

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PULLULANAZIN FARKLI TAŞIYICILARDA
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

CANDA ULUTÜRK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞEGÜL PEKSEL**

İSTANBUL, 2012

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PULLULANAZIN FARKLI TAŞIYICILARDA
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

CANDA ULUTÜRK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞEGÜL PEKSEL**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PULLULANAZIN FARKLI TAŞIYICILARDA
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Canda ULUTÜRK tarafından hazırlanan tez çalışması 16.01.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011-01-02-YULAP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmam süresince zamanını, bilgisini, ilgisini ve emeğini üzerimden eksik etmeyen, gerek hayat gerekse akademik tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum, tez danışmanım, sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan, çalışmamın aksamaması için elinden geleni yapan ve her daim arkadaşlığını esirgemeyen Arş. Gör. Nilay Altaş Kıymaz ve Yük. Kim. Mühendisi Ayşe AKAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamasında, yardıma ihtiyacım olduğu zaman koşulsuz yanımda olan, zamanını ve ilgisini eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım, Didem Begüm BAĞRIYANIK, Başak Damla ERDOĞAN ve Merve AYVALI'ya,

En başından beri hayatımın her anında yanımda olan, özverisini, sevgisini, şefkatini ve sabrını üzerimden eksik etmeyen, korktuğum zamanlarda cesaretlendiren, sevincime, huzuruma ve mutluluğuma ortak olan sevgili annem Selver ULUTÜRK ve sevgili babam Arslan ULUTÜRK'e, en yakın arkadaşım, canım kardeşim Can Alkan ULUTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2012

Canda ULUTÜRK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
ENZİMLER.....	4
2.1 Enzim Üretimi	5
2.2 Biyoteknoloji	6
2.2.1 Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı.....	6
2.2.2 Biyoteknolojide Mikroorganizmaların Enzim Üretiminde Daha Fazla Tercih Edilmelerinin Nedenleri.....	6
2.3 Mikrobiyal Enzim Üretimi	7
2.4 Önemli Endüstriyel Enzimler ve Mikroorganizmalar	8
2.4.1 Proteolitik Enzimler	8
2.4.2 Amilolitik Enzimler	8
2.4.3 Glukoz İzomeraz.....	9
2.4.4 Pektolitik Enzimler	9
2.4.5 Selülazlar	9
2.4.6 Galaktozidazlar	9
2.5 Hypocrea jecorina.....	10
2.6 Pullulanaz (pullulan-6-glucanohydrolase EC(3.2.1.41)).....	11
2.6.1 Pullulanazların Endüstride Kullanım Alanları.....	13
2.6.1.1 Pullulanazların Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanılması	13
2.6.1.2 Pullulanazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı	13
2.6.1.3 Pullulanazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	13

2.6.1.4	Pullulanazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı.....	14
2.7	Pullulan.....	14
2.8	Pullulanaz İle İlgili Önceki Çalışmalar	15
BÖLÜM 3		
ENZİM İMMOBİLİZASYONU		18
3.1	İmmobilizasyonun Tarihçesi	18
3.2	İmmobilizasyonunun Avantajları	19
3.3	İmmobilizasyon Parametreleri.....	20
3.4	İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar	21
3.4.1	İmmobilizasyonda Genel Olarak Kullanılan Taşıyıcıların Sınıflandırılması.....	22
3.4.2	Kitosan	23
3.4.3	Cam Boncuk	24
3.4.4	Amberlit	25
3.4.5	PEG (Poli Etilen Glikol).....	25
3.5	İmmobilizasyon Yöntemleri.....	26
3.5.1	Tutuklama	27
3.5.2	Taşıyıcı Bağlama Yöntemi	28
3.5.3	Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi	29
3.5.4	İyonik Bağlanma Yöntemi.....	30
3.5.5	Kovalent Bağlanma Yöntemi.....	31
3.5.6	Çapraz Bağlama Yöntemi.....	37
3.5.7	Jel Tutuklama Yöntemi.....	39
3.5.8	Fiber Tutuklama Yöntemi.....	40
3.5.9	Mikrokapsülleme Yöntemi	40
3.5.10	Kompleks Bağlama.....	40
3.5.11	Biyospesifik Bağlama	41
3.5.12	Şelat Bağlama	41
BÖLÜM 4		
MATERYAL VE METODLAR.....		42
4.1	Deneysel Çalışmada Kullanılan Materyaller	42
4.1.1	<i>Hypocrea Jecorina</i> Kaynağı	42
4.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
4.1.3	Kullanılan Cihazlar	44
4.2	Kullanılan Metodlar.....	44
4.2.1	Kültür Ortamı.....	44
4.2.1.1	Saf Kültür Ortamı.....	44
4.2.1.2	Spor Çözeltinin Hazırlanması	45
4.2.2	Enzim Üretim Ortamı	45
4.2.2.1	Sıvı Besiyerinin Bileşimi	45
4.2.2.2	Pullulanaz İndüksiyonu İçin Kullanılan Besiyerinin Bileşimi	45
4.2.3	Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması.....	46
4.2.3.1	<i>H. jecorina</i> 'dan Ekstrasellüler Pullulanazın Elde Edilmesi	46
4.2.3.2	Kültür Sıvısında Pullulanazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi.....	46
4.2.3.3	Diyaliz	47
4.2.4	Pullulanaz Aktivitesinin Tayini	47
4.2.4.1	Çözeltiler	48

4.2.4.2	Enzim Aktivitesinin Hesaplanması	48
4.2.4.3	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması	48
4.2.4.4	Glukoz Standart Eğrisinin Çizilmesi.....	49
4.2.5	Protein Miktarının Belirlenmesi	50
4.2.5.1	Protein Miktarının Hesaplanması.....	50
4.2.5.2	Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi.....	51
4.2.6	Kısmi Saflaştırılmış Pullulanaz Enziminin İmmobilizasyonu	51
4.2.6.1	Pullulanazın Adsorbsiyon Metodu ile İmmobilizasyonu	51
	Cam Boncuk Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu	51
	Amberlit-XAD16 Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu.....	52
	Alümina Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu	52
	Kitosan Boncuklarına Pullulanaz Adsorbsiyonu	53
	PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklarına Pullulanaz Adsorbsiyonu	54
4.2.6.2	Pullulanazın Hapsetme Metodu ile İmmobilizasyonu	54
	Kitosan Boncuklara Pullulanaz Hapsetme	54
	PEG İçeren Kitosan Boncuklara Pullulanaz Hapsetme.....	55
4.2.6.3	Pullulanazın Çapraz Bağlama Metodu ile İmmobilizasyonu	55
	Amberlit Üzerine Çapraz Bağlama İle Pullulanaz İmmobilizasyonu	55
	Kitosan Boncuklarına Çapraz bağlama ile Pullulanaz İmmobilizasyonu	55
4.2.7	Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon	56
4.2.7.1	İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine pH Etkisi.....	56
4.2.7.2	İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	57
4.2.7.3	İmmobilize Pullulanaz Üzerine Substrat Konsantrasyonu Etkisi ...	57
4.2.7.4	İmmobilize Pullulanazın Termal Kararlılığı	57
4.2.7.5	Hazırlanan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması.....	58
4.2.7.6	İmmobilize Pullulanazın Depo Kararlılığı	58

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59	
5.1	Adsorbsiyon Metodu ile Pullulanaz İmmobilizasyonları	59
5.1.1	Cam Boncuk Üzerine Pullulanaz İmmobilizasyonu	59
5.1.2	Amberlit-XAD16 Üzerine Pullulanaz İmmobilizasyonu	61
5.1.3	Alümina Üzerine Pullulanaz İmmobilizasyonu	62
5.1.4	Kitosan Boncuk Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu.....	63
5.1.5	PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklara Pullulanaz Adsorbsiyonu.....	64
5.2	Taşıyıcı Materyal İçine Hapsetme (Tutuklama) Metodu İle Pullulanaz İmmobilizasyonları	65
5.2.1	Kitosan Boncuklara Pullulanaz Tutuklanması (Hapsetmesi)	65
5.2.2	PEG 6000 İçeren Kitosan Boncuklara Pullulanaz İmmobilizasyonu ...	66
5.3	Çapraz Bağlama Metodu ile Pullulanaz İmmobilizasyonları	69
5.3.1	Kitosan Boncuklara Çapraz Bağlama ile Pullulanaz İmmobilizasyonu	69
5.3.2	Amberlit-XAD16 Üzerine Çapraz Bağlama İle Pullulanaz İmmobilizasyonu	71
5.4	Pullulanaz için En Uygun İmmobilizasyon Metodununun Belirlenmesi ..	72
5.5	(2:8) PEG 6000 içeren Kitosan Boncuklara Pullulanaz İmmobilizasyonu ve PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklara Pullulanaz Adsorbsiyonu Metodlarının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	73
5.5.1	İmmobilize Enzim Üzerine pH Etkisi.....	73
5.5.2	İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi	75

5.5.3	İmmobilize Enzim Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	77
5.5.4	İmmobilize Enzimin Termal Kararlılığı	79
5.5.5	(2:8) PEG 6000 İçeren Kitosan Boncuklar ve (2:8) PEG Kaplı Kitosan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması	80
5.5.6	İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı	80
5.6	Tartışma	82
KAYNAKLAR		85
ÖZGEÇMİŞ		89

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
α	Alfa
V_0	Başlangıç hız
β	Beta
rpm	Devir / dakika
g	Gram
t	İndüksiyon zamanı
C	Konstrasyon
L	Litre
V_{max}	Maksimum hız
K_m	Michaelis Menten sabiti
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
M	Molar
R^2	Regresyon katsayısı
$^{\circ}C$	Santigrat derece
M_g	Serbest bırakılan indirgen şeker glukozun moleköl ağırlığı
U	Unite
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

Abs	Absorbans
BSA	Sığır Serum Albumin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit
DEAE	Dietilaminoetil
E	Enzim
EC	Enzim kataloğu
Glu	Glutaraldehit
PDA	Patates Dekstroz Agar
PEG	Polietilen glikol
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
TUBMB	Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>Hypocrea jecorina</i>	11
Şekil 2.2 Pullulanın kimyasal formülü ($C_6H_{10}O_5$)	14
Şekil 2.3 Pullulanazın pullulan üzerine etki mekanizması.....	15
Şekil 3.1 Kitosanın kimyasal yapısı	23
Şekil 3.2 Cam boncuk mikroskop görüntüsü.	24
Şekil 3.3 Amberlit-XAD reçinesinin mikroskop görüntüsü	25
Şekil 3.4 İmmobilizasyon çeşitleri şeması	26
Şekil 3.5 Tutuklama yöntemi şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.6 Enzimin taşıyıcıya bağlanması	29
Şekil 3.7 Fiziksel adsorpsiyon gösterimi	30
Şekil 3.8 Kovalent Bağlanma.....	33
Şekil 3.9 Proteinlerin polimerik asid anhidrid ve azidlerine bağlanması.....	35
Şekil 3.10 3-Floro-4,6-dinitrofenil fonksiyonel grubu taşıyan polimerlere enzim bağlanması	35
Şekil 3.11 Diazolanmış polimerlere proteinlerin bağlanması	36
Şekil 3.12 Siyanojen bromür ile aktive edilmiş polisakkaritlere enzim bağlanması	36
Şekil 3.13 Ugi reaksiyonu ile enzim immobilizasyonu	37
Şekil 3.14 Çapraz bağlanma.....	38
Şekil 3.15 Schiff bazı reaksiyonu gösterimi	39
Şekil 3.16 Polimer matrislerine tutuklama gösterimi şeması.....	40
Şekil 3.17 Sürekli ve Süreksiz Mikrokapsülleme Gösterim Şeması.....	41
Şekil 4.1 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültür ortamı.....	44
Şekil 4.2 <i>Hypocrea jecorina</i> 'dan ekstrasellüler pullulanaz üretimi.....	46
Şekil 4.3 Glukozun yükseltgenmesi	47
Şekil 4.4 Glukoz Standart Eğrisi	49
Şekil 4.5 Protein Standart Eğrisi	50
Şekil 4.6 Kitosan Boncuklara Pullulanaz Adsorpsiyonu	53
Şekil 4.7 Kitosan Boncuklara Pullulanaz Çapraz Bağlama	56
Şekil 4.8 Boncukların Hacimlerini Belirme.....	58
Şekil 5.1 Cam boncuk üzerine immobilize ve serbest pullulanaz aktivite karşılaştırma grafiği.....	60
Şekil 5.2 Amberlit-XAD16 üzerine adsorbe ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	61
Şekil 5.3 Alümina üzerine adsorbe ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği.....	62
Şekil 5.4 Kitosan boncuklar üzerine adsorbe ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	63

Şekil 5.5	PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara immobilize ve serbest pullulanaz aktivite karşılaştırma grafiği	64
Şekil 5.6	Kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği.....	65
Şekil 5.7	PEG 6000 içeren kitosan boncukların görüntüsü.....	67
Şekil 5.8	(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	68
Şekil 5.9	(3:7) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	68
Şekil 5.10	(4:6) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	69
Şekil 5.11	Kitosan boncuklara çapraz bağlı ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	71
Şekil 5.12	Amberlit-XAD16 üzerine çapraz bağlı ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği	72
Şekil 5.13	(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum pH grafiği- total ünite	74
Şekil 5.14	(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum pH grafiği- spesifik aktivite.....	74
Şekil 5.15	(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum pH grafiği- total ünite	74
Şekil 5.16	(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum pH grafiği- spesifik aktivite	75
Şekil 5.17	(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum sıcaklığı- total ünite	75
Şekil 5.18	(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum sıcaklığı- spesifik aktivite.....	76
Şekil 5.19	(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum sıcaklık grafiği- total ünite	76
Şekil 5.20	(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum sıcaklık grafiği- spesifik aktivite.....	77
Şekil 5.21	PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın K_m ve V_{max} grafiği.....	78
Şekil 5.22	PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın K_m ve V_{max} grafiği.....	78
Şekil 5.23	(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın termal kararlılığı.....	79
Şekil 5.24	(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın termal kararlılığı.....	79
Şekil 5.25	(2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın depo kararlılığı.....	81
Şekil 5.26	(2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın depo kararlılığı .	81

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Bazı endüstriyel enzimler, kullanım alanları ve kaynakları 10
Çizelge 2.2	Pullulanaz enzimlerinin sınıflandırılması 12
Çizelge 4.1	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler..... 42
Çizelge 4.2	Glukoz standart eğrisi için absorbans değerleri 49
Çizelge 4.3	Protein standart eğrisi için absorbans değerleri 51
Çizelge 5.1	Cam boncuğa adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri 60
Çizelge 5.2	Amberlit-XAD16'ya adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri 61
Çizelge 5.3	Alümina üzerine adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri 62
Çizelge 5.4	Kitosan boncuğa adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri 63
Çizelge 5.5	PEG 6000 kaplı kitosan (2:8) boncuklara adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri..... 65
Çizelge 5.6	Kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın immobilize verim yüzdeleri..... 66
Çizelge 5.7	PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın immobilize yüzdeleri..... 67
Çizelge 5.8	Kitosan boncuklara çapraz bağlanmış pullulanazın immobilize verim yüzdeleri..... 70
Çizelge 5.9	Amberlit-XAD16 üzerine çapraz bağlı pullulanazın immobilize verim yüzdeleri..... 72
Çizelge 5.10	Pullulanaz immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar 84

**PULLULANAZIN FARKLI TAŞIYICILARDA
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Canda ULUTÜRK

Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Pullulanazlar, glikozil hidrolazların α -amilaz ailesi olarak da adlandırılan sınıfına ait enzimlerdir. Pullulanazlardan endüstride; nişastanın sakarifikasyonu, iplik endüstrisinde haşıl sökme işlemleri, deterjan endüstrisinde nişasta içeren leke çıkarıcıların aktivitesi, kağıt endüstrisinde kağıt hamurunun kirlendirilmesi gibi alanlarda yararlanılır. Pullulanazlar endüstride geniş kullanım alanı bulurken, pullulanazın immobilizasyonu ile ilgili az çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada, pullulanaz, küf mantarı *Hypocrea jecorina*'dan kısmi olarak saflaştırıldı. *H. jecorina* pullulanazı ilk defa çeşitli taşıyıcı materyallere bağlanarak adsorbsiyon, çapraz bağlama ve tutuklama (hapsetme) gibi metodlarla immobilize edildi. Pullulanaz için uygun immobilizasyon metodu seçildikten sonra immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, termal stabilite, K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

Çalışma sonucunda, pullulanaz immobilizasyonu için denenen metodlardan uygun olanları; PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilizasyon ve PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbsiyon olarak belirlenmiştir. Metodların ilki enzim tutuklama (hapsetme) ikincisi adsorbsiyon prensibine dayalıdır. Tutuklama metoduna göre immobilize pullulanazın optimum pH'sı 8, optimum sıcaklığı 50 °C, K_m değeri 0,0184 mg glu./ml, V_{max} değeri 0,2499 U/ml ve depo kararlılığı beş hafta bulundu. Yine ikinci metod olan adsorbsiyon metoduna göre immobilize pullulanazın optimum pH'sı 7, optimum sıcaklığı 70 °C, K_m değeri 0,0595 mg glu./ml, V_{max} değeri 0,2160 U/ml ve depo kararlılığı iki hafta bulundu.

Anahtar Sözcükler: Pullulanaz, *Hypocrea jecorina*, enzim immobilizasyonu, adsorbsiyon, çapraz bağlama, tutuklama

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF PULLULANASE ON DIFFERENT CARRIERS AND INVESTIGATION OF SOME PROPERTIES

ULUTÜRK, Canda

Department of Biochemistry
Master Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

The pullulanase is a member of the α -amylase family which is a class of the glycosyl hydrolases. In industry, pullulanase is used for many occasions. The saccharification of the starch, the desizing process in textile, the activity of the stain removers which contains starch in detergent industry and channeling the wood pulp in paper industry are some examples. Despite the pullulanase is used in industry very often, the immobilization of the pullulanase is not researched frequently.

In this study, the partial purification of pullulanase from the fungus of *Hypocrea jecorina* was done. For the first time, the pullulanase of *H. Jecorina* was immobilized by the methods of adsorption by linking to various carriers, cross linking and entrapment. The proper method for the immobilization of pullulanase was chosen. Later on, the optimum pH, the optimum temperature, thermal stability, of K_m and V_{max} values of the immobilized enzyme were determined.

At last, the proper methods for immobilization of the pullulanase were emerged as: the immobilization of chitosan beads which contains PEG 6000 and the adsorption of the PEG 6000 beads. First one is based on entrapment method and the second one is based on adsorption. According to the entrapment method, the characteristics of the immobilized pullulanase are found as the following; the optimum pH is 8, the optimum temperature is 50°C, the K_m value is 0,0184 mg glu./ml and the V_{max} value is 0,2499 U/ml. According to the second method which is the adsorption, the characteristics of the immobilized pullulanase were found that; the optimum pH is 7, the optimum temperature is 70°C, the K_m value is 0,0595 mg glu./ml and the V_{max} value is 0,2160 U/ml.

Key words: Pullulanase, *Hypocrea jecorina*, immobilization of enzyme, adsorption, cross linking, entrapment

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Enzimler canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları regüle eden biyolojik katalizörlerdir [1].

Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Solunumun, büyümenin, kas kasılmasının, sinirdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlanmasının, determinasyonun, sindirim vs.nin temelini oluştururlar.

Enzimler, proteinlerin en büyük grubunu teşkil ederler. Enzimlerin canlı yapısındaki önemi gittikçe artmaktadır. Temel bilimler, kimya, biyoloji, tıp ve eczacılık gibi çok geniş araştırma alanındaki, çalışmaların büyük bir kısmı enzimler üzerinde yapılmıştır.

Enzimlerin katalitik potansiyeli ve tabiatı anlaşıldıktan sonra, endüstri bu çok faydalı maddelerden geniş ölçüde yararlanmaya başlamıştır.

Çoğu enzimlerin kaynağı canlı hücrelerdir ve mikrobiyal kaynaklar bitkisel ve hayvansal kaynaklara tercih edilir. Çünkü mikroorganizmalar mevsimlere bağımlı olmaksızın gelişirler. Bu sebepten endüstri de kullanılan enzimlerin pek çoğu mikroorganizmalardan elde edilir. Enzimler mikrobiyal kaynaklar sayesinde kolay üretilmeye başlanmışlardır [1].

Enzimler doğal durumda suda çözünürler. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak serbest enzimlerin kullanılması pek çok sakıncalara sebep olmaktadır. Serbest enzim ile gerçekleştirilen bir reaksiyonun durdurulması, enzim istenilen anda ortamdaki uzaklaştırılmadığından ancak spesifik inhibitör kullanılarak sağlanabilir. Bu durumda enzim yan ürünleri ile kirletilen

reaksiyon ürün veya ürünlerine bir yeni safsızlık daha eklenmiş olur. Ürünlerin de bu kirliliklerden arıtılması güç ve maliyeti çok yüksek işlemlerdir. Ayrıca inhibitör katılımı ile reaksiyonun durdurulması enzimin aktivitesinde düşüklüğe sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra serbest enzimi inhibitör olmasa bile ortamdan aktivitesini yitirmeden uzaklaştırmak ve geri kazanmak neredeyse olanaksızdır [1].

Enzimi reaksiyon ortamında aktivitesini yitirmeden, istenilen anda ve kolay bir işleme uzaklaştırmaya olanak sağlayan çözüm enzimlerin immobilizasyonudur [1]. Enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek amacıyla özellikle son yıllarda enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan çalışmaların sayısı logaritmik olarak artmaktadır.

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ve kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

Gerçek anlamda ilk immobilizasyon denemeleri 1950'li yıllarda birçok çalışma grubu tarafından aynı anda yayınlanmış ve günümüzde dünyanın her yerinde oldukça popüler bir çalışma haline gelmiştir [1]. Enzimler katalizör olarak üç değişik formda kullanılırlar:

- 1) Çözünen form
- 2) Çözünen immobilize form
- 3) Çözünmeyen immobilize form

Yukarıdaki sınıflandırma nedeniyle son yıllarda immobilize terimi "enzimi suda çözünmez forma getirme" tanımlamasının dışında bir anlam kazanmıştır [1].

Pullulanazlar, pullulanı hidroliz eden bir çeşit glukanazdır. Substrat molekülünün sadece α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterdikleri için "sınır dekstrinazlar" olarak da adlandırılırlar. Pullulanazların gıda endüstrisinde nişasta hidrolizinde kullanılması prosesi daha verimli hale getirir. Pullulanazlar, nişastadan glukoz ve maltoz oluşumu verimini arttırırlar [2].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada hidrolaz sınıfı bir enzim olan pullulanazın değişik materyaller üzerine immobilizasyonu ve immobilize pullulanazın bazı özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Serbest enzim çözünmez bir materyale immobilize edildiğinde enzimin pek çok fiziksel ve kimyasal özelliği değişime uğramaktadır. Bu yüzden de bu çalışmada *H. jecorina*'dan kısmi saflaştırılan pullulanazın farklı taşıyıcılara immobilizasyonu, immobilize edilen pullulanazın optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinin incelenmesi, termostabil olup olmadığına bakılması, substrata ilgisi K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması ve depo kararlılığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar serbest enzim ile karşılaştırılmıştır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada *H. jecorina* pullulanazı cam boncuk, alümina, amberlit, kitosan boncuk ve PEG içeren kitosan boncuk gibi farklı taşıyıcı sistemlerine immobilize edildi. Denenen metodlardan pullulanaz için en uygun olanı belirlendi. Uygun metod ile immobilize edilen pullulanazın optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} , depo kararlılık gibi bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendi.

BÖLÜM 2

ENZİMLER

Enzimler hem hücre içi hem de hücre dışında biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen genellikle protein yapısında olan biyolojik makromoleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bugün enzimler ekmek, bira, peynir vb. gıdalar ile çeşitli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde yaygın bir şekilde kullanıldığı gibi, tıpta teşhis ve tedavide önemli roller oynamaktadır [1]. Enzimlerin ayrıca kimya endüstrisinde ve biyolojik savaşta da kullanım alanı bulunmaktadır. Endüstrinin hemen hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürünleri oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, düzenli ve fazla miktarlarda elde edilebilmeleridir [1]. Yüksek yapılı bitkiler, vakuollerinde artık ürünler olarak bir nevi enzim inhibitörleri veya toksik yapılı maddeler depoladıkları ve bitkilerden enzim elde edilmesi sırasında bunlar da preparata karıştıkları için bitkisel enzimler endüstri ve klinikte enzim kaynağı olarak tercih edilmemektedir.

Enzimler katalizör olarak aşağıdaki özellikleri gösterirler;

1. Dar sıcaklık (genellikle 20-40 °C) ve pH aralıklarında ılımlı koşullar altında kullanılırlar,
2. Seçimlilikleri az ya da çok olarak değişebilmesine karşın, katalizlenen tepkimelerde stereoseçimli, substrat için yüksek seçimli olabilirler.
3. Katalitik aktiviteleri, var olan substratlar, ürünler ve diğer bileşenlerin derişimleri ile önemli ölçüde etkilenebilir.

Üretim süresinin uzun olması, kararsız olmaları, yüksek fiyat, substrat seçicilikleri, enzimlerin sentetik kimyada katalizör olarak kullanımlarında en önemli sorunlardır. Bununla birlikte, yeni endüstriyel gereksinimler, kimya ve biyolojideki yeni gelişmeler ile bu anlayış değişmektedir. Bunun farklı nedenleri vardır [2]:

1. Çeşitli enzimatik tepkimeler, doğal ya da doğal olmayan substratların stereoseçimli olarak ürünlere dönüştüğünü göstermektedir.
2. Hem enzim tutuklanması ve kararlılığı için hem de proses ölçeklerinin büyütülmesi için yeni teknikler geliştirilmektedir.
3. Rekombinant DNA teknolojisi, enzimlerin düşük maliyetle üretilmesi ve istenen özelliklere sahip enzim üretimine olanak sağlamaktadır.

Enzimleri kullanarak çok sayıda organik reaksiyon, örneğin kiral ara ürünlerin, şekerlerin, nükleotidlerin ve ilgili bileşenlerin dönüşümü; amino asitler, şekerler ve şeker fosfatları gibi fizyolojik aktif bileşenlerin sentezi; peptidlerin ve proteinlerin dönüşümü ve içinde klasik kimya yöntemlerinin de kullanılmak zorunda oldukları diğer dönüşümler gerçekleştirilebilir. Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25.000 enzimden yaklaşık olarak 4.000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (TUBMB) tarafından sınıflandırılmıştır. Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak üretilmektedir. Enzimler arasında hidrolazlar, endüstriyel alanda sıkça başvurulan ve kullanılan enzim sınıfıdır [2].

2.1 Enzim Üretimi

Enzimler hayvansal kaynaklar, bitkisel kaynaklar veya mikroorganizmalardan elde edilirler. Enzimler türlerine göre canlıların belirli hücrelerinde daha fazla bulunabildiği gibi yine türüne bağlı olarak hücrelerin belirgin kısımları da belirli enzimlerce zengindir. Enzimler hücrelerde çalıştıkları ortama göre hücre içi (intraseküller) ve hücre dışı (ekstraseküller) olmak üzere ikiye ayrılır;

1. **Hücre dışı (ekstraseküller) enzimler:** Hücreler tarafından hücre dışına salgılanan enzimlerdir. Elde edilişleri kolay olduğundan endüstride kullanım alanları daha yaygındır.

2. **Hücre içi (intraseküler) enzimler:** Hücre içinde salgılanan ve dışarıya salınmayan enzimlerdir. Elde edilmeleri ve saflaştırılmaları için öncelikle hücre zarının parçalanması gerekmektedir [1].

2.2 Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, canlı hücrelerden (mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücrelerinden veya dokuları) elde edilen enzimler veya organeller tarafından gerçekleştirilen biyolojik reaksiyonlar ile uğraşır [2].

Biyoteknolojinin çalışma alanlarını dünyanın temel problemleri oluşturur. Örneğin; protein üretimi ve insan beslenmesinin garantiye alınması, hammadde ve enerji stoklarının daha verimli değerlendirilmesi, insan ve hayvan sağlığını koruyucu bileşiklerin üretilmesi, bitkilerin biyoteknolojik korunması, bulaşıcı ve salgın hastalıklar ile savaş, atık su arıtılması, çevre korunması ve atıkların yeniden değerlendirilmesi gibi [1].

Biyoteknolojik uygulamalarda çoğu kez çevreye zarar vermeyen teknikler kullanılır, enerji ihtiyacı azdır, yüksek basınç gerektirmez ve oda sıcaklığında veya daha düşük sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirilir [1].

2.2.1 Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeni ile biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır [14].

2.2.2 Biyoteknolojide Mikroorganizmaların Enzim Üretiminde Daha Fazla Tercih Edilmelerinin Nedenleri

1. Yüksek düzeyde protein ihtiva ederler.
2. Bitki ve hayvanlardan daha kolay ve hızlı çoğalırlar.
3. Belirli bir miktar gıda üretimi için, başka kaynaklardan daha az alan isterler ve daha ucuza üretilbilirler.
4. Kontrol edilebilen şartlarda, fermantasyon reaktörü içinde sürekli kültür halinde üretilbildiğinden, üretimleri çevre ve iklim şartlarından etkilenmez.

2.3 Mikrobiyal Enzim Üretimi

Enzimler bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedir. Bazı özel uygulamalar için bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler özel önemlerini korumakla birlikte son 30 yıldan beri teknik uygulamalar için mikrobiyal kaynaklar ağırlık kazanmaya başlamıştır. Enzimlerin mikrobiyolojik yolla üretilmesinde genellikle derin kültür tekniği ve aerobik karıştırmalı tank tipi biyoreaktörler kullanılır.

Mikroorganizmalar yardımı ile enzim üretimi birçok faktör tarafından etkilenir. Besi ortamının kompleks kimyasal bileşimi, indüksiyon ve represyon gibi iç faktörler yanında pH ve oksijen temini gibi dış faktörler de enzim verimi için önemlidir. Mikroorganizma seçimi bir başka önemli konudur. Seçilen mikroorganizma kısa sürede yüksek verimle enzim üretebilmeli, toksik madde ve antibiyotik üretmemeli, ucuz besi ortamında rahatlıkla çoğalabilmeli, gerek enzim üretimi sırasında gerekse izolasyon ve saflaştırma işlemleri sırasında problem oluşturacak yan ürünler üretmemelidir.

Enzimlerin üretiminde yararlanılan besi ortamları genellikle kompleks karbon ve azot maddelerinin karışımıdır. Besi ortamı karbon ve enerji kaynağı içermek zorundadır. Çoğu kez ortama mineraller ve bazı büyüme faktörleri de eklenir. Eğer indüklenen bir enzim üretilcekse ortamda indüktör bulunmalı fakat repressör bulunmamalıdır. Substratlar genellikle indüktör etkiye sahiptir. Örneğin amilaz için nişasta, üreaz için üre indüktör etkiye sahiptir. Bazı substratlar düşük konsantrasyonda indüktör, yüksek konsantrasyonda repressor olarak etki gösterebilir. Substratların çok yavaş parçalanabilen türevleri güçlü bir indüktif etkiye sahiptir (invertaz için sakkarozpalmitat). Koenzimlerde indüktör olarak etki gösterebilirler. Örneğin tiamin, pirüvat-karboksilaz verimini artırmaktadır. Bazı durumlarda üretilen enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünü enzim için indüktör etkiye sahip olabilmektedir (β -amilaz üretiminde maltodekstrin ve pullulanaz üretiminde maltoz). Bazı enzimler için ise tamamen ters bir etki söz konusu olup ürünler repressör etki gösterirler. Katabolik represyon olarak adlandırılan bu etkiyi ortadan kaldırmak için bu önlemler alınabilir.

1. Glukoz gibi kolay değerlendirilen substratlarca zengin besi ortamlarından kaçınılması,
2. Represif etkili maddenin besi ortamındaki konsantrasyonunun düşürülmesi,

3. Büyüme faktörlerinin konsantrasyonu ve sıcaklık düşürülerek veya zayıf toksik etkili maddelerin ilavesi ile büyüme hızının düşürülmesi.

Katabolik represyon durumunda karbon kaynağı seçimi çok kritiktir. Glukoz gibi kolay değerlendirilebilen madde durumunda, fermentör ortamındaki glukoz konsantrasyonu düşük tutulmalıdır. Bu ise azar azar ama sürekli glukoz ilavesiyle sağlanır. Enzim veriminde azot kaynağının (amonyak, nitrat veya organik azot bileşikleri) doğru seçilmesi ve mineral ile iz elementler arasındaki oran da önemlidir. Besi ortamının optimizasyonunda ortam bileşenleri, üretimden sonra enzimin saflaştırılmasını en az etkilemeli ve fermentasyon sonunda büyük ölçüde tüketilmelidir [3].

2.4 Önemli Endüstriyel Enzimler ve Mikroorganizmalar

Bugün 3000 den fazla enzim bilinmesine rağmen büyük boyutta üretimi yapılan ve endüstriyel amaçla kullanılan enzim sayısı çok azdır. Daha çok proteinler, nişasta ve selüloz gibi doğal polimerleri parçalayan ekstrasellüler enzimler ve glukoz izomeraz enzimi teknikte kullanım alanı bulmuştur. Endüstride kullanım alanı bulan ve mikroorganizmalardan üretilen bazı önemli enzim sınıfları ve üretildikleri mikroorganizmalar aşağıdaki anlatılmaktadır.

2.4.1 Proteolitik Enzimler

Proteolitik enzimler *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* türü mikroorganizmalar tarafından ekstrasellüler olarak üretilirler. Bu enzim grubu içerisinde endüstriyel tüketim açısından en büyük payı deterjanlara katılan alkali proteazlar alır. Özellikle *B. licheniformis* ve *B. Amyloliuefcians*'ten üretilen subtilizin deterjanlar için en uygun enzimdir [1].

Aspergillus ve *Mucor* türü mantarlardan elde edilen asit proteazların termofilik olanları peynir üretiminde kullanılır. Yine *Aspergillus* proteazları soya soslarının hazırlanmasında, et artıklarından ve balıktan protein hidrolizatları hazırlanmasında geniş ölçüde kullanılır [1].

2.4.2 Amilolitik Enzimler

Bakteriyel amilaz preparatları yüksek oranda α -amilaz içerir. Bu enzim α -1,4-glikozid bağlarını parçalayan bir endoenzimdir. Bakteriyel amilazlar termostabildir. Mantar amilazları ise termostabil olmakla birlikte α -amilaz yanında glukoamilaz da içerir.

Glikoamilaz nişastayı bir uçtan başlayarak hem α -1,4- hem de α -1,6-glikozid bağlarından parçalayabilen bir enzimdir [1].

Amilazlar nişasta endüstrisinde dekstrin, glukoz ve maltoz şurubu üretiminde kullanılırlar. Ekmekçilikte ise yardımcı enzim olarak kullanılırlar. Yine ayrıca tekstil sanayinde de görev alırlar [1].

2.4.3 Glukoz İzomeraz

Glukoz izomeraz, glukozu fruktoza dönüştürdüğünden büyük bir ekonomik değere sahiptir. Üretiminde değişik mikroorganizmalardan yararlanır. En yaygın kullanılanı *Streptomyces* türleridir [1].

2.4.4 Pektolitik Enzimler

Pektolitik enzimler galakturonik asidin doğal polimerleri olan pektinleri parçalar. Üretimde *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium* türleri kullanılır.

Pektin parçalayan enzimler meyve sularının berraklaştırılmasında, meyve suyu üretiminde filtrasyonu kolaylaştırıp verimin artırılmasında, C vitamini sentezi için çıkış maddesi olan galakturonik asidin eldesinde yaygın biçimde kullanılırlar [1].

2.4.5 Selülazlar

Doğada en yaygın şekilde bulunan selüloz, glukoz birimlerinin β -1,4-glikozid bağları ile birbirine bağlanması sonucu oluşan bir polimerdir ve sekonder yapısı çok sıkıdır. Bakteriler anaerobik koşullarda selülozu parçalarlar.

Selülaz üretiminde daha çok *Trichoderma viride* kullanılır. Enzim oluşumu selüloz tarafından indüklenir.

Selülaz enzimleri meyve suyu, sebze ve meyve püreleri hazırlanmasında hücrelerin parçalanmasında, diyet gıdaların hazırlanmasında ve teknik proseslerde istenmeyen liflerin uzaklaştırılmasında kullanılırlar. Ayrıca bitkisel ürünlerin kurumasını kolaylaştırırlar [1].

2.4.6 Galaktozidazlar

α -Galaktozidaz şeker fabrikalarında verimin artırılmasında β -galaktozidaz ise sütteki ve peynir altı suyundaki laktozun hidrolizlenmesinde kullanılır [1].

Çizelge 2.1 Bazı endüstriyel enzimler, kullanım alanları ve kaynakları [1].

ENZİM	KULLANIM ALANI	MİKROORGANİZMA
α -amilaz	Maltoz ve dekstrinin yıkılması Leke çıkarıcı Glikoz şurubu	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>B. licheniformis</i>
β -glukanaz	β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması	<i>A. oryzae</i> <i>B. subtilis</i>
Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önlemek için	<i>A. niger</i>
Selülaz	Deterjan katkı maddesi Atıkların değerlendirilmesi	<i>Penicillium spp.</i>
Glikoz izomeraz	Glikoz, Fruktöz dönüşümü	<i>Streptomyces spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>
Glikoz oksidaz	Biyosensor	<i>A.niger</i>
Laktaz	Peynir altı suyu Laktosus gıda üretimi	<i>Kluyveromyce laktis</i>
Lipaz	Deterjan katkı maddesi Yağların parçalanması	<i>A. oryzae</i>
Pektinaz	Meyve suyu ekstraksiyonu Şarap ve meyve suyu berraklaştırılması	<i>Erwinia spp.</i>
Proteaz	Deterjan katkı maddesi Deri Endüstrisi, et ekstraksiyonu	<i>B. Subtilis</i>

2.5 *Hypocrea jecorina*

Hypocrea jecorina, hidrolitik enzimleri etkin bir şekilde üretmesi nedeniyle endüstride oldukça yer alan ipliksi (saprofit) bir mantar türüdür. Lignosellülozik biyokütle, biyoyakıt ya da platform kimyasalları monomerik şekerlere dönüştürme kabiliyeti sebebiyle endüstride artan bir ilgi alanına sahiptir. Kağıt hamuru üreten kağıt endüstrisi,

gıda ve yem endüstrisi, tekstil sanayi gibi alanlarda yaygınca kullanılan bir suştur. Yine alternatif yakıt ihtiyacı sebebiyle hidrolitik enzimlerinin aktivitesinden yararlanılarak biyoyakıt teknolojisinde kullanılmaktadır. Polimerik biyokütleli bileşikler kolaylıkla *Hypocrea jecorina* varlığında glukoz, ksiloz gibi monomerik birimlere dönüştürülebilmektedir [4].



Şekil 2.1 *Hypocrea jecorina* [15].

2.6 Pullulanaz (pullulan-6-glucanohydrolase EC(3.2.1.41))

Pullulanı hidroliz eden pullulanazlar α -amilaz ailesi olarak bilinirler [5]. Bu enzimlerin aynı genel özelliklere sahip olduğu bulunmuş ve substrat bağlanma bölgelerinin amilazlarla aynı olduğu gözlenmiştir. Buna ilaveten pullulanazın katalitik bölgesinde Asp ve Glu aminoasitlerinin katalitik aktiviteden sorumlu olduğu belirtilmiştir [6].

Substrat molekülünün sadece α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterdikleri için ‘sınır dekstranazlar’ olarak da adlandırılırlar [1]. Pullulanazlar, glukoz ve maltoz verimini arttırlar [7].

Pullulanaz enzimi ilk defa Bender ve Wallenfel tarafından 1961 yılında, pullulan polimerinin α -1,6 bağlarını hidroliz eden enzim olarak tanımlanmıştır [2]. Pullulanaz pullulan, amilopektin ve glikojendeki α -1,6 glikozidik bağlarına etki eder. Başlıca kullanım alanı nişasta endüstrisidir [1].

Pullulanazlar (pullulan-6-glucanhydrolase EC(3.2.1.41)) nişasta, amilopektin ve çeşitli oligosakkaritlerin α -D-1,4 glikozidik bağlarını hidrolizleyebilme yeteneğine göre;

1. Pullulanaz Tip I
2. Pullulanaz Tip II (amilopullulanaz) olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır.

Her iki tip pullulanaz, pullulanın α -D-1,6 glikozidik bağlarını parçalar ve ortaya maltotrioz çıkar. Ancak Pullulanaz Tip II enzimleri, Tip I’den farklı olarak α -D-1,4

glikozidik bağlarına karşıda etki gösterebilirler. Bunların yanında son yıllarda Pullulan Hidrolaz'lar da tanımlanmıştır. Bunlar;

1. Pullulan Hidrolaz Tip I (neopullulanaz)
2. Pullulan Hidrolaz Tip II (isopullulanaz)'dır.

Bu enzimler pullulandaki α -D-1,4 glikozidik bağlarını parçalaması sonucu hidroliz ürünü olarak panoz ve isopanoz oluşur. En son olarak pullulandaki α -D-1,6 ve α -D-1,4 glikozidik bağlarının ikisini birden aynı anda parçalayarak maltotrioz, panoz ve maltoz birimleri oluşturan;

3. Pullulan Hidrolaz Tip III

enzimi tanımlanmıştır [8].

Çizelge 2.2 Pullulanaz enzimlerinin sınıflandırılması [9]

Pullulanaz Çeşidi:	Son Ürün:
Pullulanaz Tip I (EC 3.2.1.41)	Maltotrioz, lineer oligosakkarit
Pullulanaz Tip II	Glukoz, maltoz, maltotrioz
Pullulan Hidrolaz Tip I (EC 3.2.1.135) (Neopullulanaz)	Panoz (α -6-D-glukozilmaltoz)
Pullulan Hidrolaz Tip II (EC 3.2.1.57) (İsopullulanaz)	İsopanoz (α -6-maltozilglukoz)
Pullulan Hidrolaz Tip III	Maltotrioz, panoz, maltoz

Pullulanaz Tip I, α -dekstrin-6-glukanohidrolaz ya da limit dekstrinaz olarak isimlendirilir. Bu tür enzim ilk defa *Klebsiella* türü mikroorganizmalarda keşfedilmiştir. Pullulan haricinde nişastanın dallanma noktalarını da parçalar. Böylece nişasta parçalayıcı enzim adını alır. Glukoamilaz enzimi ile beraber kullanılarak, nişastadan yüksek verimde glukoz oluşumunu sağlar. Bu iki enzimin birlikteliğinden düşük kalorili bira yapımında yararlanır. Pullulanaz Tip I, β -amilaz ile beraber kullanıldığında nişastadan maltoz meydana gelir. Böylece pullulanaz yüksek saflıkta fruktoz eldesinde ve maltoz şurubu üretiminde de kullanır [1].

Pullulanazların gıda endüstrisinde nişasta hidrolizinde kullanılması prosesi daha verimli hale getirir. Ancak ticari pullulanazların termal stabilitesi yüksek değildir ve 60°C gibi düşük sıcaklıklarda bile birkaç saat içerisinde başlangıç aktivitesinin büyük oranda kaybedilmesi istenmeyen bir özelliktir. Bu sebeple pullulanazların endüstride kullanım alanı sınırlıdır [10].

2.6.1 Pullulanazların Endüstride Kullanım Alanları

2.6.1.1 Pullulanazların Nişastanın Şekerlendirilmesinde Kullanılması

Nişasta moleküllerinin pullulanaz enzimleri tarafından hidrolizi sonucu indirgen şekerler oluşur. Bu şekerler arasında glukoz, maltoz ve maltotrioz, bulunmaktadır. Sıvı haldeki bu ürün, glukoz şurubu olarak da adlandırılmaktadır.

Nişastanın hidrolizi sonucu elde edilen glukoz şurubu, daha sonra glukoz izomeraz enzimi ile fruktoza dönüştürülebilmekte ve ürün olarak da fruktoz şurubu elde edilmektedir. Tat açısından fruktoz daha etkili olduğu için çeşitli gıda maddelerinde tatlandırıcı olarak fruktoz şurubu tercih edilmektedir [11,13,39,40].

2.6.1.2 Pullulanazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

B. subtilis ve *B. amyloliquefaciens* suşlarından derin fermantasyon yöntemi ile üretilen bu enzimlerin diğer bir özelliği çirilenmiş nişastayı oldukça kısa sürede parçalamalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı yaklaşık 70-80 yıldır pamuklu dokuma sanayinde haşıl sökücü olarak kullanılmaktadırlar. Pamuklu ipliklerin dokuma işlemi sırasında torozlanarak kopmalarını önlemek için iplikler nişasta esaslı bir haşıl banyosundan geçirilip kurutularak sağlamlaştırılır.

Dokuma işleminden sonra ham bezi diğer işlemlere hazırlamak için bu nişasta kolasının alınması gerekmektedir. Haşıl sökme denilen bu işlem, beze zarar vermeden en kolay şekilde pullulanaz enzimleri kullanılarak yapılmaktadır [12].

2.6.1.3 Pullulanazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Pullulanazlar nişasta içeren (örneğin patates, makarna, çikolata gibi) kir ve lekelerin temizlenmesine yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan bulaşık makineleri deterjanlarına pullulanaz katılarak nişasta içeren kurumuş yemek artıklarının çözünmesi sağlanabilmektedir [12,13].

2.6.1.4 Pullulanların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Kağıt endüstrisinde kağıdın işlenmesi için kağıt hamurunun nişastayla kırılenmesi gerekmektedir. Bu işlem kağıdın kalitesini arttırır, kağıda sertlik ve dayanıklılık kazandırır, kağıdın güzel tabakalanmasını ve daha iyi silinebilirliğini sağlar. Doğal nişastaların viskoziteleri kağıt kırılenmesi için çok fazladır. Bu nişastalar pullulanaz enzimleri kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılır [13].

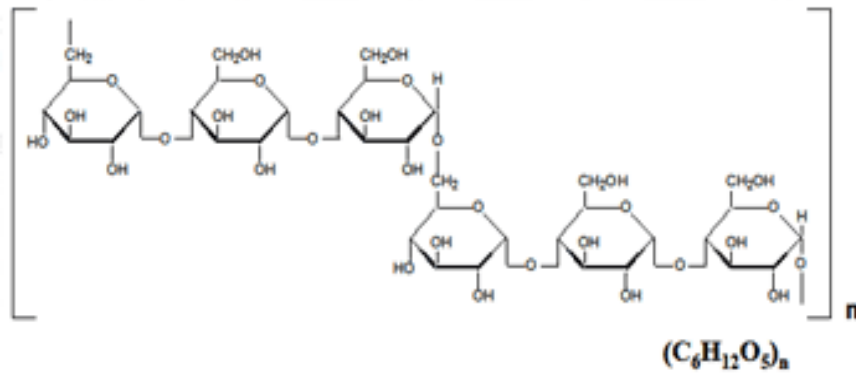
2.7 Pullulan

Pullulan amiloz, dekstroz, selüloz gibi nötral bir glukandır. Mikroorganizmalar tarafından (özellikle *Aureobasidium pullulans*) fermentasyon yoluyla elde edilir [2].

Pullulan maltotrioz birimlerinin birbirine α -1,6 glikozidik bağlarla bağlandığı lineer bir polisakkarittir.

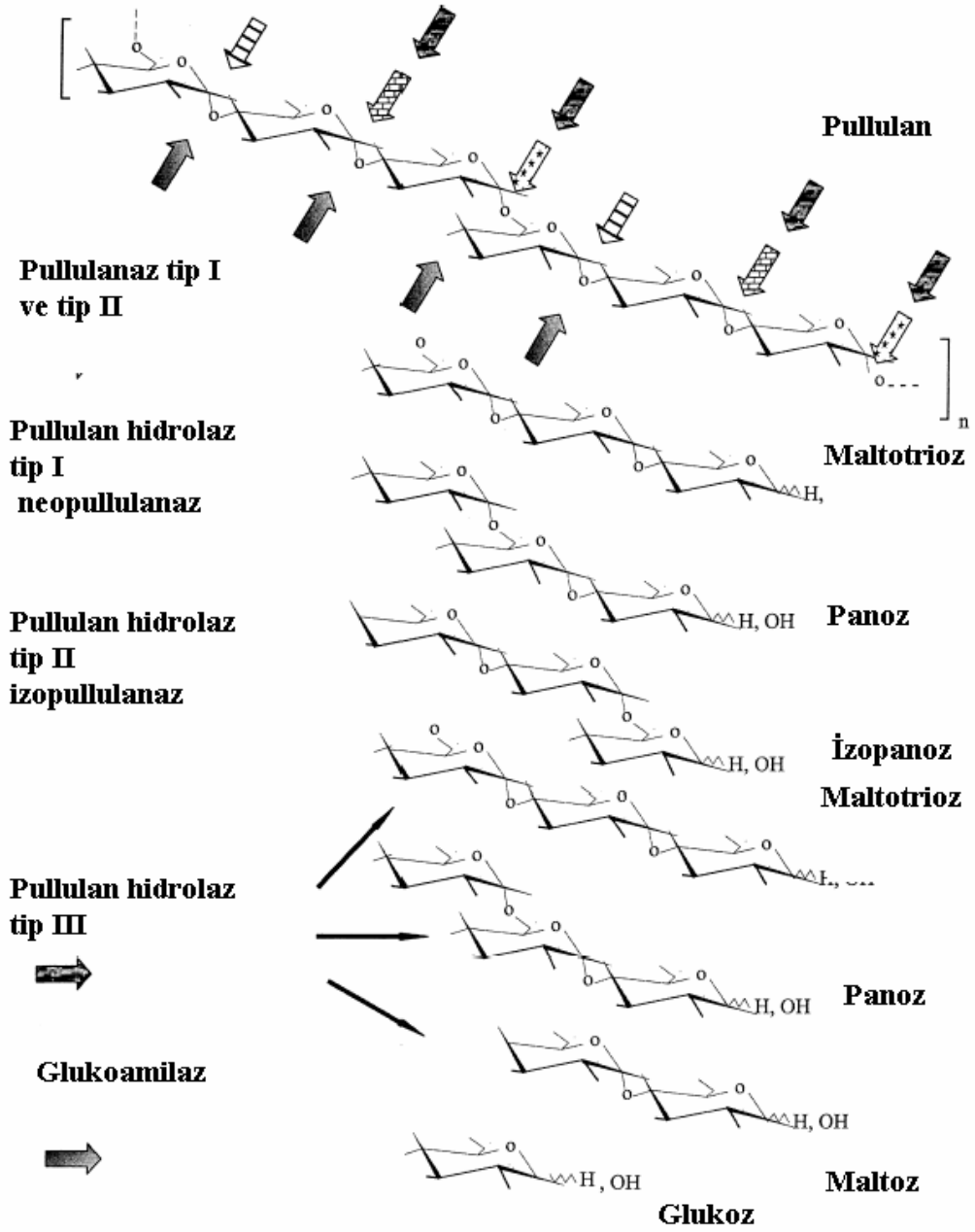
Aureobasidium pullulans ilk defa 1866 yılında De Bary tarafından tanımlanmış, ancak bu mikroorganizmanın ürettiği pullulan polimerinin saflaştırılıp karakterizasyonunun yapılması 1958 yılında Bernier adındaki bilim adamı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bugün kullanılan pullulan adı ise 1959 yılında Bender tarafından verilmiştir [14].

Pullulan düzenli olarak birbirini tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşmuştur. Pullulanın bir diğer yapısal birimi tetramer veya maltotetrozdur. Catley ve arkadaşları tarafından 1986 yılında yapılan çalışmada pullulanın maltotrioz birimleri yanında miktarı % 7'yi aşmayacak şekilde maltotetroz birimlerinden de meydana geldiği ortaya çıkmıştır [14].



Şekil 2.2 Pullulanın kimyasal formülü ($C_6H_{10}O_5$)

Şekil 2.2'de pullulanın kimyasal yapısı görülmektedir. Şekil 2.3'te ise pullulanın pullulanaz enzimi üzerindeki etki mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Pullulanazın pullulan üzerine etki mekanizması [2].

2.8 Pullulanaz İle İlgili Önceki Çalışmalar

Son yıllarda meydana gelen biyoteknolojik gelişmeler ile beraber araştırmacıların enzimle ilgili yapılan çalışmalara olan ilgisi artmıştır.

Günümüzde endüstri daha ekonomik, verimli, işletme şartlarına uyum sağlayabilecek enzimlerle ilgilenmeye başlamıştır. Böylece enzimlerle ilgili yapılan çalışmalara, günümüz teknolojisinin sağladığı imkanlarla birlikte rekombinant DNA teknolojisi

kullanılarak daha kararlı enzimlere sahip mikroorganizmaların üretilmesi, farklı immobilizasyon teknikleri ile kararlılığı arttırılmış enzimlerin eldesi konularında yapılan çalışmalar eklenmektedir.

Yapılan literatür çalışması ile pullulanaz enzimi ile ilgili gerçekleştirilen bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada serbest pullulanaz ve manyetik kitosan tanelerine immobilize edilmiş pullulanazın spesifik aktiviteleri ve kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Çalışmada *Klebsiella pneumoniae* pullulanazı kullanılmıştır. Manyetik kitosan taneleri, manyetik Fe₃O₄ sulu çözeltisinde fotokimyasal polimerizasyon ile hazırlanmıştır. Manyetik kitosan taneleri düzgün küresel şekilde, 86 nm çapında ve süperparamanyetik özelliğindedir. Pullulanaz enzimi manyetik kitosan tanelerine çapraz bağlama yöntemiyle (çapraz bağlama reaktifi glutaraldehit) immobilize edilmiştir. Bu şekilde toplamda 180 µg pullulanazın, 1 mg manyetik kitosan tanesine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilize pullulanazın optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. Bu değer serbest pullulanazın optimum sıcaklığıyla aynıdır. Ancak 50°C sıcaklıkta immobilize pullulanaz serbest pullulanaza göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Serbest haldeki pullulanazın optimum pH değeri 5,5 iken, immobilize pullulanazın optimum pH değeri 5 olarak bulunmuştur ve immobilize pullulanaz daha geniş bir pH aralığında kararlılığını koruyabilmektedir. Manyetik kitosan tanelerinin pullulanaz immobilizasyonu için kullanılabilir uygun bir kaynak olduğu gösterilmiştir [2].

Kuroiwa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Klebsiella pneumoniae*'dan indüklenmiş ticari pullulanaz enziminin, aktifleştirilmiş agar jel ve kitosan tanelerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve iki immobilize enzimin serbest enzime göre kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Aktif agar jelde immobilizasyon, enzimdeki amino grupları ile jel yüzeyindeki aldehit grupları arasında birçok noktadan kovalent bağlanma yöntemiyle gerçekleşmiştir. Pullulanazın aktif agar jele immobilizasyonunda, pullulanaz içeren 120 mL 0,1 M pH 10 borat tamponunda 15 g aktifleştirilmiş agar jel çözülmüştür. Elde edilen çözelti, 25°C'de 24 saat boyunca karıştırılmış, ardından 240 mg NaBH₄ ilave edilmiş ve karışım 30 dakika süresince karıştırılmaya devam edilmiştir. Çözelti 0,1 M, pH 10 fosfat tamponu ve destile su ile yıkanarak süzölmüş ve jel elde edilmiştir. Aktif agar jele immobilizasyonda termal kararlılığın, immobilizasyon veriminin ve enzim aktivitesinin, jel üzerinde bağlanmayı

gerçekleştirecek aldehit gruplarının yoğunluğuna bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Enzimin kitosan tanelerine immobilizasyonunda ise enzim fiziksel adsorpsiyon metoduyla immobilize edilmiştir. Bu işlem için kitosan taneleri pH 7’de 0,1 M fosfat tamponunda bir gece boyunca bekletilmiş, ardından 5 g kitosan, bir miktar pullulanaz ile fosfat tamponunda süspansiyon haline getirilmiş ve 25°C’de 1 saat boyunca yavaşca karıştırılmıştır. Kitosan taneleri fosfat tamponu ve destile su ile yıkanmış ve szlmştr. Pullulanaz aktivitesi lm için substrat olarak 0,1 M, pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış % 0,5 (m/v) konsantrasyonda pullulan çözeltisi kullanılmıştır. Serbest pullulanaz 8 saatlik inkübasyon süresinin ardından inaktif hale gelmiştir. Kitosan tanelerine adsorbe edilen enzimin kararlılığının, daha önce aynı çalışma grubu tarafından yapılan bir başka çalışmadaki, kitosan tanelerine önce adsorpsiyon ardından çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiş pullulanaza göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Aktif agar jele immobilize edilen pullulanazın 48 saat inkübasyon süresinin sonunda kararlılığının % 30’unu hala koruduğu görülmüştür [2,10].

Amilopullulanaz, genellikle bakterilerde incelenmiş olup, bu bakterilerden izole edilen amilopullulanazın fizikokimyasal özellikleri ve indüksiyon parametreleri araştırılmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda çalışılan bakterilerden biri de *Geobasillus sp.*’dir [8].

ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Enzimler yasayan hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları hızlandıran protein molekülleridir. Enzimler reaksiyonlar sonucunda modifiye olmazlar. Bu nedenle aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak enzimin reaktanlar ve/veya ürünler ile birlikte bir çözelti içerisinde bulunması, enzimin çözülden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda enzimin bir katıya tutundurulması sağlanarak, ürünler ortamdaki alınmakta ve enzim tekrar kullanılabilir bir hale gelmektedir [16,24].

Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir [16,24].

Suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edilen enzim moleküllerinin; suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılmasına ‘‘immobilizasyon’’ denir. Enzim immobilizasyonunda amaç, yalnızca enzimi istenilen anda reaksiyon ortamından uzaklaştırmayı sağlamak değildir. Immobilizasyon sonucu enzim aktivitede çok önemli bir düşme de olmamalıdır. Bu nedenle immobilizasyon çok yumuşak koşullarda gerçekleştirilmeli ve işlem sırasında enzim aktif merkezleri rahatsız edilmemelidir. Bu durum özellikle enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent bağlanması ile söz konusu olur [1].

3.1 İmmobilizasyonun Tarihçesi

1916 yılında Nelsen ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertazının (E.C.3.2.1.26) [9001–57–4], sukrozun hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu gelişmenin ardından fizyolojik aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu üzerine çok çeşitli raporlar yayınlanmıştır. Bütün bu

çalışmalara rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi çeşitli enzimleri diazolanmış poliaminostiren reğnesi üzerine kovalent bağlanmayla immobilize etmelerine kadar immobilizasyon pratikte kullanılmamıştır. Daha sonra 1956 yılında Mitz, katalazın DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonunu gerçekteşirmiştir. 1963 yılında Bernfeld ve Wan tripsin, papain amilaz ve ribonükleazın, poliakrilamid jel içine tutuklanmasını sağlamış, 1964 yılında Quioco ve Richards karbosipeptidaz glutaraldehitte ıapraz bağlanmasını gerçekteşirmiştir. Ayrıca, 1964 yılında Chang karbonik anhidrazın mikrokapsüllenmesini, 1971 yılında da Gregoriadis amiloglukozidaz iğerren lipozomların hazırlanmasını gerçekteşirmiştir. Bu her iki ıalışma da enzim terapisinde kullanılmaktadır. Bu sırada Katchalski-Katzir ve arkadaşlarının immobilize enzimlerin teorik olarak anlaşılmasında büyük yararları olmuştur [17].

1969 da Chibata ve arkadaşları, ilk defa immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında başarı sağlamış kişilerdir. Fungal aminoaçılazı DEAE Sephadex ile iyonik bağlanma yöntemi ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzimi N-açıl-D,L-amino asitleri hidrolizle, L-amino asitlere ve Naçıl- D-amino asitlere dönüştürmekte kullanmışlardır. 1973 yılında, Chibata ve arkadaşları tarafından mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamaları gerçekteşirilmış, poliakrilamid jelle tutuklanmış, yüksek aktivitede aspartaz iğerren *Escherichia coli* hücreleri ile amonyum fumarattan L-aspartat üretiminde kullanılmıştır [17].

Son yirmi yılda enzim immobilizasyonu yanı sıra mikroorganizma immobilizasyonu da önem kazanmıştır. Substrat mikroorganizmanın iğerdiği enzimlerden yalnız biri iğerin spesifik ise saf bir enzimin immobilizasyonu yerine bunu iğerren mikroorganizmanın immobilizasyonu yapılmaktadır. Mikroorganizma immobilizasyonu yapıldığında saflaştırma basamağı gerek duyulmadığından ekonomik aıdan da endüstriye büyük kazanç sağlamaktadır. Özellikle son ürünü elde edebilmek iğerin birden fazla enzimden yararlanılıyor ve mikroorganizmanın iğerdiği diğer enzimler reaksiyona girmiyor ya da reaksiyona girmeleri problem yaratmıyor ise saf enzimler yerine mikroorganizmaların immobilizasyonu büyük yarar sağlamaktadır [1].

3.2 İmmobilizasyonunun Avantajları

İmmobilizasyon işlemiyle bir katıya tutundurulmuş enzimin, ıözelti iğerisindeki bir enzime göre bir ıok avantajı bulunmaktadır [41]:

1. Enzim bir çok kere kullanılabilmekte ve bu da maliyeti düşürmektedir.
2. Enzimin ortamdaki uzaklaştırılması sonucu reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilmektedir.
3. Oluşan ürünlerde enzim kalıntıları bulunmamaktadır (Özellikle gıda ve ilaç sektörleri için enzimin kirletici içermemesi çok önemlidir.).
4. Enzimin kararlılığı artmaktadır.
5. Enzimin ortamdaki ayrılması kolaylaşmaktadır.
6. Sürekli sistemde çalışabilmektedir.
7. Ürünün kolayca ayrılması sağlanmaktadır.
8. Atık sıvı miktarı azalmaktadır.
9. Bazı durumlarda enzimin aktivitesi artmaktadır.
10. Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır [16,18].

Enzim immobilizasyonunun bütün avantajlarına rağmen endüstriyel uygulamaları aşağıdaki nedenlerden dolayı sınırlanmaktadır:

1. Çözülebilir enzimlerin maliyetinin daha düşük olması.
2. Geleneksel yöntemlerin değiştirilmek istenmemesi.
3. Kurulmuş prosesleri değiştirmek için yeni yatırımlara gerek duyulması.
4. İmmobilizasyon işleminde kullanılacak taşıyıcının maliyeti.
5. Sistemin performansı [18].

3.3 İmmobilizasyon Parametreleri

Diğer fiziksel ve kimyasal proseslerde olduğu gibi, immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, konsantrasyona, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır [19].

Çözünmez gözenekli taşıyıcılar kullanılarak enzim bağlanması yöntemi, laboratuvar çalışmaları ve endüstriyel uygulamalar için standart bir yöntemdir. Enzim dış yüzeyinin ve taşıyıcının fonksiyonel gruplarının özellikleri taşıyıcılara kimyasal bağlanma esnasında çok önemli rol oynar. Adsorpsiyon, yüzeyin hidrofilik ve hidrofobik olma karakteristiğine bağlıdır. Hakim olan iyonik gruplar ve bu grupların amino asitlerle olan

etkileşimleri çözeltinin pH'ıyla değişen ve tüm yüzeyin karakteristiğini belirleyen elektriksel yüke ve iyonik grupların yoğunluğuna bağlıdır [19].

Kovalent bağlanma metodunda, protein yüzeyine erişebilir olan çok sayıda fonksiyonel grup kullanılabilir. Bununla beraber, özellikle lizin ve arjininin amino grupları, aspartik ve glutamik asitin karboksil grupları gibi az sayıda amino karboksil grup pratik olarak kullanılabilir [19].

Enzim ile taşıyıcı yüzeyi arasındaki iyonik, hidrofilik veya hidrofobik ve hidrojen bağlarıyla olan güçlü etkileşimler enzimin kararlılığını etkiler. Çok sayıdaki güçlü etkileşimler (ve bunların kooperatif etkileri) taşıyıcı yüzeyinde istenmeyen tersinmez adsorpsiyona neden olabilir, bu da enzim aktivitesinde kayba neden olur. Bu ayrıca proteinin üçüncül yapısında da konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Bu etkiler özellikle katı taşıyıcı yüzeylerindeki çoklu etkileşimlerde gözlenebilir [19].

Bazı durumlarda uygun bir miktarda boşluk yaratıcı ajan olarak bilinen kimyasalların kullanılması taşıyıcıyı immobilizasyona elverişli hale getirerek enzimi korur ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Enzime belli bir miktarda pasif ve ucuz bir proteinin adsorbe edilmesi enzim immobilizasyonundaki koruyucu ön aşamalardan biridir [19].

3.4 İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar

İmmobilize enzimlerin özellikleri hem enzimin hem de taşıyıcı maddenin özelliklerine bağlıdır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimler, immobilize edilmiş enzimin pratik uygulamaları için enzimin tespit edilmesi gereken fizikokimyasal ve kinetik özellikleri hakkında kesin yargılara varmak için katkıda bulunur. İmmobilize enzimin operasyonel performansını önemli ölçüde artıracak olan taşıyıcı çok akıllıca seçilmelidir [19,40].

Tüm enzimler ve enzim uygulamaları için genel bir taşıyıcı bulunmamasına rağmen, taşıyıcı olarak kullanılacak maddelerde aranılan birçok özellik olmalıdır. Bunlar [19,40]:

1. Proteinlere karşı yüksek ilgi
2. Kimyasal modifikasyonlar ve enzimle direkt olarak reaksiyona girebilmesi için gerekli fonksiyonel grupların varlığı
3. Hidrofiliklik (suya karşı hidrofobik, proteine karşı hidrofilik olmak)
4. Yenilenebilirlik

5. Mekanik kararlılık
6. Seçilen biyotransformasyon için farklı geometrik şekillerde ve istenilen yüzey alanlarında hazırlanabilme kolaylığı
7. Geniş yüzey alanı
8. Kimyasal kararlılığının yüksek olması
9. Uygun tanecik çapı / boyutu (0.2-1 mm / 30-60 nm)
10. İyon değiştirebilme kapasitesinin yüksek olması
11. Őiřme kabiliyetinin düşük olması
12. Mikrobiyel kararlılığının yüksek olması
13. İnsan ve çevre sağlığına zarar vermemesi
14. Elastikiyetinin yeterli olması
15. Maliyetinin düşük olması
16. Doğal ortamlara zarar vermeyecek maddelere indirgenebilmesidir [19,40].

3.4.1 İmmobilizasyonda Genel Olarak Kullanılan Taşıyıcıların Sınıflandırılması

Enzim immobilizasyonunda yukarıdaki özelliklerin büyük bir kısmına sahip inorganik, doğal kaynaklardan elde edilen organik ve organik sentetik taşıyıcılar gibi çok çeşitli taşıyıcılar kullanılabilir [19].

İnorganik ve canlı taşıyıcılar:

- Gözenekli cam, SiO₂
- Gözenekli silika, SiO₂ (Deloxan)
- Alümosilika
- Polisakkaritler: agaroz (türevleri)
- Çaprazlanmış dekstranlar (Sepharoz, Selüloz)
- Proteinler: Jelatin, biyokütle (örneğin bakteriler)

Organik sentetik taşıyıcılar:

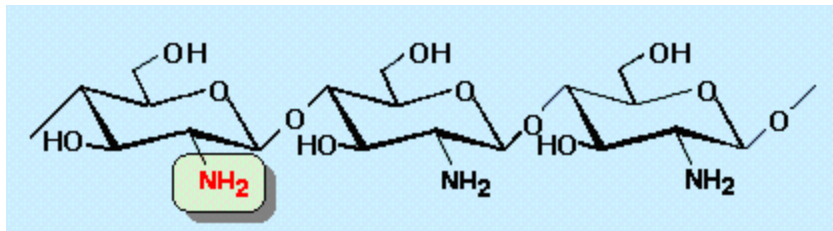
- (Metil-) Akrilat-türevleri (Eupergit)

- Akrilamid türevleri
- Vinilasetat türevleri
- Maleik asit anhidrit-türevleri
- Poliamitler (Nylon)
- Polistiren türevleri
- Polipropilen
- Sepatanecikleri (Sepabeads)

3.4.2 Kitosan

Kitosan, kitinden türetilen modifiye bir polisakkarittir. Kitinin deasetilasyonu ile üretilmektedir. Kitosan α -(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz ve α -(1-4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz birimlerinden oluşan ikili lineer bir heteropolisakkarittir. Kitosan da yapı olarak selüloza çok benzemektedir; selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun amin grubuyla yer değiştirmiş şeklidir, yani kitosan kitinde olduğu gibi çift bağlı karbon atomlarına sahip değildir. Berger ve ekibi, biyomedikal uygulamalarda kitosan hidrojenlerinin kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Hidrojel yapımında en fazla kullanılan çapraz bağlayıcılar, glioksal ve glutaraldehit. Glutaraldehit, kitosanın amin gruplarına imin grubu üzerinden bağlanmaktadır. Bu tip dialdehitler her hangi bir aditif olmadan doğrudan reaksiyon gerçekleştirebilme özelliğine sahiptir [45].

Aşağıda Şekil 3.1’de kitosanın kimyasal yapısı görülmektedir:



Şekil 3.1 Kitosanın kimyasal yapısı [41].

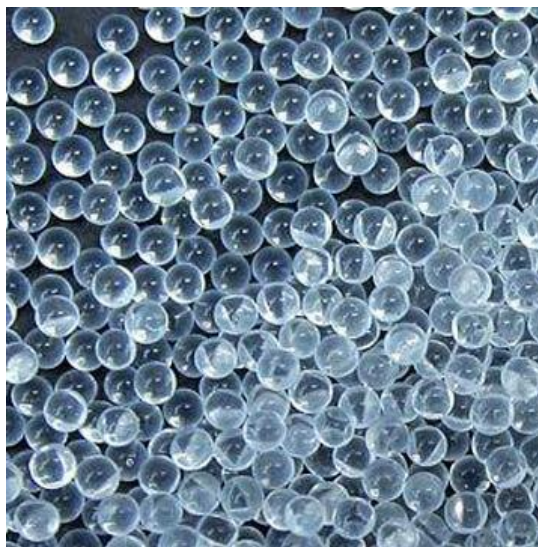
Kitosan, biyoteknolojide enzim immobilizasyonunun yanında, hücre immobilizasyonunda, protein ayırmada, hücre geri kazanımında ve kromatografik uygulamalarda da kullanılmaktadır. Ayrıca, gıda sanayinde boya maddelerinin ayrılmasında, renk stabilizasyonunda ve hayvan yemi katkısı olarak kullanılmaktadır.

Atık su arıtmada metal iyonlarının ayrılmasını sağlamakta, tarımda gübrelemede kullanılmaktadır. Medikal uygulamalarda bandajlarda, kontak lenslerde, cilt yanıklarında, kanda kolesterol düzeyinin belirlenmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak, kozmetik sektöründe, nemlendiricilerde, el, yüz, vücut krem ve losyonlarında kitosandan yararlanılmaktadır. Kabuklu deniz hayvanlarının atıklarından kitosan üretmek için öncelikle seyreltik sulu HCl çözeltisi kullanılarak dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Ardından seyreltik NaOH çözeltisiyle deproteinizasyon yapılarak kitin elde edilmektedir, ancak elde edilen kitinin renginin giderilebilmesi için % 0.5'lik $KMnO_4$ sulu çözeltisi ve oksalik asit sulu çözeltisi ya da güneş ışığı kullanılarak renksizleştirme işlemi yapılmaktadır. Böylece kitin üretimi gerçekleştirilmektedir [41].

Kitinin % 40 – 50'lik NaOH çözeltisi kullanılarak sıcak ortamda deasetilasyonu ile de kitosan üretilmektedir [41].

3.4.3 Cam Boncuk

Gözenekleri kontrollü cam boncuklar (CPG) % 96 SiO_2 , % 3 B_2O_3 , % 1 Na_2O ve eser miktarda Al_2O_3 ve diğer metal oksitlerini içermektedir. CPG mekanik etkilere ve yüksek basınca karşı çok dayanıklı, termal kararlılığı yüksek, organik çözücülere, asidik ve bazik koşullara karşı dayanıklı, farklı gözenek büyüklüklerinde bulunabilen inorganik bir destek materyalidir [43]. Şekil 3.2'de cam boncukların mikroskop görüntüleri görülmektedir.



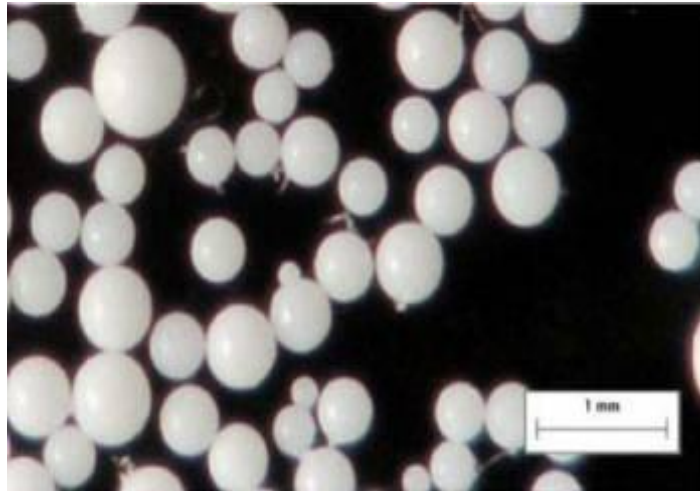
Şekil 3.2 Cam boncuk mikroskop görüntüsü [33].

3.4.4 Amberlit

Organik esaslı sentetik amberlit reçineleri elde edilişleri ve kullanılışları bakımından, iyon değiştirici ve adsorban olarak iki ana grupta toplanırlar. İyon değiştirici özelliğe sahip olanlar arasında amberlit C6-400, IRA-900, IRC-718 gibi reçineler sayılabilir. Adsorban özelliğe sahip reçineler arasında ise amberlit XAD-2,-4,-7,-8,-11,-16 ve XAD-1180 v.b. gibi polimerik reçineler sayılabilir [21].

Şekil 3.3'de görüldüğü gibi, amberlit XAD reçineleri geniş yüzey alanlı, büyük ve homojen dağılımlı gözeneğe sahip, çapraz bağlı kopolimerlerdir. Organik çözücülere, asidik ve bazik ortamlara karşı kararlı olmaları nedeniyle adsorban olarak kullanılan silikajelle karşılaştırılabilir. Ayrıca eluent olarak, organik maddelerin yanı sıra asidik veya bazik çözeltilerin kullanılabilmesi gibi üstünlükleri vardır [21].

Amberlit XAD-1180 beyaz tanecikli bir polimerik adsorbandır. XAD-1180 hidrofobik, non iyonik ve çapraz bağlı bir polimerdir. Geniş yüzey alanı ve aromatik bir yapısı vardır. Amberlit XAD-1180 reçinesi mükemmel fiziksel, kimyasal ve termal kararlılığa sahiptir [8].



Şekil 3.3 Amberlit-XAD reçinelerinin mikroskop görüntüsü [33].

3.4.5 PEG (Poli Etilen Glikol)

PEG (Metoksipoli (etilen glikol)), farklı formları olan, polimerizasyon işlemi için kullanılan en yaygın tek fonksiyonlu bir metil eterdir. PEG endüstride kullanılan kısaltılmış ismidir. PEG, saf oligomerler olarak, monodisperse, düzgün veya ayrıık olarak bulunmaktadır. Son zamanlarda X-ray ile belirlenmiş çok yüksek saflıkta kristal PEG yapıları gözlenmiştir. Fakat arıtmak ve saf oligomerler şeklinde PEG elde etmek zor ve maliyetli bir iştir. PEG'in farklı geometrileri de mevcuttur. Merkezi bir çekirdek

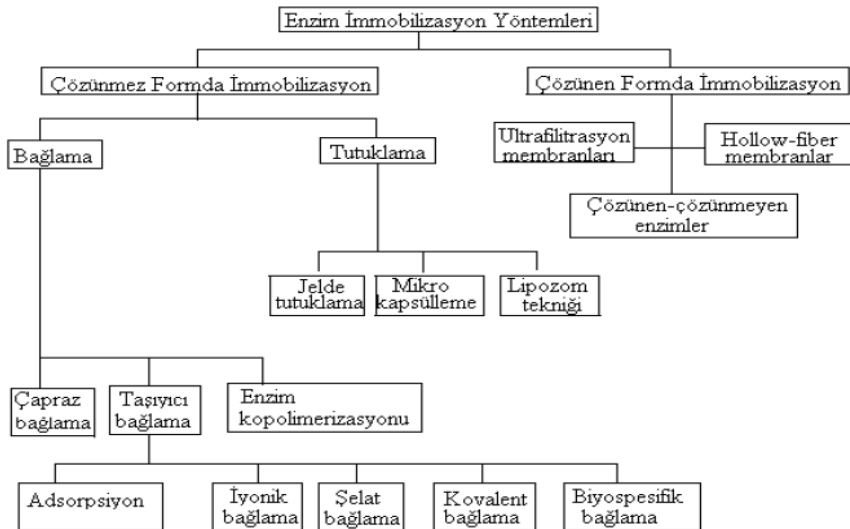
olup 3-10 birimli polimerlerine ‘‘Dallanmış PEG Zincirleri’’ denir. Bir çekirdek etrafında 10-100 birimli polimerlerine ‘‘Yıldız PEG Zincirleri’’ denir. Yine bir normal polimer omurgasına aşılanmış pek çok PEG polimeri içeren ‘‘Tarak PEG Zincirleri’’ vardır. Tüm bu PEG çeşitlerinin erime noktaları içerdikleri monomer sayısına göre artma ya da azalma gösterir.

3.5 İmmobilizasyon Yöntemleri

Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelerle immobilizasyon işlemi sırasında oluşabilecek sorunlara çabuk ve etkili çözümler getirilebilmektedir, ancak her enzim için ayrı ayrı kabul edilen genel bir metot bulunmamaktadır [22].

İmmobilizasyon yöntemi seçilirken kullanılan enzimin kimyasal yapısı ve bileşimi, substrat ve ürünlerin özellikleri, oluşan ürünün kullanılacağı alanlar dikkate alınmalıdır [22].

Ayrıca, immobilizasyon işleminde, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarını ve kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzimde aktivite kaybına neden olmayacak bir yöntem seçilmesi çok önemlidir. Bu nedenle enzimin bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyon vermesinden kaçınılmalıdır. İmmobilizasyon işleminde bağlanma sırasında enzimin aktif bölgesi koruyucu gruplarla korunur. Bağlanma sonrasında koruyucu gruplar, enzimde aktivite kaybına neden olmadan uzaklaştırılır. Bazı durumlarda bu koruyucu etki substrat ya da yarışan tip inhibitör ile sağlanabilir [16] İmmobilizasyon yöntemleri aşağıda Şekil 3.4’deki gibi sınıflandırılmaktadır [1]:



Şekil 3.4 İmmobilizasyon çeşitleri şeması [1].

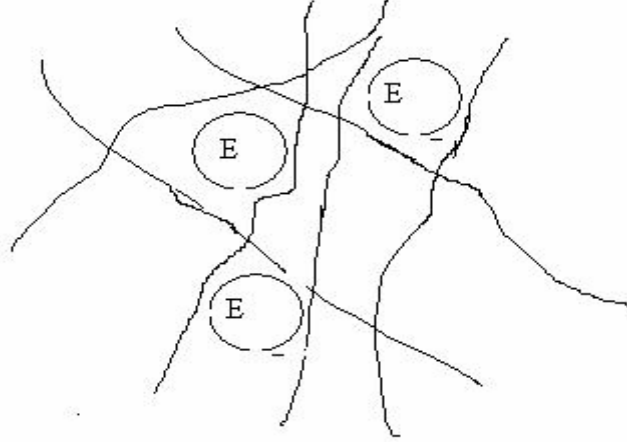
Enzimin immobilize edileceği yüzey hidrojen bağları veya elektron geçiş komplekslerinin oluşması sırasında enzimin yapısını korumaktadır. Bu bağlanmalar enzimdeki titreşimi engellemekte ve bu da sıcaklık kararlılığının artmasını sağlamaktadır. Yüzey ve enzimin yakın çevresi elektrik yüklüdür ve bu da enzimin optimum pH'sının 2 pH birimi kadar artmasına neden olmaktadır. Böylece enzimin etkin bir şekilde çalışabileceği pH aralığı artmakta ve aynı pH'ta çalışmayan enzimlerin bir arada çalışması sağlanmaktadır [16].

3.5.1 Tutuklama

Tutuklanmış biyokatalizörler beş değişik kategoride tanımlanırlar [17].

- Lattice tipi: Biyokatalizörler, polisakkarit, protein ve sentetik polimerlerden hazırlanan jel matrislerde tutuklanırlar.
- Mikro kapsül tipi: Biyokatalizörler yarı geçirgen sentetik polimerlerde tutuklanırlar.
- Lipozom tipi: Biyokatalizörler fosfolipitlerden hazırlanan sıvı membranlarda tutuklanırlar.
- Hoolow-fiber tipi: Biyokatalizörler ortamdan hollow fiberlerle ayrılırlar.
- Membran tipi: Biyokatalizörler harcanan reaksiyon çözeltisinden ultrafiltrasyon membranlarıyla ayrılırlar.

Tutuklama metodunun avantajı sadece tekil enzimlerin değil, değişik tipte enzimlerin, organellerin ve hücrelerin hemen hemen aynı prosedür ile immobilize edilebilmeleridir. Biyokatalizörler çeşitli modifikasyonlara uğramazlar ve immobilizasyon yüksek molekül ağırlığındaki enzim inhibitörlerinin etkisini elimine eder. Dezavantajları ise yüksek molekül ağırlığındaki substratlar enzime zorlukla tutunurlar ve taşıyıcılar yeniden elde edilemez. Ultrafiltrasyon membranıyla tutuklama yapıldığında, aktive olmamış enzim molekülleri bazen membran yüzeyine yapışıp reaksiyon çözeltisine geçişte azalmaya neden olsa da, yöntemin dezavantajları önlenebilir. Lattice tipi yöntem biyokatalizör immobilizasyonunda tutuklama yönteminin en çok kullanılan tipidir [17]. Şekil 3.5'te tutuklama metodunun şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 3.5 Tutuklama yöntemi şematik gösterimi [43].

3.5.2 Taşıyıcı Bağlama Yöntemi

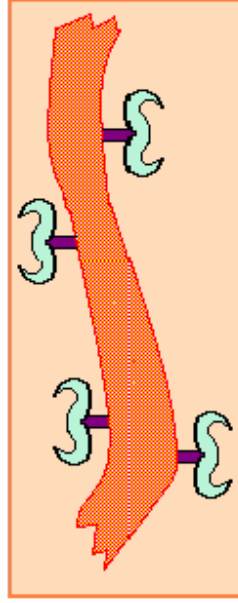
Taşıyıcı bağlama metodu en eski immobilizasyon yöntemidir, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması şeklinde gerçekleşir. Bu yöntemde bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır [16].

Taşıyıcının seçilmesi immobilize enzimin performansı açısından büyük önem taşımaktadır. Taşıyıcı seçiminde en önemli kriter enzimin cinsidir [16].

Bunun dışında taşıyıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken kriterler aşağıdaki gibidir:

- Geniş yüzey alanı
- Tanecik boyutu ve şekli
- Kimyasal bileşimi
- Hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı
- Geçirgenliği
- Hidrofilik karakteri
- Kimyasal, mekanik ve ısı kararlılığı
- Yüksek sertliği
- Mikrobiyal saldırılara karşı dayanıklılığı
- Rejenerasyon kabiliyetidir [18].

Şekil 3.6'da enzimin taşıyıcıya bağlanması görülmektedir:



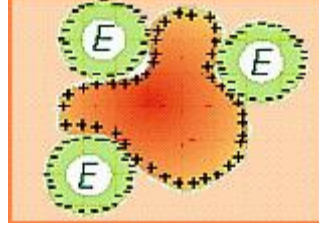
Şekil 3.6 Enzimin taşıyıcıya bağlanması [41].

Genel olarak; hidrofilik gruptaki ve bağlanan enzim konsantrasyonundaki artış immobilize enzimin aktivitesinin yükselmesini sağlamaktadır. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılardan bazıları selüloz, dekstran, agaroz, poliakrilamid jel gibi polisakkarit türevleridir [16].

3.5.3 Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcının yüzeyine fiziksel adsorpsiyonuna dayanmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında tersinir bir yüzey etkileşimi gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, en basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda ucuz bir immobilizasyon metodudur. Bu yöntemde hidrofobik bağlanma gerçekleşebilmekte, ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler de etkili olmaktadır. Bu yöntem ilk olarak β -D-frukto-furanosidaz enziminin alüminyum hidroksit üzerine immobilizasyonunda kullanılmıştır [16,24]. Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon işleminde enzimin aktif merkezinin yapısında ve de enzimde konformasyonel değişiklik çok az olmakta ya da hiç olmamaktadır. İşlem sırasında enzimin aktivitesini kaybetmemesi ve optimum adsorpsiyon koşullarının sağlanabilmesi için uygun çözücü kullanılmalı, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, adsorbant konsantrasyonu, pH ve iyon konsantrasyonları kontrol edilmelidir [16,24].

Enzimin taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi Şekil 3.7’de görülmektedir:



Şekil 3.7 Fiziksel adsorpsiyon gösterimi [41].

Bu immobilizasyon yönteminin en büyük avantajı genellikle bir ayıraç kullanılmaması ve çok az sayıda aktivasyon aşamasına ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Yani, enzim veya taşıyıcıda kimyasal değişim gerçekleşmemektedir. Bu anlamda adsorpsiyon işlemi doğal biyolojik membranlarda oluşan duruma çok benzemektedir ve bu tür sistemlerin modellenmesinde de kullanılmaktadır [16,24].

Avantajlarının yanı sıra adsorpsiyon işleminin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. İşlem sırasında enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri zayıf olduğundan adsorplanmış enzim taşıyıcıdan sızabilir. Bu zayıf bağlar nedeniyle enzimin adsorpsiyonu; sıcaklık, pH, iyonik kuvvetlerdeki değişikliklerle ve ortamda sadece substrat varlığı ile sonuçlanabilir. Ayrıca bu yöntemde ortamda bulunan diğer protein veya maddeler de taşıyıcı üzerine adsorplanabilir. Bu da immobilize enzimin özelliklerinin değişmesine, aktivasyonunun düşmesine sebep olur [16,18].

Fiziksel adsorpsiyon işleminde genellikle adsorbant olarak alümina, aktif karbon, kil, kolojen, cam ve hidroksilapatit kullanılmaktadır [18].

3.5.4 İyonik Bağlanma Yöntemi

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları içeren bir taşıyıcıya iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. Uygulanmasının kolay olması, taşıyıcının yenilenebilir olması ve enzimin modifiye olmaması yöntemin kullanımını arttıran özelliklerdir. İyonik bağlanma metodunda kullanılan taşıyıcılar;

- organik (selüloz, dekstran)

- inorganik (silika) destek maddeler
- iyon değiştirici kalıntılarında türeyen iyon değiştiricilerdir.

Genellikle taşıyıcı olarak iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Taşıyıcılar, iyon değiştirici kalıntılara bağlı olarak anyonik veya katyonik değiştirici olarak isimlendirilirler.

Fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi iyonik bağlanmada da immobilizasyon işlemi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyonda olduğundan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmada olduğundan daha zayıftır. Bu nedenle de enzimin taşıyıcıdan sızma olasılığı vardır. Bu durum genelde iyonik kuvvetin yüksek olduğu substrat çözeltilerine ya da pH değişimlerine neden olmaktadır. İyonik bağlanmada operasyon koşulları kovalent bağlanmadakine göre daha hafiftir, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezindeki değişiklik azdır. Bu nedenle genellikle immobilize edilen enzimin aktivitesi yüksek olmaktadır [16,17,18].

3.5.5 Kovalent Bağlanma Yöntemi

Bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzimin nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH₂), karboksil grubu (CO₂H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur.

Taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grubun tanıtılması gerekmektedir. Bunun için fonksiyonel monomerlerle kopolimerizasyon ya da polimer-tipi reaksiyon kullanılır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin başlıcaları aşağıdadır:

- epoksidasyon metodu
- karbodiimit metodu
- silanizasyon metodu
- glutaraldehit (apraz bağlama)
- siyanojen bromit
- tresil klorit metodu

Kovalent bağlanma yönteminde kullanılabilir çok sayıda taşıyıcı vardır, hangi taşıyıcının kullanılacağı taşıyıcının avantaj ve dezavantajları dikkate alınarak seçilmektedir. Araştırmalar taşıyıcının hidrofilik özelliğinin önemli olduğunu göstermektedir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar şunlardır [44]:

- Hidrofilik özelliği yüksek olan polisakkaritler
- selüloz
- dekstran
- nişasta
- agaroz
- gözenekli silika
- cam

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon; açılma, alkilleme-arılma. Diazolama, karbamilasyon, CN-Br yardımı ile bağlama, imidoesterler, polimerik aldehidler, SH-disülfid değişimi reaksiyonları olmak üzere 8 ana gruba ayrılmaktadır. Uygun metodu seçerken aşağıdaki üç ana unsur dikkate alınmalıdır:

- 1) Bağlanma reaksiyonu enzim aktivitesinin düşmesine neden olmayacak koşullarda gerçekleşmelidir.
- 2) Enzimin aktif merkezi kullanılan ayırıcılardan etkilenmemelidir.
- 3) Ticari olarak elde edilebilir taşıyıcı kullanılmalıdır [16,18].

Kovalent bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerindeki gibi daha kuvvetlidir. Bu nedenle substrat veya yüksek iyonik kuvvete sahip çözeltiler varlığında bile enzim ile taşıyıcı arasında sızıntı olmamaktadır. Ayrıca enzim taşıyıcının üzerine tutturulmuş olduğundan, immobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir [16].

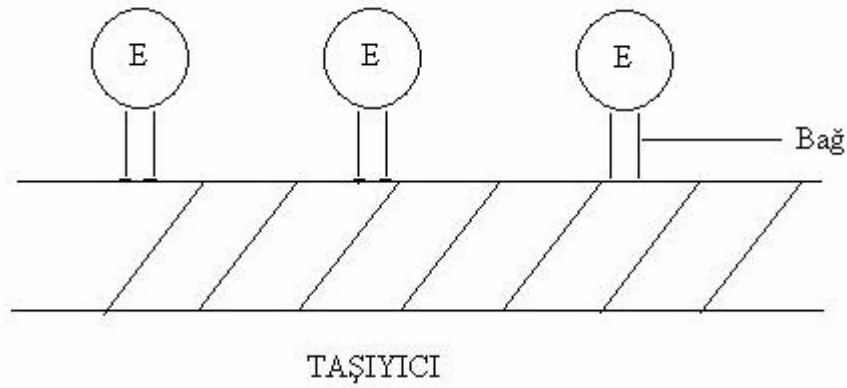
Kovalent bağlanmada immobilizasyon koşulları diğer immobilizasyon yöntemlerindeki gibi daha karmaşıktır. Bu nedenle de kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi ve konformasyonel yapısı değişiklik göstermekte ve buna bağlı olarak enzimin aktivitesi düşmektedir. Aktivite düşmesini engellemek için enzimin katalitik aktivite gösteren grupları dışındaki fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması

gerekmektedir. Aktif bölgenin aminoasit kalıntılarıyla inaktivasyon reaksiyonlarının engellenmesi sonucunda yüksek aktiviteler elde edilmektedir [16,18].

Enzimin katalitik fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması sonucu aktivite düşmesini engellemek için;

1. İmmobilizasyon işlemi yarışan tip inhibitör veya substrat varlığında gerçekleştirilebilir.
2. Tersinir, kovalent olarak bağlanmış enzim-inhibitör kompleksi kullanılabilir.
3. Taşıyıcıya kovalent bağlanması, yeni birleşmiş kalıntılarla sağlanan bir kimyasal olarak modifiye edilmiş çözünebilir bir enzim kullanılabilir [16,17,18].

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmesi Şekil 3.8’de görülmektedir:



Şekil 3.8 Kovalent Bağlanma [43].

Kovalent bağlanma aşağıdaki yöntemlerle meydana gelmektedir:

- **Diazotizasyon:** Taşıyıcı-N=N-Enzim
- **Amid Bağı Oluşumu:** Taşıyıcı-CO-NH-Enzim
- **Alkilasyon ve Arilasyon:** Taşıyıcı-CH₂-NH-Enzim, Taşıyıcı-CH₂-S-Enzim
- **Schiff'in Baz Oluşumu:** Taşıyıcı-CH=N-Enzim
- **Amidasyon Reaksiyonu:** Taşıyıcı-CNH-NH-Enzim
- **Tiyol-Disülfid Yer değiştirme:** Taşıyıcı-S-S-Enzim
- **Ugi Reaksiyonu**
- **Civa-Enzim Yer değiştirme**

Kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi engellenmiş olmamalıdır. Bazı durumlarda immobilize enzimin verimini arttırmak için enzimin reaktif kalıntılarının miktarını arttırmak mümkündür. Böylece enzimatik aktivite için gerekli olan alternatif reaksiyon bölgeleri sağlanmaktadır.

Kovalent bağlanma, çapraz bağlanma ile birlikte uygulandığında kararlı, çevredeki çözeltiliye sızıntı yapmayan immobilize enzim türevleri elde edilmektedir. Bağlanma reaksiyonlarının ve kovalent bağ yapabilen taşıyıcıların çeşitliliği bu yöntemin genellikle kullanılan bir immobilizasyon yöntemi olmasını sağlamaktadır [16].

Kovalent bağla immobilize edilen enzimler şu avantajlara sahiptir:

1. Oluşan sıkı bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı ya da parçalanmayla karşılaşmaz.
2. Immobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir çünkü enzim desteğin yüzeyinde tutturulmuştur.
3. Enzim molekülleriyle destek madde arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle çoğunlukla ısı-kararlılığında bir yükseliş görülebilir.

Diğer yandan kovalent bağın dezavantajları da vardır, bunlar ise:

1. Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlarla bozulabilir.
2. Enzim molekülleriyle destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketini engelleyebilir ve bu da enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açar.
3. Immobilizasyonun optimum koşullarını bulmak zordur.
4. Destekler genellikle yenilenebilir değildir. Bu nedenle bu metot daha çok kararlılığın kovalent bağlanma yöntemiyle arttığından emin olunan enzimler için uygundur.

Tüm bu dezavantajlarına rağmen, kovalent bağlanma analitik amaçlı immobilizasyonlarda kullanılır.

Yukarıda bahsedilen tüm immobilizasyon yöntemlerini bir arada değerlendirmek gerekirse, adsorpsiyon kolay, ucuz ve efektiftir ancak çoğunlukla kararlı değildir ve geriye dönüşüm gözlenir. Tutuklama ve mikrokapsülleme yönteminde ise difüzyon problemleri gözlenir. Enzimin kovalent bağlanma ile bir taşıyıcıya bağlanması

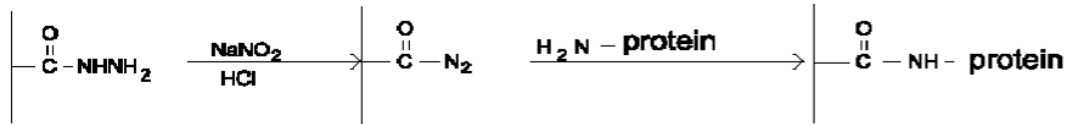
endüstriyel açıdan en cazip yöntem olarak öne çıkmaktadır. Çünkü kovalent bağlanma özellikle çapraz bağlanma ile birlikte uygulandığında efektif ve kararludur.

Çapraz bağlama ajanı olarak da en iyi sonuçlar glutaraldehit ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Kovalent bağlanmanın uygulanacağı taşıyıcıya ait de günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Organik ya da inorganik, doğal ya da sentetik pek çok madde denenmiş ve kitin ve kitosan içlerinde en ön plana geçen iki malzeme olmuştur [17,25,26,27].

Aşağıda, kovalent bağlama immobilizasyon türüne bazı örnekler vardır.

- **Açilleme Reaksiyonları:**

Asit anhidridi ve azidleri proteinin serbest amino grupları ile reaksiyon verir. Ancak alifatik ve aromatik hidroksil grupları –SH grupları ile yan reaksiyonlar da mümkündür [1]. Şekil 3.9’da bu reaksiyonlara örnekler mevcuttur.



Şekil 3.9 Proteinlerin polimerik asit anhidrid ve azidlerine bağlanması [49,50].

- **Alkilleme-Arilleme Reaksiyonları:**

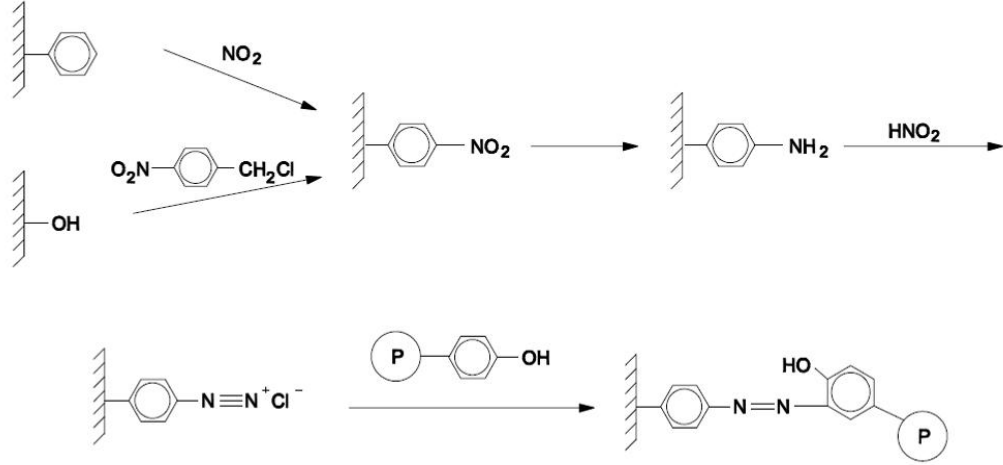
Özellikle halojen substitüe aromatik halkalar enzim molekülünü serbest amin grubu üzerinden bağlarlar. Bazen halkanın nitrolanması reaktiviteyi arttırmaktadır [1]. Şekil 3.10’da protein molekülünün halkaya bağlanmasına örnek verilmiştir.



Şekil 3.10 3-Floro-4,6-dinitrofenil fonksiyonel grubu taşıyan polimerlere enzim bağlanması

- **Diazolama Reaksiyonları:**

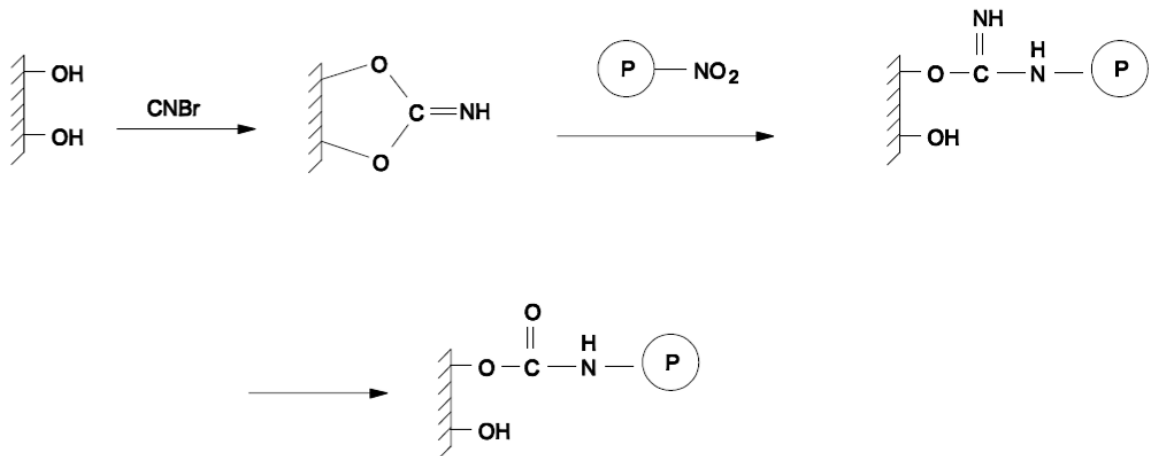
Aromatik primer amin grubu taşıyan polimerik taşıyıcılar diazonyum tuzu oluşturarak protein moleküllerini fenol, imidazol veya serbest amin grupları üzerinden bağlayabilirler [1]. Şekil 3.11’de polimere proteinlerin bağlanması gösterilmiştir.



Şekil 3.11 Diazolanmış polimerlere proteinlerin bağlanması [51,52,53].

- **CN-Br Yardımı ile Bağlama:**

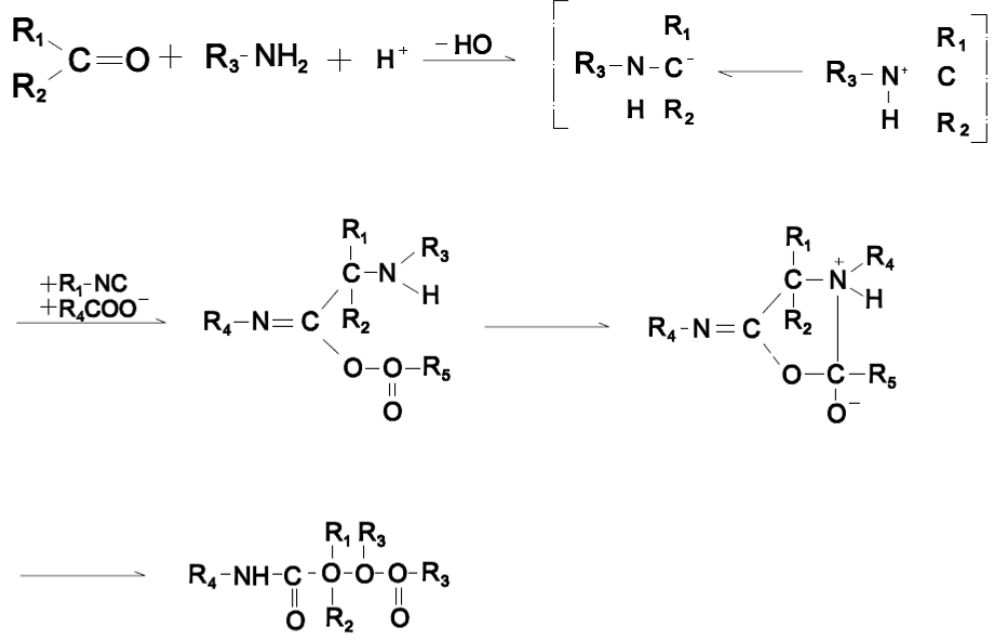
Şekil 3.12’de görüldüğü gibi; siyanojen bromür ile aktive edilmiş poli-hidroksi polimerleri gerek enzim immobilizasyonu gerekse afinite reçinelerinin hazırlanması bakımından son derece önemlidir. Özellikle selüloz, çapraz bağlı dekstran ve agaroz gibi suda çözünmeyen polisakkaritler CN-Br ile kolayca aktive edilebilmektedir [1].



Şekil 3.12 Siyanojen bromür ile aktive edilmiş polisakkaritlere enzim bağlanması [53].

- **Ugi Reaksiyonu:**

Kısaca ‘‘dört komponent kondenzasyonu’’ olarak bilinir. Ugi reaksiyonu, karboksil, primer amin, aldehid ve izonitril fonksiyonel grupları arasında gerçekleşir. Bu reaksiyon yardımıyla enzim immobilizasyonunda taşıyıcı seçimi için çok değişik seçenekler vardır, taşıyıcı dört fonksiyonel gruptan herhangi birini taşıyabilir [1]. Şekil 3.13’te Ugi reaksiyonu ile enzim immobilizasyonu görülmektedir.

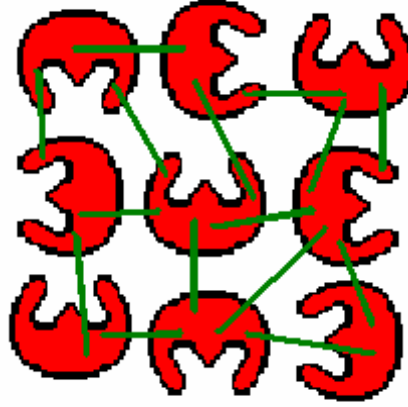


Şekil 3.13 Ugi reaksiyonu ile enzim immobilizasyonu

3.5.6 Çapraz Bağlama Yöntemi

Enzimlerin çapraz bağlama ile immobilizasyonu, diğer protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla sağlanmaktadır. Bir enzimin kendisi üzerine çapraz bağlanması pahalı ve de yetersiz bir yöntemdir, çünkü bu durumda proteinin bir kısmı taşıyıcı gibi davranmakta ve bu da enzimatik aktivitenin düşmesiyle sonuçlanmaktadır. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon metotlarından biriyle kullanılması daha iyidir. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu gerçekleştirilirken çapraz bağlama da uygulandığında desorpsiyon çok az olmaktadır. Adsorblanmış enzimleri stabilize etmek ve poliakrilamit jellerden sızıntıyı önlemek çapraz bağlamanın sıklıkla kullanıldığı alanlardır [16].

Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlanması Şekil 3.14’te görülmektedir:



Şekil 3.14 Çapraz bağlanma [44].

Çapraz bağlamanın sağlanması için en çok kullanılan maddeler:

- glutaraldehit
- toluen
- diizosiyanat'tır.

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminin en büyük avantajı basit ve hızlı prosedürlerde immobilize enzimlerin sadece ajanın varlığında hazırlanabilmeleridir. [14,17]. Ayrıca bu yöntemin 2 önemli dezavantajı da aşağıda belirtilmiştir.

1. Çapraz bağlama reaksiyonları daha sert koşullarda gerçekleşmektedir ve kolaylıkla kontrol edilememektedirler. Koşullar enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açabilir ve bu da önemli miktarda aktivite kaybı ile sonuçlanabilir.
2. Immobilizasyon için çapraz bağlama uygulanarak hazırlanan taşıyıcının jelatinimsi yapısı bir çok uygulamaya sınırlama getirmektedir.

İyi bir immobilizasyon gerçekleştirebilmek için gerekli optimum koşullar aşağıdaki özelliklere bağlıdır.

- Enzim konsantrasyonu ve yapısı
- Çapraz bağlama için kullanılan ajanın konsantrasyonu ve yapısı
- pH
- İyonik kuvvet

- Sıcaklık
- Reaksiyon süresi'dir [16,18,24].

Proteinlerin kaçınılmaz olarak ana destek maddesi olarak davranmasından dolayı, enzimler kendi kendilerine çapraz bağlanabilirler, çapraz bağlanmış enzimler daha sonra çözünmeyen makro moleküller haline gelirler. Bu da verimin göreceli olarak düşmesine dolayısıyla maliyetin artmasına neden olur. Bu dezavantajından dolayı çapraz bağlamanın başka bir yöntemle beraber kullanılması en iyi seçimdir.

Taşıyıcıyı aktive etmekte en çok kullanılan yöntem amid ya da birincil amin içeren taşıyıcının glutaraldehit ile muamelesidir. Glutaraldehit direkt olarak taşıyıcıya ilave edilerek, aldehit son grubuyla reaksiyon elde edilir. Aldehit grubun birincil amin ile pH 3–10'da 4–12 saat ve 4–25 °C'de gerçekleşen bu reaksiyonu schiff bazı formasyonu ile devam eder. Schiff bazı formasyonu aşağıdaki gibidir.

- **Schiff Bazı Reaksiyonu:**

Bu metot schiff bazı formasyonu yani aktive edilmiş taşıyıcının karbonil grubuyla enzimin serbest amino grubu arasında gerçekleşen aldimin bağla sağlanır. (Şekil 3.15) Birincil amino grubu içeren taşıyıcı glutaraldehit ile aktive edilir ve bu sayede aktif karbonil türevi elde edilir. Bunun ardından aldehit türevi proteinin serbest amino grubu ile reaksiyona girerek schiff bazı bağı meydana gelir. Bu metodun bir dezavantajı sulu ortamda geri dönüşümlü olmasıdır (özellikle düşük pH'larda). Bu ise imin bağlarının NaBH₄ ile hidrojenasyonu sonucu stabil alkil amino grubu eldesiyle önlenabilir [17].



Şekil 3.15 Schiff bazı reaksiyonu gösterimi [43].

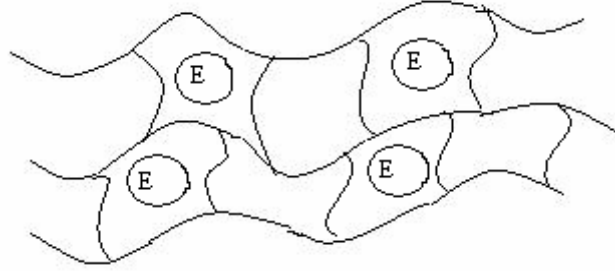
3.5.7 Jel Tutuklama Yöntemi

Jel tutuklama metodunda tutuklama; monomer (akrilamid), oligomerik ve polimerik (kolojen, jelatin, kalsiyum aljinat) maddelerden elde edilen, suda çözünmeyen polimer

jellerde gerçekleşir. Tutuklama sırasında sıcaklık, iyonik kuvvet, pH değışir ve çapraz bağlanma reaksiyonu oluşur. Endüstriyel uygulamalar; monomerlerin zehirliliği ve reaktör operasyonu sırasındaki yüksek basınç düşüşü nedenleri yüzünden sınırlanmaktadır [16].

3.5.8 Fiber Tutuklama Yöntemi

Fiber tutuklama metodu, enzimin selüloz, triasetat gibi fiber formundaki bir polimere tutuklaması sonucunda gerçekleşir (Şekil 3.16). Fiberlerin zayıf asit, alkali ve bazı organik çözücülere karşı dirençli olması ve yüksek iyonik kuvvete sahip olması bu yönteme çeşitli avantajlar sağlamaktadır, ancak düşük molekül ağırlıklı substratlarla kullanımı sınırlanmaktadır. Ayrıca polimer çözücüsü olarak suda çözünmeyen sıvıların kullanılması enzimin inaktive olmasına neden olabilmektedir [16].



Şekil 3.16 Polimer matrikslerine tutuklama gösterimi şeması [43].

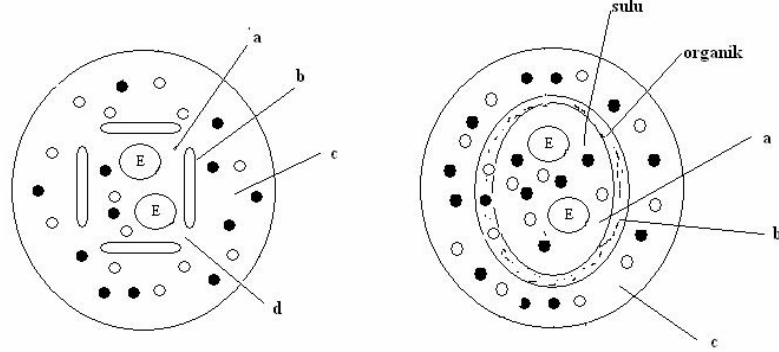
3.5.9 Mikrokapsülleme Yöntemi

Mikrokapsül tipi tutuklamada enzim yarı geçirgen polimer membran içerisinde tutuklanır. Bu metodun avantajları substratla enzime geniş yüzey alanı sağlaması ve sadece tekil enzimler değil, değişik tipte enzimlerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Metodun yüksek molekül ağırlıklı substratlara uygulanamaması, bazı durumlarda enzimin inaktive olması, membran duvarına yapışması ve mikrokapsüllerden damlaması yöntemin dezavantajları arasında sayılmaktadır [16]. Şekil 3.17’de enzimin bir kapsül içerisinde tutuklanması görülmektedir.

3.5.10 Kompleks Bağlama

Protein moleküllerinin metal iyonlarıyla kovalent olmayan bağlarla bağlanması yöntemine kompleks bağlanma denir. DNA moleküllerinin metal kompleksleriyle

etkileşimleri son yıllarda çok ilgi çekmektedir. Bağlanma yolları metal komplekslerinin boyutlarına ve stereokimyasal özelliklerine bağlıdır [28].



Şekil 3.17 Sürekli ve süreksiz mikrokapsülleme gösterim şeması [43].

3.5.11 Biyospesifik Bağlama

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanılarak enzim immobilize edilmesi işlemine denir. Lektinler spesifik karbonhidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar. Örneğin; invertaz sakkarozun kesiksiz inversiyonunda kullanılır [1].

3.5.12 Şelat Bağlama

Bazı transizyon metallerinin şelat yapma özelliğinden yararlanılarak enzimleri organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması metoduna denir. Yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmış olup daha sonra da kullanılmaya devam edilmiştir [1].

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METODLAR

4.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Materyaller

4.1.1 *Hypocrea jecorina* Kaynağı

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* QM 9414, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden temin edildi.

4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

KİMYASAL :	FİRMA/NO:
Kazein pepton	Sigma-P6588
Et ekstraktı	Merck-103979
Maya ekstraktı	Merck-103753
Glukoz	Merck-108342
Tween 20	Fluka-93780
K ₂ HPO ₄	Riedel-04248
Na- Asetat	Merck-106268
PDA (Patates Dekstroz Agar)	Sigma- P2182

KİMYASAL:	FİRMA/NO:
Metanol>>>	Riedel- 24229
Glutaraldehit (%25)	Sigma- G6257
Amberlite XAD16	Sigma- 115K0062
PEG 6000	Merck- D85662
Amonyum sitrat	Sigma-A1332
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-M1880
MnSO ₄ .H ₂ O	Sigma-M7634
KH ₂ PO ₄	Merck-104871
Coomassie Blue G-250	Sigma-B0770
Etanol	Merck-100983
o-Fosforik asit	Riedel-4107
2-Hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit	Fluka-42260
NaOH	Riedel-06203
Amilopektin	Sigma-10120
Tris	Fluka-93950
(NH ₄) ₂ SO ₄	Fluka-09978
Cam Boncuk (212-300 µm)	Sigma-G9143
Kitosan (düşük molekül ağırlıklı)	Fluka-50494
BaCl ₂	Aldrich- 21756527815
BSA (Sığır Serum Albümin)	Fluka- 27815
Diyaliz Kesesi	Aldrich- D-9777-100FT

4.1.3 Kullanılan Cihazlar

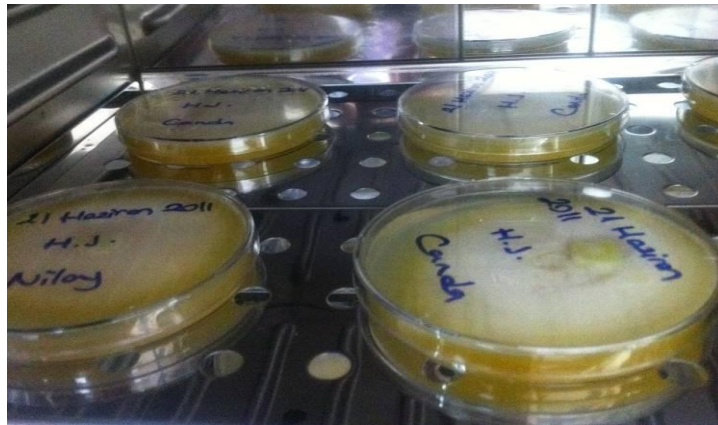
- Sterilizasyon işlemi için: Certoklav LV18 marka masaüstü otoklav
- Enzim indüksiyonunu sağlamak için: Sartorius marka Certomat IS UHK çalkalamalı inkübatör
- Destile su eldesi için: GFL marka 2001/4 destile su cihazı
- Kullanılan tampon ve çözeltilerin pH kontrolü için: Sartorius marka pH metre
- Santrifüj için: SIGMA marka 3K 30 santrifüj
- Enzim aktivite ve protein tayini için: Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrometre
- Karıştırma işlemleri için: Chiltern Hotplate HS31 manyetik karıştırıcı
- Kullanılan tampon, çözelti ve kültürlerin saklanması için: Bosch marka buzdolabı kullanılmıştır.

4.2 Kullanılan Metodlar

4.2.1 Kültür Ortamı

4.2.1.1 Saf Kültür Ortamı

H. jecorina QM9414 %3,7 patates dekstroz-agar (PDA) içeren katı besiyeri üzerinde üretildi. İnkübasyon süresi 30°C sıcaklıkta 5-7 gündür. Bu şekilde hazırlanan suş +4°C'de 3 ay muhafaza edildi. Bu yol ile çoğaltılan mikroorganizma, spor çözeltisi hazırlamak ve enzim üretim ortamına aşlamak amacıyla kullanıldı. Şekil 4.1'de *H. jecorina*'nın saf kültür ortamının fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.1 *Hypocrea jecorina* saf kültür ortamı

4.2.1.2 Spor Çözeltinin Hazırlanması

Katı besiyerinde üretilen kültürün üzerine 5 ml steril destile su eklendi ve steril cam drigalski yardımıyla petrinin yüzeyindeki bütün sporlar dikkatli bir şekilde çözeltiliye alındı. Bu şekilde mililitrede 5×10^8 spor içeren süspansiyon hazırlandı.

4.2.2 Enzim Üretim Ortamı

4.2.2.1 Sıvı Besiyerinin Bileşimi

Katı besiyerinde büyüyen *H. jecorina* QM9414 suşlarının misel oluşturması için aşılandığı sıvı besiyerinin bileşimi: 10 g kazein pepton, 10 g et ekstraktı, 5 g maya ekstraktı, 20 g glukoz, 1 g Tween 80, 2 g K_2HPO_4 , 5 g sodyum asetat, 2 g amonyum sitrat, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 0,05 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 800 ml bidestile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 1 N NaOH ile 6,5'e ayarlandıktan sonra destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 500 ml'lik geniş boyunlu erlenlere 100'er ml olacak şekilde sıvı besiyeri aktarıldı. Erlenlerin ağzları gazlı bez ile kapatılarak 20 dk. 121°C'de otoklavda steril edildi. Steril sıvı besiyerleri daha önce hazırlanan spor çözeltisi ile aşılandı. Erlenler, 30°C sıcaklıkta, 160 rpm çalkalama hızında 48 saat boyunca inkübe edildi [29].

4.2.2.2 Pullulanaz İndüksiyonu İçin Kullanılan Besiyerinin Bileşimi

Sıvı besiyerinde 48 saat inkübasyon sonunda oluşan *H. jecorina* QM9414 miselleri, steril süzgeç kağıdından (Whatman no:1) vakum altında süzüldü. Miseller iki kez steril destile su ile yıkandıktan sonra steril spatül yardımıyla enzim indüksiyon ortamına alındı. Enzim indüksiyon ortamının bileşimi (g/L): 10 g kazein pepton, 10 g et ekstraktı, 5 g maya ekstraktı, 1 g Tween 80, 2 g K_2HPO_4 , 5 g sodyum asetat, 2 g amonyum sitrat, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 0,05 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, pH 6,5'tir [29,30]. Enzimin indüksiyonu laboratuvarımızda daha önce yapılan optimizasyon çalışmalarına göre gerçekleştirildi. Yapılan önceki optimizasyon çalışmalarında *H. jecorina* pullulanazı için en iyi substrat kaynağı ve konsantrasyonu % 0,1 (m/v) amilopektin olarak bulunmuştu. Buna göre pullulanaz indüksiyonu için besiyeri, karbon kaynağı olarak glukoz yerine ağırlıkça % 0,1 konsantrasyonda amilopektin ile desteklendi. Daha önceki çalışmalarda bulunan optimum koşullara göre 30 °C'de, 160 rpm'de 24 saat inkübe edildi [29].

4.2.3 Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması

4.2.3.1 *H. jecorina*'dan Ekstrasellüler Pullulanazın Elde Edilmesi

H. jecorina'dan ekstrasellüler pullulanaz üretiminde 24 saat boyunca enzim induksiyon ortamında inkübe edilen *H. jecorina* miselleri vakum altında süzülerek ayrıldı. Elde edilen kültür sıvısında enzim aktivite ve protein miktar tayinleri yapıldı. Kültür sıvısında bulunan enzimi çöktürmek için amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı [29]. Şekil 4.2'de inkübatörde ekstrasellüler pullulanazın üretimi gösterilmiştir.



Şekil 4.2 *Hypocrea jecorina*'dan ekstrasellüler pullulanaz üretimi

4.2.3.2 Kültür Sıvısında Pullulanazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

H. jecorina pullulanazını çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonu % 60 olarak bulundu. Enzimi çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 60 olduğu saptandıktan sonra kültür sıvısına ortamdaki konsantrasyonu %60 olacak şekilde toz amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Soğuk dolapta manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan sonra ağzı kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün, 0°C'de 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Çökelti pH'sı 6,5 olan 0.1 M sodyum asetat tamponunda çözüldü ve hacmi ölçüldü. Bu çözeltide pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı [29].

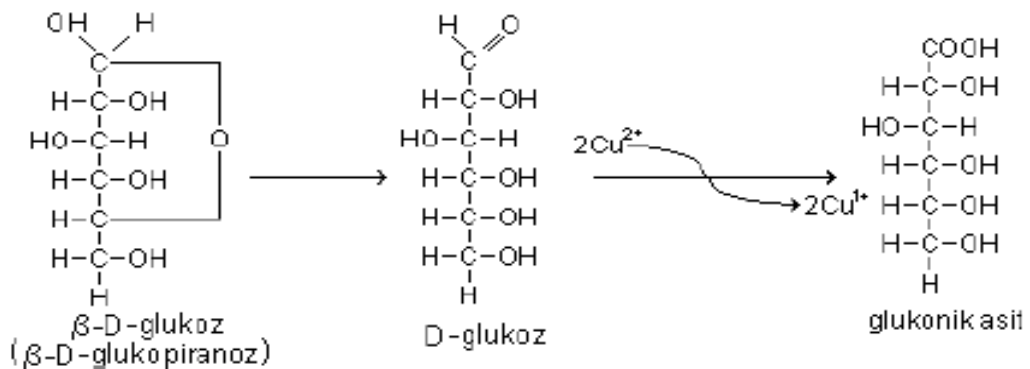
4.2.3.3 Diyaliz

% 60 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülen ve daha sonra tamponda çözünen protein çözeltisi, amonyum sülfatı uzaklaştırmak ve iyon dengesini sağlamak amacıyla diyaliz kesesine (genişliği 25 mm, çapı 16 mm) konuldu. +4°C’de 0,1 M sodyum asetat tamponuna (pH 6,5) karşı diyalizlendi. Diyaliz tamponu sık sık değiştirilerek çözeltide sülfat iyonu kalmayıncaya kadar diyaliz işlemine devam edildi. Tamponun son kez değiştirilmesine karar verebilmek için, diyaliz tamponundan bir miktar alınıp üzerine % 2’lik BaCl₂ çözeltisinden 1-2 damla damlatıldı ve bulanıklık görülmemesi sonucu diyaliz sonlandırıldı. Diyaliz işlemi tamamlanmış olan çözelti, diyaliz kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla 0°C’de 10000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak çözelti alındı ve % 60 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırıldı. Pullulanaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldıktan sonra uygun hacimlere bölünerek -20°C’de saklandı. İmmobilizasyon çalışmalarında % 60 amonyum sülfat kesiti, enzim kaynağı olarak kullanıldı [29].

4.2.4 Pullulanaz Aktivitesinin Tayini

Pullulanaz aktivitesi DNS indirgen şeker tayini ile gerçekleştirildi. Örnekleredeki pullulanaz enziminin katalitik etkisi ile substrat çözeltisi parçalanarak ortaya çıkan glukoz miktarı 540 nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

şekeri indirgeyerek ortaya çıkan rengin spektrofotometrik olarak okunmasını sağlayan birçok yöntem vardır. 3,5-dinitrosalisilik asit belirteci ilk defa Sumner tarafından idrardaki şekeri tayin etmek amacıyla kullanılmıştır. DNS yönteminde 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit, 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenirken; glukoz birimleri glukonik asite yükseltgenir [30].



şekil 4.3 Glukozun yükseltgenmesi [31]

4.2.4.1 Çözeltiler

A. 0,1 M, pH 6,5 Asetat Tamponu: 50 µl asetik asit ve 4,032 gr Na-asetat çözeltileri karıştırıldı. Destile su ile 500 ml'ye tamamlandı. 1 N NaOH ile pH 6,5'a ayarlandı.

B. DNS Çözeltisi: 10 g 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit, 10 g NaOH, 2 g fenol ve 200 g Na-K tartarat karıştırıldı. Hacmi destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

C. % 1'lik Substrat Çözeltisi: Substrat çözeltisi olarak kullanılacak amilopektinden 1 g alınarak ayarlanılmak istenen pH değerindeki 0,1 M asetat tamponunda çözüldü ve balon jojede 100 ml'ye tamamlandı.

Enzimin aktivite tayininde 0,25 ml enzim örneği üzerine, 0,25 ml substrat çözeltisi eklendi. Kör deneme için 0,5 ml 0,1 M pH 5 asetat tamponu kullanıldı. Her iki numune 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Numuneler 5 dakika buz banyosunda soğutulmuş olarak reaksiyon sonlandırıldı. Ardından hem örneğe hem de kör tüplere 0,75 ml DNS belirteci ilave edildi ve 5 dakika kaynayan suda tutuldu. Tüplerin herbirine 3,75 ml destile su eklenerek absorbans değerleri 540 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Bulunan değerlerden, standart glukoz eğrisi yardımıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkan glukoz miktarı µmol/dakika olarak belirlendi ve enzim aktivitesi hesaplandı.

4.2.4.2 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite pullulanaz aktivitesi (U); standart koşullar altında bir dakikada pullulandan 1 µmol glukoz oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı ve enzim aktivitesi total ünite olarak U/ml cinsinden ifade edildi.

Şekil 4.4'teki standart glukoz grafiği kullanılarak bulunan glukoz konsantrasyonları (2.1) denkleminde yerine yazılarak total ünite (U/ml) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/ml)} = \left[\frac{\text{mg indirgen şeker} / \text{ml} \times 1000}{t \times M_G} \right] \quad (2.1)$$

- mg ind. şeker / ml : örneğin absorbansına karşılık gelen indirgen şeker miktarı
- t : inkübasyon zamanı (30 dakika)
- M_G: serbest bırakılan indirgen şekerin (glukoz) molekül ağırlığı (180 /mo

4.2.4.3 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

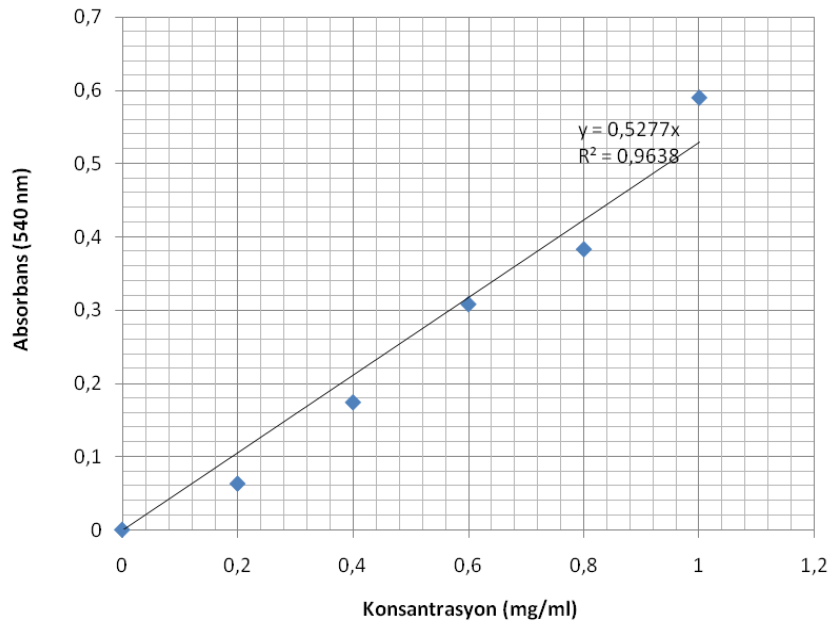
Total ünite değerleri ml'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

4.2.4.4 Glukoz Standart Eğrisinin Çizilmesi

Glukoz standart eğrisi için 1 mg/ml konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi hazırlanarak, bu çözeltiden 0,2-1 mg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik glukoz çözeltileri hazırlandı. Elde edilen farklı konsantrasyonlardaki glukoz çözeltilerine enzim aktivite deneyi uygulandı. 0,25 ml glukoz çözeltisinin üzerine 0,25 ml substrat çözeltisi eklendi. Kör olarak 0,5 ml asetat tamponu kullanıldı. Deney her konsantrasyon için beş kez tekrarlandı ve beş ölçümün ortalaması alındı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplandı ve standart eğri grafiği çizildi. Çizelge 4.2’de farklı konsantrasyon değerlerine karşılık olarak 540 nm’de okunan absorbans değerlerinin ortalamaları verilmiştir.

Çizelge 4.2 Glukoz standart eğrisi için absorbans değerleri

X (mg/ml)	Y (nm)
0	0
0,2	0,0626
0,4	0,1742
0,6	0,3076
0,8	0,3826
1	0,5900



Şekil 4.4 Glukoz Standart Eğrisi

4.2.5 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktar tayini sığır serum albümin (BSA) kullanılarak Bradford (1976) Yöntemi'ne göre yapıldı.

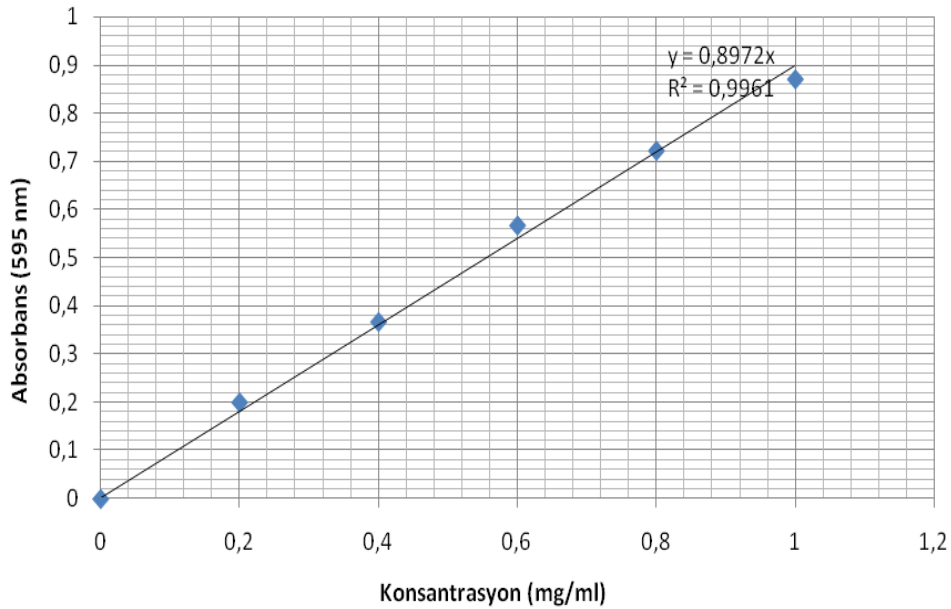
- **Bradford yöntemi için renk reaktifinin hazırlanması:**

100 mg Coomassie Blue G-250, 50 ml % 96 (v/v) etanolde çözüldükten sonra 100 ml % 85 (v/v) o-fosforik asit eklendi. Son hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 numaralı Whatman kağıdından süzöldükten sonra renk reaktifi koyu renkli cam bir şişede saklandı.

BSA eğrisi çizilerek standart protein grafiği elde etmek için; 1 ml renk reaktifi (bradford yöntemi ile hazırlanmış çözelti) üzerine 10 µl protein örneğinden eklenip, homojen karışımları sağlandı. Örnek 1 ml renk reaktifine karşı spektrofotometrik olarak 595nm'de ölçöldü. Elde edilen absorbans değerlerinin BSA ile çizilen standart grafiğe (Şekil 4.5) uygulanmasıyla protein miktarı mg/ml olarak belirlendi.

4.2.5.1 Protein Miktarının Hesaplanması

Şekil 4.5'deki BSA standart eğri grafiği kullanılarak mL' deki protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.5 Protein Standart Eğrisi

4.2.5.2 Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi

mg/ml konsantrasyon olacak şekilde BSA stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,2-1 mg/ml konsantrasyon aralığında seyreltilmiş protein standart çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Bradford deneyi uygulandı. Deney her konsantrasyon için beş kez tekrarlandı, ölçümün ortalaması alındı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplandı ve grafik çizildi. Çizelge 4.3'de farklı konsantrasyon değerlerine karşılık olarak 595 nm'de okunan absorbans değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3 Protein standart eğrisi için absorbans değerleri

X (mg/ml)	Y (nm)
0	0
0,2	0,2
0,4	0,367
0,6	0,567
0,8	0,723
1	0,870

4.2.6 Kısmi Saflaştırılmış Pullulanaz Enziminin İmmobilizasyonu

H. jecorina'dan kısmi saflaştırılan (% 60 oranında) pullulanaz enzimi cam boncuk, amberlit, kitosan boncuk, PEG 6000-kitosan olmak üzere farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edildi. Bu taşıyıcılardan pullulanazın aktivitesinin korunmasına en uygun olanı seçildi. Tüm immobilizasyon yöntemleri arasından enzim preparatı için en uygun olan yöntem belirlendikten sonra ilgili yöntemin bazı kinetik özellikleri incelendi.

4.2.6.1 Pullulanazın Adsorbsiyon Metodu ile İmmobilizasyonu

Serbest pullulanaz; cam boncuk, amberlit, alümina ve PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar ve kitosan boncuklara adsorbe edildi.

Cam Boncuk Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu

5 gram 212-300 µm çapında cam boncuklar, safsızlıklarından arındırılma amacıyla 4 M HCl ile 10 dakika boyunca karıştırıcı üzerinde muamele edildi. Daha sonra asitten alınan cam boncuklar yaklaşık 2 litre destile su ile yıkandı. Yıkanmış boncuklar 120 °C sıcaklıktaki etüvde 2 saat süreyle kurutuldu. Etüvden alınan boncuklar 1:1 oranda

kariştirilan kloroform: etanol cözücü sistemi ile tekrardan yıkandı ve 150 °C sıcaklıktaki etüvde yarım saat kurutuldu.

Safsızlıklarından arınmış olan 1 gram cam boncuk 0,2727 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile muamele edildi. Kariştiricinin en düşük ayarında iki saat kariştirıldı. Daha sonra cam boncuklar enzimli cözeltiden süzölüp sırasıyla aseton ve Na-asetat (pH: 6,5) tamponunda yıkandı. Tamamen süzölün cam boncuklar vakumlu desikatörde bir gece boyunca kurutuldu [48]. Yıkama sularında ve immobilize boncuklarda aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı [30].

Amberlit-XAD16 Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu

1 gram Amberlit-XAD16 0,2727 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ile kariştirıcı üzerinde 2 saat boyunca kariştirıldı. Daha sonra karişim süzölüdü. Enzim immobilize edilmiş amberlit derin dondurucuda donana kadar bekletildi. Donmuş olan amberlit kristallerini bağlanmayan protein moleküllerinden arındırmak amacıyla distile su ile yıkama yapıldı.

Yıkamış ve süzölümüş adsorbe enzim ihtiva eden amberlit bir gece boyunca vakumlu desikatörde, dolapta kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 10 mg enzim immobilize edilmiş amberlit 1ml Na-asetat tamponunda 10 dakika calkalandı ve süzölüdü [38,48]. Yıkama sularında ve immobilize enzimde aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı.

Alümina Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu

Alümina ile immobilizasyon yapılmadan önce, nem çekici özelliğinden kaynaklanan, içereceğı suyu uçurmak üzere 5 g alümina, 100 °C sıcaklıktaki etüvde 2 saat kurumaya bırakıldı.

Kurutma işleminin bittikten sonra alüminanın oda sıcaklığına kadar soğuması beklenildi. Soğumuş alüminanın 1 gramı ile 0,3168 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı 2 saat boyunca 4 °C'de kariştirıcı üzerinde kariştirıldı. Daha sonra karişmakta olan preparatın içerisine 3 ml soğuk aseton eklendi. Karişim buzdolabında 15. dakikada bir kez kariştirılmak suretiyle bir saat bekletildi. Süre tamamlandığında süzme işleminin yapıldı. Süzölün pullulanaz immobilize edilmiş alümina, yaklaşık 15 ml soğuk aseton ile yıkandı. İyice yıkamış alümina bir gece boyunca vakumlu desikatörde, dolapta

kurumaya bırakıldı. Kuruyan enzim immobilize edilmiş alüminadan 10 mg tartılıp 1 ml tamponda çalkalanarak enzimin çözünmesi sağlandı. Son olarak yıkama sularında ve immobilize enzim çözeltisinde protein ve aktivite tayinleri yapıldı ve immobilizasyon verimi hesaplandı.

Kitosan Boncuklarına Pullulanaz Adsorbsiyonu

0,2 g kitosan tartılıp % 1'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözününceye kadar karıştırıldı. Asit içerisinde kitosanın tamamen çözüldüğüne emin olduğunda, hazırlanan Metanol:NaOH:dH₂O çözeltisine (10:10:10 ml oranında hazırlanmış) damlalık yardımıyla damla damla eklendi. Boncukların oluşumu tamamlandıktan sonra bir saat süreyle boncuklar çözelti içerisinde bekletildi. Oluşan boncuklar (Şekil 4.6) yaklaşık 20 ml destile su ile çözeltiden gelebilecek safsızlıklardan arındırılmak amacıyla yıkandı. Daha sonra boncuklardan 35-40 tanesi alınarak üzerine 0,4407 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı eklendi. Bir saat boyunca karıştırıcı üzerinde karıştırılan enzim eklenen boncuklar bir gece boyunca 4°C'de immobilize olması için bekletildi. Ertesi gün boncuklar yaklaşık 10 ml destile su ile yıkandı [36]. Son olarak yıkama sularında ve immobilize enzim çözeltisinde protein ve aktivite tayinleri yapıldı ve immobilizasyon verimi hesaplandı.



Şekil 4.6 Kitosan boncuklara pullulanaz adsorbsiyonu

PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklarına Pullulanaz Adsorbsiyonu

0,8 g kitosan ve 0,2 g PEG 6000 (8:2) oranında tartılıp 67 ml % 1 asetik asit çözeltisinde çözününceye kadar karıştırıldı. Hazırlanan karışım Metanol:NaOH:dH₂O çözeltisine (10:10:10 ml oranında) damlatıldı. Oluşan boncuklar 1 saat süreyle çözelti içinde bekletildi. Daha sonra yaklaşık 20 ml destile su ile safsızlıklardan arındırıldı. Hazırlanan boncukların 35-40 tanesi alınıp üzerine 0,4407 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı eklendi ve 60 dakika karıştırıldı. Boncuklar gece boyunca +4 °C'de bekletildi. Daha sonra enzim immobilize edilmiş boncuklar, yaklaşık 10 ml distile su ile yıkandı. Yıkama sularında ve immobilize boncuklarda aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı. 8:2 kitosan-PEG 6000 oranı dışında 6:4 ve 7:3 oranları da benzer şekilde çalışıldı.

Boncukların aktivitesine bakmak için 1 adet boncuk 1 ml % 1 amilopektin içeren substrat çözeltisinde 10 dakika inkübe edildikten sonra çözeltiden alınan örnek, DNS metoduna göre aktivite tayini için hazırlandı ve spektroskopik ölçüm yapıldı [36].

Boncukların protein miktarını belirlemek için 1 adet boncuk 1ml Bradford çözeltisinde 10 dakika inkübe edildikten sonra spektroskopik ölçüm yapıldı.

4.2.6.2 Pullulanazın Hapsetme Metodu ile İmmobilizasyonu

Serbest pullulanaz; PEG 6000 içeren kitosan boncuklara ve yalnızca kitosan içeren boncuklara tutuklama metodu ile immobilize edildi.

Kitosan Boncuklara Pullulanaz Hapsetme

0,2 gram kitosan üzerine yaklaşık 6,7 ml % 1'lik asetik asit çözeltisi eklendi ve karıştırıcı üzerinde çözününceye kadar karıştırıldı. Daha sonra üzerine 0,4407 mg/ml protein içeren 1 ml enzim katıldı. Boncukların oluşturulması için Metanol:NaOH:dH₂O çözeltisi (10:10:10 ml oranında) hazırlandı ve üzerine enzim ihtiva eden preparat, damlalık yardımıyla damla damla eklendi. Oluşan boncuklar bir saat boyunca çözelti içerisinde bekletildi. Boncuklar yaklaşık 20 ml destile su ile yıkanarak çözeltiden gelebilecek safsızlıklardan arındırıldı [36,46]. Son olarak, yıkama sularında ve immobilize enzim çözeltisinde protein ve aktivite tayinleri yapılarak immobilizasyon verimi hesaplandı.

PEG İçeren Kitosan Boncuklara Pullulanaz Hapsetme

0,8 g kitosan ve 0,2 g PEG 6000 (8:2 oranında) tartılıp, 67 ml % 1 asetik asit çözeltisinde çözününceye kadar karıştırıldı. Çözeltiye 0,4407 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı ilave edildi ve +4C°'de NaOH:Metanol:dH₂O (10:10:10 ml oranında) özeltisine damlatıldı. Oluşan boncuklar 1 saat çözelti içinde bekletildi. Daha sonra süzölüp yıkandı ve yıkama suları toplandı. Aktivite ve protein tayinleri yapılarak immobilizasyon verimleri hesaplandı. 8:2 kitosan PEG 6000 oranı dışında 6:4 ve 7:3 oranları da benzer şekilde denendi. 6:4 ve 7:3 oranında polimerizasyon için hazırlanan preparatlara eklenen serbest enzim çözeltisinin protein miktarları da 0,4407 mg/ml'dir [46]. İmmobilize boncukların aktivite tayinleri ve protein miktarları benzer şekilde hesaplanmıştır.

4.2.6.3 Pullulanazın apraz Bağlama Metodu ile İmmobilizasyonu

Serbest pullulanaz; amberlit ve kitosan boncuklara çapraz bağlama metodu ile immobilize edildi.

Amberlit Üzerine apraz Bağlama İle Pullulanaz İmmobilizasyonu

Amberlit tanecikleri % 5 konsantrasyonunda hazırlanan glutaraldehit çözeltisi içerisinde bir gece bekletilerek aktive edildi. Ertesi gün aktive olan tanecikler fazla glutaraldehit solüsyonundan arındırılması için yaklaşık 10 ml destile su ile yıkandı. Yıkanan apraz bağlamaya hazır taneciklerin üzerine 0,4407 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı eklendi ve bir gece boyunca 4°C'de bekletildi. İmmobilizasyon için belirlenen süre sonunda tanecikler destile su ile iyice yıkandı. Yıkama sularında ve immobilize enzim çözeltisinde protein ve aktivite tayinleri yapıldı ve immobilizasyon verimi hesaplandı.

Aynı şekilde çapraz bağlama için amberlit taneciklerini aktive eden glutaraldehit çözeltisinin %2,5; %7,5; %10 glutaraldehit içeren konsantrasyonları da denenmiştir.

Kitosan Boncuklarına apraz Bağlama ile Pullulanaz İmmobilizasyonu

% 1,5 Asetik asit çözeltisi ile Kitosan % 1,5 oranında çözelti olarak hazırlandı. 0,1 gram kitosan tartıldı, üzerine yaklaşık 6,7 ml asetik asit eklenerek karıştırıcı üzerine alındı. Yaklaşık 55-60 °C'de çözününceye kadar karıştırıcıda karıştırıldı. Tamamen özünen kitosan asetik asit çözeltisi, 50 ml 1M KOH özeltisi içine damla damla enjekte edildi. Oluşan tanecikler, boncuk oluşum işleminin tamamen bitince yaklaşık 20 ml destile su ile

yıkılarak KOH fazlalıklarından arındırıldı. Kullanılana kadar 4 °C’de Na-asetat tamponunda muhafaza edildi.

Kullanıma hazır olan kitosan boncuklar, istenilen glutaraldehit konsantrasyonunda aktive olmaları için bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Aktive işlemi için 35-40 adet boncuk bir behere alındı ve üzerine 5 ml istenen glutaraldehit konsantrasyonundan eklendi ve bir gece oda sıcaklığında aktive olması için bırakıldı. Aktive işleminden sonra safsızlıklardan ve fazla glutaraldehit çözeltisinden arındırmak için boncuklar 0,1 M Na-asetat tamponu ile yıkandı.

Daha sonra aktive edilmiş boncukların her bir beherine 0,2727 mg/ml protein içeren 1 ml enzim preparatı eklendi. Çalkalamalı karıştırıcı üzerinde düşük devirde karıştırılarak enzimin çapraz bağlanması sağlandı. Son olarak yıkama sularında ve immobilize enzim çözeltisinde protein ve aktivite tayinleri yapıldı ve immobilizasyon verimi hesaplandı.

Çapraz bağlamada glutaraldehit konsantrasyonu öneminin incelenmesinde, denenen glutaraldehit konsantrasyonları sırasıyla %2.5, %5, %7.5 ve %10’dur. Şekil 4.7’de çapraz bağlanma için aktive edilmiş kitosan boncuklar görülmektedir.



Şekil 4.7 Kitosan Boncuklara Pullulanaz Çapraz Bağlama

4.2.7 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

4.2.7.1 İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine pH Etkisi

Enzimler proteinlerden oluştuğu için katalitik aktivite dikkate değer bir şekilde, ortam koşullarından, özellikle de sulu ortamın pH’sından etkilenir. İnkübasyon ortamının pH’sı protein molekülünün tamamının yük ve dissosiyasyon durumu yanında aktif

merkezini de etkilemektedir. Bu nedenle pH-aktivite ilişkisinin incelenmesi, enzim proteinlerinin yapı-fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması açısından faydalıdır [47].

Pullulanazın seçilmiş immobilizasyon metodları da en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH aralığının seçilebilmesi için pH 3-10 arasındaki değerler incelendi. Optimum pH tespiti için pH 4-7 aralığında Na-asetat, pH 8-10 aralığında Tris-HCl tamponları kullanıldı. Aktivite ölçmek amacıyla amilopektin çözeltisi % 1 (m/v) konsantrasyonunda pH 3-10 arasındaki tampon çözeltilerde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerde protein ve aktivite tayinleri yapıldı, spesifik aktivite değerleri hesaplandı.

4.2.7.2 İmmobilize Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağımlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla artar. Fakat bu artış sürekli olmayıp belli bir dereceden sonra düşme gösterir [47].

İmmobilize pullulanazın maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı bulabilmek için seçilmiş metodların belirlenen optimum pH değerlerinde % 1 (m/v) konsantrasyonunda amilopektin çözeltileri ile 40-90°C arasındaki sıcaklıklarda gösterdiği aktivite incelendi. Spesifik aktivite değerleri ve total üniteler hesaplandı.

İstenen konsantrasyonda optimum pH değerinde hazırlanmış substrat çözeltisi ile immobilize enzim çözeltisinin DNS metoduna göre aktivite değişimleri incelendi.

4.2.7.3 İmmobilize Pullulanaz Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

K_m değeri pullulanaz enziminin substrat amilopektin çözeltisine karşı gösterdiği ilgiyi ifade etmektedir. Bu çalışmada % 0,5, 1, 1,5 ve 2 (m/v) konsantrasyon değerlerinde amilopektin çözeltileri kullanılmıştır.

S değerleri amilopektin çözeltisinin konsantrasyon değerlerini, V_0 değerleri ise S konsantrasyonlarındaki total ünite değerlerini ifade eder. Bu grafiğin eğiminden yararlanılarak K_m ve V_{max} bulundu.

4.2.7.4 İmmobilize Pullulanazın Termal Kararlılığı

Enzim immobilizasyonunun en büyük amaçlarından biri enzimin kararlılığının gerek medikal gerekse endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirlik etkinliğinin artırılmasıdır. Enzimler protein yapısında oldukları ve ısıya karşı kararlı

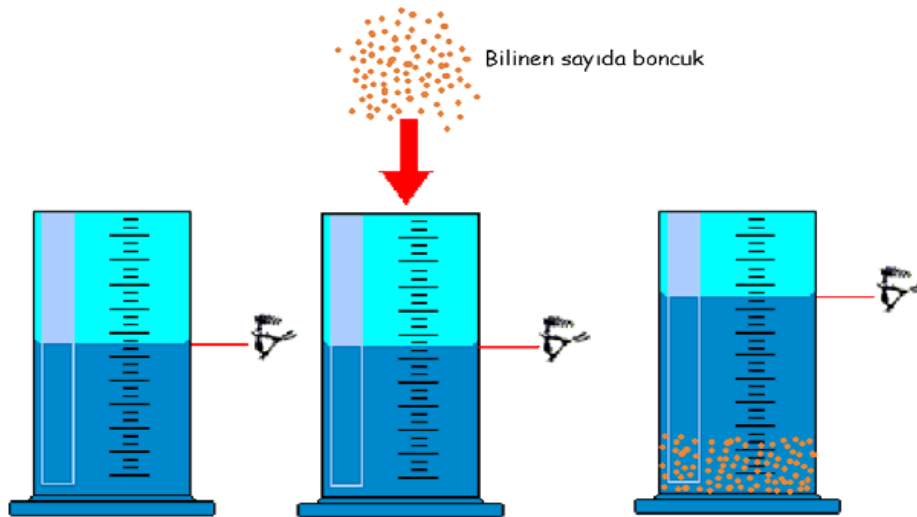
olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybı hızlanır.

İmmobilize boncukların termal kararlılığı, farklı sıcaklıklarda (40-50-60-70-80-90 °C) yarım saat inkübe edildikten sonra optimum pH koşullarında aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlendi.

4.2.7.5 Hazırlanan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması

Hazırlanan boncukların çaplarını ölçmek amacıyla 5 ml lik mezüre su konuldu. Bilinen belirli sayıda boncuk eklenerek hacimdeki artış ölçüldü (Şekil 4.8). Boncukların çaplarını hesaplamak için (4. 2)'deki formül kullanıldı [47]:

$$4/3.\pi.r^3. \text{ Boncuk sayısı} = \text{Hacimdeki artış} \quad (4. 2)$$



Şekil 4.8 Boncukların hacimlerini belirme [47].

Boncukların yaklaşık ağırlıklarını ölçmek için ise, tampon çözeltisinde bekletilen boncuklardan bir tanesi alınıp üzerindeki sulu fazdan uzaklaştırmak için 10-15 saniye temiz bir kağıt üzerinde bekletip tartımı yapıldı.

4.2.7.6 İmmobilize Pullulanazın Depo Kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize enzimlerin uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametre olup, uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Depo kararlılığını belirlemek amacıyla, 4 °C'de saklanan serbest ve immobilize enzimlerden belirli zaman aralıklarında örnekler alındı ve aktivitelerine bakılarak karar verildi [47].

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada küf mantarı *H. jecorina*'dan kısmi olarak saflaştırılan, hidrolaz sınıfı bir enzim olan pullulanazın adsorbsiyon, çapraz bağlama veya boncuklar içine hapsetme (tutuklama) gibi farklı metodlarla immobilizasyonu gerçekleştirildi. Immobilizasyonda taşıyıcı materyal olarak; adsorbsiyon için cam boncuk, alümina, amberlit ve PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar kullanıldı. Yine çapraz bağlama için amberlit ve kitosan boncuklar denendi. Pullulanazı tutuklama tekniğinde ise sadece PEG 6000 içeren kitosan boncuklar seçildi. Sonuçların her biri protein miktarı, total ünite ve spesifik aktivite cinsinden değerlendirildi. Son olarak immobilizasyon verimleri hesaplandı. Immobilizasyonda en iyi sonuç veren yöntemle immobilize edilen enzimin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek serbest enzim ile karşılaştırıldı.

5.1 Adsorbsiyon Metodu ile Pullulanaz İmmobilizasyonları

Adsorbsiyonla enzim immobilizasyon işlemi kolay olmakla birlikte optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur. Enzim desorpsiyonu, özellikle substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda hiç istenmeyen bir durumdur [47].

Bu yöntemle pullulanaz cam boncuk, amberlit-XAD16, alümina veya PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar üzerine immobilize edildi.

5.1.1 Cam Boncuk Üzerine Pullulanaz İmmobilizasyonu

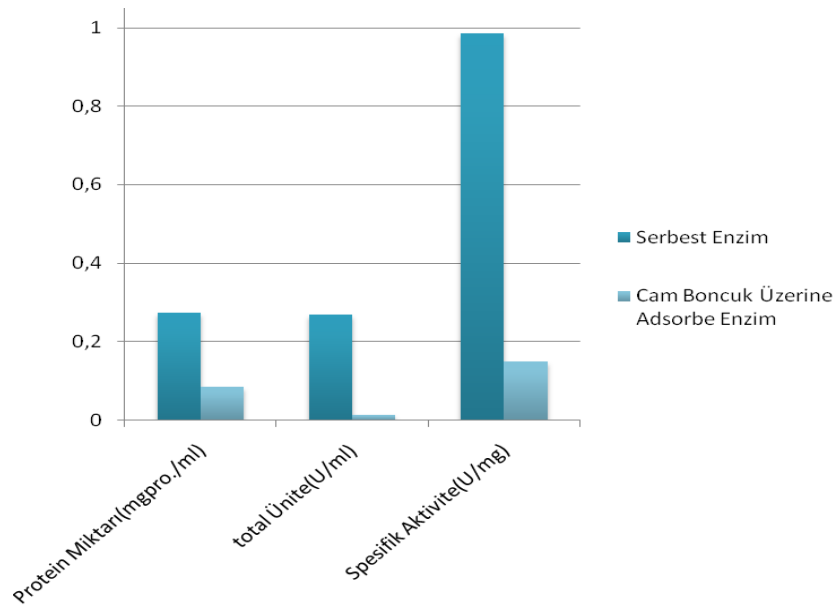
Pullulanazın cam boncuk üzerine adsorbsiyonu sonucunda immobilize enzimin total ünite değerinin serbest enzimin değerine göre düşük olduğu belirlendi. Aynı zamanda

immobilize enzimin spesifik aktivitesinin serbest enzimin spesifik aktivitesinden oldukça düşük olduğu da görülmektedir (Şekil 5.1). Bu durumda cam boncuklara adsorbe olan enzimin aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Protein değerleri kıyaslandığında ise immobilize olan enzim miktarının serbest enzimin miktarının oldukça altında olduğu görüldü. Adsorbsiyon tekniği, prensipte protein moleküllerini taşıyıcı materyale zayıf bağlarla bağlama (van der Waals, H bağı gibi) olduğu için enzimin cam boncuk üzerine istenen düzeyde bağlanmadığı söylenebilir. Tayin edilen protein ve aktivite değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan immobilizasyon verimi yüzdesi düşük bulundu. Bu durum cam boncuk üzerine pullulanaz adsorbsiyonunun uygun bir metod olmadığını göstermiştir.

Çizelge 5.1 Cam boncuk üzerine adsorbe pullulanazın immobilizasyon verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Cam Boncuk Üzerine Adsorbsiyon</i>	0,0128 U/ml	0,0858 mg/ml	0,1489 U/mg	% 15,1	% 31,5
<i>Serbest Enzim</i>	0,2689 U/ml	0,2727 mg/ml	0,9862 U/mg	-	-

Çizelge 5.1’de de görüldüğü gibi cam boncuk üzerine pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi %15,1 bulunurken protein cinsinden immobilizasyon verimi ise %31,5 olarak bulundu.



Şekil 5.1 Cam boncuk üzerine immobilize ve serbest pullulanaz aktivite karşılaştırma grafiği

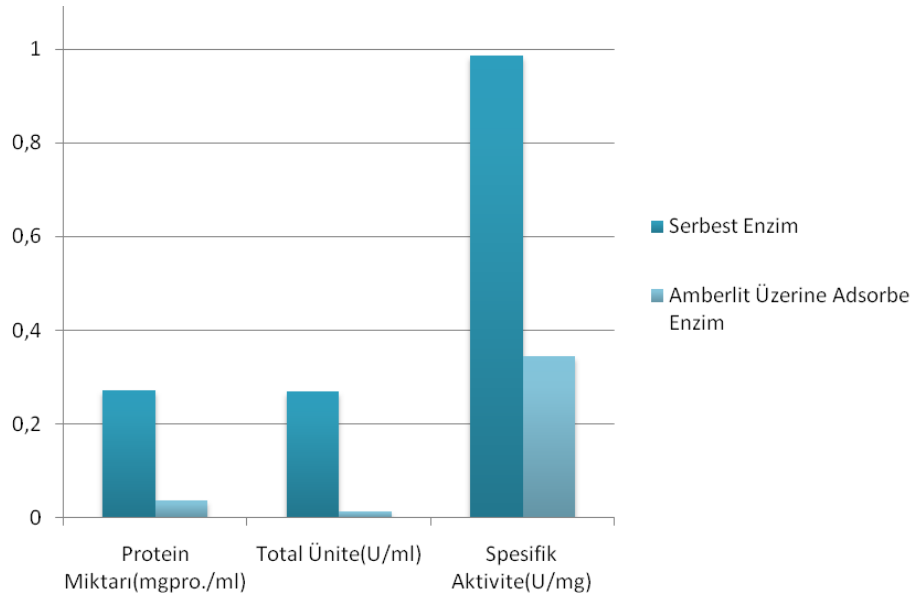
5.1.2 Amberlit-XAD16 Üzerine Pullulanaz İmmobilizasyonu

Amberlit-XAD16 üzerine pullulanaz immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra immobilize enzim çözeltisinde protein ve aktivite tayini yapıldı. Amberlit-XAD16'nın pullulanazı düşük oranda bağlandığı gözlemlendi. Protein ve aktivite tayini değerlerine göre çizilen serbest enzim ile immobilize enzimin karşılaştırıldığı Şekil 5.2 incelendiğinde amberlit adsorbsiyonun düşük olduğu görüldü. Yine buna paralel olarak serbest enzimin total ünite değerleri ile spesifik aktivite değerleri immobilize enzimin değerleri ile karşılaştırıldığında oranların düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum bize amberlit-XAD16'nın pullulanaz için uygun bir adsorban olmadığını ifade etmiştir. Hesaplanan verim de oldukça düşük bulunmuştur.

Çizelge 5.2 Amberlit-XAD16'ya adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Amberlit-XAD16 Üzerine Adsorbsiyon</i>	0,0124 U/ml	0,0359 mg/ml	0,3451 U/mg	% 34,99	% 11,33
<i>Serbest Enzim</i>	0,2689 U/ml	0,2727 mg/ml	0,9862 U/mg	-	-

Çizelge 5.2'de görüldüğü gibi amberlit-XAD16 üzerine adsorbe pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi %34,99; protein cinsinden immobilizasyon verimi ise %11,33 olarak bulundu.



Şekil 5. 2 Amberlit- XAD16 üzerine adsorbe ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği

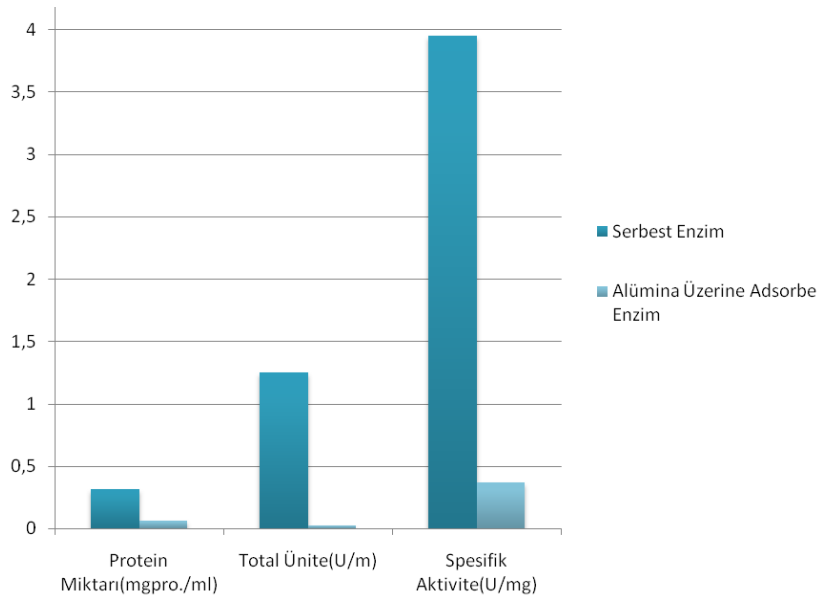
5.1.3 Alümina Üzerine Pullulanaz İmmobilizasyonu

Alümina üzerine adsorbe edilen pullulanazın çözeltilinde protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Hesaplanan değerler yardımıyla immobilizasyon verimi bulundu. Çizelge 5.3 ve Şekil 5.3 incelendiğinde; alüminanın pullulanazı adsorbe etmek için uygun bir materyal olmadığı görülür. Gerek spesifik aktivitesi gerekse total ünite değerleri incelendiğinde immobilize edilmiş enzimin değerlerinin serbest enzimin değerlerinin çok altında olduğu görüldü. Grafikte de görüldüğü gibi serbest enzimin spesifik aktivitesinin immobilize enzimden çok daha yüksek olması alüminanın pullulanazı adsorbe ederken enzimi inhibisyona uğrattığı ve enzimin aktivite göstereceği katalitik bölgelerini inaktif ettiği düşünüldü.

Çizelge 5.3 Alümina üzerine adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Alümina Üzerine Adsorbsiyon</i>	0,0238 U/ml	0,0646 mg/ml	0,3684 U/mg	%9,32	%20,39
<i>Serbest Enzim</i>	1,2526 U/ml	0,3168 mg/ml	3,9538 U/mg	-	-

Çizelge 5.3’de görüldüğü gibi alümina üzerine adsorbe pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi %9,32; protein cinsinden immobilizasyon verimi ise %20,39 olarak bulundu.



Şekil 5.3 Alümina üzerine adsorbe ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği

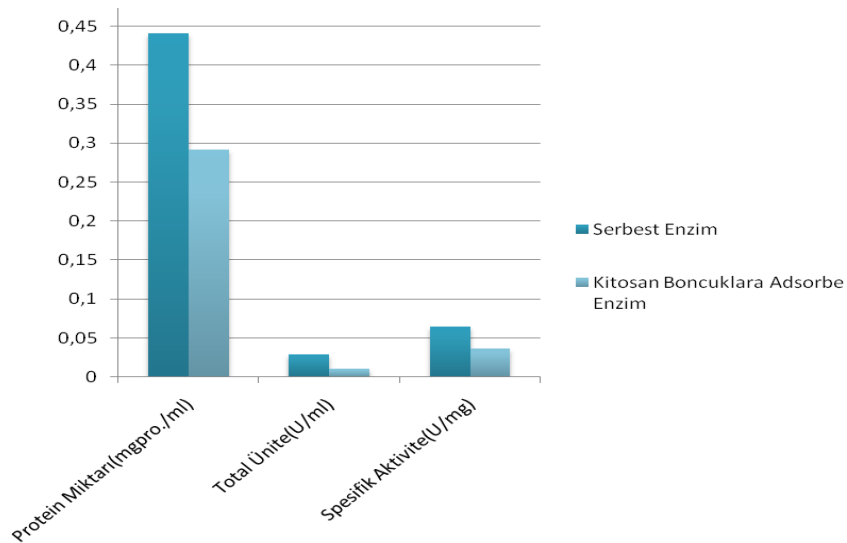
5.1.4 Kitosan Boncuk Üzerine Pullulanaz Adsorbsiyonu

Kitosan boncuklara enzim immobilizasyonu sonucunda tayin edilen protein ve aktivite değerlerine bakıldığında (Şekil 5.4); serbest enzim ile immobilize enzimin protein miktarları arasında çok büyük bir fark olmadığı gözlemlendi. Bu durumda kitosan boncukların pullulanazı immobilize etme işleminde iyi bir adsorban olduğunu söylenebilir. Elde edilen sonuçlardan kitosan ile enzimin protein yapısının bağlanma için uyumlu olduğu anlaşıldı. Adsorbsiyon gibi zayıf bağlama metoduna rağmen pullulanazın yüksek oranda bağlandığı görüldü. Aktivite ve protein miktarlarından hesaplanan immobilizasyon verimi (Çizelge 5.4) kitosan boncukların pullulanaz için iyi bir taşıyıcı olduğunu gösterdi.

Çizelge 5.4 Kitosan boncuğa adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Kitosan Boncuk Üzerine Adsorbsiyon</i>	0,01065 U/ml	0,2920 mg/ml	0,0365 U/mg	%56	%81
<i>Serbest Enzim</i>	0,0287 U/ml	0,4407 mg/ml	0,0652 U/mg	-	-

Total ünite değerleri incelendiğinde, adsorbsiyon sırasında enzimin aktif bölgelerinin inhibe olmadığı söylenebilir. Fakat kitosan boncukların immobilizasyondan sonra kısa sürede elastikliğini kaybedip, kırılma ve çatlamalara uğradığı görüldü. Bu durum kitosan boncukların pullulanaz için uzun süreli immobilizasyon materyali olamayacağını düşündürür.

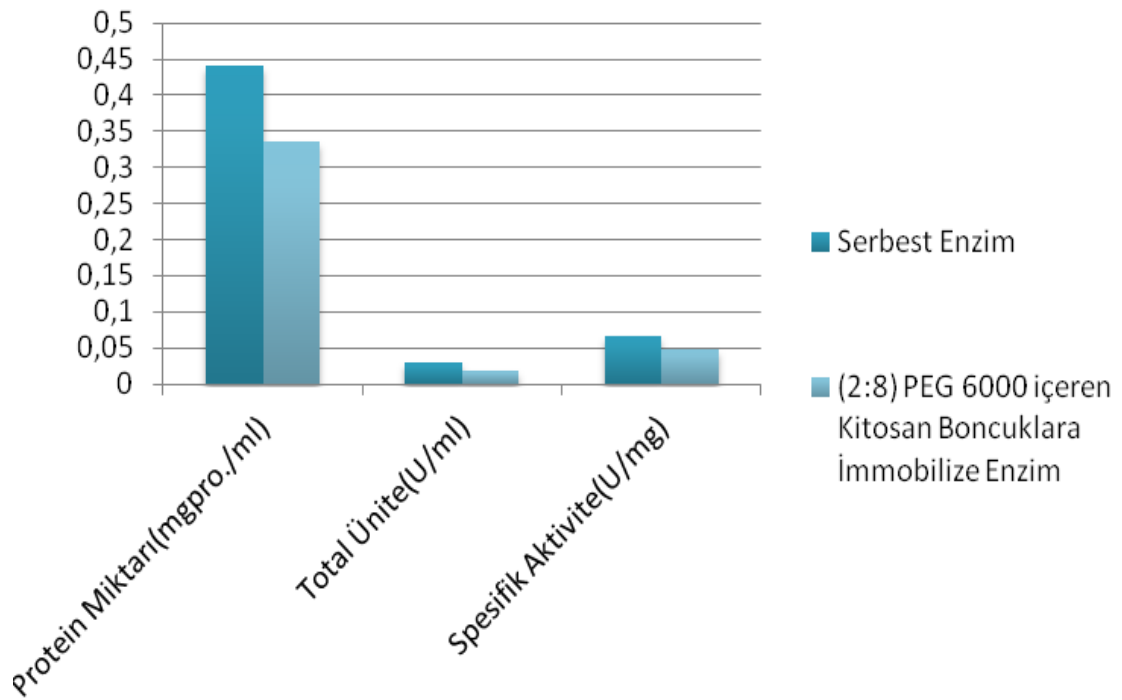


Şekil 5.4 Kitosan boncuklara adsorbe ve serbest pullulanazın karşılaştırma grafiği

5.1.5 PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklara Pullulanaz Adsorbsiyonu

PEG 6000 ile kaplı kitosan boncuklar üzerine adsorbsiyon işleminde oluşturulan enzim ihtiva eden boncukların protein miktarlarının serbest enzimin protein miktarına yakın olduğu tayin edildi. Yine benzer şekilde total ünite değerleri ile spesifik aktivite değerleri de serbest enzime yakın değerlerde bulundu (Şekil 5.5). Pullulanazın PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara immobilize edildikten sonra aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmemesi uygulanan metodun pullulanaz için uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Adsorbsiyon metodunda immobilizasyonun zayıf yapılmasına rağmen kitosan molekülünün enzimlerin amin gruplarını bağlama yeteneğinden dolayı tutunma işleminin yüksek afinite göstermiş olduğu söylenebilir.

Aynı şekilde farklı oranlarda (7: 3 ve 6: 4 oranlarında) kitosan ve PEG 6000 ihtiva eden, PEG 6000 kaplı kitosan boncukların immobilizasyonu yapıldı. Fakat 6:4 ve 7:3 kitosan-PEG 6000 içeren oranlarda immobilize pullulanaz aktivitesi çok düşük bulundu. Bu sebeple immobilizasyon için uygun oranlar olmadıkları düşünüldü.



Şekil 5.5 PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara immobilize ve serbest pullulanaz aktivite karşılaştırma grafiği

Çizelge 5.5’de görüldüğü gibi PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi %74,85; protein cinsinden immobilizasyon verimi %81 olarak bulundu.

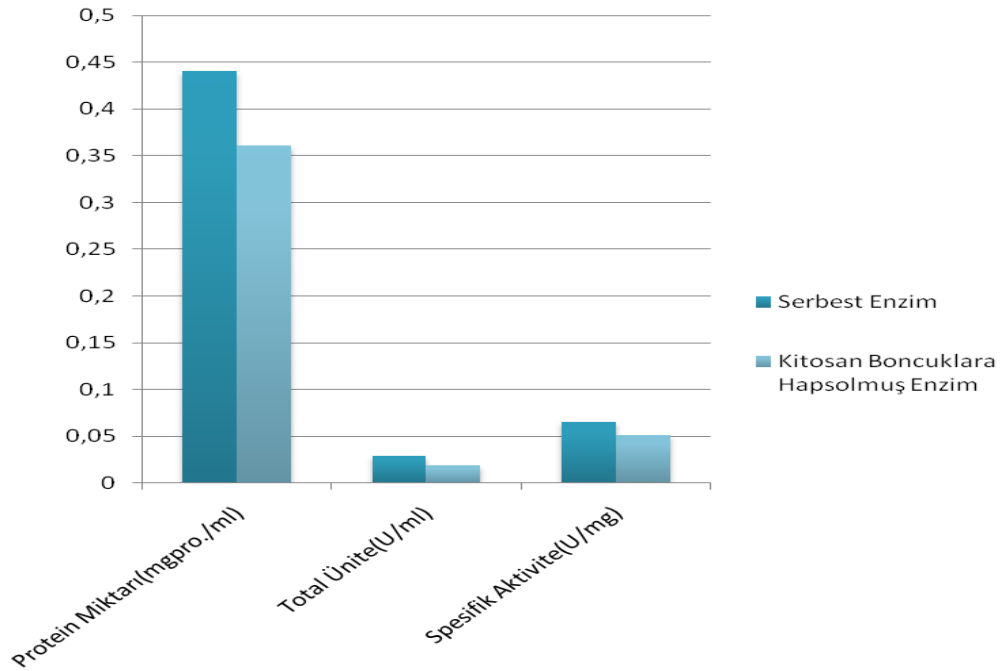
Çizelge 5. 5 PEG 6000 kaplı kitosan (2:8) boncuklara adsorbe pullulanazın immobilize verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Kitosan-PEG 6000 (8:2) Boncuk Üzerine Adsorbsiyon</i>	0,0174 U/ml	0,3364 mg/ml	0,0488 U/mg	% 74,85	% 81
<i>Serbest Enzim</i>	0,0287 U/ml	0,4407 mg/ml	0,0652 U/mg	-	-

5.2 Taşıyıcı Materyal İçine Hapsetme (Tutuklama) Metodu İle Pullulanaz İmmobilizasyonları

5.2.1 Kitosan Boncuklara Pullulanaz Tutuklanması (Hapsetmesi)

Kitosan boncuklar oluşturulurken *H. jecorina* pullulanazı kitosanın çözündüğü çözeltinin içerisine enjekte edildi. Bu şekilde enzim tanecikleri boncuk materyalinin içerisine hapsedilmiş oldu. Hapsolmuş boncuklarda protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Serbest enzim ile immobilize enzimin karşılaştırılabilmesi için grafik çizildi.



Şekil 5.6 Kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği

Şekil 5.6 incelendiğinde; boncuk içerisine hapsedilen pullulanazın protein miktarının oldukça yüksek olduğu görüldü. Bu durum proteinlerin denatürasyonunun az olduğunu ve enzim kaybının az olduğunu gösterir. Yine spesifik aktivite ve total ünite değerleri incelenecek olursa immobilize enzimin serbest enzimin spesifik aktivitesinden daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görülür. Enzimin immobilize olmasının aktivitesinde artışa sebep olduğu ve protein miktarının çoğunlukla korunduğu göz önüne alındığında kitosan boncuklara pullulanaz hapsedme yönteminin pullulanaz için uygun immobilizasyon yöntemlerinden biri olabileceği görülür. Hapsedilen pullulanazın aktivitesinin artması enzimin aktif bölgelerinin engellenmediğini ve kullanılabilir formda korunduğunu ifade eder.

Çizelge 5. 6 Kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın immobilize verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Kitosan Boncuklara Hapsedme</i>	0,0185 U/ml	0,3606 mg/ml	0,0513 U/mg	% 78,7	% 81
<i>Serbest Enzim</i>	0,0287 U/ml	0,4407 mg/ml	0,0652 U/mg	-	-

Çizelge 5.6'da görüldüğü gibi kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimi %78,7; protein cinsinden immobilizasyon verimi ise %81 olarak bulundu.

5.2.2 PEG 6000 İçeren Kitosan Boncuklara Pullulanaz İmmobilizasyonu

PEG 6000 içeren kitosan boncuklara enzim immobilizasyonu diğer metodlardan daha farklı olarak serbest enzimin boncukları oluşturmadan önce kitosan ve PEG 6000 içeren çözeltinin içine enjekte edilmesi işlemini içerir. Protein ve aktivite tayinleri yapıldıktan sonra serbest enzim ile değerlerin karşılaştırıldığı grafik Şekil 5.7 de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi immobilize enzim içeren boncuklar yüksek miktarda protein içermektedir. Yine spesifik aktivite ve total ünite değerleri ve serbest enzimin değerleri birbirine yakındır. Bu durumda PEG 6000 içeren kitosan boncuklara enzimin hapsedilme metodunun pullulanazı immobilize etmek için uygun yöntemlerden biri olduğu söylenebilir.

PEG 6000 içeren kitosan boncukların oluşmadan önce içine enzimin enjekte edilmesinin proteinlerin denatürasyonunu engellemede büyük bir avantaj sağladığı gözlemlendi. Böylelikle daha fazla protein molekülü etkin bir şekilde aktivite gösterebildi.

Yine aynı şekilde farklı oranlarda (7: 3 ve 6: 4 oranında) kitosan-PEG 6000 içeren boncukların da enzim immobilizasyonu denendi.

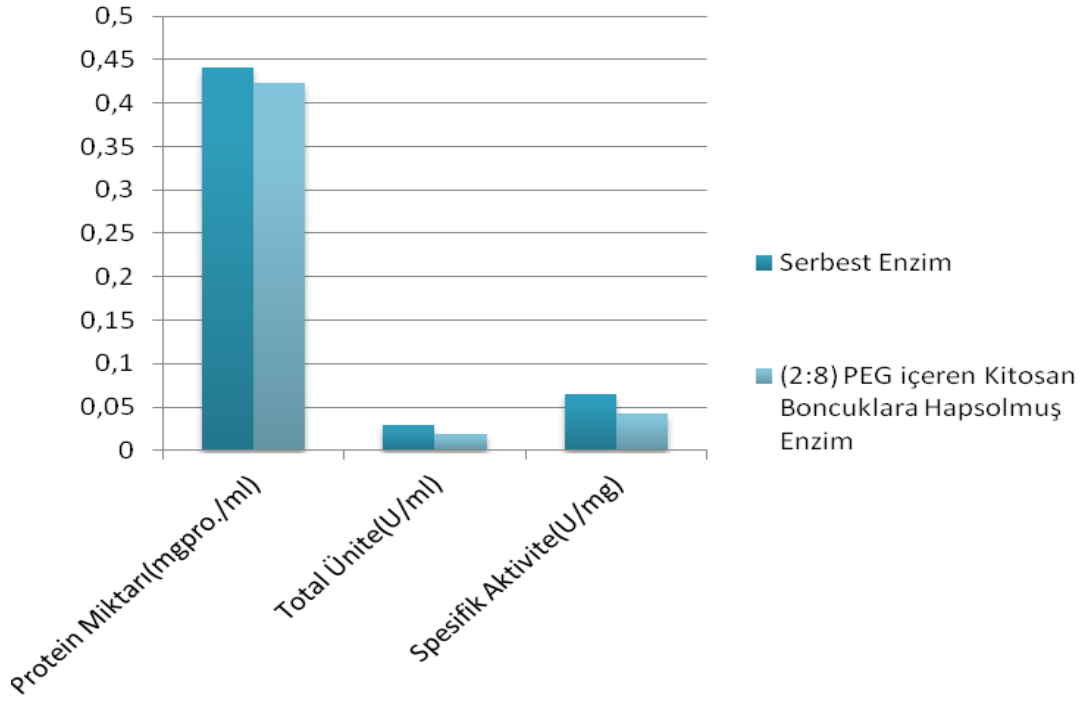


Şekil 5. 7 PEG 6000 içeren kitosan boncukların görüntüsü

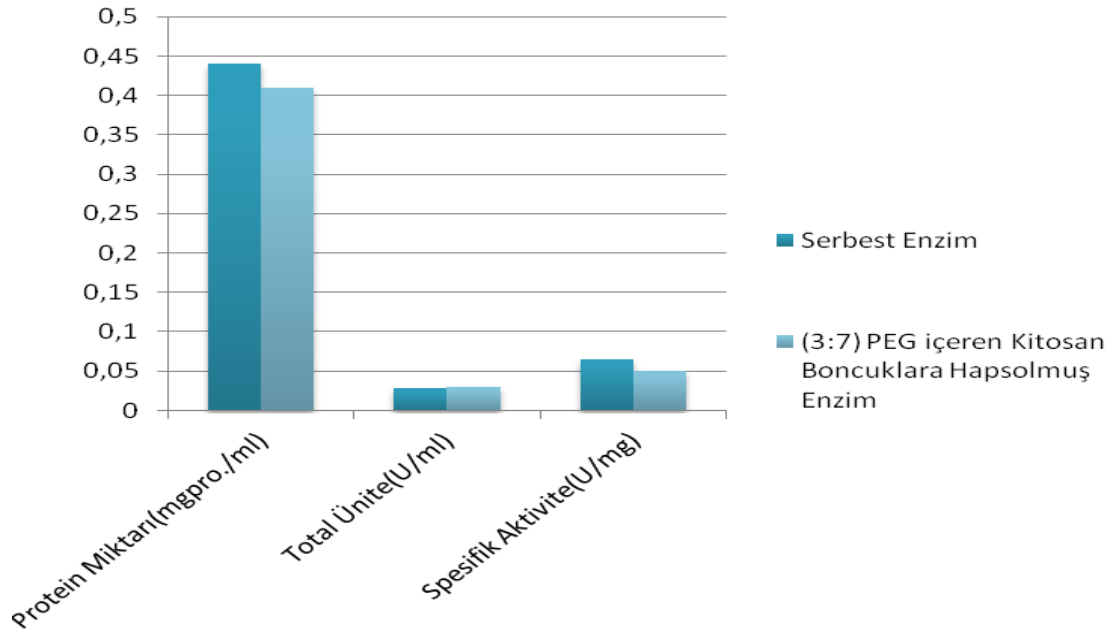
Çizelge 5.7’de görüldüğü gibi (8:2), (7:3) ve (6:4) oranlarında PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimleri sırasıyla %66,26; %77,15 ve %81,5; protein cinsinden immobilizasyon verimleri ise %93,7; %93 ve %84 olarak bulundu.

Çizelge 5. 7 PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın immobilize yüzdeleri

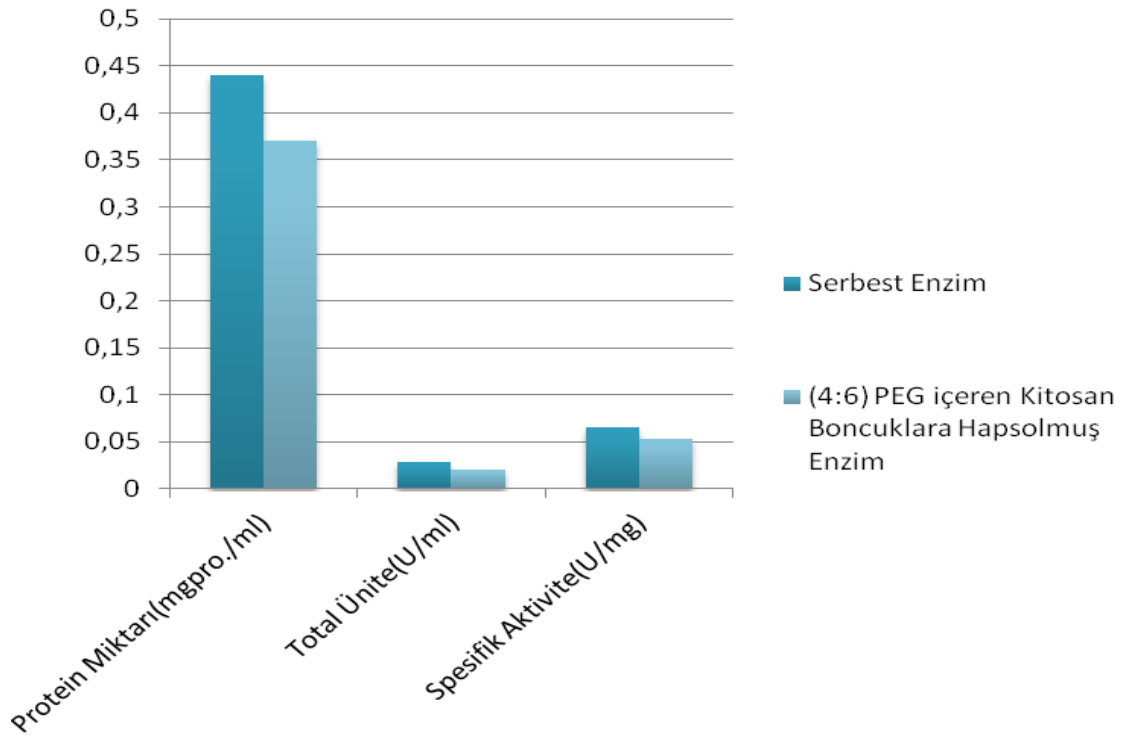
İmmobilizasyon Yöntemi	İmm. Enzimin Total Ünitesi	İmm. Enzimin Protein Miktarı	İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi	% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)	% Verim (Protein Cinsinden)
Kitosan-PEG (8: 2) Boncuklara Hapsetme	0,0183 U/ml	0,4231 mg/ml	0,0432 U/mg	%66,26	%93,7
Kitosan-PEG (7: 3) Boncuklara Hapsetme	0,0296 U/ml	0,4099 mg/ml	0,0503 U/mg	%77,15	%93
Kitosan-PEG (6: 4) Boncuklara Hapsetme	0,0199 U/ml	0,3701 mg/ml	0,0538 U/mg	%81,5	%84
Serbest Enzim	0,0287 U/ml	0,4407 mg/ml	0,0652 U/mg	-	-



Şekil 5. 8 (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği



Şekil 5. 9 (3:7) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği



Şekil 5. 10 (4:6) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği

PEG 6000 içeren kitosan boncuklara pullulanaz hapsolme işlemi, Şekil 5.8, Şekil 5.9 ve Şekil 5.10 incelendiği zaman; pullulanaz immobilizasyonu açısından oldukça uygun bir metod olduğu gözlemlendi. Gerek total ünite değerleri gerekse spesifik aktivite değerleri incelendiğinde enzimin polimer kapsülünün içerisinde aktivitesini koruduğu ve yüksek verim gösterdiği görüldü. Yine kitosan ve PEG polimerleşmesinin serbest enzimi katalitik etki göstereceği ortamda denatürasyondan koruduğu ve aktivitesini gösterebilmesine olanak sağladığı düşünüldü.

5.3 Çapraz Bağlama Metodu İle Pullulanaz İmmobilizasyonları

5.3.1 Kitosan Boncuklara Çapraz Bağlama İle Pullulanaz İmmobilizasyonu

Kitosan boncuklar farklı glutaraldehit konsantrasyonlarında aktive edilerek pullulanaz immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra immobilize enzimin protein ve aktivite tayinleri yapıldı, serbest enzim ile karşılaştırılmak üzere Şekil 5.11'deki grafik hazırlandı. İmmobilizasyon verimleri hesaplandı. Değerlere bakıldığında, kitosan boncukları çapraz bağlamak için aktive ederken kullanılan glutaraldehitin konsantrasyonunun artırılması ya da azaltılması bağlanma yüzdesinde belirgin bir değişime sebep olmadığı görüldü. Enzimin kitosan boncuklara bağlanmasının çapraz

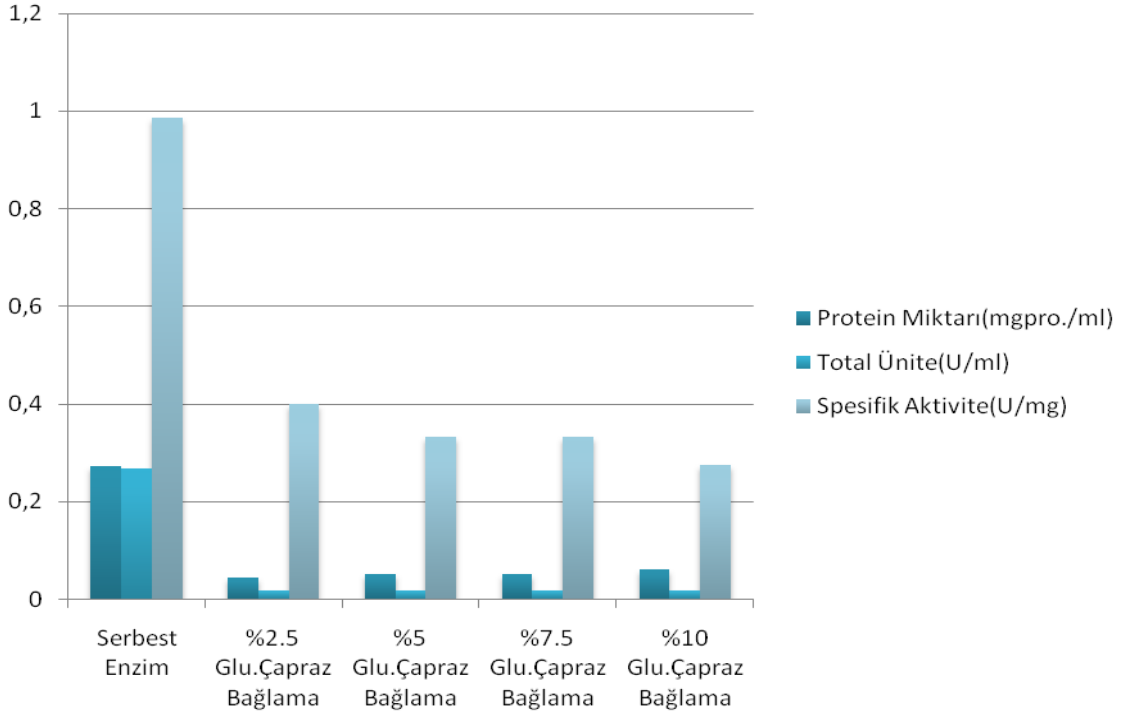
bağlayıcı solüsyonun konsantrasyonundan bağımsız olduğunu söylenebilir. Spesifik aktivite ve total ünite değerlerinin serbest enzimden oldukça düşük olması immobilizasyon için tercih edilen bir metod olmadığını göstermektedir.

Bunun yanında boncukların aktive edilmesi amacıyla içinde bekletildiği glutaraldehit çözeltisi konsantrasyonu arttıkça, boncuk yüzeylerinde korozyonlar gözlemlendi. Bu durum taşıyıcı materyalin dayanıklılığını düşürdüğünden immobilizasyon verimi için negatif bir özellik olduğu söylenebilir.

Çizelge 5.8 Kitosan boncuklara çapraz bağlanmış pullulanazın immobilize yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
<i>Kitosan Boncuklara Çapraz Bağlama (%2,5 Glu.)</i>	0,0174 U/ml	0,0437 mg/ml	0,3991 U/mg	%40,47	%16,02
<i>Kitosan Boncuklara Çapraz Bağlama (%5 Glu.)</i>	0,0173 U/ml	0,0517 mg/ml	0,3337 U/mg	%33,84	%18,96
<i>Kitosan Boncuklara Çapraz Bağlama (%7,5 Glu.)</i>	0,0175 U/ml	0,0523 mg/ml	0,3336 U/mg	%33,83	%19,18
<i>Kitosan Boncuklara Çapraz Bağlama (%10 Glu.)</i>	0,0171 U/ml	0,0622 mg/ml	0,2752 U/mg	%27,91	%22,81
<i>Serbest Enzim</i>	0,2689 U/ml	0,2727 mg/ml	0,9862 U/mg	-	-

Çizelge 5.8’de görüldüğü gibi kitosan boncuklara çapraz bağlanmış pullulanazın spesifik aktivite cinsinden immobilizasyon verimleri çizelge sırasına göre; % 40,47; % 33,84; % 33,83; % 27,91 bulunurken protein cinsinden immobilizasyon verimleri; % 16,92; % 18,96; % 19,18 ve % 22,81 bulundu.



Şekil 5.11 Kitosan boncuklara çapraz bağlı ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği

5.3.2 Amberlit-XAD16 Üzerine Çapraz Bağlama İle Pullulanaz İmmobilizasyonu

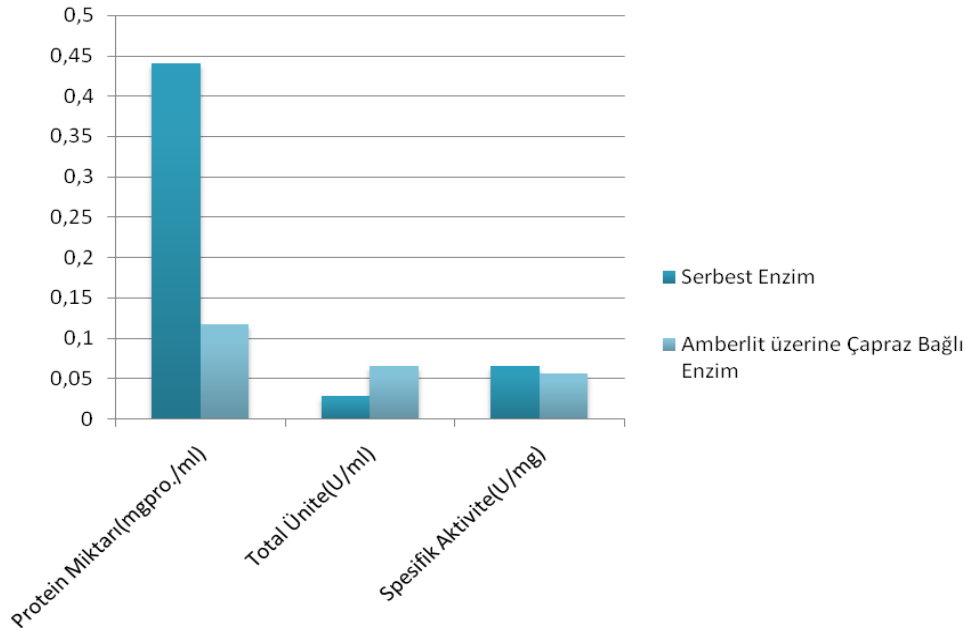
Amberlit-XAD16 üzerine çapraz bağlama enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra immobilize enzimin çözeltisinde protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Amberlit-XAD16'nin pullulanazı çapraz bağlama için uygulanabilir bir materyal olduğu düşünüldü. Fakat protein ve aktivite tayin değerlerine göre Şekil 5.12 incelendiği zaman, materyal üzerine çapraz bağlanan protein miktarının azlığı yöntemin yoğun protein konsantrasyonlarında yetersiz kalacağını gösterdi. Serbest enzimin oldukça az bir kısmı çapraz bağlama yapabildiği düşüldü. Yine grafikten de görüleceği gibi immobilize enzimin total ünitesinin değeri serbest enzimin total ünite değerinden daha yüksek olmasına rağmen; spesifik aktivitesinin serbest enzime göre düşük olduğu görüldü. Bu durum enzimin aktif substrat bağlama yeteneğinin serbest enzim formundayken daha iyi olduğunu gösterir.

Çapraz bağlamada taşıyıcı materyali bağlanma için aktive eden glutaraldehit konsantrasyonunun etkisini incelemek için aynı denemeler % 2,5; % 7,5 ve % 10 glutaraldehit konsantrasyonları için de denendi. Denemeler sonucunda, % 2,5; % 7,5 ve % 10 konsantrasyonlarında bağlanma yüzdesi çok düşük olduğundan dikkate alınmadı.

Çizelge 5. 9 Amberlit-XAD16 üzerine çapraz bağlı pullulanazın immobilize verim yüzdeleri

<i>İmmobilizasyon Yöntemi</i>	<i>İmm. Enzimin Total Ünitesi</i>	<i>İmm. Enzimin Protein Miktarı</i>	<i>İmm. Enzimin Spesifik Aktivitesi</i>	<i>% Verim (Spesifik Akt. Cinsinden)</i>	<i>% Verim (Protein Cinsinden)</i>
Amberlit-XAD16 Çapraz Bağlama (%5 Glu.)	0,0066 U/ml	0,1169 mg/ml	0,0565 U/mg	% 86,6	% 26,52
Serbest Enzim	0,0287 U/ml	0,4407 mg/ml	0,0652 U/mg	-	-

Çizelge 5.9'de görüldüğü gibi amberlit-XAD16 üzerine çapraz bağlı pullulanazın spesifik aktivite cinsinden % immobilizasyon verimi 86,6 bulunurken; protein cinsinden % immobilizasyon verimi 26,25 bulundu.



Şekil 5.12 Amberlit-XAD16 üzerine çapraz bağlı ve serbest pullulanazın aktivite karşılaştırma grafiği

5.4 Pullulanaz için En Uygun İmmobilizasyon Metodununun Belirlenmesi

Yapılan pullulanaz immobilizasyonu denemelerinden elde edilen protein ve aktivite tayini sonuçları ve immobilizasyon verimi hesaplamalarının değerleri incelendiğinde; yüksek oranda protein bağlama kapasitesi, total ünite ve spesifik aktivite değerinin yüksek olması, protein cinsinden ve total ünite cinsinden % verim değerinin yüksek olması sebebiyle (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara pullulanaz immobilizasyonu ve (2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara pullulanaz immobilizasyonu metodlarının uygun olduğuna karar verildi. Aynı zamanda uygun bulunan metodlardan farklı

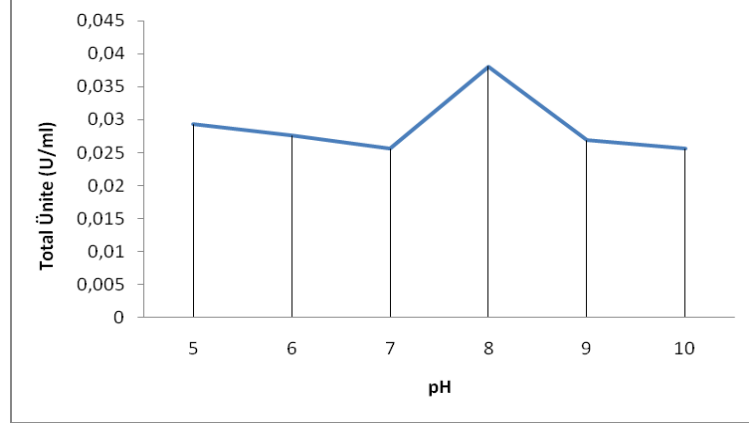
oranlarda PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş enzim metodunda (2:8) oranında hazırlanan uygulaması, boncuk dayanıklılığı yüksek olduğu için seçilme sebebidir. 8 birim kitosana karşı 2 birim PEG 6000 içeren boncukların diğer boncuklara göre daha az sert ve kimyasal korozyona karşı daha dayanıklı olduğu görüldü. Bu durum endüstriyel açıdan önemli olan pullulanazın, proseslerde daha uzun süreli kimyasal korozyonla karşılaşılacağı düşünüldüğünde, önemli bir etmendir. Yine boncukların oluşturulması esnasında bazik solüsyon içerisine damlatılan polimerizasyon malzemesi (PEG 6000 içeren kitosan çözeltisi) kitosan miktarının yoğun olduğu denemelerde daha hızlı oluşum gösterdi. Ayrıca PEG 6000 içeren boncuklar, PEG 6000 içermeyen boncuklara göre daha elastiktir. Süzme ve yıkama süreçlerinde daha az kırılma ve parçalanmaya uğramıştır. Tüm bu özellikler ve sayısal değerler dikkate alındığında pullulanaz immobilizasyonu için en uygun olan metodların (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklar ve (2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklar olduklarına karar verildi.

5.5 (2:8) PEG 6000 içeren Kitosan Boncuklara Pullulanaz İmmobilizasyonu ve PEG 6000 Kaplı Kitosan Boncuklara Pullulanaz Adsorbsiyonu Metodlarının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

5.5.1 İmmobilize Enzim Üzerine pH Etkisi

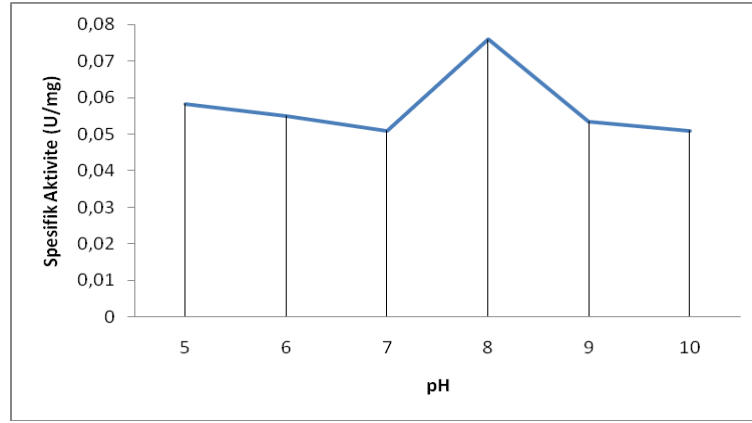
Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden en önemlisi pH etkisidir. Bir enzimin optimum pH'ı, reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağımlı bir değişkendir. Biyokimyasal reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleştiğinden, pH enzimin yük durumunu dolayısı ile aktivitesini çok etkiler.

H. jecorina pullulanazının optimum pH'sı 6,5 olarak bulunmuştur [29]. Aşağıda Şekil 5.13, Şekil 5.14, Şekil 5.15 ve Şekil 5.16'de gösterilen grafiklerde pH'nın immobilize *H. jecorina* pullulanazı üzerinde etkisi gösterilmiştir.

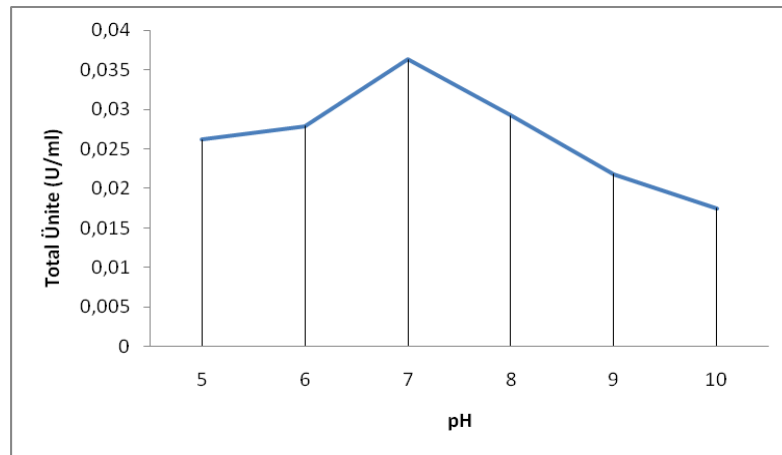


Şekil 5.13 (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum pH grafiği-total ünite

(2.8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara pullulanaz immobilizasyonunun optimum pH'sı 8 olarak belirlendi (Şekil 5.13 ve Şekil 5.14). Bu pH değerinde total ünite 0,0381 U/ml, spesifik aktivite ise 0,0759 U/mg olarak belirlendi.

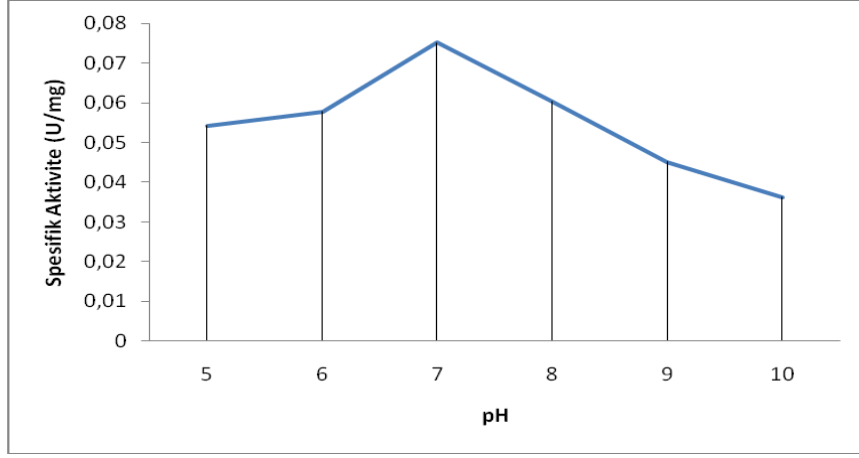


Şekil 5.14 (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum pH grafiği-spesifik aktivite



Şekil 5.15 (2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum pH grafiği-total ünite

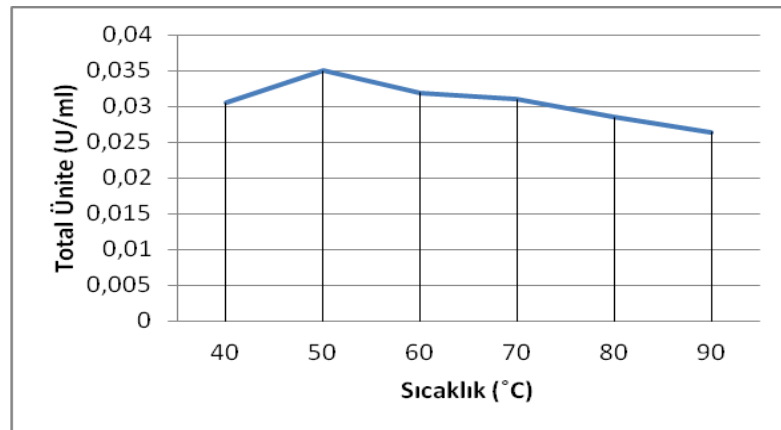
(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara pullulanaz adsorbsiyonunun optimum pH'sı 7 olarak belirlendi (Şekil 5.15 ve Şekil 5.16). Optimum pH değerinde total ünite 0,0363 U/ml, spesifik aktivite 0,0752 U/mg bulundu.



Şekil 5.16 (2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum pH grafiği-spesifik aktivite

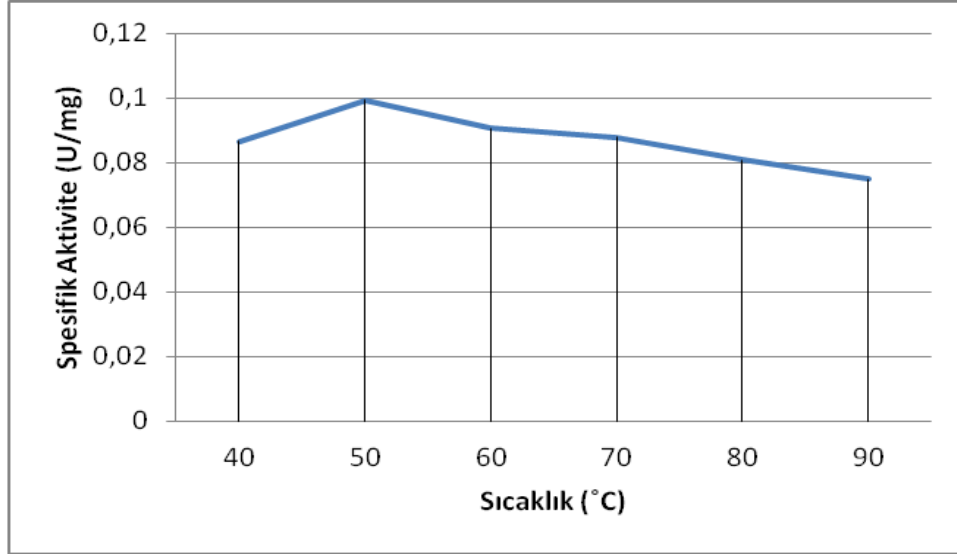
5.5.2 İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi

Protein yapısında olan enzimler, sıcaklıkla denatürasyona uğramakta ve üç boyutlu yapısı bozulmaktadır. Bu da enzimatik aktivitenin azalması ve giderek kaybolması sonucunu doğurmaktadır. Bu nedenle sıcaklık-aktivite ilişkisinin incelenmesi, enzim ve kimyasal katalizörlerin karşılaştırılması için faydalı bilgiler sağlayabilir. İmmobilizasyon sonrasında enzimin optimum sıcaklığı genellikle değişir [47]. Serbest pullulanazın optimum sıcaklık aralığı 35-65°C arasındadır [29]. Aşağıdaki grafiklerde sıcaklığın immobilize pullulanaz üzerindeki etkisi gösterildi.

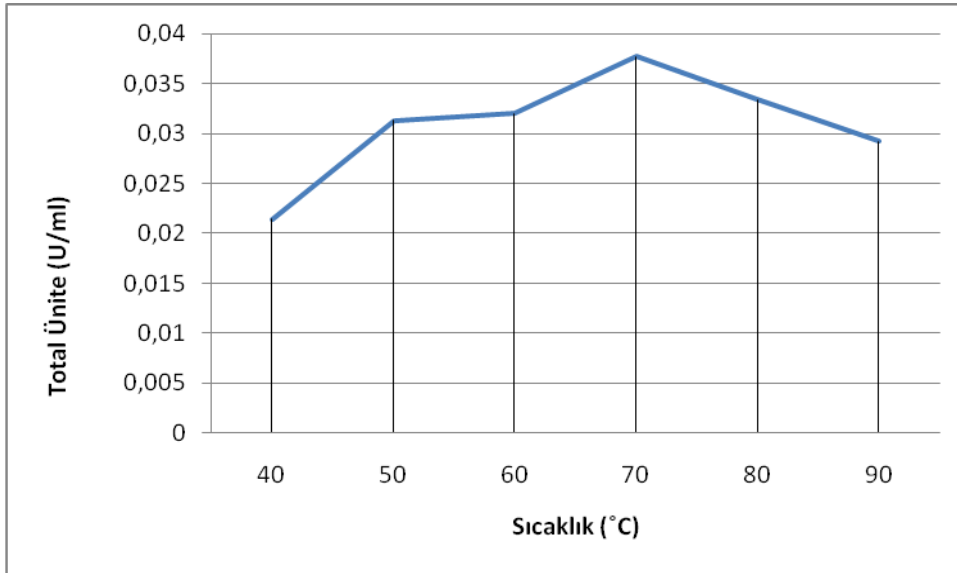


Şekil 5.17 (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum sıcaklığı-total ünite

(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara pullulanaz immobilizasyonunun optimum sıcaklığı 50°C bulundu (Şekil 5.17 ve Şekil 5.18). Yine aynı zamanda 40-50°C arasında artan bir aktivite gözlemlendi. Optimum sıcaklıkta 60°C'den sonra aktivitede düşme görüldü. İmmobilize enzimin total ünitesi 0,0350 U/ml, spesifik aktivitesi 0,0993 U/mg belirlendi.



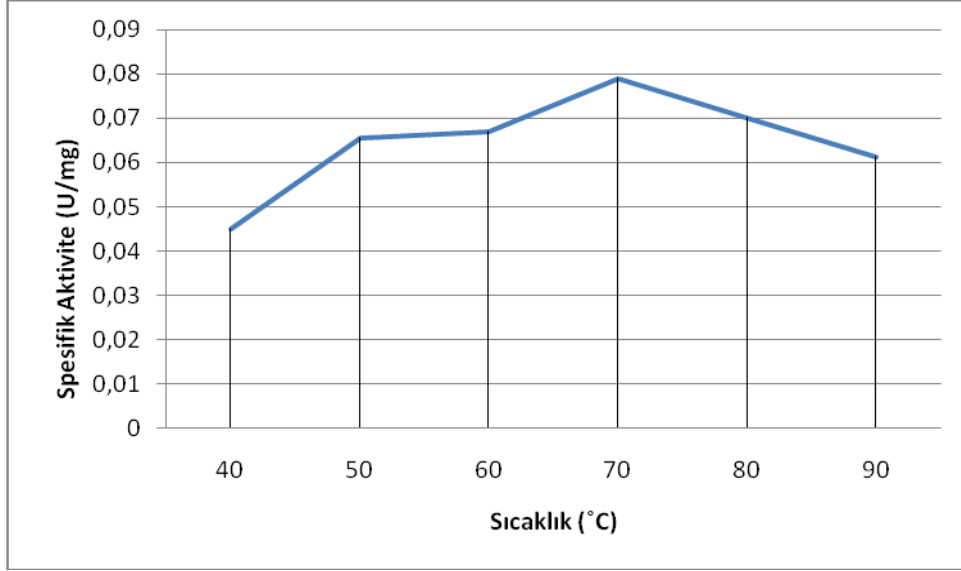
Şekil 5.18 (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın optimum sıcaklığı-spesifik aktivite



Şekil 5.19 (2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum sıcaklık grafiği-total ünite

(2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara pullulanaz adsorbsiyonunun optimum sıcaklığı 70°C olarak belirlendi (Şekil 5.19 ve Şekil 5.20). Grafik incelendiğinde 60-70°C arasında aktivitenin arttığı görüldü. Optimum sıcaklıkta immobilize enzimin total

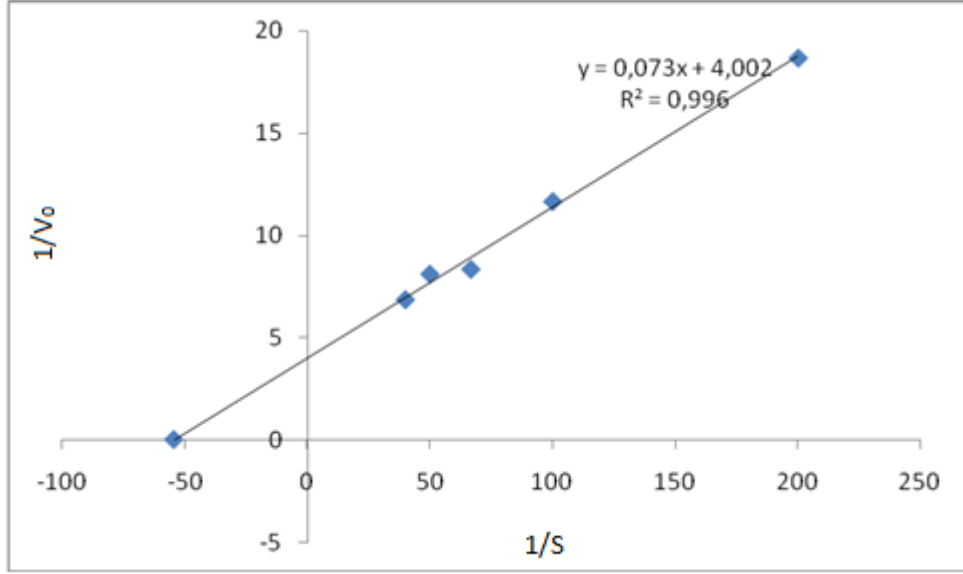
ünitesi 0,0377 U/ml, spesifik aktivitesi 0,0790 U/mg bulundu. Serbest enzimin optimum sıcaklık aralığı göz önünde bulundurulduğunda; pullulanazın PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbsiyonu sonucunda optimum sıcaklığın arttığı gözlemlendi. Pullulanaz immobilize halinde serbest halindekiinden daha yüksek sıcaklıklarda bile aktivitesini kaybetmemektedir.



Şekil 5.20 (2:8) PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum sıcaklık grafiği-spesifik aktivite

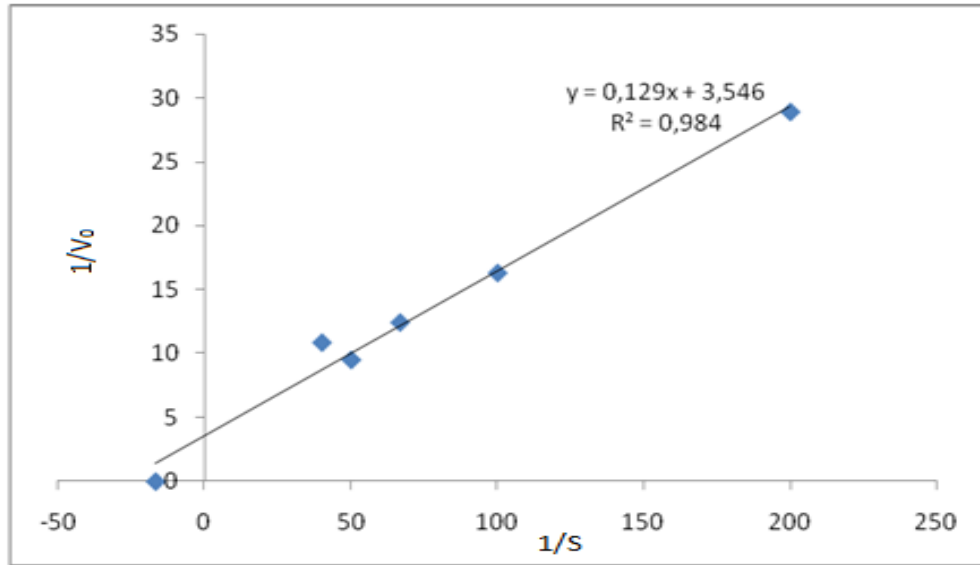
5.5.3 İmmobilize Enzim Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri, immobilize enzimlerin serbest enzimden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olurlar. O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerinin tayini oldukça önemlidir. Substrat konsantrasyonunun etkisi de immobilize enzim kinetiğini etkileyen önemli parametrelerden biridir.



Şekil 5.21 PEG 6000 içeren kitosan boncuklara immobilize pullulanazın K_m ve V_{max} grafiği

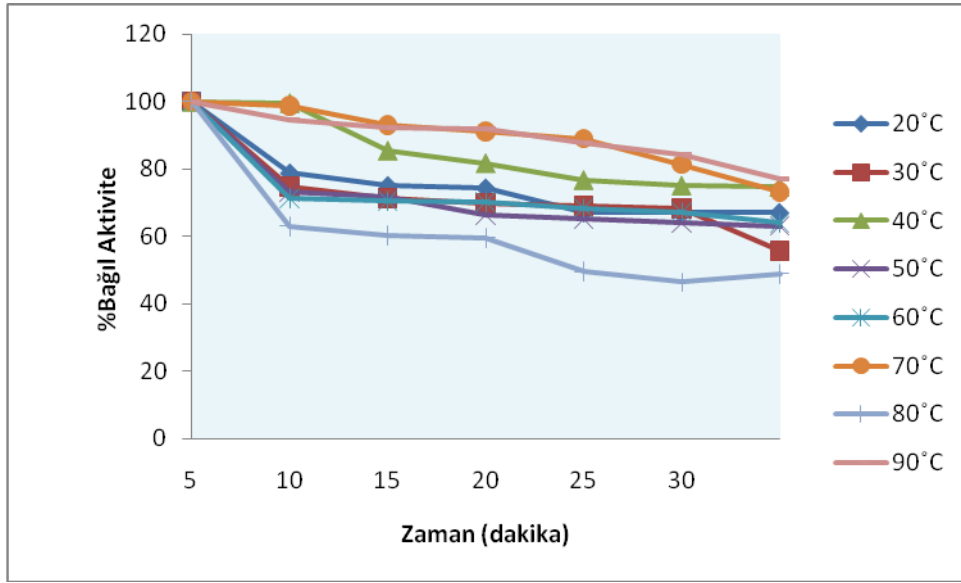
Şekil 5.21 ve Şekil 5.22'deki grafiklerde substrat konsantrasyonunun immobilize pullulanaz üzerine etkisi gösterildi. (2:8) PEG 6000- kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın $1/S$ ye karşı $1/V_0$ grafiğinden K_m değeri 0,0184 mg glu./ml , V_{max} değeri ise 0,2499 U/ml bulundu. Yine aynı şekilde (2:8) PEG 6000-kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın $1/S$ 'ye karşı $1/V_0$ grafiğinden K_m değeri 0,0595 mg glu./ml, V_{max} değeri 0,2160 U/ml bulundu. Literatürde serbest haldeki H. jecorina pullulanazının K_m değeri 0,0129 mg glu/ml, V_{max} değeri 0,512 U/ml olarak belirtilmiştir.



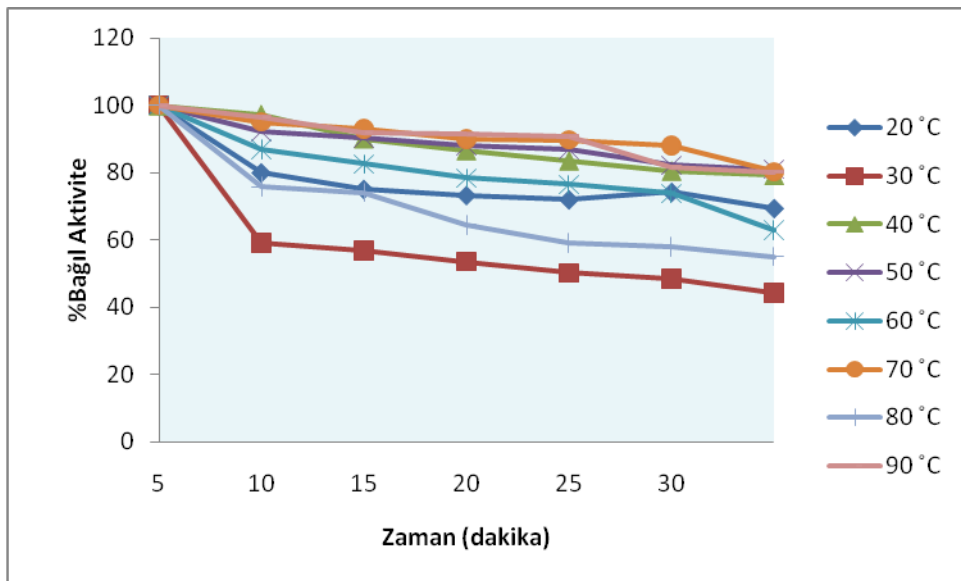
Şekil 5.22 PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın K_m ve V_{max} grafiği

5.5.4 İmmobilize Enzimin Termal Kararlılığı

(2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklar ile (2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara immobilize pullulanazın termal kararlılığının incelenmesi için immobilize boncukların, her metod için ayrı ayrı, 20-90°C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilen örneklerinin spesifik aktivite değerlerine bakıldı. En yüksek çıkan değer % 100 kabul edilerek bu değere göre bağıl aktiviteleri hesaplandı. Serbest pullulanazın termal kararlılığı 40-70°C aralığı arasında bulunmuştur. Yine 90°C'de aktivitesinin % 43'ünü kaybettiği görülmüştür. [29].



Şekil 5.23 (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın termal kararlılığı



Şekil 5.24 (2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın termal kararlılığı

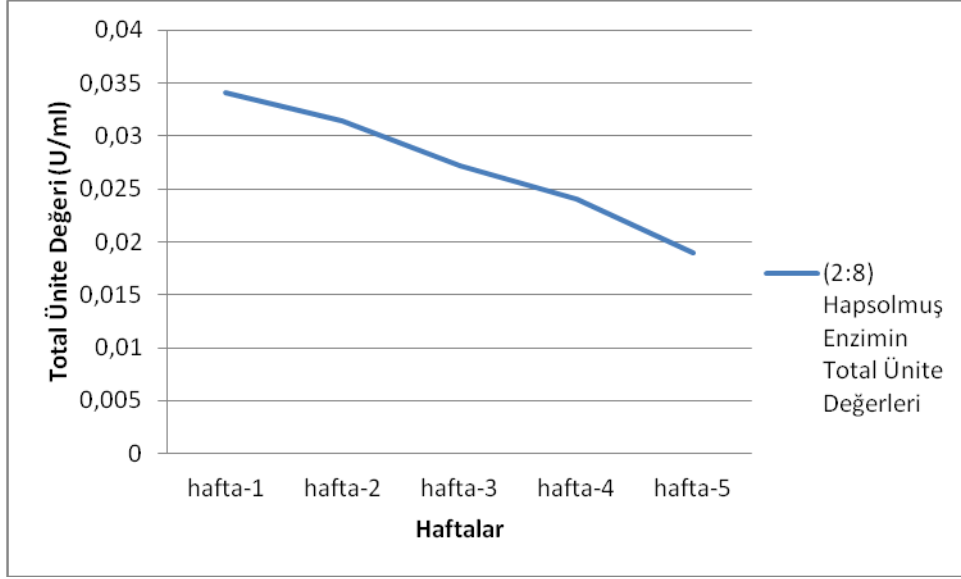
Şekil 5.23 ve Şekil 5.24'te görüldüğü gibi (2:8) PEG içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın termal kararlılığı artan sıcaklıkla fazla aktivite kaybetmemekle birlikte en iyi kararlılığı 70 ve 90°C'de, (2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın ise 70°C'de gösterdiği görüldü. Grafik incelendiğinde; PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe enzimin 70°C'de stabilitesi izlenirken 10. dakikadaki aktivitenin % 95,06'sını koruduğu, 30. dakikaya gelindiğinde ise aktivitenin % 80,29'a düştüğü görüldü. PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş enzimin 70°C'de inkübasyonda 10. dakikada aktivitesinin % 98,81'ni koruduğu, 30. dakikaya gelindiğinde aktivitenin % 73,23'e düştüğü gözlemlendi. Yine her iki metod dikkate alındığında; adsorbe pullulanazın 90°C'da aktivitesinin % 19,71'ini kaybederken, hapsolmuş pullulanaz aynı sıcaklıkta aktivitesinin % 22,98'ini kaybetmiştir. Serbest pullulanazın aynı sıcaklıktaki aktivite kaybından, immobilize enzimin daha az aktivite kaybı gözlemlendiğinden immobilize pullulanazın serbest olana nazaran daha termostabil olduğu söylenebilir.

5.5.5 (2:8) PEG 6000 İçeren Kitosan Boncuklar ve (2:8) PEG Kaplı Kitosan Boncukların Boyutlarının Hesaplanması

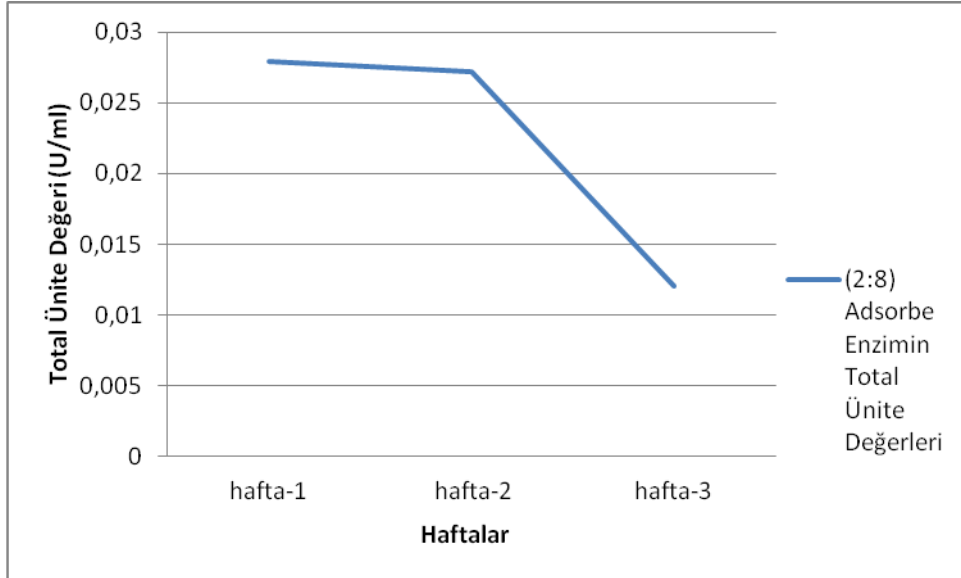
Hazırladığımız pullulanaz tutuklanmış (2:8) PEG 6000 içeren kitosan boncuklar ile pullulanaz adsorbsiyonu yapılmış PEG kaplı kitosan boncukların bilinen belirli sayıları su konulmuş 5 ml'lik mezürün içerisine atıldı. Hacimde oluşan farklılıktan yararlanılarak yarıçapları hesaplandı. Bir tane boncuğun hacimde yaptığı değişiklik 0,02 ml olarak ölçüldü. Metod kısmında verilen denklemde (4.2) yerine konularak bir boncuğun yarıçapı (r) 0,168 cm, çapı da 0,336 cm olarak hesaplandı. Yine bir tane boncuğun yaklaşık ağırlığı 30,1 mg olarak tartıldı. ($\pi= 3,14$)

5.5.6 İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

İmmobilize boncukların her ikisinin de enzim aktiviteleri baz alınarak yapılan çalışma sonunda ne sürede aktif kalabildikleri incelendi. Sonuç olarak; elde edilen verilerden yararlanılarak kararlılık grafikleri (Şekil 5.25 ve Şekil 5.26) çizildi.



Şekil 5.25 (2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın depo kararlılığı



Şekil 5.26 (2:8) PEG kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın depo kararlılığı

Haftalar sonunda yapılan değerlendirmeye göre; pullulanazın hapsedme metoduna göre immobilize edildiği yöntemde, enzimin aktif olarak daha uzun süre çalıştığı ve aktivite kaybının doğrusal bir azalma gösterdiği görüldü. Bunun yanında adsorbe pullulanazın ise; daha az aktif olarak kaldığı ve ikinci haftadan sonra hızla aktivitesinin kaybolduğu gözlemlendi.

5.6 Tartışma

Pullulanaz, nişasta ve pullulan gibi maddelerin α -1,6 glikozidik bağlarına etki eden bir enzimdir; nişastayı hidroliz ederek nişastadan glukoz ve maltoz eldesi verimini artırır; bu yüzden nişasta endüstrisinde kullanılan önemli bir enzimdir [2].

Hypocrea jecorina küf mantarından kısmi saflaştırılmış pullulanazın literatürde immobilizasyonu ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan elde edilen pullulanazın immobilizasyonu çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmada *H. jecorina* pullulanazının farklı materyallere immobilizasyonu denendi ve en uygun yöntem belirlendi. Belirlenen iki immobilizasyon yöntemi; PEG 6000 içeren kitosan boncuklara tutuklama (hapsetme) ve PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara pullulanaz adsorbsiyonudur.

PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın optimum pH'sı 8 bulundu. Optimum pH'sındaki total ünite değeri 0,0381 U/ml; spesifik aktivite değeri 0,0759 U/mg olarak hesaplandı. PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe pullulanazın optimum pH'sı ise 7 bulundu. Optimum pH'sındaki total ünite değeri 0,0363 U/ml; spesifik aktivite değeri 0,0732 U/mg olarak hesaplandı. Serbest *Hypocrea jecorina* pullulanazın optimum pH'sının 6,5 olduğu literatürde belirtilmiştir. Bu sonuca göre immobilize *Hypocrea jecorina* pullulanazının optimum pH'sının serbest formuna göre daha bazik olduğu belirlendi.

Optimum sıcaklıkların belirlenmesi çalışmasında; PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş pullulanazın opt. sıcaklığı 50°C bulundu. Bu sıcaklıktaki total ünite değeri 0,0350 U/ml, spesifik aktivite değeri 0,0993 U/mg olarak hesaplandı. Adsorbe pullulanazın ise optimum sıcaklığı 70°C bulundu. Optimum sıcaklıkta total ünite değeri 0,0377 U/ml; spesifik aktivite değeri 0,0790 U/mg olarak hesaplandı. Serbest enzimin optimum sıcaklık aralığı literatürde 35-65°C olarak belirtilmiştir. Adsorbe pullulanazın optimum sıcaklığı, serbest pullulanazın optimum sıcaklık aralığından daha yüksek bulundu. Bu durum immobilize *Hypocrea jecorina* pullulanazının sıcaklıkla denatürasyona daha dayanıklı olduğunu gösterdi.

PEG 6000 içeren kitosan boncuklara hapsolmuş *H. jecorina* pullulanazının amilopektin konsantrasyonuna ilgisi incelendiğinde; K_m değeri 0,0184 mg glukoz/ml bulunurken, V_{max} değeri 0,2499 U/ml olarak hesaplandı. PEG 6000 kaplı kitosan boncuklara adsorbe

enzimin amilopektin konsantrasyonuna ilgisi ise, $K_m=0,0595$ mg glukoz/ml; $V_{max}= 0,2160$ U/ml olarak belirlendi.

İmmobilizasyon sonunda pullulanazın 30 dakikalık inkübasyon süresince aktivitesindeki değişimi incelendiğinde; hapsolmuş enzimin termal kararlılığının 70°C ve 90°C’de yüksek olduğu bulundu. Adsorbe pullulanazın termal kararlılığı 70°C olarak belirlendi. Serbest pullulanazın termal kararlılığı literatürde 40-80°C aralığında belirtilmiştir. [29]. 90°C’de serbest pullulanaz aktivitesinin % 43’ünü kaybederken; hapsolmuş pullulanaz aynı sıcaklıkta aktivitesinin % 22,99’unu, adsorbe pullulanaz ise % 19,71’ini kaybetmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda; pullulanazın immobilize formunun serbest enzim formuna göre daha termostabil olduğu gözlemlendi.

PEG 6000 içeren kitosan boncuklar ve PEG 6000 kaplı kitosan boncukların boyutlarına bakıldığında; bir boncuğun yaklaşık 0,336 cm çapında ve 30,1 mg ağırlığında olduğu belirlendi.

Çizelge 5.10’de; poli (akrilamid-akrilik asit) reçinesi, agaroz, manyetik kitosan boncuk ve aktif agar jel gibi materyaller üzerine immobilize edilmiş ve kinetik özellikleri belirlenmiş pullulanaz ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Immobilize pullulanazın bu çalışmalarda optimum sıcaklığının 30-50 °C, optimum pH’sının 4-6 değerleri arasında belirlendiği görülmüştür [10,20,34,50].

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; *Hypocrea jecorina*’dan kısmi saflaştırılan pullulanazın immobilizasyonunun enzimin termal kararlılığı bakımından serbest enzime göre yüksek sıcaklıklarda aktivitesini daha uzun süre koruduğu görüldü. Endüstride nişasta sakarifikasyonunda *H. jecorina* termostabil pullulanazı kullanılarak uygulama süresi kısalmaktadır. Bunun sonucunda da işlem maliyeti en aza indirilecektir. *Hypocrea jecorina* pullulanazının immobilize formu endüstri için yeni bir enzim kaynağıdır.

Çizelge 5.10 Pullulanaz immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar

ÇALIŞMANIN ADI	TAŞIYICI VE ENZİM	SONUÇLAR	REF.
Pullulanaz ve β -amilaz ko-immobilizasyonu kullanılarak Sakarifikasyon zamanının azaltılması ve matoz veriminin artırılması	Poli (akrilamid-akrilik asit) reçinesi üzerine pullulanaz ve β -amilaz (10:0,75) immobilizasyonu	2,39 mg/ml protein bağlanmış; spesifik aktivitesi 6,7 mmol maltoz/min. bulunmuş; optimum pH 4 ve optimum sıc. 30°C	[50]
Doğal ve sentetik polimerlere pullulanaz immobilizasyonu	Epiklorohidrin ve triklorotriazin ile aktive edilmiş agaroz, epiklorohidrin ile aktive edilmiş kazein içeren bütül akrilat-akrilik asit kopolimerine pullulanaz immobilizasyonu	Agaroz- epiklorohidrin: 1,916 mg/g; agaroz- triklorotriazin: 1,921 mg/g; kazein-epiklorohidrin: 1,872 mg/g protein bağlanmış; hepsinin spesifik aktivitesi 8 U/g; opimum sıcaklığı 35°C; opt. pH 4.	[20]
Pullulanaz immobilizasyonu için manyetik kitosan boncuklarının fotokimyasal hazırlanması	Fe ₃ O ₄ yardımıyla UV varlığında oluşturulan manyetik kitosan boncukların pullulanaz üzerine çapraz bağlama ile immobilizasyonu	3,89 mg/ml protein bağlanmış: spesifik aktivitesi 180 μ g/ml, optimum pH 5 (serbest enzim pH 5,5) ve optimum sıcaklık 50°C	[34]
Çoklu bağlama metodu ile aktive edilmiş agar jel kullanılarak <i>Klebsiella pneumoniae</i> den indüklenmiş pullulanazın immobilizasyonu ve stabilizasyonu	Aktif agar jel yüzeyindeki aldehit gruplarına kovalent bağlama ile immobilizasyon	Spesifik aktivite 5,61 U/g, optimum sıcaklık 50°C optimum pH 6	[10]
Pullulanazın farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi	<i>H. jecorina</i> 'dan indüklenmiş pullulanazın PEG 6000-Kitosan boncuklara adsorbsiyonu ve hapsedilmesi	Hapsolmuş pullulanaz: sp. akt. 0,0432 U/mg, opt. sıcaklık 50°C, opt. pH 8, Adsorbe pullulanaz: sp. akt. 0,0488 U/mg opt. Sıcaklık 70°C, opt. pH 7	Tez

KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., (1997). Enzimoloji, Yüksek Lisans Yaz Okulu Ders Notları, Kuşadası, Aydın.
- [2] Akan, A., (2011). *Aspergillus niger*'de Pullulanaz İndüksiyonu ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [3] Celal Bayar Üniversitesi, Enzim Teknolojisi, www.bayar.edu.tr/gida/unite/enzim.teknolojisi.doc, 30 Haziran 2011.
- [4] Matthias G. Steiger, Marika Vitikainen, Pekka Uskonen, Kurt Brunner, Gerhard Adam, Tiina Pakula, Merja Penttilä, Markku Saloheimo, Robert L. Mach, ve Astrid R. Mach-Aigner "Transformation System for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) That Favors Homologous Integration and Employs Reusable Bidirectionally Selectable Markers"
- [5] Matzke J., Hermann A., Schneider E. ve Schwartz M., (2000). "Gene Cloning, Nucleotide Sequence and Biochemical Properties of Acytoplasmic Cyclomaltodextrinase (Neopullulanase) from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, Reclassification of A Group Enzymes", FEMS Microbiol Lett. 183, 55.
- [6] Kuriki T. ve Imanaka T., (1999). "The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism", J. Biosci. Bioeng. 87, 557.
- [7] Aiyer, P.V., (2005). "Amylases and Their Applications", African Journal of Biotechnology, 4:1525-1529.
- [8] Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi ve M., Mollania, N., (2009). "Purification and Characterization of A Novel Amylopullulanase that Converts Pullulan to Glucose, Maltose and Maltotriose and Starch to Glucose and Maltose", Enzyme And Microbial Technology, 46:57–63.
- [9] Bertoldo C. ve Antranikian G., (2003). "Starch –Hydrolyzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria" Current Opinion in Chemical Biology, 6:151-160.
- [10] Kuroiwa, T., Shoda, H., Ichikawa, S., Sato, S. ve Mukatak, S., (2004). "Immobilization and Stabilization of Pullulanase from *Klebsiella Pnömiania*

- by a Multipoint Attachment Method Using Activated Agar Gel Supports", *Process Biochemistry*, 40:2637-2642.
- [11] Kıran ve Çömlekçioğlu, (2003). "Zeytin Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi", *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2):41.
- [12] Batum, M., (1997). Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 14
- [13] Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B., (2003). "Microbial α -Amylases: A Biotechnological Perspective" *Enzyme and Technology*, 38:1599.
- [14] Çınar, E., (2007). İnek Sütünden İzole Edilen *Bacillus sp.*' den Pullulanaz ve α -Amilaz Enzimlerinin Üretimi, Bu Enzimlerin Bazı Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- [15] DiArk A Resource for Eucaryotic Genome Research, *H. jecorina*, http://www.diark.org/diark/species_list_Hypocrea_jecorina_QM6a , 12 Temmuz 2011.
- [16] Rens Search Rensselaer Libraries, Immobilized Enzymes, <http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immobil.html>, 7 Ağustos 2011.
- [17] Aehle, W., (2004). *Enzymes in Industry Production and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
- [18] Lizbon Teknik Üniversitesi, Enzim İmmobilizasyonu, <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immobil.html>, 2004.
- [19] Worsfold, P.J., (1995). "Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes", *Pure& Appl. Chem*, 67(4), 597-600.
- [20] Atia, K.S., Issa, G.I. ve Dessouki, A.M., (2001). "Pullulanase Immobilization on Natural and Synthetic Polymers", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 700-706.
- [21] Tokaloğlu, Ş., (1997). Sultansazlığı Su ve Sediment Örneklerinde Metal Türlemesi ve Faktör Analizi, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [22] Uhlig, H., (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley & Sons, USA.
- [23] Krajewska, B., (2003). "Application of Chitin -and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review", *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126-139.
- [24] Bickerstaff, G.F., (1997). *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, USA.
- [25] Gözükar, E.M., (1997). *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri*, Ankara.

- [26] Uludağ, Y.B., (2000). İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- [27] Kırkköprü, İ. ve Alpaslan, S.C., (2004). Proteaz Enziminin Degisik Tasıyıcılarda İmmobilizasyonu, Bitirme Tezi, İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- [28] Vijayalakshmi, R., Kanthimathi, M., Parthasarathi, R., ve Nair, B.U., (2006). "Interaction of Chromium(III) Complex of Chiral Binaphthyl Tetradentate Ligand with DNA", *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 14:3300-3306.
- [29] Orhan N., (2011). *Hypocrea jecorina* QM9414'den pullulanazın saflaştırılması, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [30] Miller, G.L., (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry*, 31:426.
- [31] Altınışik, M., (2011). Glukozun Yükseltgenmesi, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/sunularim.htm> , 5 Temmuz 2011.
- [32] Asia Chemical Materials and Products, Glass Beads, <http://www.asia.ru/en/ProductInfo/483796.html> , 3 Ağustos 2011.
- [33] Brazilian Journal of Chemical Engineering, Amberlit Reçinesi, http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010466322007000100002&script=sci_ar_ttext , 5 Ağustos 2011.
- [34] Zhang, L., Zhu, X., Zheng, S. ve Sun, H. (2009). "Photochemical Preparation of Magnetic Chitosan Beads for Immobilization of Pullulanase", *Biochemical Engineering Journal*, 46:83-87.
- [35] Manrich, A., Galvao, C., Jesus, C., Giordana, R. ve Giordana, R.C. (2008). "Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports", *International Journal of Biological Macromolecules*, 43:54-61.
- [36] Tripathi, P., (2007). "Immobilization of α -amylase from mung bean (Vigna radiata) on amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study", *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 49:69-74.
- [37] Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ., (2007). *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, İstanbul.
- [38] Dağaşan, L., (1997). Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U) Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Bölüm 15.
- [39] Telefoncu, A., (1995). *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [40] Krajewska, B., (2004). "Application of Chitin- and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review", *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126-139.
- [41] Kasavi, C., (2006). Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [42] Alptekin, Ö., (2009). Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- [43] Özçömlekçi, E., (2006). Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [44] Taşdelen, Ç., (2006). Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metotları ile İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [45] Demir, A., Seventekin, N., (2009). "Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları" Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2:92-103.
- [46] Sökmen, B.B., (2005). Kayısı (*Armeniaca vulvaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- [47] Coşkun, G., (2007). Glutatifon-s-transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir.
- [48] Goldstein, L., (1973). "Immobilized Enzymes. Synthesis of A New Type of Polyanionic and Polycationic Resins and Their Utilization for The Preparation of Water-İnsoluble Enzyme Derivatives", *Biochimica et Biophysica Acta*, 315,1:1-17.
- [49] Bradford, M.M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- [50] Atia, K.S., Ismail, S.A., El-Arnaouty, M.B. ve Dessouki, A.M., (2003). "Use of Co-Immobilized β -Amylase and Pullulanase in Reduction of Saccharification Time of Starch and Increase in Maltose Yield", *Biotechnology Programme*, 19:853-857.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Canda ULUTÜRK
Doğum Tarihi ve Yeri :29.05.1986
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :canda.uluturk@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya	Uludağ Üniversitesi	2008
Lise	Fen-Matematik	Bahçelievler Lisesi	2003