etkiyi içermeyen çift yönlü bir etkileşimle örtüşmüştür. PB dizaynı bağımsız parametrelerin etkileşimini açıklamaya imkan sağlamaz. Bu yöntem önemli etkileşim oluşturan temel parametreleri tanımlayabilir. Bu önemli temel faktörlerin daha ileri analiziyle bu parametreler arasındaki etkileşimlerin tanımlanması ve belirlenmesi gereklidir. Plackett-Burman dizaynının kullanımı tarama için uygun bir tasarımıdır. Bu tarama işlemlerini aşağıdaki gibi özetleyebiliriz;

- Faktörlerin seçimi incelenen sistem hakkında literatür taranarak bilgi edinilmelidir.
- Faktörlerin seviyelerinin belirlenmesi, incelenecek bağımsız değişkenlerin hangi aralıklarda olması gerektiği literatür ve tecrübe ile saptanmalıdır.
- Takip edilecek cevabın seğilmesi,
- PBD matrisinin oluşturulması, Plackett-Burman tarafından önerilen modele uygun olarak faktör sayısı ve incelenecek aralıklar göz önüne alınarak yapılacak deneysel çalışma programı oluşturulacaktır.
- Deneysel plana uygun olarak tanımlanan deneylerin yapılması,
- Deneylerin tekrarlarının yapılması
- Model geliştirmek.
- Etkilerin istatistiksel ya da pratiksel analizini yapmak,
- İstatistiksel analizleri yorumlamak ve sonuç çıkarmak,
- Eğer gerekirse daha ayrıntılı modeller uygulamak ve sonuçlara göre mümkün olabilecek gelişmeleri önermek,
- Sonucun doğrulamasını gerçekleştirmek.

1.6. Kaynak Özetleri

Vitreoscilla hemoglobin geni (*vgb*) taşıyan bir vektörle klonlanmış olan *Escherichia coli* rekombinantının farklı suşlarından yararlanılarak α -amilaz enzimi üretilmesi daha önce birçok çalışmada yapılmıştır (Khosravi vd.,1990). Çalışmalar, *vgb* geni taşıyan ve taşımayan *E.coli* ve diğer bakterilerden sıvı faz fermantasyonu ile α -amilaz üretimi için ortam bileşimi, pH, sıcaklık gibi parametrelerin etkilerinin incelenmesi; benzer incelemenin tarımsal katı substratlar varlığında yapılması; her iki yöntemle de üretilen enzimin saflaştırılarak karakterize edilmesi şeklindedir.

α -Amilaz önemli bir endüstriyel enzimdir. Oksijen aktarım kısıtlamasının *vgb* geni ile aşılabileceği literatürde bulunmaktadır (Devesh ve Bharat,2006). Bunun gibi, benzer çalışmalar (*vgb* geni taşıyan aynı *E.coli* rekombinantı ile α -amilaz üretim için ortam bileşimi, biyoreaktör türü etkisi, vb) literatürde yine yer almaktadır (Tari vd., 1998). Bu çalışmada, *E. coli*'nin MK79 ve MK57 suşları ile α -amilazın nişasta varlığında aktivitesinin ortam bileşimine, havalandırma ve çalkalama oranlarına bağlı olarak değişimi yapılmıştır. Bunun sonucunda rekombinant hücrelerin gelişmeleri nişasta varlığında daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Nişastanın ilavesi geciktirildiği zaman spesifik ve toplam α -amilaz aktivitesinin daha fazla arttığı belirlenmiştir.

Mahvash Khosravi vd. 1990'da yaptıkları bir çalışmada VHb'nin; mikro aerobik şartlar altında aerobik bir şekilde bakterilerin büyümelerine izin veren ve O₂ bağlayıcı özelliğe sahip olan bir protein olduğunu ve bu proteinin oksijenle sınırlı büyüme şartları altında globulin gibi bir fonksiyona sahip olduğunu, muhtemelen bir mikrop için alışılmadık bir rolde olan bu bakteri oksijen metabolizmasında rol aldığını , ipliksi bir yapıya sahip olduğunu, Beggiatoa ailesinin üyesi olup, durgun gölet ve çürümekte olan bitkisel maddeler gibi oksijence fakir çevrelerde bulunduğunu belirtmişlerdir (Khosravi vd.,1990).

Khosla ve Bailey, yaptıkları bir çalışmada; *Vitreoscilla*, ipliksi gram negatif bir bakteri olup, oksijenin sınırlı olduğu tatlı su sedimentlerinde ve hayvan gübresinde bulunduğunu belirtmişlerdir. (Khosla ve Bailey, 1988b).

Orji ve Webster'in yaptığı bir çalışmaya göre ise VHb proteinin hemoglobin özelliği; kinetik ve yapısal özellikleri ile ispatlanmıştır (Orii ve Webster, 1986).

1988 yılında Dikshit ile Webster'in yaptıkları çalışmalarda; VHb'nin şu ana kadar en iyi karakterize edilmiş bakteriyel hemoglobin olduğu saptanmıştır. VHb'yi kodlayan gen bölgesi (vgb) izole edilmiş ve proteinin üç boyutlu yapısı çözülmüştür (Dikshit ve Webster, 1988; Khosla ve Bailey, 1988b).

1999'da Bülow'un yaptığı bir başka çalışmada ise; Webster'in ifade ettiği "VHb'nin diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında düşük oksijen afinitesine sahip" olmasından dolayı VHb biyoreaktörlerde hücrelere oldukça iyi bir oksijen transferi sağladığını ve VHb'nin ortalama oksijen asosiasyon hız sabiti $k_{on} = 78 \mu M^{-1}s^{-1}$ iken ortalama oksijen ayrışma hız sabiti $k_{off} = 5600 s^{-1}$ olup, diğer globülinlerden yüz kat daha büyük olduğunu ispatlamıştır. Yüksek k_{off} değeri, VHb'nin oldukça hızlı oksijeni serbest bırakmasını ve kirli çevrelerde karşılaşılan düşük oksijen konsantrasyonunun belli bir aralıkta tutulmasını sağladığını ifade etmiştir (Bülow vd., 1999).

Bailey ve arkadaşları; VHb'nin fonksiyonel incelemesi, şu ana kadar bilinen tüm globülinler arasında, çeşitli organizmaların enerji metabolizmaları açısından, VHb'nin mühendislik açısından kullanımını desteklemektedir. VHb'nin biyokimyasal karakteristiği ve inceleme sonuçlarının önemli bir kısmının temelini VHb-ekprese eden *Escherichia coli* oluşturduğu belirtilmiştir (Bailey, 1995).

Farres ve Kallio, Khosla ve Bailey ve arkadaşları; yaptıkları çalışmalarda, oksijenin sınırlı olduğu koşullar altında, VHb ekspresyonu yapan hücrelerde, protein sentezi ve hücre büyümesinde önemli bir artışın olduğunu rapor etmişlerdir (Farres ve Kallio, 2002; Khosla vd., 1990; Khosla ve Bailey, 1988a; Wei vd., 1998).

Böylece yapılan çalışmalar VHb eksprese eden hücrelerin mikrobiyal fermantasyon proseslerinde kullanılabileceği ve bakteriyel hemoglobinin endüstriyel bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

1.6.1. *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) Uygulamaları

İstenen birçok metabolitin endüstriyel üretiminde, hücre büyümesi ve üretim verimliliğinin optimizasyonu için büyüme koşullarının (sıcaklık, pH değeri ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi) ayarlanması ve kontrolü gerekir. Bir biyoprosesin laboratuardan endüstriyel ölçeği büyütüldüğü zaman, temel konu çözünmüş oksijen konsantrasyonunun kültür koşullarında ayarlanmasıdır. Bunun nedeni oksijenin sudaki

düşük çözünürlüğü ve yüksek hücre yoğunluğuyla meydana gelen yüksek besin talebinin bir kombinasyonudur. Oksijenin önemi hem bir besin maddesi olarak kullanımı hem de hücrenin metabolizma ve fizyolojisi ile bağlantılıdır. Oksijen elektron transfer zincirinde terminal elektron alıcısı olarak görev alır. Elektronlar aerobik metabolizma ile oksijene doğru transfer olduğu zaman, fermentatif veya anaerobik yoldaki diğer elektron alıcılarından daha yüksek enerji üretir (Ingledew ve Poole, 1984). Oksijenin enerji metabolizmasındaki önemine karşı, metabolik değişimlere, plazmid replikasyonuna, protein ve DNA oksidasyonuna neden olur (Konz vd., 1998). Çeşitli mikrobiyal suşların kültürü süresince, yetersiz oksijen beslemesi, sitokrom p-450 monooksigenazların aktivitesinde düşüşe neden olur (Urlacher vd., 2004).

Webster (1988) ve Bailey (1988) VHb proteinini kodlayan vgb genini içeren DNA fragmentlerini izole ettiler. Southern-blot analizleri kromozom üzerinde bu genin sadece tek bir kopyasının olduğu göstermiştir. Birçok çalışma sonucunda elde edilen deneysel veriler mikro aerobik koşullar altında VHb proteinini eksprese eden *E.coli* bakterilerinde hücre büyümesi ve protein üretiminde önemli artış olduğu belirlenmiştir (Khosla vd., 1990; Khosla ve Bailey, 1988a; Khosravi vd., 1990). Şimdiye kadar VHb, metabolit üretimi ve büyüme özelliklerini düzeltmek için birçok mikroorganizmada eksprese edilmiştir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Mikroorganizma

Deneylerde İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden temin edilen *Escherichia coli* JM103 (pMK79) suşu kullanılmıştır.

2.1.1. Bakteri Üretim Besiyerleri ve Koşulları

α -Amilaz üretiminde kullanılan bakterilerin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin saptanması amacıyla kullanılan farklı besiyerleri aşağıda verilmiştir. Kùltürler buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir. Kùltürler 30 günde bir yenilenmiştir. Aktivite bakımından test edilecek bakteriler önce sıvı LB besiyerinde 37 °C’de ve bir gece de üretilmişlerdir.

Tablo 2.1. Luria-Bertani (LB) ortamının içeriğı (Miller,1972).

Bileşimi	Miktar (g/L)
Pepton	10
Yeast Ekstrakt	5
Sodyum klorür	10
* Agar	15

* Sıvı ortamda kullanılmamıştır.

Tablo 2.2. Medium 9 (M9) ortamının içeriğı (Rhee vd., 1997).

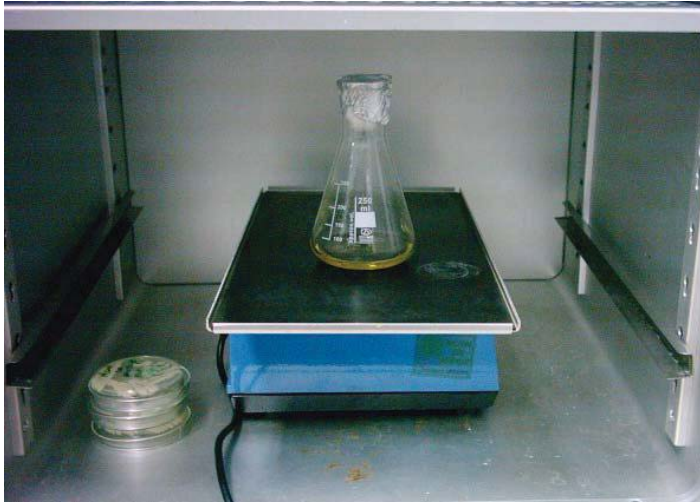
Bileşimi	Miktar (g/L)
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
1 M MgSO ₄ .7H ₂ O	0.24
0.1 M CaCl ₂	0.24
Pepton	3
Nişasta	10
Distile su (mL)	1000

Tablo 2.3. Gliserinli ortam içeriği (Tanyıldızı, 2005).

<u>Bileşimi</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Gliserin	%15 v/v
Pepton	5.0
Yeast ekstrakt	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
NaCl	1.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1
KH ₂ PO ₄	0.5

2.2. Yapılan Analizler

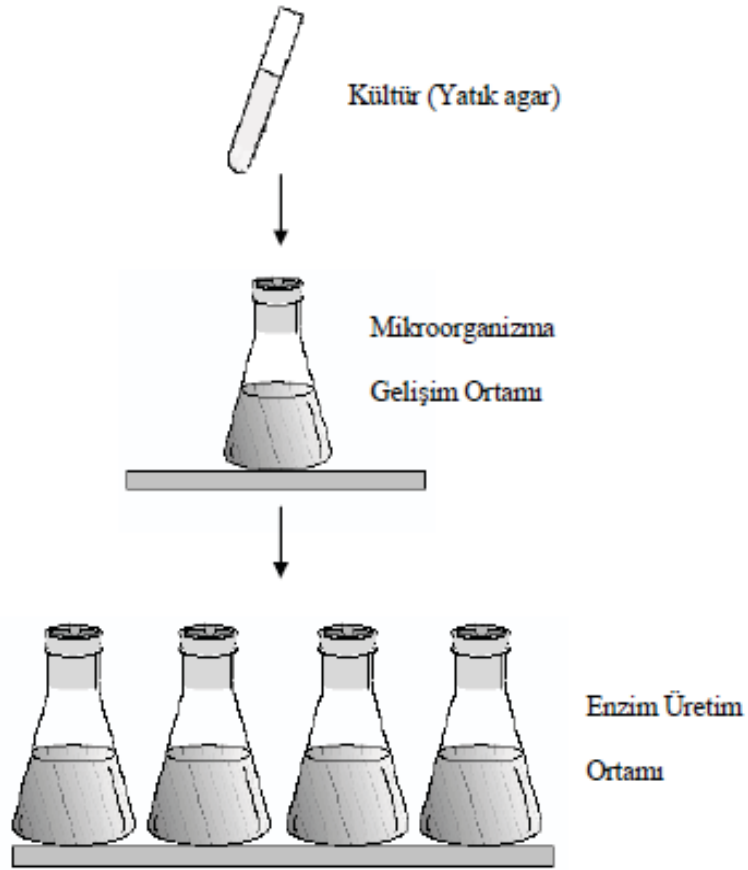
α -Amilaz aktivitesi bakımından test edilecek bakteriler önce LB sıvı besiyerinde 37°C’de 18 saat süre ile üretilmişlerdir (Şekil 2.1.). Bu süre sonunda, üreyen bakterilerden mikro pipet yardımıyla besiyerine ekimleri yapılmış ve 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılarak bakterilerin büyümeleri sağlanmıştır.



Şekil 2.1. Bakterilerin LB sıvı besiyerinde üretilmeleri

Hazırlanan besiyerlerinden 50 ml alınarak 250 ml’lik erlenlere konulmuştur. Başlangıç pH’ları 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanarak ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 121°C’de ve 1.2 bar basınçta 15 dakika süre ile otoklavda (Prior Clave

129) sterillenmiştir. Sterillenen besi yerleri laminar flow kabinde ortam sıcaklığına soğutulmuştur. Eğik slantlarda (yatık agar) bulunan bakteri kültürleri steril bir öze (loop) yardımıyla 50 ml bakteri LB ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere aşılanmıştır. Erlenlere aşılanan kültür 37°C'de 150 dev./dk. çalkalama hızına sahip orbital inkübatörlü çalkalayıcıda (Selecta Rotabit) 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Sterillenmiş enzim üretim besiyeri içeren erlenlere 0.5 ml bakteri LB ortamından aşılanmıştır. Bunun yanında bütün erlenlere 0.05 ml antibiyotik (Ampicillin 500 mg) ilave edilmiştir.



Şekil 2.2. Enzim üretiminde takip edilen yol

2.2.1. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bakteri kültürlerinde α -amilaz aktivitesi tayininden önce, hücrelerin ve diğer katı kısımların ayrılması amacıyla 5000 rpm'de 5 dakika fermantasyon ortamı santrifüjlendi (Hettich Eba21) ve daha sonra kültür sıvısı kullanılarak enzim aktivitesinin tayini yapıldı. Deneylerde aktivite tayini için Pfueller ve Elliotun (1969) dekstrinojenik yöntemi kullanıldı. α -Amilaz aktivitesinin tayini dekstrinojenik yöntem ile iyot'un nişastayla verdiği renk esasına dayanılarak ölçüldü. Bu yöntemle göre nişasta parçalandıkça iyotla verdiği (mavi) renk açılmaktadır. Nişasta α -amilaz tarafından adım adım parçalandığında, kısa zincirli dekstrinler üretilir ve renk mavi-mor-kırmızı- turuncu yolundan sarıya dönüşür. İyot metodu kolaylığı ve iyi sonuç vermesinden dolayı aktivite ölçümünde kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde, %3'lük 2.3 ml çözünür nişasta, 1 ml 0.1M CaCl_2 , 250 ml 0.1M potasyum fosfat tamponu (0.025 M NaCl içeren, pH=6.2), 200 ml distile sudan oluşan karışım substrat çözeltisi olarak kullanılmıştır. Aktivite ölçümlerinde, bir kontrol ve üç numune tüpü olmak üzere toplam dört tüp kullanılmıştır. Tüplere 4.5 ml substrat çözeltisi eklendikten sonra 37 °C'de su banyosunda 5 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra numune tüplerine 0.5 ml enzim ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında hem örnek tüplerine hem de kontrol tüplerine 1 M 0.9 ml HCl çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Kontrol tüpüne 0.5 ml enzim çözeltisi konduktan sonra renk oluşumunu gözlemek için 0.1 ml iyot ayırıcı içeren kör numuneye karşı 620 nm'de spektrofotometre (Jenway-6105) yardımıyla ölçülmüştür. Kontrol tüpünün verdiği değerden, örnek tüpünün verdiği değer çıkarılarak, aralarındaki fark yardımıyla enzim aktivitesi Unite (U) olarak hesaplanmıştır. Bir unite enzim, 37 °C' de yukarıda tanımlanan deney koşullarında 0.0284 optik densite (OD) azalmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Sarıkaya, 1995). Yüksek enzim aktivitelerinde, uygun oranlarda fosfat tamponuyla enzim çözeltisi seyreltilmiş ve sonuç seyrelme faktörüyle çarpılmıştır.

$$U = \frac{(\text{Kontrol} - \text{Numune})}{0.0284} * (\text{Seyreltme Oranı}) \quad (2.1.)$$

2.2.2. Deneysel Tasarım ve İstatiksel Analiz

Yapılan denemeler sonucunda maksimum α -amilaz aktivitesi optimum işlem koşulları cevap yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasından sıcaklık, pH, aşılama miktarı, çalkalama hızı, azot kaynakları, karbon kaynakları ve tuzlar aktivite üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, azot ve karbon kaynakları ve tuzlar bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin aktiviteye (bağımlı değişken) etkileri incelenmiştir. Önce azot ve karbon kaynaklarının ve tuzların (Pepton, Na_2HPO_4 , YE, KH_2PO_4 , NH_4Cl , CaCl_2 , Nişasta, Glikoz) aktivite üzerindeki etkilerini araştırmak için dizayn taraması yapıldı. Daha sonra yanıtlar ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmediğinden ikinci dereceden polinomial bir modelle gerçek yanıt fonksiyonuna yaklaşılabileceği varsayıldı. Bu bir modelin uyarlanabilmesi için gerekli deneysel veriler ‘Merkez Kompozit Dizayn’ deneme planı izlenerek elde edilmiştir ‘Merkez Kompozit Dizayn’ 2^3 faktöriyel bir tasarıma $6(n_0)$ adet merkez ve $6 (\alpha=(2^m)^{1/4})$ ekseknel noktanın eklenmesiyle elde edilir. Merkez noktası tüm değişkenlerin orta (0) değerini aldığı deneme noktasıdır. Bu noktada yapılan tekrarlar, uygun serbestlik derecesi sağlayarak kalıntı hatanın, saf deneysel hata ve “lack of fit” olarak ayrılmasını sağlar. Böylelikle modelin matematiksel formunun uygunluğu da test edilebilmiş olur. Ekseknel nokta ise bağımsız değişkenlerin en yüksek ve en düşük değerleri aldıkları noktalardır ve modeldeki eğriliğin tahminlenmesini sağlamak için 2^3 faktöriyel tasarıma eklenmiştir. Böylelikle deneme planı rotatable olmuştur. Rotatable dizaynlar, değişkenlerin deneysel uzayında tüm yönlerde eşit tahminleme gücüne sahip olduklarından, başlangıçta yeri bilinmeyen optimum noktanın bulunmasında önemli avantajlar sağlamaktadır (Koç, 2008).

Değişkenler, regresyon analizini ve optimum noktanın bulunmasını kolaylaştırmak için aşağıda belirtildiği gibi kodlanır.

$$x_i = \frac{(X_i - \bar{X}_i)}{\Delta x_i} \quad (i=1,2,3) \quad (2.2.)$$

Burada,

x_i : Bağımsız değişkenin boyutsuz(kodlanmış) değeri

Δx_i : Bağımsız değişkendeki basamak artışı

X_i : Bağımsız değişkenin gerçek değeri

$\bar{X}_i$: Bağımsız değişkenin merkez noktasındaki gerçek değeridir.

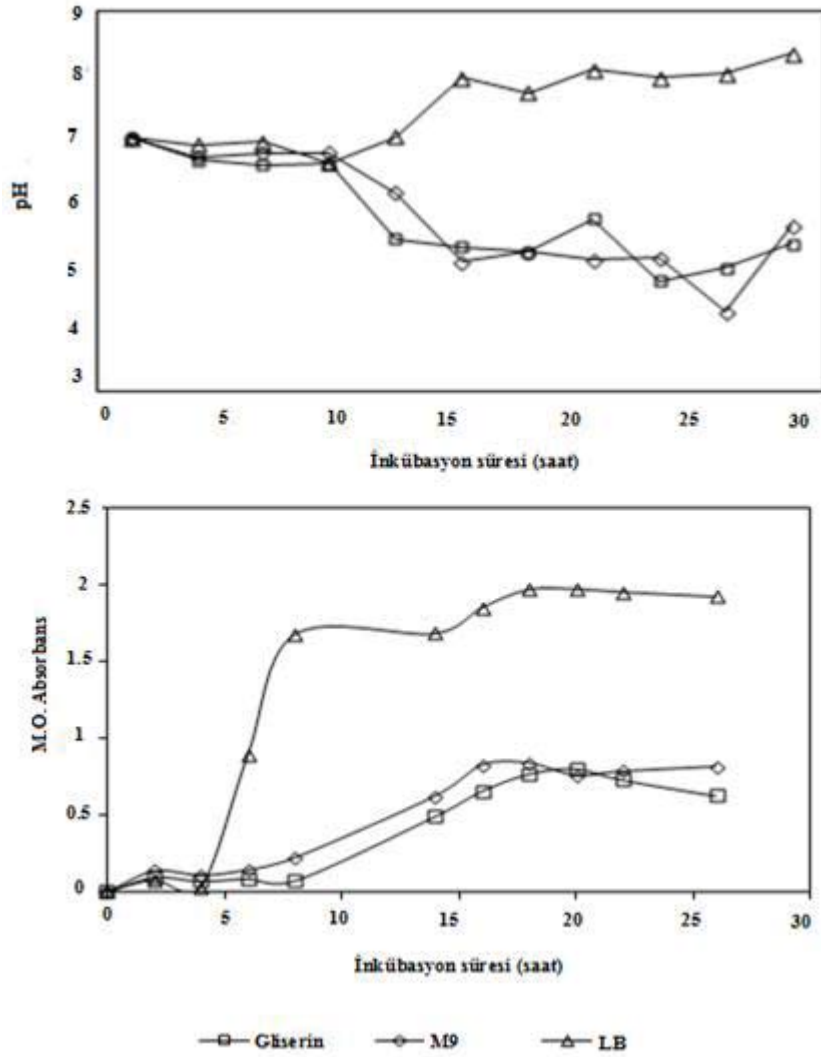
Değişkenlerin bu şekilde kodlanması regresyon analizini ve optimum noktanın bulunmasını kolaylaştırır.

Oluşturulan modellerin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, quadratik ve interaksiyon etkilerinin yanıtlar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri % 95 güvenlik seviyesinde *Fischer* (*F-testi*) testi uygulanarak bulunmuştur. Bir modelin sistemin gerçek yanıtına uygun bir yaklaşım olup olmadığına, “lack of fit”den kaynaklanan hatanın önemsiz ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun % 95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşuluyla karar verilmiştir. Ayrıca, modelin uygunluğu regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı ($Adj-R^2$), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS) ve tahminlenmiş çoklu belirleme katsayısı ($Pre-R^2$) kullanılarak test edilmiştir (Koç, 2008).

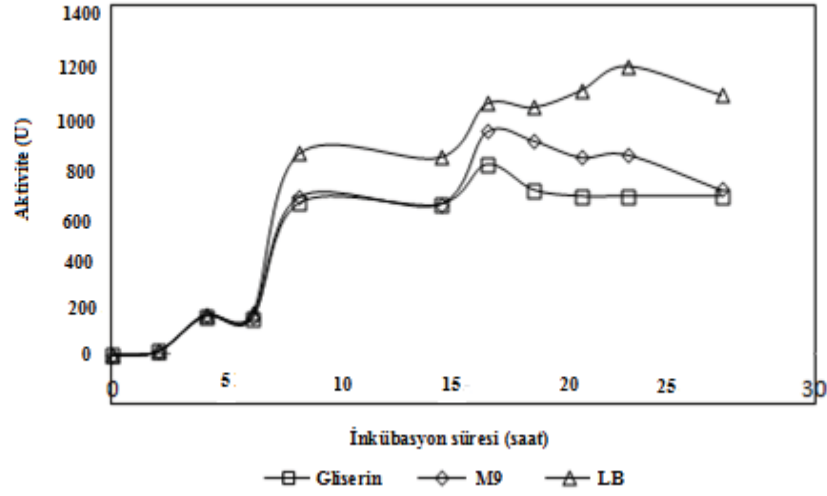
Regresyon analizi, istatistiksel analizler, ve yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon Design Expert [Version (6.0) Statease Inc.] paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

Rekombinant *E.coli* ile α -amilaz üretiminin araştırılması amacıyla seçilen temel ortamlar literatürden alınmıştır (Miller,1972; Tanyıldızı, 2005). Bu amaçla yapılan çalışmalarda LB (Luria-Bertani) ortamı, gliserin içeren ortam ve M9 ortamlarında ekim yapılmış ve bu ortamlardaki pH değişimi, enzim üretimi ve mikroorganizma büyümesi takip edilmiştir (Şekil 3.1-3.2.). LB ortamında elde edilen sonuçların diğer ortamlardan daha yüksek olduğu ve her üç ortamda da enzim üretiminin gerçekleştiği şekilden görülmektedir.



Şekil 3.1. Gliserin, M9 ve LB ortamlarında zamanla mikroorganizma büyümesi ve pH'nın değişimi



Şekil 3.2. Gliserin, M9 ve LB ortamlarında zamanla enzim aktivitesinin değişimi

LB ortamıyla birlikte diğer iki ortamdaki bileşenlerin üretimindeki etkilerinin ortaya konulması amacıyla PB (Plackett-Burman) dizaynı yapılmıştır. Oluşturulan tasarımda incelenen aralıklar daha önce yapılan deneylerin sonuçlarından faydalanılarak belirlendi. Belirlenen bağımsız parametrelerin incelenen aralıkları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Plackett-Burman dizaynında kullanılan bağımsız değişkenlerin değer aralıkları tablosu

	Kodlu Değer	Pepton (A) (g/L)	Na ₂ HPO ₄ (B) (g/L)	YE (C) (g/L)	KH ₂ PO ₄ (D) (g/L)	NH ₄ Cl (E) (g/L)	CaCl ₂ (F) (g/L)	Nişasta (g/L)	Glikoz (G) (mL/L)
Düşük	Değer	-1	2	1	1	1	3	1	1
Yüksek	Değer	+1	4	4	3	4	6	4	4

PB dizaynı ve deneysel sonuçlar Tablo 3.2’de görülmektedir. PB dizaynında 8 bağımsız parametrenin 2’li seviyeleri için 12 deney önerilmektedir.

Tablo 3.2. Tahmin edilen ve deneysel olarak tayin edilen α -amilaz aktivite değerleri içeren PB dizayn matrisi

Çalışılan sıra	(A) Pepton (g/L)	(B) Na ₂ HPO ₄ (g/L)	(C) YE (g/L)	(D) KH ₂ P)O ₄ (g/L)	(E) NH ₄ Cl (g/L)	(F) CaCl ₂ (g/L)	Nişasta (g/L)	(G) Glikoz (mL/L)	Deneysel Aktivite (U)	Tahmin edilen Aktivite(U)
1	2.00	4.00	3.00	1.00	4.00	3.00	4.00	1.00	146.1	150.23
2	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	470.0	460.09
3	4.00	1.00	3.00	1.00	4.00	3.00	1.00	4.00	193.6	191.90
4	4.00	1.00	1.00	4.00	4.00	3.00	4.00	4.00	183.1	184.86
5	2.00	4.00	3.00	4.00	1.00	3.00	4.00	4.00	100.4	96.24
6	2.00	1.00	1.00	4.00	4.00	6.00	4.00	1.00	142.606	140.85
7	4.00	1.00	3.00	1.00	1.00	6.00	4.00	1.00	308.099	315.73
8	4.00	4.00	1.00	1.00	1.00	6.00	4.00	4.00	285.211	277.58
9	4.00	4.00	3.00	4.00	4.00	6.00	1.00	1.00	218.31	208.33
10	2.00	1.00	3.00	4.00	1.00	6.00	1.00	4.00	89.7887	93.90
11	2.00	4.00	1.00	1.00	4.00	6.00	1.00	4.00	102.113	109.74
12	4.00	4.00	1.00	4.00	1.00	3.00	1.00	1.00	510.563	520.54

Tablo 3.3. PB dizaynıyla elde edilen lineer denklemin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Prob > F
Model	2.161*10 ⁻⁶ +005	8	27013.52	152.01	0.0008 önemli
Pepton (g/L)	34979.83	1	34979.83	196.84	0.0008
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	50.63	1	50.63	0.28	0.6305
YE (g/L)	33848.48	1	33848.48	190.47	0.0008
KH ₂ PO ₄ (g/L)	5657.77	1	5657.77	31.84	0.0110
NH ₄ Cl (g/L)	50462.25	1	50462.25	283.96	0.0005
CaCl ₂ (g/L)	17460.99	1	17460.99	98.26	0.0022
Nişasta (g/L)	14631.07	1	14631.07	82.33	0.0028
Glikoz (mL/L)	59017.10	1	59017.10	332.10	0.0004

Modelin yeterli olup olmadığı hesaplanıp ve Tablo 3.3.'de PB dizaynı birinci dereceden (lineer) cevap yüzeyi modelin α -amilaz üretimi için anova sonuçları gösterilmiştir. *Prob F* değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlar cevapda önemli etkisi olduğu düşünülür. Tabloda incelenen her parametre için *prob>F* değerinin 0.05'den küçük olanların sonuç üzerinde etkisinin fazla olduğu düşünülürse, önerilen modeldeki etkin parametre sayısının oldukça fazla olduğu söylenebilir. Glikoz (0.0004) değeri ile en önemli faktör olarak belirlenmiştir. Pepton (0.0008), YE (0.0008), KH₂PO₄ (0.0110) , NH₄Cl (0.0005), CaCl₂

(0.0022), Nişasta (0.0028), terimlerinin $Prob>F$ değerinin 0.05’den küçük olduğu görülmektedir.

Regresyon eşitlik katsayıları hesaplatılarak birinci dereceden polinomiyal eşitlik uygulanarak aşağıdaki kodlu faktör denklemi bulundu.

$$\alpha\text{-Amilaz aktivitesi} = 229.17 + 53.99* \text{Pepton} - 2.05* \text{Na}_2\text{HPO}_4 - 53.11* \text{YE} - 21.71* \text{KH}_2\text{PO}_4 - 64.85* \text{NH}_4\text{Cl} - 38.15* \text{CaCl}_2 - 34.92* \text{Nişasta} - 70.13* \text{Glikoz} \quad (3.1)$$

Tablo 3.4. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler

Standart sapma	13.33	R^2	0.9975
Ortalama	229.17	Adj R^2	0.9910
Varyasyon katsayısı (C.V.)	5.82	Pred R^2	0.9606
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	8530.05	Adeq Precision	36.955

Anovadan elde edilen regresyon eşitliğinde R^2 0.9975 olarak bulundu ve bu, modelin cevaptaki değişikliği % 99.75’ini açıklama yeteneğinde olduğunu gösterir (Tablo 3.4). Modelde gösterilen “Adj R^2 ” 0.9910 değeri ve “Pred R^2 ” 0.9606 değeri istatistiksel çalışmalar için uygun sonuçlardır. Çünkü, iyi bir istatistiksel modelde R^2 0 ile 1 arasındadır. Bu değer 1’e yaklaştıkça modelin daha uygun olduğu belirtilir. Modelin “Adeq Precision” değeri 36.955’dir ve bu değer gürültü oranının sinyalini ölçer. “Adeq Precision” değeri 4’den daha yüksek bir oran tercih edilir. Bulunan 36.955 oranı yeterli bir sinyal gösterir.

Plackett-Burman dizaynı sonucunda glikoz, nişasta, CaCl_2 , NH_4Cl , KH_2PO_4 , YE ve pepton etkin parametre olarak seçilmiştir.

3.1. Merkez Kompozit Dizayn (MKD)

PB tarama tasarımı sonucunda etkin olduğu belirlenen ortam bileşenlerinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve ortam optimizasyonunun yapılması amacıyla merkez kompozit dizaynı kullanılmıştır. Bu tasarımda bağımsız parametrelerin birbirine olan etkileşimlerinin belirlenmesi gerçek optimum noktaların ortaya konulması açısından önemlidir. Bu amaçla hazırlanan deney tablosu Tablo 3.5’de görülmektedir. Seçilen tasarım küçük MKD dizaynıdır. Burada incelenen ortam bileşenleri $-\alpha(-2.166)$, $-1, 0, +1$ ve $+\alpha(2.166)$ aralığında belirlenen kodlu değerlerle tanımlanmaktadır. Bu tasarımda 41 farklı

deney noktasıyla 7 bağımsız değişkenin aktivite üzerine etkisi incelenmektedir. Uç noktaların (14 nokta) sonuç üzerine etkisi bu tasarımdan çok daha önemlidir. Tasarımda 5 deney merkez noktada yapılırken 22 deney noktası ise faktöriyel kısım içerisinde kalmaktadır. PB dizaynında belirlenen etkin parametre sayısının nispeten yüksek olmasından dolayı çalışmada minimum deney sayısı içeren tasarım seçilmiştir.

İncelenen ortam bileşenlerinin taranılan aralıkları ve bunlara karşılık gelen kodlu değerleri Tablo 3.5’de görülmektedir. Bu aralıkların seçimi gerçek optimum noktaların belirlenmesinde önemlidir. Aralıkların seçiminde hem PB dizaynında elde edilen sonuçlar hem de tasarımdan önce yapılan çalışmalardan yararlanılmıştır.

Tablo 3.5. Merkez Kompozit Dizayn deney tablosunda bulunan değişkenler ve incelenen aralıklar

Faktör	Adı	- α	-1	+1	+ α
A	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	4.00	4.00	4.00	8.00
B	KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.50	1.50	1.50	3.50
C	NaCl (g/L)	0.50	0.50	0.50	1.00
D	NH ₄ Cl (g/L)	0.50	0.50	0.50	1.00
E	MgSO ₄ .H ₂ O (mL/L)	6.00	6.00	6.00	14.00
F	CaCl ₂ (mL/L)	6.00	6.00	6.00	14.00
G	Glikoz (mL/L)	6.00	6.00	6.00	14.00

Tablo 3.6. Önemli olan yedi değişken için 41 sıralı MKD dizayn matrisi ve deneysel olarak belirlenen enzim aktivite değerleri

Sıra	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	NH ₄ Cl (g/L)	MgSO ₄ .H ₂ O (mL/L)	CaCl ₂ (mL/L)	Glikoz (mL/L)	Aktivite (U)
1	8.00	1.50	0.50	1.00	14.00	14.00	14.00	316
2	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	18.66	228
3	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	126
4	10.33	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	17
5	6.00	2.50	1.29	0.75	10.00	10.00	10.00	588
6	4.00	3.50	0.50	1.00	6.00	6.00	6.00	186
7	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	139
8	4.00	1.50	1.00	0.50	6.00	6.00	14.00	250
9	4.00	3.50	0.50	0.50	6.00	14.00	14.00	302
10	8.00	3.50	1.00	1.00	6.00	14.00	6.00	426
11	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	1.34	105
12	6.00	2.50	0.75	1.29	10.00	10.00	10.00	137
13	4.00	3.50	1.00	1.00	6.00	6.00	14.00	285
16	4.00	1.50	0.50	0.50	14.00	6.00	14.00	366
17	6.00	2.50	0.75	0.75	1.34	10.00	10.00	313
18	4.00	1.50	0.50	0.50	6.00	6.00	6.00	28
19	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	18.66	133
20	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	95
21	4.00	3.50	0.50	0.50	14.00	14.00	14.00	147
22	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	80
23	8.00	3.50	1.00	0.50	14.00	6.00	6.00	316
24	8.00	3.50	0.50	1.00	6.00	14.00	6.00	126
26	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	10.00	10.0	116
27	6.00	2.50	0.75	0.75	10.00	18.66	10.00	88
28	6.00	4.67	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	179
29	8.00	1.50	1.00	0.50	6.00	6.00	14.00	1299
30	1.67	1.67	2.50	0.75	10.00	10.00	10.00	77
31	4.00	3.50	0.50	1.00	14.00	6.00	14.00	355
32	6.00	2.50	0.75	0.21	10.00	10.00	10.00	197
33	6.00	0.33	0.75	0.75	10.00	10.00	10.00	246
34	6.00	2.50	0.75	0.75	1.34	10.00	10.00	119
35	4.00	1.50	1.00	1.00	14.00	14.00	6.00	17
36	4.00	3.50	1.00	0.50	6.00	14.00	6.00	137
37	8.00	3.50	1.00	0.50	14.00	6.00	14.00	250
38	8.00	3.50	1.00	0.50	14.00	14.00	14.00	73
39	8.00	1.50	1.00	1.00	6.00	14.00	14.00	665
40	8.00	1.50	0.50	0.50	14.00	6.00	6.00	95
41	8.00	1.50	0.50	0.50	6.00	14.00	14.00	105

Design Expert yazılımı yardımıyla elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 3.7’de görülmektedir. Bu sonuçlara göre NaCl ve CaCl₂ konsantrasyonlarının enzim aktivitesine

Tablo 3.7. Amilaz üretiminde ikinci dereceden (quadratic) cevap yüzey modelinin amilaz üretimi için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Prob > F
Model	1.972E+006	35	56350.08	16.41	0.0027 önemli
A	1791.56	1	1791.56	0.52	0.5025
B	2237.90	1	2237.90	0.65	0.4562
C	1.340E+005	1	1340E+005	39.00	0.0015
D	1791.56	1	1791.56	0.52	0.5025
E	99.19	1	99.19	0.029	0.8717
F	25391.79	1	25391.79	7.39	0.0418
G	7593.98	1	7593.98	2.21	0.1972
A ²	385.76	1	385.76	0.11	0.7511
B ²	42617.66	1	42617.66	12.41	0.0169
C ²	1.334E+005	1	1.334E+005	38.83	0.0016
D ²	20709.33	1	20709.33	6.03	0.0575
E ²	7848.13	1	7848.13	2.29	0.1910
F ²	35949.91	1	35949.91	10.47	0.0231
G ²	20709.33	1	20709.33	6.03	0.0575
AB	85254.40	1	85254.40	24.82	0.0042
AC	3.110E+005	1	3.110E+005	90.56	0.0002
AD	2976.41	1	2976.41	0.87	0.3946
AE	17431.00	1	17431.00	5.08	0.0740
AF	1.344E+005	1	1.344E+005	39.12	0.0015
AG	10318.42	1	10318.42	3.00	0.1436
BC	1.048E+005	1	1.048E+005	30.51	0.0027
BD	3818.428	1	3818.42	11.12	0.0207
BE	12329.58	1	12329.58	3.59	0.1167
BF	98199.19	1	98199.19	28.59	0.0031
BG	33822.74	1	33822.74	9.85	0.0257
CD	26148.29	1	26148.29	7.61	0.0399
CE	60655.89	1	60655.89	17.66	0.0085
CF	1.234E+005	1	1.234E+005	35.93	0.0019
CG	1.121E+005	1	1.121E+005	32.64	0.0023
DE	95054.17	1	95054.17	27.68	0.0033
DF	1.192E+005	1	1.192E+005	34.71	0.0020
DG	1.016E+005	1	1.016E+005	29.59	0.0028
EF	1.092E+005	1	1.092E+005	31.81	0.0029
EG	0.002490810.01	1	90810.01	26.44	0.0036
FG	25230.98	1	25230.98	7.35	0.0423
Artan	17173.09	5	3434.62		
Uyum eksikliği	14974.10	1	14974.10	27.24	0.0064 önemli

lineer olarak etkileri önemlidir. KH_2PO_4 , NaCl ve CaCl_2 konsantrasyonlarının model denkleminde etkilerinin üstel şekilde olduğu tablodan görülmektedir. Bu parametrelerdeki küçük bir değişim enzim üretimini önemli oranda etkileyebilmektedir. Metal enzim olan α -amilazın ortamdaki Ca^{++} iyonlarıyla aktivitesindeki değişim beklenen bir sonuçtur. Ayrıca ortamın iyonik dengesi ve hücre geçirgenliğinin değişimi enzim üretimi ve mikrobiyal büyümeyi etkileyecektir (Shilpi vd, 2012).

ANOVA sonuçlarına göre ortam bileşenlerinin birbirine etkileri oldukça fazladır. *Prop-F* değerlerine göre Na_2HPO_4 konsantrasyonunun KH_2PO_4 , NaCl ve CaCl_2 konsantrasyonlarıyla olan etkileşimi önemlidir. KH_2PO_4 konsantrasyonuyla NaCl, NH_4Cl , CaCl_2 ve glikoz konsantrasyonuyla etkilerinin ANOVA test sonuçlarına göre önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca NaCl konsantrasyonu ile NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 ve glikoz aralarındaki etkileşim, NH_4Cl ile $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ arasındaki etkileşiminde önemli olduğu model tarafından önerilmektedir.

Tabloda incelenen her parametre için *Prob>F* değerinin 0.05 den küçük olanların sonuç üzerinde etkisinin fazla olduğu düşünülürse, α -amilazın üretilmesi bakımından önerilen modeldeki etkin parametre sayısının oldukça fazla olduğu söylenebilir. C, F, B^2 , C^2 , F^2 , AB, AC, AF, BC, BD, BF, BG, CD, CE, CF, CG, DE, DF, DG, EF, EG, FG terimlerin 0.05'den küçük olduğu görülmektedir. Model terimlerinden 0.05'den büyük olan değerler önemli sayılmamaktadır. 27.24 ile ifade edilen Fit *F* değeri yani uyum eksikliği değeri önemlidir. Bu değer sadece % 64'lük bir gürültüden kaynaklanır.

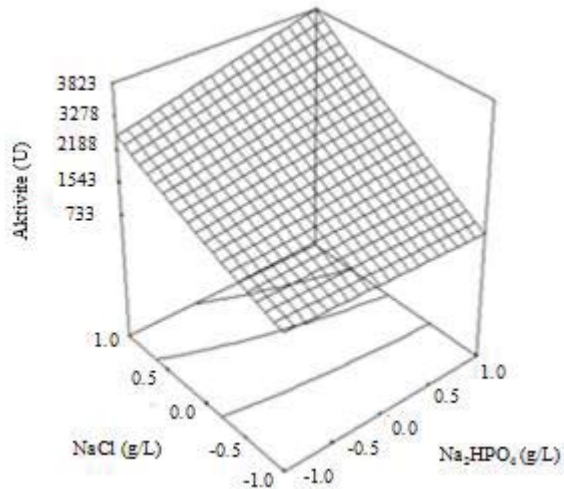
Tablo 3.8. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler

Standart sapma	58.61	R^2	0.9914
Ortalama	226.84	Adj R^2	0.9309
Varyasyon katsayısı (C.V)	25.84	Pred R^2	-24.1491
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	$5.003 \cdot 10^6 + 007$	Adeq Precision	23.523

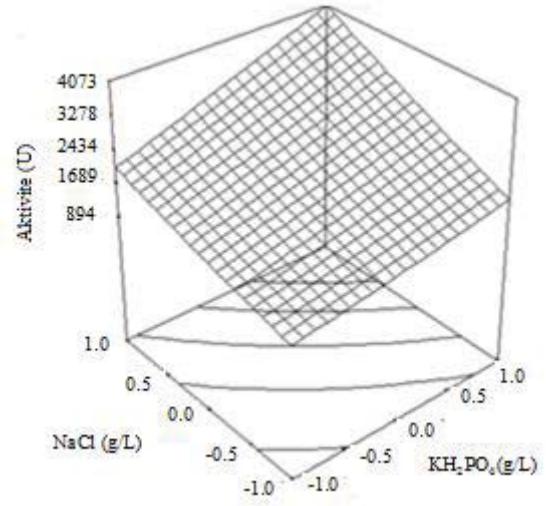
Design Exper (Statease Inc.) yazılımıyla belirlenen ANOVA verileri Tablo 3.8.'de görülmektedir. Genel ortalamada vurgulanan negatif bir "Pred R^2 " değeri şimdiki modelden daha iyi bir cevap tahminidir. "Adeq Precision" sinyal gürültü oranını ölçer. 4'den daha büyük bir ölçek tercih edilir. Bizim 23.523 değeri yeterli bir sinyali gösterir. Bu model, tasarım yüzeyini göstermek için kullanılabilir.

Fermantasyon ortam bileşenlerinin incelenen aralıklarda birbiriyle olan etkileşimleri 3 boyutlu grafiklerde Şekil 3.3-3.7'de verilmiştir. Ortamın iyonik gücünü dengelemesi açısından önemli olan NaCl ile diğer ortam bileşenlerinin etkileşimleri şekil de görülmektedir. Genel olarak NaCl konsantrasyonunun yüksek olduğu değerlerde α -amilaz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarındaki artışla bu artışın daha da belirginleştiği şekil 3.3.a,b' den görülmektedir. NH_4Cl ve CaCl_2 'ün yüksek konsantrasyon değerlerinde aktivitedeki azalmanın düşük NaCl konsantrasyonlarında daha belirgin olduğu şekilden görülmektedir. Glikoz konsantrasyonu ile gözlenen artış özellikle yüksek NaCl konsantrasyonlarında çok daha fazladır.

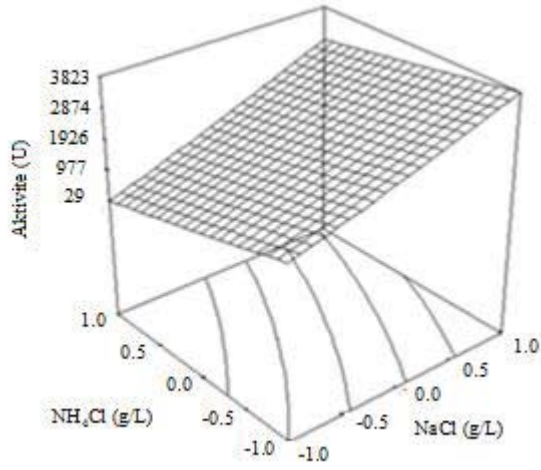
Şekil 3.4.'de PO_4^{3-} iyonunun diğer ortam bileşenleriyle olan etkileşimi verilmiştir. Fosfat konsantrasyonundaki artış genel olarak enzim oluşumunu olumlu yönde artırmaktadır. Bu değişim Na_2HPO_4 ile KH_2PO_4 arasındaki değişimin verildiği şekil 3.4. (a)'da belirgin bir şekilde görülmektedir. CaCl_2 konsantrasyonunun yüksek aktivite değerlerinde düşüş şekil (b) ve (e) de net bir şekilde gözlenmektedir. Artan glikoz konsantrasyonu ile enzim aktivitesindeki artış yüksek fosfat konsantrasyonlarında daha fazla gerçekleşmektedir.



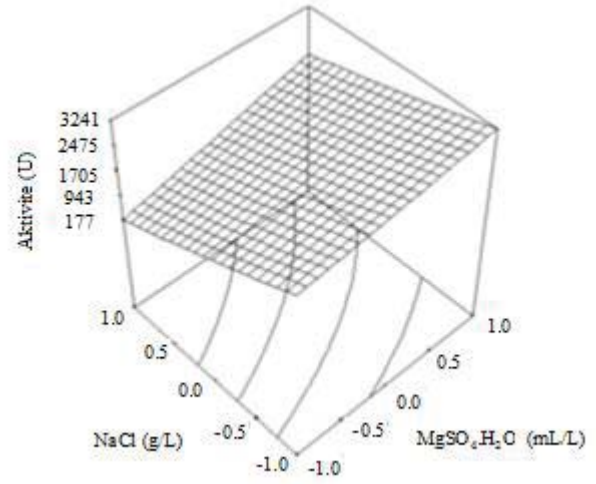
(a)



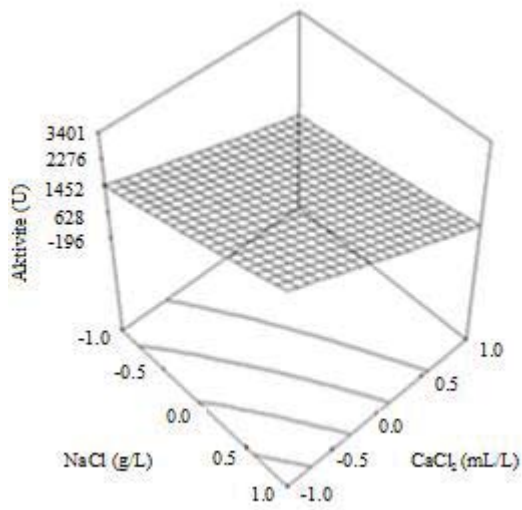
(b)



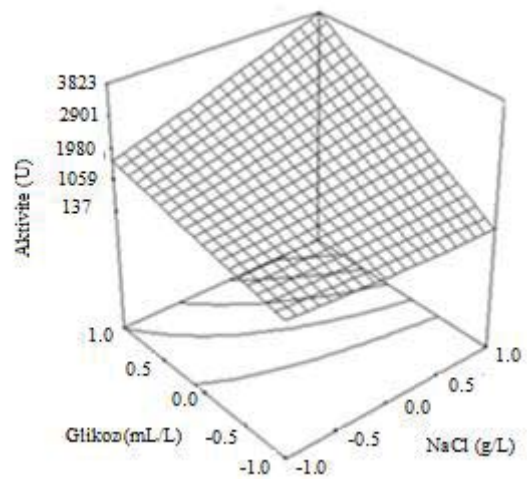
(c)



(d)

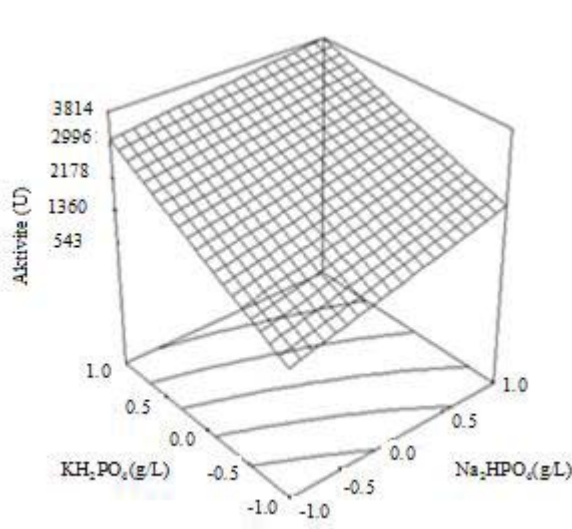


(e)

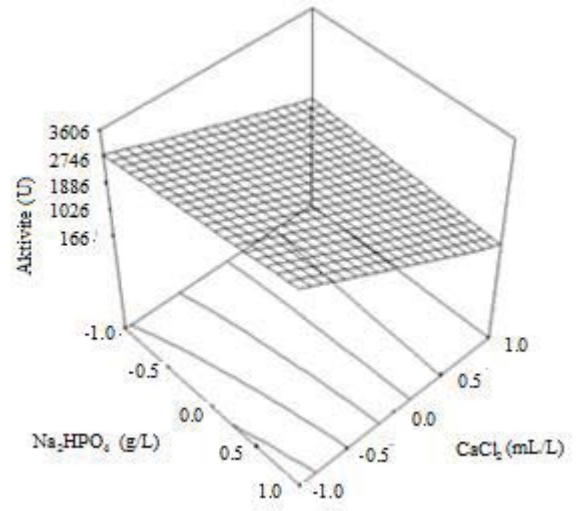


(f)

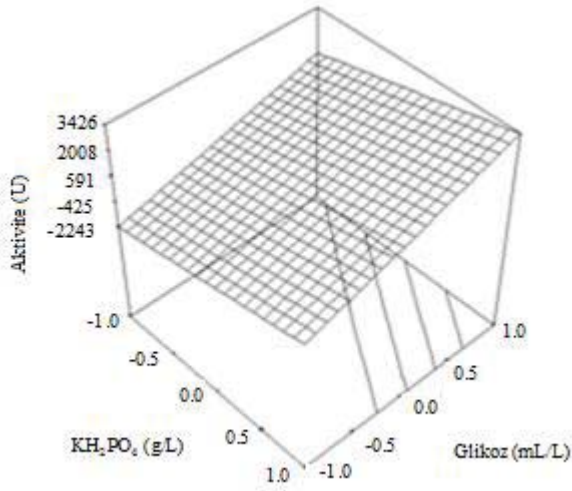
Şekil 3.3. NaCl ile diğer parametrelerin etkileşimi [(a) NaCl-Na₂HPO₄ (b) NaCl-KH₂PO₄ (c) NH₄Cl-NaCl (d) NaCl-MgSO₄.H₂O (e) NaCl-CaCl₂ (f) Glikoz- NaCl]



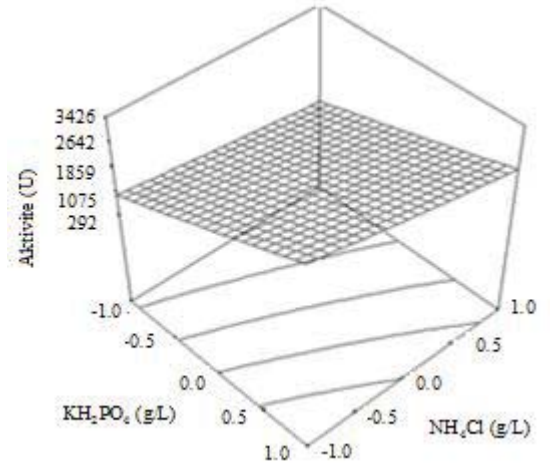
(a)



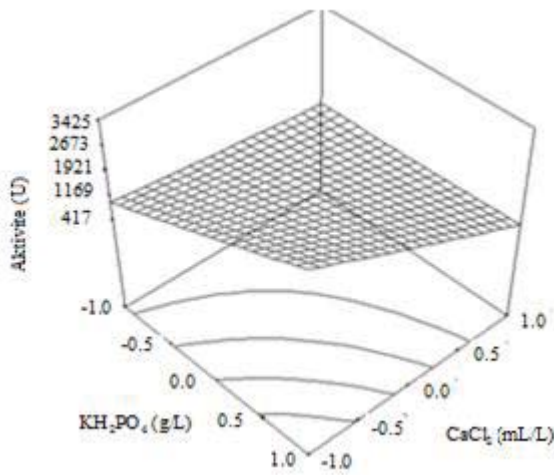
(b)



(c)



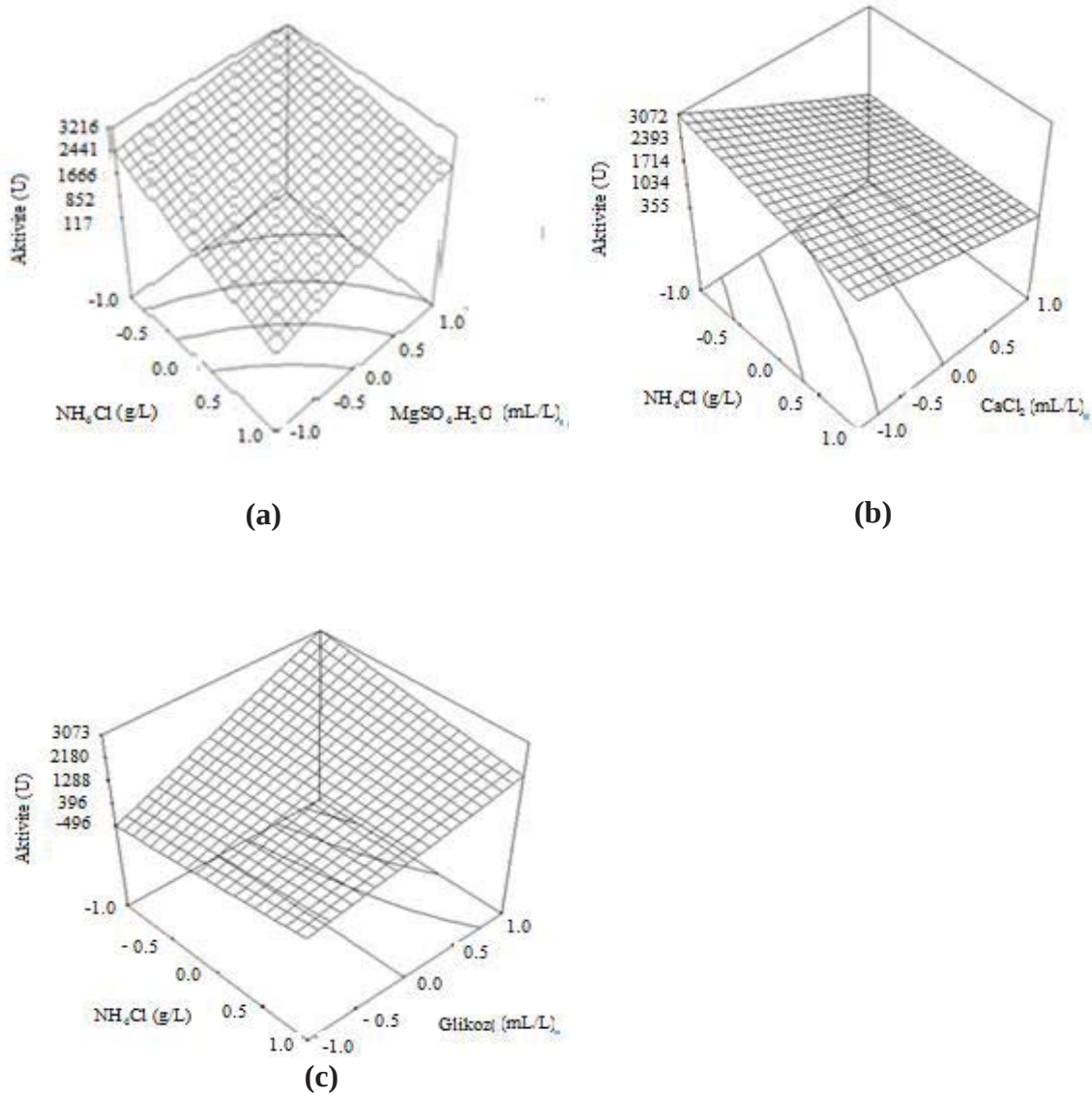
(d)



(e)

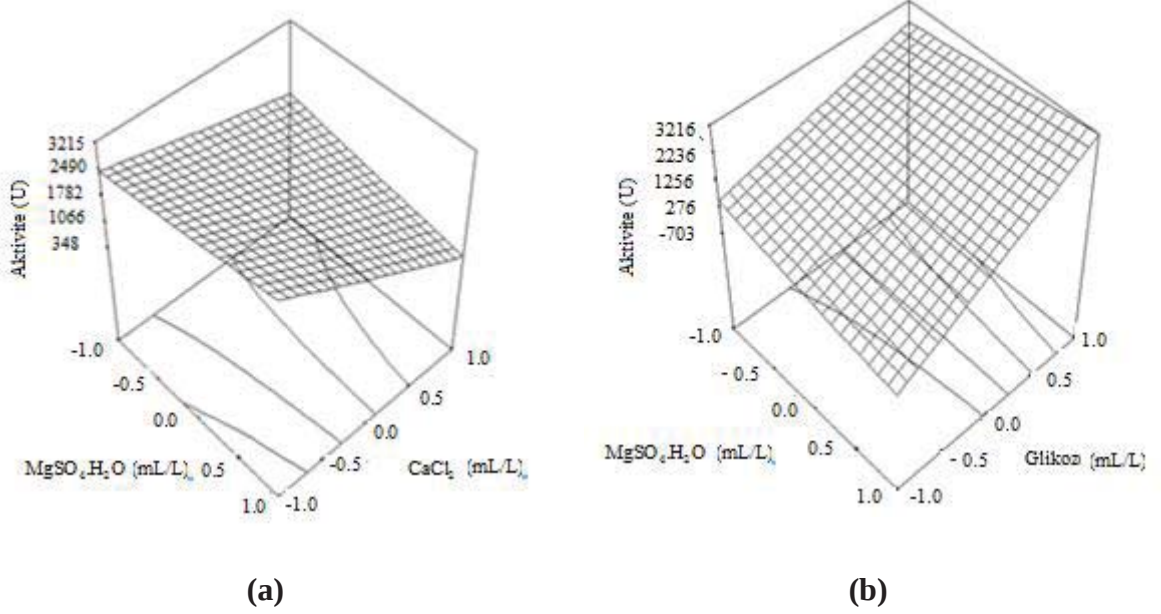
Şekil 3.4. PO_4^{3-} iyonu diğer parametrelerin etkileşimi [(a) KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (b) Na_2HPO_4 - CaCl_2 (c) KH_2PO_4 -Glukoz (d) KH_2PO_4 - NH_4Cl (e) KH_2PO_4 - CaCl_2]

Aşağıdaki şekilde NH_4Cl konsantrasyonunun etkileşim grafikleri bulunmaktadır. Amonyum klorür konsantrasyonundaki artışın aktiviteyi olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Yüksek CaCl_2 konsantrasyonlarında gözlenen NH_4Cl 'ün olumsuz etkisinin düşük CaCl_2 konsantrasyonu değerlerinde daha az olduğu belirlenmiştir. Glikozun düşük değerlerinde amilaz aktivitesini artıran NH_4Cl , yüksek glikoz konsantrasyon değerlerinde olumsuz etki yaptığı şekil 3.5.(c)'de görülmektedir.

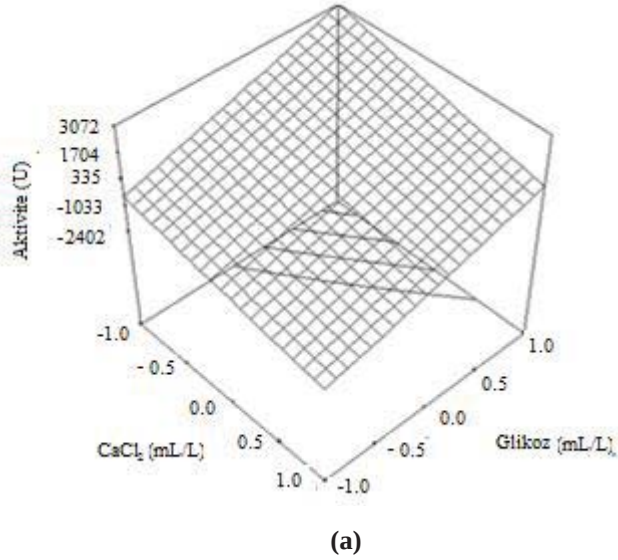


Şekil 3.5. NH_4Cl ile diğer parametrelerin etkileşimi (a) NH_4Cl - $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (b) NH_4Cl - CaCl_2 (c) NH_4Cl -Glikoz

Şekil 3.6.'da MgSO_4 konsantrasyonunun enzim üretimini arttırdığı belirlenmiştir. CaCl_2 konsantrasyonundaki artışın enzim üretimine olumsuz etkisi şekil 3.7.'de görülmektedir. Bu etki düşük glikoz konsantrasyonlarında daha belirgin olmaktadır.



Şekil 3.6. $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ile diğer parametrelerin etkileşimi (a) $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - CaCl_2 (b) $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Glukoz



Şekil 3.7. CaCl_2 iyonu ile glukozun etkileşimi (a) CaCl_2 -Glukoz

Design Expert yazılımı yardımıyla kodlu değer içeren faktörler cinsinden tanımlanan quadratik denklem aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \alpha\text{-Amilaz aktivitesi} = & 87.68 - 13.82*A - 15.45*B + 119.50*C - 13.82*D + 3.25*E \\ & - 52.03*F + 28.45*G - 3.07*A^2 + 32.2*B^2 + 56.99*C^2 + 22.46*D^2 + 13.83*E^2 \\ & + 29.59*F^2 + 22.46*G^2 + 188.03*A*B + 242.45*A*C + 22.77*A*D \\ & + 118.98*A*E - 314.10*A*F - 64.36*A*G + 279.92*B*C - 167.98*B*D \\ & + 67.56*B*E - 585.53*B*F + 102.58*B*G + 144.45*C*D - 217.24*C*E \\ & - 222.25*C*F + 631.65*C*G + 326.73*D*E + 278.81*D*F - 557.75*D*G \\ & - 415.88*E*F + 496.07*E*G - 166.83*F*G \end{aligned} \quad (3.2.)$$

Myers and Montgomery sayısal çözümleme yöntemini kullanan Design Exper yazılımı yardımıyla +1 ile -1 kodlu değerler arasında model denkleminde maksimum enzim aktivitesini veren çözüm noktaları arasından deneysel olarak uyumu yüksek olan çözüm noktası Tablo 3.9’da da verilmiştir. Modelin önerdiği denklem çözüm noktasında yapılan deney sonucunda bulunan aktivite değeri 4209 U olarak belirlenmiştir. Deneysel olarak doğrulanan Tablo 3.9’daki ortam bileşenleri değerleri kullanılarak fiziksel parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır.

Tablo 3.9. MKD ortam tasarımının optimizasyon sonucu

Na ₂ HPO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	NH ₄ Cl (g/L)	MgSO ₄ .H ₂ O (mL/L)	CaCl ₂ (mL/L)	Glikoz (mL/L)	Aktivite (U)
8.00	1.00	0.75	0.97	3.57	14.00	4.00	4209.59

Fermantasyon ortamının optimizasyonu amacıyla hazırlanan deneysel tasarımda merkez kompozit dizayn kullanılmış ve bağımsız parametre olarak başlangıç pH’sı, ortam sıcaklığı, çalkalama hızı ve aşılama miktarı seçilmiştir. İncelenen dört bağımsız değişkenin incelenen aralıkları Tablo 3.10’da verilmiştir. Ortam bileşenlerinin değerleri daha önceki dizayndan elde edilen optimum ortam koşulları kullanılmıştır. Merkez kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar tabloda görülmektedir. Seçilen 4 bağımsız değişkenin ortam bileşenleri Tablo 3.11’de gösterilmiştir.

Tablo 3.10. Merkez Kompozit Dizayn deney tablosunda bulunan değişkenler ve incelenen aralıklar

Faktör	Adı	- α	-1	+ 1	+ α
A	Başlangıç pH'sı	5.00	6.00	8.00	9.00
B	Çalkalama Hızı (rpm)	100.00	150.00	200.00	250.00
C	Aşı Miktarı (mL/L)	2.00	6.00	10.00	14.00
D	Sıcaklık (°C)	34.00	37.00	40.00	43.00

Tablo 3.11. İncelenen dört bağımsız değişkenin ortam bileşen değerleri

Çalışılan sıra	pH	Çalkalama Hızı(rpm)	Aşı Miktarı(mL/L)	Sıcaklık (°C)	Aktivite (U)
1	6.00	200.00	6.00	34.00	3591
2	7.00	150.00	10.00	31.00	2830
3	6.00	100.00	6.00	34.00	2982
4	7.00	150.00	10.00	43.00	2788
5	8.00	200.00	6.00	40.00	2831
6	8.00	200.00	14.00	40.00	2852
7	5.00	150.00	10.00	37.00	3950
8	7.00	150.00	10.00	37.00	4150
9	7.00	150.00	18.00	37.00	3394
10	6.00	100.00	14.00	40.00	2870
11	7.00	150.00	10.00	37.00	4273
12	7.00	250.0	10.00	37.00	3260
13	7.00	150.00	2.00	37.00	3352.11
14	7.00	150.00	10.00	37.00	4200
15	8.00	100.00	14.00	40.00	2878.87
16	8.00	100.00	6.00	34.00	2866.2
17	8.00	100.00	6.00	40.00	2838.07
18	8.00	200.00	6.00	34.00	3649.76
19	8.00	100.00	14.00	34.00	2716.85
20	6.00	200.00	14.00	40.00	2825.4
21	6.00	200.00	6.00	40.00	2822.61
22	8.0	200.00	14.00	34.00	3573.26
23	7.00	150.00	10.00	37.00	4133.8
24	7.00	150.00	10.00	37.00	3957.75
25	9.00	150.00	10.00	37.00	3908.45
26	7.00	50.00	10.00	37.00	3183.1
27	6.00	200.00	14.00	34.00	3663.42
28	6.00	100.00	14.00	34.00	2746.41
29	6.00	100.00	6.00	40.00	2807.04
30	7.00	150.00	10.00	37.00	4243.41

Tablo 3.12’de verilen ANOVA verilerinden elde edilen *Fisher-F* testi değeri $[(P_{model}>F)=0.0001]$ önerilen modelin önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca varyasyon katsayısının (CV) nispeten küçük değeri yapılan deneylerin güvenilirliğinin uygunluğunu göstermektedir. Model regresyon katsayısı R^2 değeri (0.896) biyoteknoloji çalışmalar için oldukça iyi bir değerdir. Deneysel verilerle model sonuçlarının uyumunun gösteren adj R^2 değeri (0.8) de tanımlanan modelin yeterli olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.12. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler

Standart sapma	246.31	R^2	0.8965
Ortalama	3338.11	Adj R^2	0.8000
Varyasyon katsayısı (C.V)	7.38	Pred R^2	0.4351
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	$4.969 \cdot 10^{-6}$	Adeq Precision	10.410

"Pred R-Squared" 0.4351 değeri normal bir şekilde beklenen "Adj R-Squared" 0.8000 değeri kadar iyi değildir. Bu büyük bir blok etkisi veya bizim modelimiz ve değerlerimizdeki problem olarak gözlenebilir. "Adeq Precision" sinyal gürültü oranı ölçer. 4’den daha yüksek bir oran tercih edilir. Bizim oranımız 10.410 yeterli bir sinyal gösterilir.

Kodlu değerler cinsinden önerilen quadratik model denklemi eşitlik 3.3’ de verilmiştir.

$$\begin{aligned}
 \alpha\text{-Amilaz aktivitesi} = & 4159.69 - 7.81 \cdot A + 135.74 \cdot B - 7.40 \cdot C - 131.18 \cdot D - 107.76 \cdot A^2 \\
 & - 284.69 \cdot B^2 - 246.84 \cdot C^2 - 387.69 \cdot D^2 + 6.89 \cdot A \cdot B - 4.16 \cdot A \cdot C \\
 & + 15.79 \cdot A \cdot D + 18.74 \cdot B \cdot C - 201.82 \cdot B \cdot D + 32.37 \cdot C \cdot D
 \end{aligned} \quad (3.3.)$$

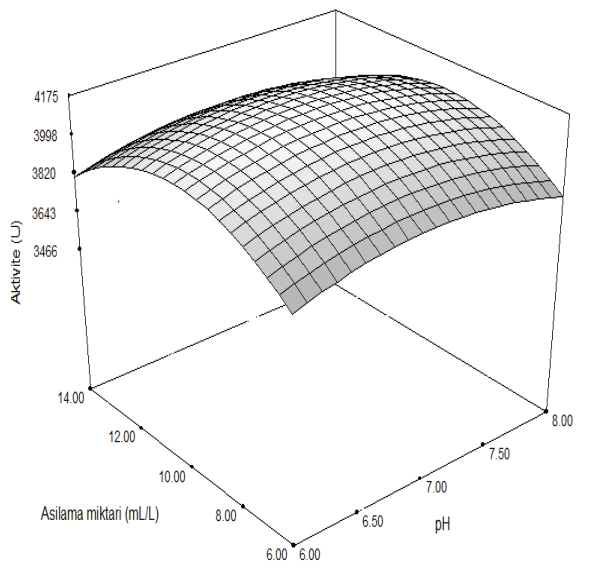
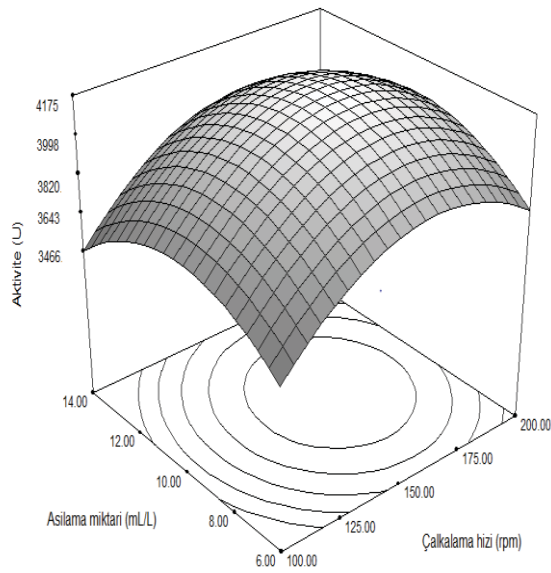
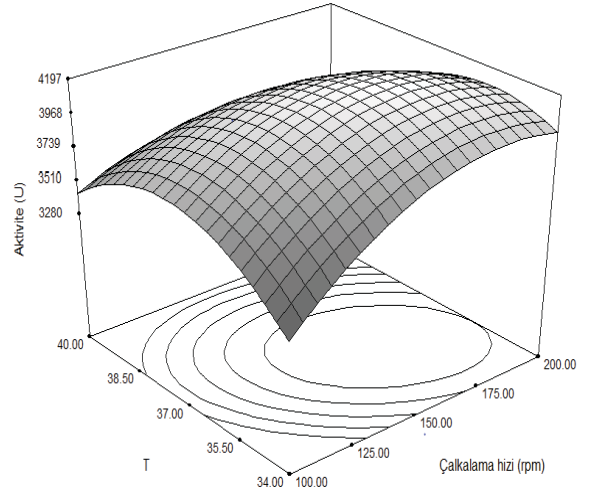
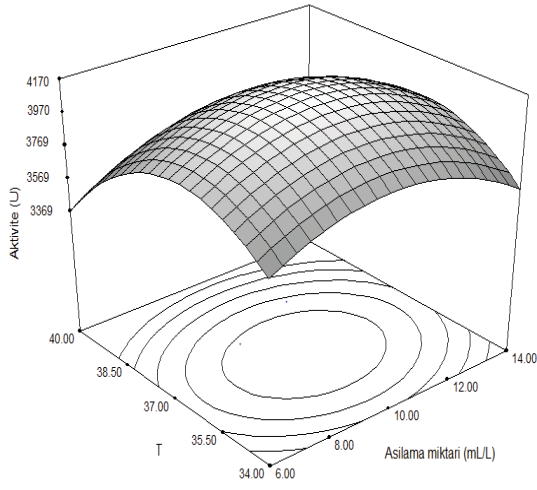
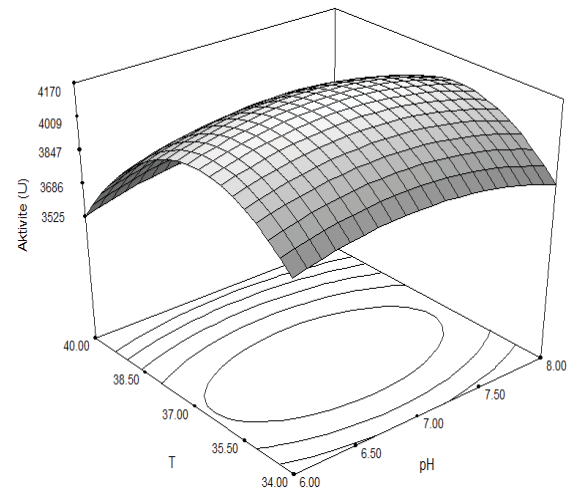
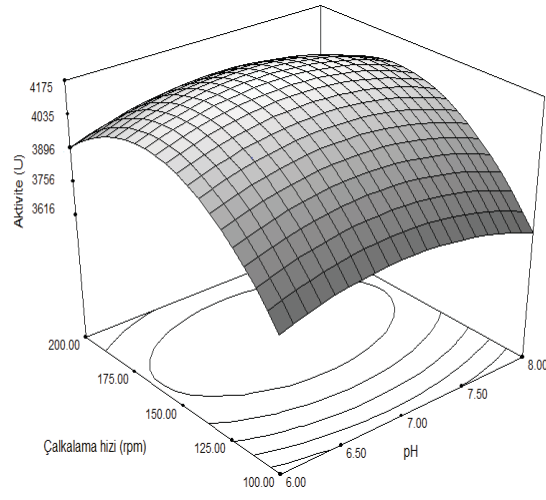
Tablo 3.13. Amilaz üretiminde ikinci dereceden (quadratic) cevap yüzey modelin amilaz üretimi için ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	Prob > F
Model	7.887E+006	5.633E+005	9.29	< 0.0001 önemli
A	1465.72	1465.72	0.024	0.8786
B	4.422E+005	4.422E+005	7.29	0.0165
C	1315.96	1315.96	0.022	0.8849
D	4.130E+005	4.130E+005	6.81	0.0197
A ²	3.185E+005	3.185E+005	5.25	0.0368
B ²	2.223E+006	2.223E+006	36.64	< 0.0001
C ²	1.671E+006	1.671E+006	27.55	< 0.0001
D ²	4.123E+006	4.123E+006	67.95	< 0.0001
AB	758.64	758.64	0.013	0.9124
AC	276.49	276.49	4.557E-003	0.9471
AD	3987.80	3987.80	0.066	0.8011
BC	5621.33	5621.33	0.093	0.7650
BD	6.517E+005	6.517E+005	10.74	0.0051
CD	16766.62	16766.62	0.28	0.6068
Uyum eksikliği	8.470E+005	84697.47	6.72	0.0242 önemli.

Tablo 3.13’de incelenen her parametre için *Prob>F* değerinin 0.05 den küçük olanları sonuç üzerinde etkisi fazla olmaktadır. ANOVA sonuçlarına göre enzim üretimi üzerine başlangıç pH’sı ve aşılama miktarı lineer olarak etkilemektedir. Başlangıç pH’sı, karıştırma hızı ve aşılama miktarındaki küçük bir değişiminin sonuç üzerine önemli olduğu, bu parametrelerdeki değişimin üssel olarak etkisinin sonuca yansıtacağı

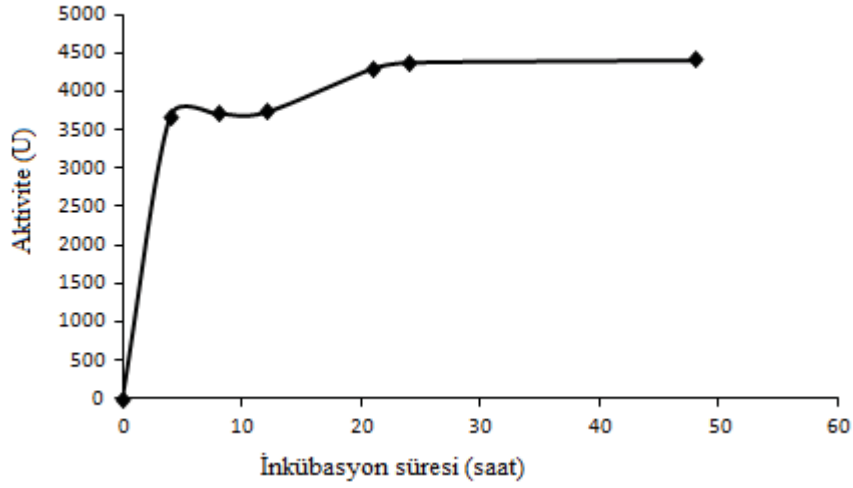
görülmektedir. Ayrıca karıştırma hızıyla fermentasyon ortam sıcaklıklarının birbiriyle etkileşiminin önemli olduğu ANOVA sonuçlarından görülmektedir.

İncelenen fermentasyon ortam koşullarının birbiriyle olan etkileşimleri grafikleri şekil 3.8.'de verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi çalkalama hızının yüksek ve düşük değerlerinde aktivite değerleri azalmaktadır. Maksimum enzim aktivitesi 166 rpm arasında olduğu belirlenmiştir. α -amilaz aktivitesinde sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın gelişebilmesi, enzim ya da metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığıyla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sodhi vd., 2005). Ortam sıcaklığının optimum değeri 35.5 °C ile 37 °C arasında olduğu ve karıştırma hızı ile fermentasyon ortam sıcaklığının etkileşiminin önemli olduğu görülmektedir. Genellikle α -amilaz aktivitesinde ortam sıcaklığı 25-37 °C aralığında değişmektedir ve mikroorganizmanın büyüme kinetiğine bakıldığında sıcaklığa bağlı olarak bu sıcaklık aralıklarında kararlı kaldığı belirtilmektedir (Dutta vd., 2005). Enzim aktivitesindeki değişimin yüksek ortam sıcaklığında önemsiz olduğu ancak düşük sıcaklık noktasında daha belirgin olduğu grafikten gözlemlenmektedir. Bununla birlikte nötr pH değerlerinde enzim üretiminin arttığı görülmektedir, bu veri literatürde α -amilaz üretimi için tanımlanan değerlerle uyum içerisindedir (Amutha ve Jaya ,2011). Literatürde aşılama seviyesinde enzim üretiminde önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir. Yüksek aşı konsantrasyonu nem içeriğini artırır. Düşük aşılama seviyesinde üretim ortamında daha düşük sayılı hücreler oluşturulur (Shilpi vd, 2012). Şekilde 10 mL/L aşı konsantrasyonun enzim üretimini maksimize ettiği görülmektedir.



Şekil 3.8. Fermantasyon ortam koşullarının birbirleriyle olan etkileşimleri

Enzim üretimini maksimum veren model denkleminin optimum değerleri Myers and Montgomery sayısal çözümleme yöntemini kullanan Design Exper (6.0) yazılımı yardımıyla belirlenmiştir. Belirlenen optimum ortam koşullarında (pH: 6.95, Çalkalama hızı:166 rpm, Aşılama miktarı:9.9, Sıcaklık:36°C) maksimum enzim aktivitesi 4199 U olarak bulunmuştur. Daha önce belirlenen optimum ortam bileşenleri ve ortam koşullarında yapılan deney sonucu şekil 3.9 görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi ulaşılan maksimum enzim aktivitesi (4405 U) programın önerdiği aktivite değerine yakın olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.9. Optimum şartlarda α -amilaz aktivitesinin zamanla değişimi

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bazı enzimlerin doğal ortamlarında düşük konsantrasyonlarda üretilmesi, bu enzimlerin büyük miktarlarda üretilme zorluğunu arttırmakta veya imkânsız hale getirmektedir. Uygun ekspresyon sistemlerinin kullanımı ile bu problem aşıldığından dolayı rekombinant bakteriler rekombinant olmayan bakterilere göre daha ilgi çekicidirler (Walsh, 2002).

Literatürde rekombinant olmayan mikroorganizmalar ile doğal ortamlarda yapılan çalışmalar ile kimyasal bileşen içeren ortamda yapılan çalışmalarla kıyaslandığında enzim üretiminin doğal ortamlarda daha yavaş olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu oksijenin ne nutrientlerin ortama geçişinin kimyasal bileşen içeren ortamlara nazaran daha yavaş olduğundan kaynaklandığı belirtilmiştir (Tanyıldızı, 2005; Selen, 2006). Bülow ve arkadaşları (1999); mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu oksijenin, oksijen transferi sağlayarak hem hücre büyümesini hem de enzim üretimini artıran rekombinant mikroorganizmalar olduğunu ifade etmişlerdir (Bülow vd., 1999).

Yine literatürde *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) bakterisi klonlanarak oluşturulan rekombinant bir suşun rekombinant olmayan suşu ile kıyaslandığı bir çalışmada VHb'nin oksijen bağlayıcı özelliğinden dolayı rekombinant suşun amilaz aktivitesinin rekombinant olmayana göre daha fazla üretildiği belirtilmiştir (Wei vd., 1998).

Rekombinant suşun literatürden alınan besiyerlerinde α -amilaz enzim üretiminin incelendiği deneylerin sonucunda tüm ortamlarda enzim aktivitesi belirlenmiş maksimum enzim üretimi LB ortamından elde edilmiştir.

E.coli'ye ait α -amilaz geni daha önce değişik bakterilerde klonlanmıştır (Tari vd., 1997; Geckil vd., 2000). Tari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada α -amilaz geni MK79 ve MK57 suşlarına klonlanmış ve LB ortamında ve M9 ortamında aktivite değerlerine bakılmıştır. Bunun sonucunda LB ortamında bulunan aktivite değeri daha yüksektir.

Denenen üç farklı ortamdaki ortam bileşenlerinden enzim üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan PB dizaynı sonucunda 7 (glukoz, yeast ekstrakt, pepton, nişasta, KH_2PO_4 , CaCl_2 , NaCl) parametrenin etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir.

Enzim üretimini maksimize eden ortam bileşimini belirlemek amacıyla MKD ile yapılan denemeler sonucunda optimum ortam Na_2HPO_4 (8 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), NaCl (0.75 g/L), NH_4Cl (0.97 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.57 mL/L), CaCl_2 (14 mL/L), glukoz (4 mL/L) olarak belirlenmiştir. Bu noktada enzim aktivitesi 4209.59 U değerine artırılmıştır.

Enzim üretim koşullarının α -amilaz aktivitesine etkisi MKD dizaynıyla belirlenmiş ve maksimum enzim aktivitesi (4199 U) pH (6.95), fermentasyon ortam sıcaklığı (36°C), karıştırma hızı (166 rpm) ve ekim konsantrasyonu (9.9 mL /L) değerlerinde elde edilmiştir.

Amutha ve arkadaşları (2011), enzim üretim koşullarının α -amilaz aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada; maksimum enzim aktivitesinin pH (6) , ortam sıcaklığının (40 °C) ve karıştırma hızının 150 rpm ile 200 rpm arasında olduğunu ifade etmişlerdir (Amutha vd.,2011).

Optimum ortamda yapılan doğrulama deneyinde elde edilen enzim aktivitesi (4405 U) modelin önermiş olduğu aktiviteyle (4537 U) uyumlu olduğu görülmüştür.

5. ÖNERİLER

Endüstriyel enzimlerin çok büyük bir kısmı rekombinant suşlar ile derin fermantasyon kullanılarak üretilmektedir. Yapılan bu çalışmada kullanılan rekombinant *E.coli*'nin hemoglobin üretebilmesi enzim üretiminde önemli bir artı sağlayabileceği literatürde verilen çalışmalarda vurgulanmıştır. Yapılan bu çalışmada ortam optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu çalışmanın devamında yapılacak biyoreaktör deneyleriyle enzim üretimi incelenerek rekombinant suşun davranışı belirlenebilir.

Özellikle son yıllarda dikkat çeken katı substrat fermantasyonunda bu suşun kullanımı salgılanacak hemoglobin yardımıyla oksijen transferinde önemli avantaj sağlayabilir. Yarı katı hal fermantasyonu yöntemiyle farklı substratlarla çalışmanın incelenmesiyle ekonomik olarak enzim üretimiyle sonuçlanabilir.

Farklı ortamlardan elde edilen enzimin karakterizasyonu yapılarak endüstriyel kullanımı incelenebilir.

KAYNAKLAR

Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.

Aira, S., K., Kilal, ve A., Imanaka, 1983. Cloning and Expression of Thermostable α -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 1059-1065.

Amutha, K., ve Jaya Priya K., 2011. Effect of pH, Temperature and Metal Ions on Amylase Activity from *Bacillus Subtilis* KCX 006.

Atlas R.M., 1994, Microorganisms in our World, Mosby, pp724-726.

Bailey, J. E., 1995. Chemical engineering of cellular processes. Chemical Engineering Science 50, 4091–4108.

Bezbaruah, R.L., Gogoi, B.K., Pillai K.R., Nigam, J.N., 1991. Amylase Production by three *Bacillus* strains active at alkaline pH. Journal of Basic Microbiology 31.1. 13-20.

Bhardwaj Shilpi , A.B. Vedamurthy , Bhattacharya Sourav ve Das Arijit., 2012. Effect of Inorganic Salts and ASurfactants on the Productant of α -Amylase by a Mangrove Isolate of *Aspergillus flavus* using Solid-State Fermentation.

Boyer E.W and Ingle M.B., 1972. Extracellular Alkaline Amylase from a *Bacillus* species. Journal of Bacteriology. Amsterdam 427-430.

Box GEP, Wilson KB., 1951. "On the Experimental Attainment of Optimum Conditions." Journal of the Royal Statistical Society B, 13, 1{45.

Bülow, L., N. Holmberg, G. Lilius, and J. E. Bailey., 1999. The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants. Trends Biotechnol. 17:21-24.

Devesh H. Suthar and Bharat B. Chatto., 2006. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth and levels of α -amylase in *Schwanniomyces occidentalis*. Appl. Microbiol. Biotechnol 72:94-102.

Dikshit KL, Webster DA., 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. Gene 70:377-386.

Dutta Tapan Kr., Jana M, Pahari Priti R., Bhattacharya Tanmay ., 2005. The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodiaptomus viduus*. India.

Elgün, A. ve Ertugay, Z., 1995. Tahıl işleme teknolojisi, Atatürk Üni. Ziraat Fakültesi Yayınları No:718, 376 sayfa, Erzurum.

Ekici A, Timur M, Bağış H., 2006. Transgenik canlılar ve akulkültürdeki önemi. E.U. Su ürünleri Dergisi, 23:211-214.

Farez-Vidal, M.E., Fernandez-Vivas, A., Arias, J.M., 1992. Production of α -amylase by *Myxococcus coralloides* D. Journal of Applied Bacteriology,213, 148-156.

Farez-Vidal, M.E., Fernandez-Vivas, A., Arias, J.M., 1995. Properties and significance of an α -amylase produced by *Myxococcus coralloides* D.J. Appl. Bacteriol. 78, 14-19.

Farres, J., and Kallio, P. T., 2002. Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. Biotechnol. Prog. 18, 229–233.

Fogarty, W., M., 1983, Microbial Enzymes and Biotechnology, Aplied Science,2-72.

Geckil, H., Stark C. Benjamin and Webster Dale A., 2000. Cell growth and oxygen uptake of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene. Department of Biological,Chemical and Physical Sciences, Illinois Institute of Technology, USA.

Godfrey, T. and West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology. Industrial Enzymology, (Second Edition). Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York.

Gözükara Engin ,M., 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri,İstanbul.

IngledeW WJ, Poole RK., 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1984 Sep;48(3):222–271.

Jin, F., Li, Y., Zhong, C., Yu, H., 2001. Thermostable α -amylase and α -galaktosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. Strain.process Biochemistry. 36, 559-564.

Joglekar, A.M., May, A.T. 1987. Product Excellence Trough Design Of Experiments. Cereal Foods World, 32 (12), 857,860.

John, F.K, 1987. Enzyme Technology (HJ. REHM.5 G.REED editor). Biotechnology Vol. 7A. New York s 37-62.

John, W., and Sons, I., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. United States of Amerika. 454p

Khosla, C, Bailey, J.E., 1988a. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* 1988a, 331,633-635.

Khosla C, Bailey JE., 1988b. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 158–161.

Khosla, C., Curtis, J. E., DeModena, J., Rinas, U., and Bailey, J. E., 1990. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* **8**, 849–853.

Khosravi, M., Ryan, W., Webster, D. A., And Stark, B.C., 1990. Presence of the Bacterial Hemoglobin Gene Improves α -Amylase Production of a Recombinant *Escherichia coli* Strain.

Kılıç,D., 2002, Mısır nişastasının hidrolizinde α -amilaz enziminin aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Koç B., 2008. Püskürtmeli kurutma yöntemi ile yoğurt tozu üretim koşullarının optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye.

Konz, J. O., J. King, and C. L. Cooney., 1998. "Effects of oxygen on recombinant protein expression." *Biotechnology Progress*, 1998: 393-409.

Lee, B.H., 1996. Fundamentals of Biotechnology, VCH Publishers, USA, 431p.

Levenque, E., Janecek, S., Bernard, H., Belarbi, A., 2000. Thermophilic archeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 3-14.

Madsen, G.B., Norman, B.E., and Slott, S., 1973. A New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High-Temperature Liquefaction. *Starke* **25**,304.

Mead, R., Pike D.J., 1975. A Biometrics Invited Paper. A review of Response Surface Methodology from a Biometric Viewpoint. *Biometrics*. Vol 31. No.4.

Miller, J.H.,1972.Experiments in molecular genetics.Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY.

Orji Y., Webster D.A., 1986. *J. Biol. Chem.* **261**:3544-3547.

Pazarlıoğlu, N., 1997. Enzim Üretimi Ve Saflaştırılması Enzimoloji. (Telefoncu, A.-eds).E.Ü. Fen Fak. 139-176. İzmir.

Pekin, B., 1983. Enzimler Endüstriyel Mikrobiyoloji. (Çetin E.-eds) İstanbul Üni. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı-Bayda Yayınları No: 2,145-160.İstanbul.

Pfueller S.L., Eliot W.H.,1969,“The extracellular α -Amylase of *Bacillus stearothermophilus*”, *J. Biological Chemistry*,**244**,48-54.

Radley, J.A., 1976, Production Of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production Technology (L.A. Underkofler),16, 295-309, Aplied Science Publisher Ltd. Ripple Road, England.

Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F.,1987, Biotechnology, 7a, 5-100, Vch, New York.

Rhee Jong, Bode J, Juan C., Diaz-Ricci, Daniel Poock,Beate Weigel,Karl Schügerl, Gerlinde Kretzmer.,1997. Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM109 and on the production of the fusion protein *EcoRI::SPA*. Departamento de Bioquímica de la Nutricio'n, Instituto Superior der In6estigaciones Biolo'gical (CONICET-UNIT), Chacabuco 467,4000 Tucuman, Argentina.

Sağıroğlu, A.K., 1999, Bilim ve Teknik, No:383, 74-80.

Sarıkaya, E.,1995,Alfa Amilaz Üreten Bazı Bacillus Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu,Doktora Tezi,Ankara Ün,Ankara.

Selen V., 2006., Bacillus Amylolıqquefaciens ile α -Amilaz üretiminin katı substrat fermentasyonu ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Selen V., 2008., Rekombinant DNA Teknolojisi, Doktora Semineri, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Sodhi, H., K., Sharma, K., Gupta, J.K., SoniS.K., 2005, Production of a thermostable α -amylase from Bacillus sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, 40, 525-534.

Swamy, M.V. ve Seeneyya G., 1996. Thermostable pullulanase and α -amylase activity from Colostidium thermosulfurogenes SV9 optimization of culture conditions for enzyme production. Process Biochemistry. Vol 31, No 2. 157-162.

Syu M., Chen., Y.H, 1997, A study on the α -amylase fermentation performed by Bacillus amyloliquefaciens, Chemical Engineering journal, 65, 237-247.

Tari C, Parulekar J. Satish, Stark C. Benjamin, Webster Dale A., 1998.Synthesis and Excretion of α -Amylase in vgb^+ and vgb^- Recombinant *Escherichia coli*:A comparative Study,Department of Biological,Chemical, and Physical Sciences, Illinois Institue of Technology, Chicago.

Taylor. A.J., Leach, R.M., 1995. Enzymes in the food industry. Enzymes in the Food processing.(Tucker, G.A., Woods, L.F.J.,-eds). 26-41. Chapman and Hall,Glasgow.

Tanyıldızı, M. Ş., 2005, Çeşitli bakteri türleriyle farklı ortam ve çalışma şartlarında α -amilaz üretiminin incelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Topal, S., 1985, Enzimler,Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri,Gıda, 10(1), 25-37.

Telefoncu, A., 1997, Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir.

URL-1, http://misoyasal.nku.edu.tr/admin/userfiles/9_%20Bolum.pdf.

URL-2, http://www.cyberwarrior.org/Forum/rekombinant-dna-teknolojisi_341171,0.cwx.

Urlacher, V. B., Lutz-Wahl, S., and Schmid, R. D., 2004. Microbial P450 enzymes in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 317–325.

Walker, C.E., Parkhurst, A.M., 1984. Responce Surface Analysis Of Bake-Jab Data With A Personel Compputer, Cereal Foods World,29 (20):662.

Walsh, G., 2002. Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley&Sons Baffins Lane, West Sussex, England.

Webster. D.A., Bailey C. S.,1988. Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonads: effects on cell growth. Appl Microbial Biotechnol.44:419-424.

Wei, M. L., Webster, D. A., and Stark, B. C., 1998. Genetic engineering of Serratia marcescens with bacterial hemoglobin gene: Effects on growth, oxygen utilization, and cell size. Biotechnol. Bioengin. 57, 477–483.

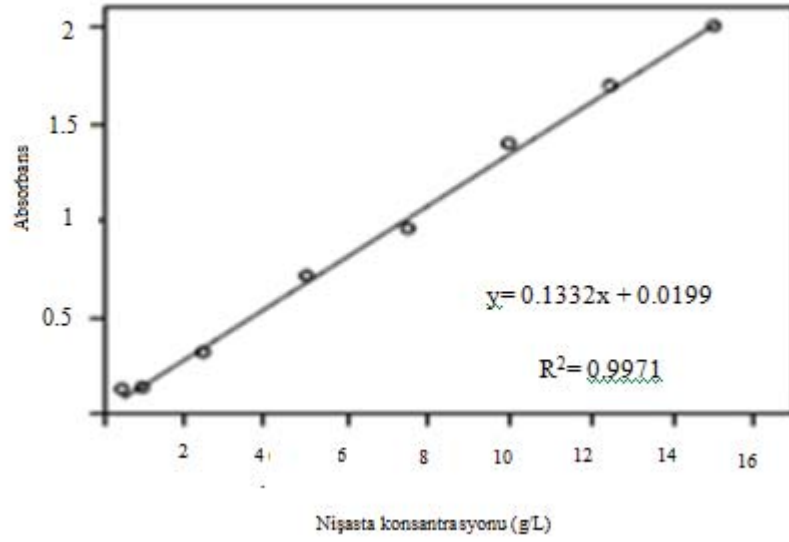
Wong W.S.D., 1995. Amylolitic Enzymes. Food Enzymes Structure and Mechanism. Chapman and Hall 38.

Yazgan, O., Aksoy, A., 1983. Biyokimya Ders Notları (Yayımlanmamıştır) 322 s. Erzurum.

EKLER

Tablo E.1. Nişasta çözeltisinin kalibrasyon verileri.

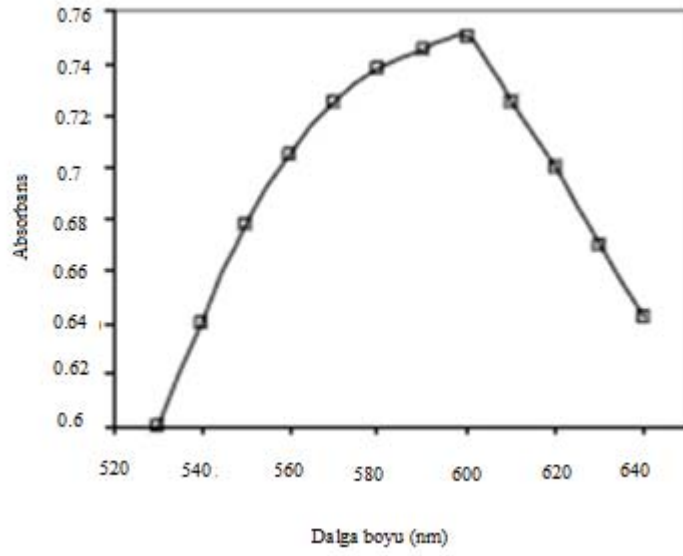
Nişasta (g/L)	0.5	1	2.5	5	7.5	10	12.5	15
Abs. (600 nm)	0.125	0.135	0.321	0.715	0.955	1.4	1.7	2



Şekil E.1. 600 nm’de nişasta kalibrasyon grafiği.

Tablo E.2. % 5'lik nişasta çözeltisinin dalga boyu taraması.

Dalga Boyu (nm)	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
Absorbans	0.6	0.64	0.68	0.70	0.72	0.74	0.74	0.75	0.72	0.7	0.67	0.64



Şekil E.2. Dalga boyunun değişmesiyle nişasta çözeltisinin absorbans değerleri.

Fosfat tamponu: 0.1 M KH_2PO_4 'den 868.4 ml, 0.1 M K_2HPO_4 'den 131.6 ml alınıp içerisinde 0.025 N NaCl konularak hazırlanmıştır (pH:6.2).

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Palu’da doğmuştur. 2004 yılında Elazığ Hıdır Sever Lisesi’nden mezun olmuştur. Aynı yıl Fırat Üniversitesi, Mühendislik fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümünde lisans eğitime başlamıştır.2008 yılında Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü’nden mezun olmuştur.2009 yılında Fırat Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Proses ve Kontrol Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başlamıştır. 2009 yılından beri Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünde Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.