

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOĞAL BİR TAŞIYICI PLATFORM OLARAK
YUMURTA KABUĞU MEMBRANINA
 β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU
VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELEN KIZILDAĞ

MAYIS 2019
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOĞAL BİR TAŞIYICI PLATFORM OLARAK
YUMURTA KABUĞU MEMBRANINA
 β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU
VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELEN KIZILDAĞ

MAYIS 2019

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SELEN KIZILDAĞ tarafından hazırlanan **DOĞAL BİR TAŞIYICI PLATFORM OLARAK YUMURTA KABUĞU MEMBRANINA β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU** başlıklı tezinin, 21/5/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ~~oakluğ~~ ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Mustafa TEKE (Danışman)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

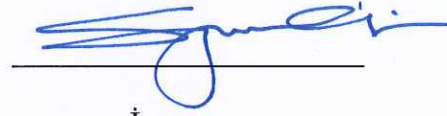
İmza:



Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK(Üye)

Biyomühendislik Bölümü,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale

İmza:



Dr. Öğretim Üyesi Yasemin İ.DOĞAÇ(Üye)

Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

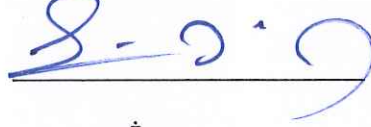


ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. M.Emin DURU (B.Başkan V.)

Kimya Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

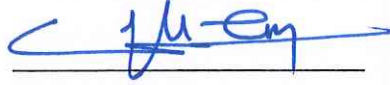
İmza:



Prof. Dr. Mustafa TEKE (Danışman)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 21/5/2019

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Selen KIZILDAğ

21/05/2019

ÖZET

DOĞAL BİR TAŞIYICI PLATFORM OLARAK YUMURTA KABUĞU MEMBRANINA β -GALAKTOZİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Selen KIZILDAĞ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TEKE

Mayıs 2019, 78 sayfa

Enzim immobilizasyonunun stabilite, aktivite ve substrat spesifikliğini artırması yönünden endüstriyel alanda kullanımı önemlidir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanımlarının maliyeti azaltması, reaksiyon ortamında kontrolü sağlandığı için kirlilik yaratmaması, mikro çevre oluşturarak pH ve sıcaklık gibi etkilere karşı dayanıklılık göstermesi bu önemi artırmıştır.

Sunulan bu tez çalışması iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım, yumurta kabuğu membranına β -Galaktozidaz immobilizasyonu, immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyonundan oluşmaktadır. İkinci kısım aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan β -Galaktozidaz immobilize yumurta kabuğu membranı ile hazırlanan doğal membran platformu ile süttten laktoz giderim performansı açısından değerlendirilmesinden oluşmaktadır.

Asidik ve bazik ortam değerlendirmesi yapıldığında; pH 5.5’da immobilize β -Galaktozidazın göreceli aktivitesi %100 iken serbest β -Galaktozidaz aktivitesi aynı pH’ta %63’ tür. Serbest β -Galaktozidaz aktivitesinin maksimum olduğu pH değeri ise 4.5’tir. Serbest β -Galaktozidaz 70°C’de denatüre olurken, immobilize β -Galaktozidaz aynı sıcaklıkta aktivitesini %18,22 olarak korumaktadır. İmmobilize β -Galaktozidaz enziminin tekrar kullanım sayıları 16. tekrara kadar devam etmektedir. 10. kullanımda göreceli aktivitesi %50’nin altına düşmektedir. Serbest β -Galaktozidazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,39 mM ve 5,88 U/mg’dır. β -Galaktozidaz immobilize membranların K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,31 mM ve 6,76 U/mg olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Yumurta Kabuğu Membranı, Enzim, β -Galaktozidaz, İmmobilizasyon

ABSTRACT
IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF β -GALACTOSIDASE
ENZYME ONTO EGGSHELL MEMBRANE AS A NATURAL CARRIER
PLATFORM

Selen KIZILDAĞ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TEKE

May 2019, 78 pages

Enzyme immobilization is important in terms of stability, activity and substrate to use increase specificity in industrial field. Immobilization enzymes reusing help reduce cost, prevent pollution due to gaining control in reaction setting, resist some effects such as pH and temperature by forming micro environment. All these benefits increased the importance of enzyme immobilisation.

This thesis study consists of two parts. The first part consists of β -Galactosidase immobilization in the eggshell membrane, optimization and characterization of immobilization conditions. The second part consists of β -Galactosidase, which is the most suitable for activity and stability, and the natural membrane platform prepared with immobilized eggshell membrane and the evaluation of lactose removal performance from milk.

When acidic and basic environment is evaluated; The relative activity of immobilized β -Galactosidase at pH 5.5 is 100% while the free β -Galactosidase activity is 63% at the same pH. The maximum pH of the free β -Galactosidase activity is pH 4.5. While free β -galactosidase is denatured at 70°C, immobilized β -Galactosidase maintains its activity at the same temperature as 18,22%. The number of re-use of the immobilized β -galactosidase enzyme continues until the 16th repetition. After 10 reuse relative activity in use falls below 50%. K_m and V_{max} values of free β -Galactosidase were 0,39 mM and 5,88 U/mg, respectively. K_m and V_{max} values of β -Galactosidase immobilized membranes were calculated as 0,31 mM and 6,76 U / mg, respectively.

Keywords: Eggshell Membrane, Enzyme, β -Galactosidase, Immobilization

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Teke danışmanlığında yapılarak, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, hoşgörü ve nezaketiyle destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa TEKE'ye şükran ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca bana yol gösteren değerli hocalarım Arş. Gör. Ceyhun IŞIK'a, Dr. Öğr. Üyesi Yasemin İSPİRLİ DOĞAÇ'a ve laboratuvar arkadaşım Gökmen ARABACI'ya teşekkür ederim.

Bugüne kadar bana her türlü desteği veren ve her daim yanımda olan çok kıymetli aileme ve yeğenim Alperen KABLANOĞLU'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İV
ABSTRACT	V
ÖNSÖZ.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Biyomateryal	4
2.2. Yumurta.....	5
2.3. Enzimler	10
2.3.1. Enzimlerin kaynakları	11
2.3.2. Enzimlerin sınıflandırılması	12
2.3.3. Enzim kinetiği	12
2.3.4. Enzim inhibisyonu.....	15
2.3.5. Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörler	17
2.3.5.1. pH'ın enzimatik reaksiyon hızına etkisi.....	17
2.3.5.2. Sıcaklığın enzimatik reaksiyon hızına etkisi	17
2.3.5.3. Substrat derişiminin enzimatik reaksiyon hızına etkisi.....	18
2.3.5.4. Enzim derişimlerinin enzimatik reaksiyon hızına etkisi	18
2.3.5.5. Reaksiyon süresinin enzimatik reaksiyon hızına etkisi	19
2.3.5.6. Fiziksel etmenlerin enzimatik reaksiyon hızına etkisi.....	19
2.3.5.7. Aktivatör ve inhibitörlerin enzimatik reaksiyon hızına etkisi	19
2.3.6 Enzimlerin kullanım alanları	19
2.3.7. Enzim immobilizasyonu.....	20
2.3.7.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	22
2.3.7.1.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri.....	22
2.3.7.1.2. Adsorpsiyon	23
2.3.7.1.3. İyonik bağlama	24

2.3.7.1.4. Şelat bağlama	24
2.3.7.1.5. Biyospesifik bağlama	24
2.3.7.1.6. Kovalent bağlama	24
2.3.8. Laktoz	25
2.3.9. β -Galaktozidaz	28
2.3.9.1. β -Galaktozidaz enziminin reaksiyon mekanizması	29
2.3.9.1.1. Laktoz hidroliz mekanizması	30
2.3.9.2. β -Galaktozidazın kullanım alanları	31
3. MATERİYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	32
3.1.2. Kullanılan cihazlar	32
3.2. Deneysel Bölüm	33
3.2.1. Taramalı elektron mikroskopu (Scanning electron microscopy-SEM)	33
3.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy-FTIR)	33
3.3. β -Galaktozidaz Aktivite Tayini	33
3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	34
3.5. İmmobilizasyon İşleminde Taşıyıcı Olarak Kullanılacak YKM'nin Hazırlanması	35
3.6. YKM'ye β -Galaktozidaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu	36
3.6.1. Taşıyıcı miktarının belirlenmesi	36
3.6.2. β -Galaktozidaz miktarının belirlenmesi	36
3.6.3. Adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	37
3.6.4. Glutaraldehit (GA) derişiminin belirlenmesi	37
3.7. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonunun karakterizasyonu	37
3.7.1. Optimum sıcaklık	38
3.7.2. Optimum pH	38
3.7.3. Termal kararlılık	39
3.7.4. pH kararlılığı	39
3.7.5. Tekrar kullanılabilirlik	39
3.7.6. Kinetik sabitlerin belirlenmesi	40
3.7.7. β -Galaktozidaz immobilize membranlarla süttten laktoz gideriminin araştırılması	40
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR	41
4.1. SEM Analizi	42

4.2. FTIR Analizi.....	43
4.3. YKM'ye β -Galaktozidaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu.....	44
4.3.1. YKM miktarı	45
4.3.2. β -Galaktozidaz miktarı	46
4.3.3. Adsorpsiyon süresi	47
4.3.4. Glutaraldehit (GA) miktarı.....	48
4.4. YKM'ye β -Galaktozidaz İmmobilizasyonunun Karakterizasyonu	48
4.4.1. Optimum sıcaklık	49
4.4.2. Optimum pH.....	50
4.4.3. pH kararlılığı	52
4.4.4. Termal kararlılık.....	53
4.4.5. Tekrar kullanılabilirlik	55
4.4.6. Kinetik parametreler.....	57
4.5. YKM'ye İmmobilize β -Galaktozidaz Enziminin Karbohidrat Dönüşüm Reaksiyonları Amacıyla Kullanılması	59
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. YKM'nin aminoasit içeriği	9
Çizelge 2.2. Çeşitli enzimlerin endüstride kullanım alanları	20
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	25
Çizelge 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin kendi arasında kıyaslanması	25
Çizelge 2.5. β -Galaktozidaz enziminin bulunduğu kaynaklar	29
Çizelge 3.1. Bradford protein tayini yöntemi.....	35
Çizelge 4.1. Serbest β -Galaktozidaz ve immobilize β -Galaktozidazın immobilizasyonunun optimizasyonu sonrası aktivite özellikleri.....	44
Çizelge 4.2. Immobilize ve serbest β -Galaktozidaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri	58
Çizelge 4.3. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyon süresinin optimizasyonu ile ilgili HPLC diyagramlarının hesaplamaları	59
Çizelge 4.4. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyonunda kullanılan YKM miktarı ile ilgili HPLC diyagramlarının hesaplamaları	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyomateryallerin sınıflandırılması	4
Şekil 2.2. Yumurta ve yumurta kabuk yapısı	6
Şekil 2.3. Yumurta kabuğunun kesit görünümü	6
Şekil 2.4. YKM'nin iç ve dış zar yapılarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüsü.....	7
Şekil 2.5. YKM katmanlarının SEM görüntüsü.....	8
Şekil 2.6. Enzim-substrat ilişkisinde anahtar-kilit modelinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.7. Enzim-substrat ilişkisinde uyarılmış uyum modelinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.8. Michaelis-Menten grafiği	14
Şekil 2.9. Lineweaver-Burk grafiği.....	14
Şekil 2.10. Enzimin inhibitör ile etkileşimi	15
Şekil 2.11. pH'ın reaksiyon etkisi	17
Şekil 2.12. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi	18
Şekil 2.13. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	18
Şekil 2.14. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	19
Şekil 2.15. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	22
Şekil 2.16. Taşıyıcılı immobilizasyon yöntemleri	23
Şekil 2.17. Laktozun kimyasal yapısı	25
Şekil 2.18. Laktozun normal ve laktoz intolerant kişilerde bağırsak bölgesinde sindirilmesi.....	27
Şekil 2.19. β -Galaktozidazın laktozu galaktoz ve glukoza hidrolizinin şematik gösterimi.....	28
Şekil 2.20. β -Galaktozidaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	29
Şekil. 2.21. Laktozun hidroliz reaksiyonu	30
Şekil 2.22. β -Galaktozidaz ile laktoz hidrolizi.....	31
Şekil 3.1. o-nitrofenol kalibrasyon grafiği	34
Şekil 3.2. Protein tayini kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 4.1. Ham YKM'nin SEM görüntüsü.....	42

Şekil 4.2. β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrası YKM'nin SEM görüntüleri.....	42
Şekil 4.3. Ham YKM ve immobilize YKM'ye ait ATR-FTIR Spektrumları	44
Şekil 4.4. YKM'lere β -Galaktozidaz enzimi immobilizasyonu için uygun YKM miktarının belirlenmesi	45
Şekil 4.5. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu için optimum enzim derişiminin belirlenmesi.....	46
Şekil 4.6. YKM'ye β -Galaktozidaz enzimi immobilizasyonu için uygun adsorpsiyon süresinin belirlenmesi	47
Şekil 4.7. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu için uygun glutaraldehit miktarının belirlenmesi	48
Şekil 4.8. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri	49
Şekil 4.9. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri	51
Şekil 4.10. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri	52
Şekil 4.11. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında 50°C termal kararlılık eğrileri	53
Şekil 4.12. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında 60°C termal kararlılık eğrileri	54
Şekil 4.13. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında 70°C termal kararlılık eğrileri	54
Şekil 4.14. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım sayısı.....	55
Şekil 4.15. İmmobilize β -Galaktozidazın 9. tekrar kullanımı sonrası YKM'nin SEM görüntüleri.....	56
Şekil 4.16. İmmobilize β -Galaktozidazın 16. tekrar kullanımı sonrası YKM'nin SEM görüntüleri.....	57
Şekil 4.17. YKM'ye serbest β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında kinetik Lineweaver-Burk doğrusu.....	57
Şekil 4.18. YKM'ye immobilize β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında immobilize enzimin kinetik Lineweaver-Burk doğrusu	58
Şekil 4.19. Standart HPLC kromatogramları.....	60

Şekil 4.20. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyon süresi ile ilgili HPLC diyagramları	61
Şekil 4.21. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyonunda kullanılan YKM miktarının optimizasyonu ile ilgili HPLC diyagramları	63



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Dk	Dakika
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GA	Glutaraldehit
g	Gram
$V_{\max}$	Maksimum hız
K_m	Michaelis-Menten sabiti
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV-VIS	Ultraviyole visible
YKM	Yumurta kabuğu membranı
%	Yüzde

1.GİRİŞ

Dünyada her yıl yaklaşık olarak 10 trilyon yumurta tüketilmektedir. Yumurtanın tüketimi sonrası oluşan yumurta kabuğu ve yumurta kabuğu membranı uzun yıllar atık olarak düşünülmüş ve göz ardı edilmiştir. Ancak, son yıllarda yumurtalardan elde edilen atıkların işlenmesi araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Yumurta kabuğu membranı, yumurta kabuğu ile yumurta beyazı arasında bulunan protein bakımından zengin, lifli ve doğal bir biyomateryal zardır. Yumurta kabuğu membranı temel olarak proteinlerden oluşmakla birlikte karbohidratlar, lipitler ve minerallerde içermektedir. Bu doğal biyomateryal membran platformu, yüksek yapısal dayanıma, geniş yüzey alanına, gözenekli yapıya sahiptir. Sahip olduğu bu eşsiz kimyasal ve yapısal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda iyi bir taşıyıcı olarak ön plana çıkmıştır.

Süt şekeri olarak bilinen laktoz, süt ve süt ürünlerinde bulunan ve tek doğal kaynağı süt olan bir karbohidrattır. Süt ve süt ürünleri ile birlikte alınan laktoz, organizmada monosakkaritleri olan glukoz ve galaktoza parçalanır. Bazı kişilerin vücutlarında β -Galaktozidaz aktivitesinin yetersiz kalmasına ya da hiç olmamasına laktoz intoleransı denilmektedir. Bu durum laktozun monosakkaritlerine metabolize olmasına izin vermemektedir. Hidrolize olamayan laktozun yoğunluğu artmakta ve sonuçta bağırsakta yüksek osmotik basınç oluşmaktadır. Bu basınç, bağırsak boşluklarına su akımına yol açmakta; kişide şişkinlik, bağırsakta gaz toplanması ve kramplara neden olmaktadır. Bu kişilerin laktoz içermeyen diyetler yapmaları ya da laktozsuz gıdaları tüketmeleri gerekmektedir. Bu nedenle yeni gıda ürünlerinin geliştirilebilmesi açısından laktozun hidrolizi büyük önem taşımaktadır. Laktozun hidrolizlenmesinde asidik ve enzimatik yöntem olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Asit ile hidrolizde, asit çözeltisi ya da asidik iyon değiştirici reçineler kullanılarak 150°C ve pH 1-2'de hidrolizlenme gerçekleştirilir. Reaksiyon çok hızlı gerçekleşir. Ancak, hidrolizlenmenin çok yüksek sıcaklıklarda olması dolayısıyla asitler, proteinler ve yağlar arasında oluşan ikincil reaksiyonlar, koku ve aromada oluşan yaygın değişimler, süt içeriğindeki besin değerlerinin azalması gibi nedenlerden dolayı

hidrolizlenme yetersiz olmaktadır. Herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın elde edilen son ürünlerin bozulmadan kalması ve besin içeriğinde herhangi bir kayıp olmaması nedeni ile enzimatik hidrolizlenme teknik açıdan daha uygundur. Ayrıca, sıcaklık ve pH gibi reaksiyon koşullarının daha elverişli olması, proseste enerji ve madde maliyetlerini azaltmaktadır. Bu nedenle süt endüstrisinde sütte bulunan laktozun giderimi için enzimatik yöntem tercih edilmektedir.

Endüstride kullanılan enzimlerin hemen hemen hepsi sulu çözeltilerde aktivite göstermektedir. Bu nedenle çözelti ortamında bulunan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden ortamdaki uzaklaştırılması veya geri kazanılması imkansızdır. Serbest enzim kullanılan proseslerde çözelti ortamından enzimin istenildiği zaman çekilmesi mümkün olmadığı için reaksiyonu kontrol etmek de mümkün değildir. Reaksiyonu durdurarak kontrol altına almak için ortama inhibitör katılabilir ancak bu durum da serbest enzim tarafından kirletilmiş olan ürüne fazladan kirlilik ekleyecektir. Ortamdaki bu kirliliklerin uzaklaştırılması üretim maliyetlerini artırır. Ayrıca serbest enzimin ortamdaki uzaklaştırılıp tekrar kullanımı mümkün olmadığından maliyeti yüksek katalizörler için bir dezavantaj oluşur. Endüstride sürekli sistemler kullanılmaktadır. Serbest enzimlerin sürekli sistemlerde kullanımı mümkün değildir. Bu sorunların önüne geçmek amacı ile enzim immobilizasyonu çalışmaları popüler hale gelmiştir. Immobilizasyon, suda çözünen biyomolekölün, suda çözünmeyen reaktif bir polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak; suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak, polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılmasıdır.

Bu tez çalışmasında, β -Galaktozidaz enzimi membran yapılı doğal bir polimer olan yumurta kabuğu membranına immobilize edilerek oluşturulacak membran platformlar kullanılarak sütteki laktozun giderilmesi için alternatif, ekonomik ve kolay bir yöntem sunulmaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda, β -Galaktozidaz enzimi doğal bir polimer olan yumurta kabuğu membranına immobilize edildi ve immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve devamında karakterizasyon çalışmaları yapıldı. β -Galaktozidaz immobilizasyonunun optimizasyonu için yumurta kabuğu membranı miktarı, adsorpsiyon süresi, β -Galaktozidaz miktarı ve glutaraldehit miktarı temel parametreler olarak araştırıldı. Karakterizasyon çalışmalarında ise, optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri

araştırıldı. Serbest β -Galaktozidaz enzimi içinde karakterizasyon çalışmaları yapıldı ve immobilize form ile karşılaştırıldı. Ayrıca yumurta kabuğu membranı ve β -Galaktozidaz immobilize yumurta kabuğu membranı için SEM ve FTIR analizleri yapılarak her iki form için morfolojik yapı analizleri ve bağlanma karakterizasyon çalışmaları da gerçekleştirildi. İkinci kısımda ise, aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan β -Galaktozidaz immobilize yumurta kabuğu membranı ile hazırlanan doğal membran platformu ile süttten laktoz giderim performansı incelendi.

Bu çalışmada, laktoz giderimi için alternatif bir doğal membran platform modeli önerilmiştir. Bu doğal membran platform modeli ile başarılı bir şekilde süttten laktoz giderimi gerçekleştirilmiştir. Sütte bulunan laktozun hidrolizi ile birlikte, laktoz intoleransı olan kişiler için laktozsuz süt üretimi başta olmak üzere diğer süt ürünlerinin üretim proseslerinin geliştirilmesi ile yeni gıda katkılarının elde edilmesini, üretim maliyetlerinin düşmesini ve laktozun kristalli yapısından kaynaklanan kumsu dokunun engellenmesini sağlaması açısından özellikle gıda endüstrisi için son derece uygun bir model olabileceği düşünölmektedir.

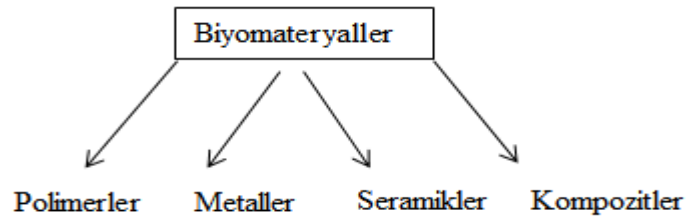
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyomateryal

Biyomateryal, vücudun zarar gören ya da işlevini yitiren doku ve organların işlevlerini kısmi veya tamamen yerine getirmek üzere tasarlanmış doğal veya yapay olan, vücut ile biyouyumlu maddelerdir (Tüylek, 2017).

Biyouyumluluk, “vücut ile uyuşabilir” anlamında olup bir biyomateryalin canlı vücudunda istenilen ilk özelliğidir. Biyouyumlu bir materyal doku, organ ve sistemlere zarar vermez, onlarla istenmeyen tepkiler göstermez (Mutlu ve Kurt, 2005).

Biyomateryaller; hastalıklı veya hasar görmüş kısımların yerine, iyileşmeye yardımcı olmak, fonksiyonelliği artırmak, kozmetik problemleri düzeltmek, tedaviye yardımcı olmak, teşhise yardımcı olmak, fonksiyon bozukluklarını düzeltmek için kullanılır (Güven, 2014). Biyomateryaller 4 ana grupta sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2.1. Biyomateryallerin sınıflandırılması

Polimerler, çok sayıda monomerin birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak oluşturduğu makromoleküllerdir. Polimerler, bileşiklerin kaynağına göre doğal ve sentetik polimerler olmak üzere ikiye ayrılır.

Yapay şekilde sentezlenen polimerlere sentetik polimer denir (Herdman, 1993). Endüstriyel alanda sentetik polimerlere polietilen (PE), polipropilen (PP),

polivinilklorür (PVC), polistiren (PS), naylon ve sentetik kauçuklar örnek olarak verilebilirler (Pişkin, 1987).

Sentetik polimerler üretilip kullanılmadan önce doğal polimerler gereksinimleri gidermekteydi (Tüylek, 2017). Üretilen ilk sentetik polimerler doğal polimerlere alternatif oluşturmak amacıyla sentezlenmiştir. Du Pont firmasının doğal kauçuk ve ipeği örnek alarak sentetik kauçuk ve sentetik ipek üretmesi bu duruma örnektir.

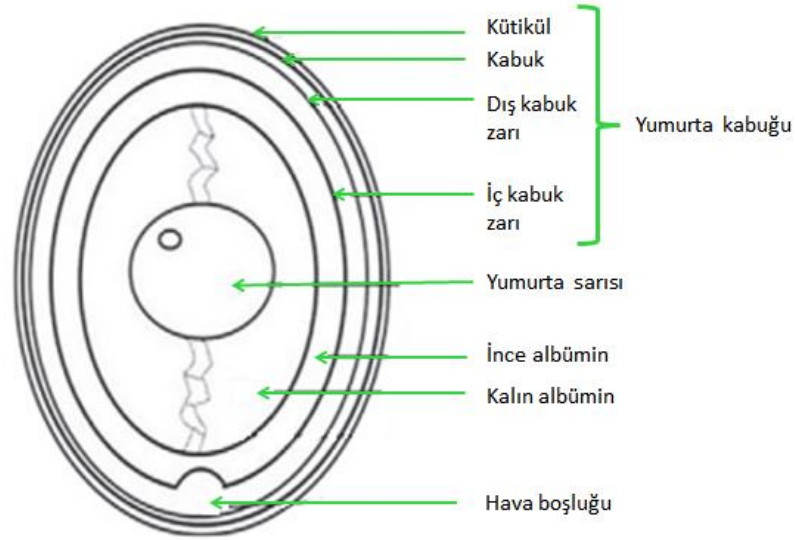
Doğadan elde edilen veya canlı organizmalar tarafından üretilen polimerlere doğal polimer denir (Fessenden vd., 2001). Polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin, vb), proteinler (kollajen, jelatin, elastin, aktin, vb) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) doğal polimerlere örnek gösterilebilir. Ayrıca membran yapılı doğal polimer olarak yumurta zarı, soğan zarı, ipek, istiridye kabuğu örnek verilebilir.

Doğal polimerler biyolojik ortamdaki makromoleküller ile yüksek oranda benzerliklere sahip oldukları, canlı vücuduyla temas ettiklerinde zehir etkisi ve iltihaplanma gibi istenmeyen tepkimeleri vermedikleri için biyomateryallerin vazgeçilmez kaynaklarıdır (Lakshmi vd., 2007).

2.2. Yumurta

Yumurta, yeterli ve dengeli beslenme için gereksinim duyulan tüm esansiyel besin maddelerini içeren, her zaman sevilerek tüketilen bir gıdadır. Hayvansal ürünler içerisinde en iyi protein kalitesine sahip olan yumurta A, D, E, K ve B grubu vitaminlerce, demir ve fosfor gibi mineral maddelerce zengindir (Stadelman vd., 1988).

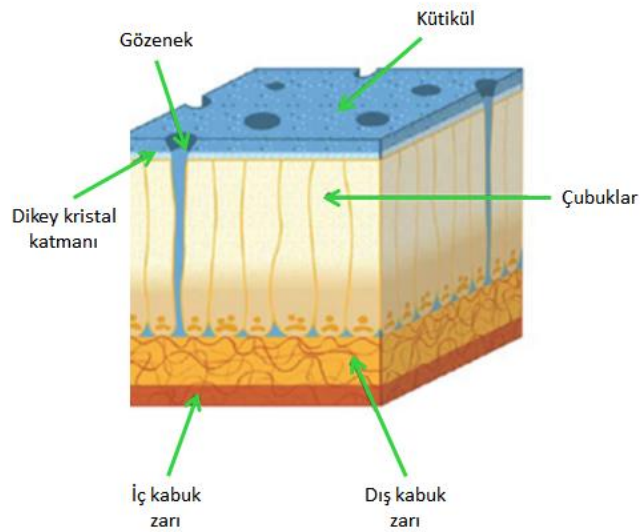
Yumurta temel olarak kabuk, kabuk membranı, yumurta beyazı ve yumurta sarısı olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Şekil 2.2’de yumurtanın yapısı görülmektedir. Yumurtanın yararlılığı esas olarak sıvı haldeki yumurta beyazı ve sarısında bulunan protein ve besinlerden kaynaklanırken, katı koruyucu kabuk ve kabuk membranı genellikle atık olarak değerlendirilir (Mittal vd., 2016).



Şekil 2.2. Yumurta ve yumurta kabuk yapısı (Mittal vd., 2016)

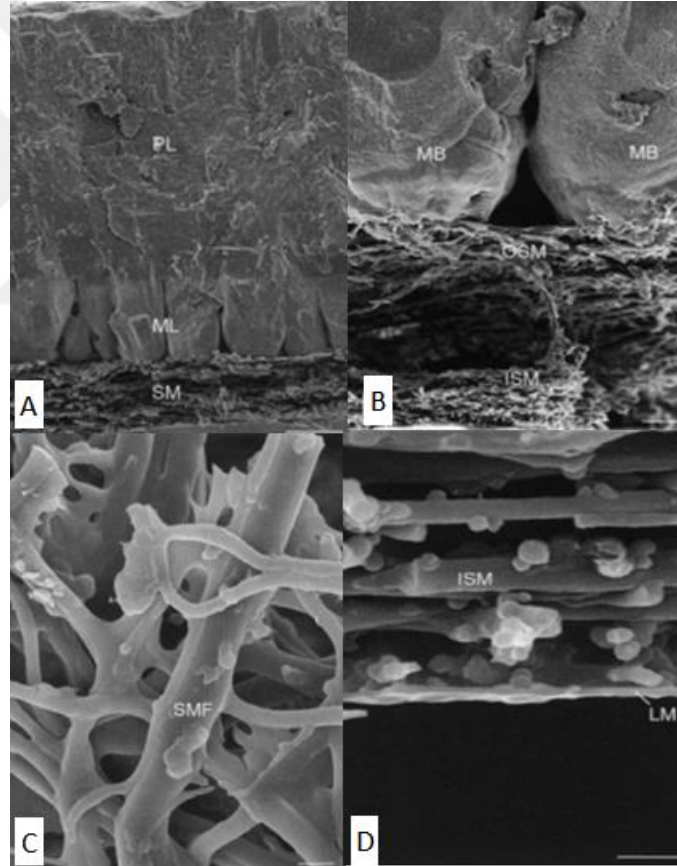
Yumurta kabuğu, yumurtanın toplam ağırlığının %9-12'lik kısmını oluşturmaktadır (Hassan, 2015). Yumurta kabuğu, kabuk ağırlığının %96'sını oluşturan kalsiyum karbonat kristalleri, %1 oranında magnezyum karbonat, %1 oranında kalsiyum fosfat, organik bileşenler ve suya bağlı protein iplikleri ağlarından oluşmuştur. Kalsiyum karbonat kristalleri kabuğun temel bileşenini oluşturmaktadır (Oliveira vd., 2013).

Yumurta kabuğu membranı (YKM) ise iç zar, dış zar ve membran sınırlayıcı zar olmak üzere üç katmandan oluşur (Devi vd., 2012; Ponkham vd., 2011). Şekil 2.3.'te yumurta kabuğunun kesit görünümü gösterilmiştir.



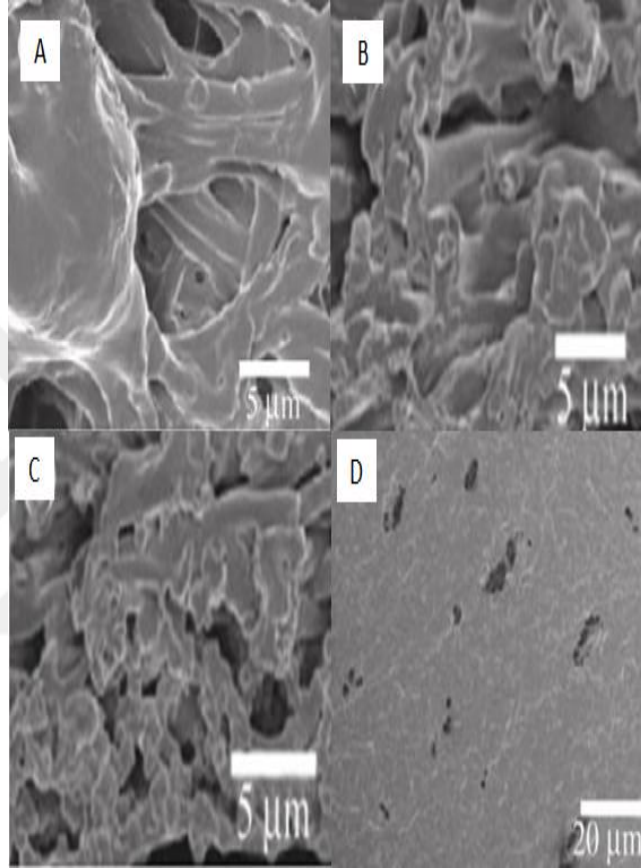
Şekil 2.3. Yumurta kabuğunun kesit görünümü (Hincke vd., 2012)

YKM; albumin ve yumurta kabuğu iç yüzeyini sınırlayan zar arasında bulunur (Nakano vd., 2003; Tsai vd., 2006; Rose ve Hincke, 2009). İç ve dış zarlarının yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kanıtlanmış olup Şekil 2.4.'te gösterilmektedir (Hincke vd., 2000). SEM görüntüleri, dış katmanların kalınlığının tipik olarak 50-70 μm olduğunu ve iç katmandaki kalınlığın 15-30 μm olduğunu göstermektedir (Liong vd.,1997). Bu katmanların her ikisi de çapları 0.1-7 μm aralığında olan iç içe geçmiş liflerin dolaşmış yapılarına sahiptir (Yang vd., 2002). Özellikle liflerin dış tabakasının çapları 1 ile 7 μm arasında değişirken, liflerin iç tabakasının çapları 0.1 ile 3 μm arasında değişir (Bellairs ve Boyde, 1969; Liong vd., 1997). İç katmanlar dış katmanlardan daha yoğun bir şekilde paketlenir (Chai vd., 2013) ve lifler arasındaki boşluklar oldukça gözeneklidir. Lifler arasındaki gözenek boyutu yaklaşık 5 μm olup, hem gaz hem de su geçişini sağlar (Yang vd., 2002).



Şekil 2.4. YKM'nin iç ve dış zar yapılarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüsü [(A) Yumurta kabuğu ve yumurta kabuğu membranının kesit görüntüsü (memeliler tabaka; ML palisade tabakası; PL yumurta kabuğu membranı; SM); (B) YKM arayüzünün daha yüksek büyütülmüş görüntüsü (memeli bedenler; MB, dış; OSM, iç YKM, ISM); (C) Kabuk membran liflerinin (SMF) SEM görüntüsü; (D) İç YKM'nin (ISM) SEM görüntüsü. Sınırlayıcı membran (LM) altında ISM ve yumurta beyazını çevreliyor] (Hincke, 2000)

Genel olarak, kabuk membran lifleri yumurtanın yüzeyinde katmanlar halinde düzenlenmiştir (Bellairs ve Boyde, 1969). Bu katmanlar lifin konumu, yönü ve boyutundaki değişiklikler ile ayırt edilebilir (Liong vd., 1997). Dış yüzeyde, fiberlerin birleşmesiyle oluşan daha fazla boğum varken; YKM'nin iç yüzeyi çok daha pürüzsüzdür ve iç membran dıştan daha kompakt bir yapıdadır (Zhou vd., 2011). Bu morfolojik özellikler Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. YKM katmanlarının SEM görüntüsü [(A) Dış yüzeyde bulunan boğumların SEM görüntüsü (B) Dış YKM'nin SEM görüntüsü; (C) İç YKM'nin SEM görüntüsü; (D) Pürüzsüz iç yüzeyin SEM görüntüsü] (Zhou vd., 2011)

Bileşenlerin çeşitliliği göz önüne alındığında dış ve iç tabakalarda benzerlik söz konusudur (Nakano vd., 2003). Her iki tabakanın lifleri tip I, V, X kollajen, osteopontin, sialoprotein (Wong vd., 1984; Arias vd., 1991; Fernandez vd., 1997) ve sakkaritler de dahil olmak üzere az miktarda karbohidrattan oluşur (Baker ve Balch 1962; Nys vd., 2001).

YKM; temel protein yapısından dolayı amino, karboksil ve hidroksil grupları gibi çeşitli kimyasal gruplara sahiptir (Liu vd., 2004). Çizelge 2.1.'de YKM' nin aminoasit içeriği gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. YKM'nin aminoasit içeriği (Leach vd., 1981)

Aminoasit	%
Lizin	3,37
Histidin	3,30
Arjinin	5,45
Aspartik asit	7,45
Treonin	5,67
Serin	6,00
Glutamik asit	9,69
Prolin	11,92
Glisin	9,67
Alanin	4,01
Sistin/Sisteik asit	10,31
Valin	7,90
Metiyonin	3,04
İzolösin	3,57
Lösin	4,78
Tirosin	1,40
Fenilalanin	1,47
OH-Prolin	0,89
OH-Lösin	0,10

YKM'nin sahip olduğu kimyasal grupların yapıya kazandırdığı işlevsellik nedeniyle birçok avantaja sahiptir ve endüstride yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. YKM'nin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Evsel atık olduğu için tedarik edilmesi kolaydır.
- Çevreyle dost olup, toksik etkisi bulunmamaktadır.
- Maliyeti düşüktür.
- Kullanıma hazırdır.
- Yüksek stabilite sağlar.

YKM, sahip olduğu benzersiz kimyasal ve yapısal özellikleri nedeniyle pek çok alanda farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar göz önüne alındığında yarı iletkenler ve yakıt hücreleri, sensörler, piller, kondansatörler, güneş panelleri, sensörler, çevre mühendisliği ve biyomedikal mühendisliği alanlarında kullanılmıştır. Bu çalışmalardan özellikle biyomedikal mühendisliği alanında yapılan çalışmalar çok dikkat çekicidir. Özellikle bu alanda yapılan çalışmalarda YKM; biyomalzeme, ağrı, eklem sertliği, bağ dokusu bozuklukları için etkili tedavi yöntemi geliştirilmesi, yara-yanık tedavisinde ve enzim immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanılmıştır (Park vd., 2016; Yu vd. 2012).

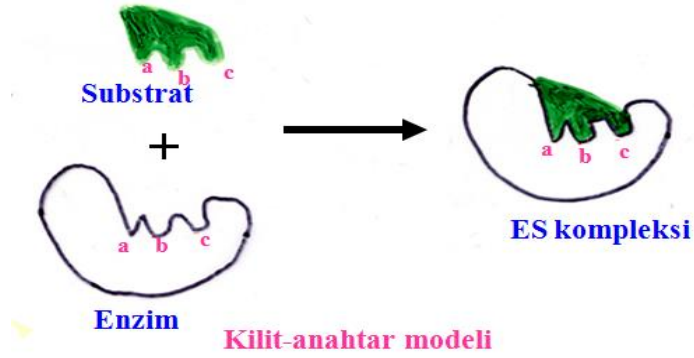
2.3. Enzimler

Enzimler, yapay ve doğal ortamlarda birçok tepkimeyi katalizleyen (Bailey ve Ollis, 1986), kendisi reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen, canlı organizmalar tarafından üretilen protein molekülleridir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Enzimlerin etkileyerek değişikliğe uğrattığı moleküle substrat denir (Yücel, 2008). Enzimler protein yapısında olmasına rağmen pek çok durumda bu protein yapısına protein olmayan daha küçük yapıları organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş protein yapısı gözlenir. Bu yapıda enzimin protein kısmına apoenzim, protein olmayan kısmına koenzim denir. Koenzim, enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu tayin ederken; apoenzim ise hangi substrata etki edeceğini tayin eder (Tekman ve Öner 1994). Koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda enzimin gerçek aktivitesi gözlenir (Leblebici, 1999). Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde sadece belirli aminoasitlerin oluşturduğu bir bölge vardır. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu olup “aktif bölge” olarak tanımlanmaktadır (Boyacı, 2001). Aktif bölgede dipolar, elektrostatik, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları oluşur. Fonksiyonel grupları içeren aminoasitlerin yan zincirleri glutamat, aspartat, lizin, histidin, arginin, serin, treonin, trozin ve sistein dizilerinin karboksi, amino, imidazol, hidroksi ve tiol grupları ile kimyasal katalizi gerçekleştirir. Bu fonksiyonel gruplar enzim ile substrat arasında elektrostatik etkileşmeyi sağlar, hidrojen bağları oluşturur ve bu şekilde asit-baz, nükleofilik, elektrofilik katalizi meydana getirir (Frey ve Hegeman, 2007).

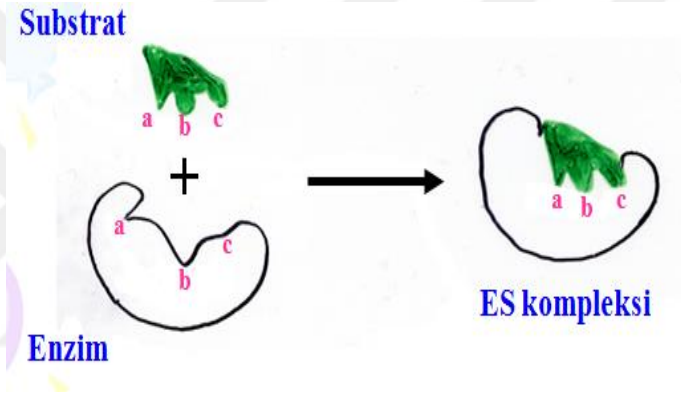
Aktif bölge, enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturan üç boyutlu bir yapıdır. Bu üç boyutlu yapı enzimin lineer yapısının değişik noktalarında bulunan grupların bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Aktif bölgeler bir yarı ve girinti içinde yer alırlar. Yapısı incelenmiş olan bütün enzimlerde substrat molekülleri suyun girmediği çukur bölgelere bağlanır. Spesifik bir bağlanma, atomların aktif bölgede belirli tarzda düzenlenmeleri sonucu mümkün olur. Substrat bu bölgeye tam oturabilecek şekle sahip olmalıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 2011).

Enzimin substrata bağlanma olayı iki ayrı modelle açıklanır. Bunlar anahtar kilit modeli ve uyarılmış uyum modelidir. Anahtar kilit modelinde, enzimin aktif merkezi substratın yapısına birebir uyumludur. Uyarılmış uyum modelinde ise enzimin aktif merkezi, enzim ile substrat arasında mesafe olduğu durumlarda substrata benzerlik

göstermez. Enzim substrat arası mesafe azaldıkça enzimin aktif merkezi substratın şeklini alır (Aybastier, 2010).



Şekil 2.6. Enzim-substrat ilişkisinde anahtar-kilit modelinin şematik gösterimi (Anonim, 2018a)



Şekil 2.7. Enzim-substrat ilişkisinde uyarılmış uyum modelinin şematik gösterimi (Anonim, 2018a)

2.3.1. Enzimlerin kaynakları

Endüstride kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ya da mikroorganizma kaynaklıdır.

Hayvansal kaynaklı enzimler; genellikle yumurta akı, domuz midesi, pankreas, geviş getiren hayvanların sindirim sistemi gibi yenilebilen organlardan izole edilmektedir.

Bitkisel kaynaklı enzimler; toksik etki yapmayan, yenmesi durumunda bir zararı olmayan bitkilerden elde edilmektedir (John, 1987).

Mikrobiyal kaynaklı enzimler; toksik ve patojen olmayan mikroorganizmalar tarafından üretilirler (Demain ve Solomon 1981).

2.3.2. Enzimlerin sınıflandırılması

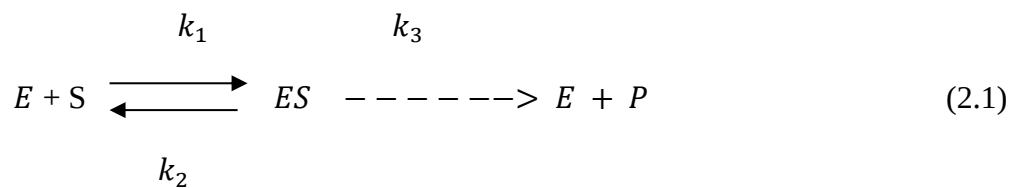
Enzimler gösterdikleri katalizleme özelliklerine göre 6 temel sınıfta incelenir (Telefoncu vd., 1997).

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleridir. Bu gruptaki enzimler yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler.
2. Transferazlar: Grup transfer reaksiyonlarını katalizlerler. P, C, N taşıyan bir fonksiyonel grup donörden bir akseptöre taşınır.
3. Hidrolazlar: Bir mol su katılmasıyla bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: Bir molekülden bir grubun ayrılarak çift bağ oluşturduğu ya da çift bağ içeren moleküllere başka grupların bağlanmasıyla bağın ortadan kalktığı reaksiyonları katalizlerler.
5. İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yapan ve onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.
6. Ligazlar: Enerji kullanılarak yüksek enerjili fosfat bağı içeren bileşiklerden fosfat bağının koparılmasını sağlayan enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2011).

2.3.3. Enzim kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerler. Enzim kinetiği, katalizli reaksiyonların hızlarını ve hızlarını etkileyen faktörleri inceler. Reaksiyonda ilk olarak enzim ile substrat arasında kararsız bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşiğin oluşma hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Enzim reaksiyonlarının kinetiğini açıklamak için kabul edilen genel teori Michaelis-Menten teorisidir. Bu teoriye göre;

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce “Enzim-Substrat kompleksi” oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve tekrar enzime dönüşür. Enzim kinetiği mekanizması denklem 2.1’de gösterilmektedir.



k_1, k_2 ve k_3 : reaksiyonun hız sabitleri

Burada enzim-substrat kompleksi [ES]; enzim [E] ve substrat [S]'dan k_1 hız sabiti ile oluşur. Bu reaksiyonun hızlı ve tersinir olduğu, kimyasal bir değişim olmadan enzim ile substratın bir arada fiziksel kuvvetler yardımıyla bulundukları kabul edilir. Daha sonra [ES] kompleksi, k_1 hız sabitli geri reaksiyonla ve k_2 hız sabiti ile ürün ve enzime ayrışır. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca “Kararlı Durum İlkesine” göre [ES]'nin oluşma hızı ayrışma hızına eşit olur, yani derişimi zamanla değişmez.

Serbest bir hızla (k_{-1}), (ES) kompleksi yeniden enzim ve substrata dönüşebilir . Ya da k_2 sabit hızıyla ürün (P) oluşur ve enzimde serbest kalarak ilk haline dönüşebilir (Nelson ve Cox, 2004). Denklem 2.2 ve 2.3' te gösterilmektedir.

$$ES_{\text{oluşum hızı}} = k_1[E][S] \quad (2.2)$$

$$ES_{\text{yıkım hızı}} = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.3)$$

Bu yaklaşımda; substrat derişimi enzim derişiminden fazladır. Bu şekilde de enzime bağlı olan substrat miktarı ihmal edilmektedir. Reaksiyonun denge anında enzim-substrat kompleksinin oluşum ve yıkılım hızları birbirine eşittir. Reaksiyon denge durumunu (Oluşum hızı = yıkılım hızı) denklem 2.4 ve 2.5'te incelersek;

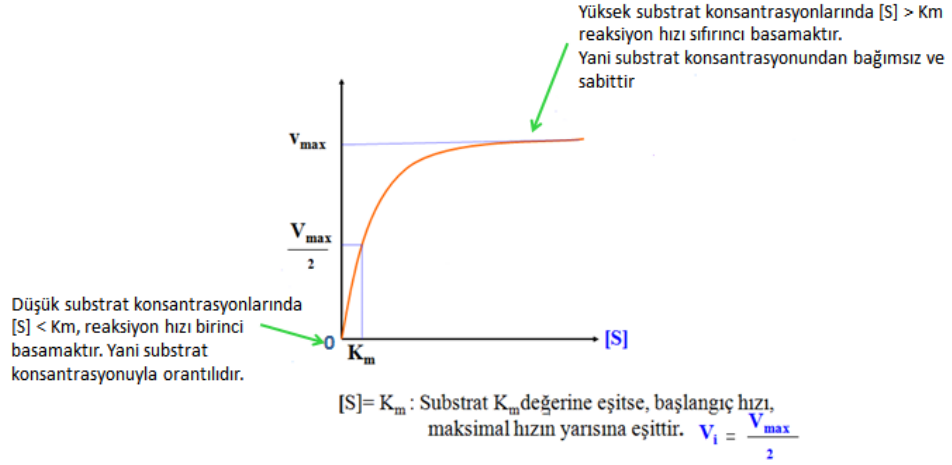
$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.4)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{k_2 + k_3 / k_1} \quad (2.5)$$

Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir.

V_{max} maksimum hız olarak belirtilir. Ortamda bulunan enzim substrat ile tamamen doyduğu anda V_{max} 'a ulaşılmaktadır. Maksimum hızın yarısına ($V_{\text{max}}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m , bir enzimin aktivitesini belirleyen özgün enzim sabitleridir. K_m 'si düşük olan enzimler substratına yüksek ilgi, K_m 'si büyük olanlar ise substratına düşük ilgi göstermektedir. K_m değerinin birimi ise mol/L olarak ifade edilmekte olup denklem 2.6'da gösterilmektedir.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.6)$$



Şekil 2.8. Michaelis-Menten grafiği

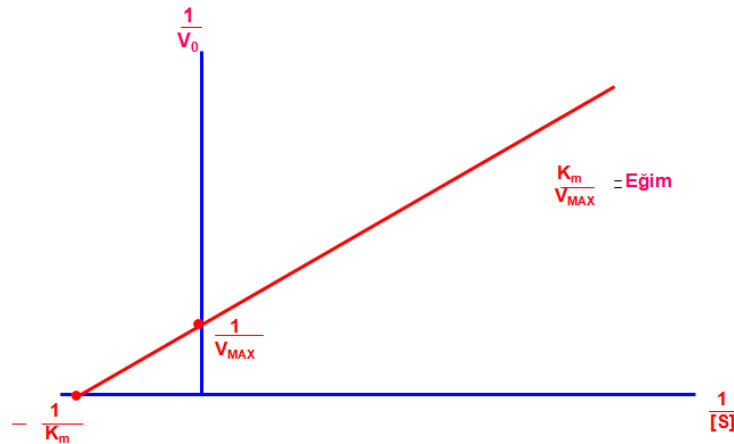
Belirli bir andaki enzim katalizinin hızı Michaelis-Menten eşitliği ile bulunur. Bu eşitlik grafik eğrisinin denkleminde oluşturulur. Denklem 2.7’de gösterimi mevcuttur.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (2.7)$$

Belirli bir andaki kataliz hızı dışında, enzim inhibitörlerinin etki reaksiyonlarının saptanmasında da yine bu eşitlik kullanılabilir. Michaelis-Menten eşitliği, Lineweaver-Burk yöntemiyle birleştirilirse denklem 2.8’de gösterildiği gibi;

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.8)$$

Lineweaver-Burk çift-resiprok Eğrisi



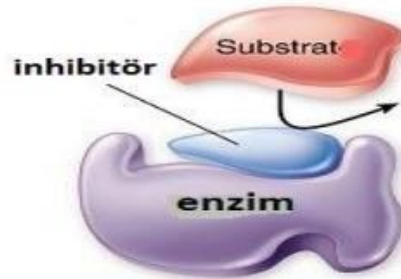
Şekil 2.9. Lineweaver-Burk grafiği

Denklemini ortaya çıkar. $1/[S]$ ile $1/V_o$ arasında bir grafik çizersek denklemimizin oluşturduğu doğru y eksenini $1/V_{max}$ 'tan, x eksenini ise $-1/K_m$ 'den kestiği ortaya çıkar. Çok sayıda veri ve yüksek substrat derişimleri için bu yöntemin kullanılmasının daha avantajlı olması bilinmektedir.

K_m değerin bilinmesi; enzimlerin saflaştırılmasında, enzim inhibitörün belirlenmesinde, ilaç imalatında ve dokulardaki enzim aktivitesinin saptanmasında yarar sağlamaktadır.

2.3.4. Enzim inhibisyonu

Enzim etkinliğini yavaşlatan ya da durduran bileşiklere inhibitör denir. İnhibitörlerin enzimin aktif merkezine girerek substratın bu bölgeye bağlanmasını engellemesine veya aktif merkez dışında bir bölgeye bağlanıp enzim konformasyonunu değiştirerek enzimin reaksiyon hızının azaltılmasına inhibisyon denir (Özata ve Kutlu, 2000). Enzimin inhibitör ile etkileşimi Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Enzimin inhibitör ile etkileşimi (Özevci, 2012)

Enzim inhibisyonu tersinir ve tersinmez olmak üzere iki genel gruba ayrılır. Tersinir inhibisyonunda kendi arasında yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve karışık inhibitörler olarak dörde ayrılır.

Tersinir (geri dönüşümlü) inhibitör; enzime zayıf bağlarla bağlanan ve bağlanmadan sonra kolayca enzimden ayrılabilen inhibitörlerdir. Derişimleri düşürüldüğü zaman enzimlerden ayrılma eğilimi gösterirler ve enzim aktivite düzeyi normale döner. Tersinir inhibitörler enzime bağlandıkları yere göre üçe ayrılır.

Yarışmalı (rekabetçi, competitive) inhibitör; substratın bağlanacağı aktif bölge için yarışan ve yapı olarak substrata benzeyen inhibitörlerdir. Bu inhibitör aktif bölgeye

bağlanıp substrat molekülünün enzime bağlanmasını engelleyerek K_m 'yi artırarak reaksiyon hızını düşürürler. Ortama yüksek derişimde substrat eklenerek bu inhibisyon türü ortadan kaldırılabilir.

Yarışmasız (rekabetçi olmayan, non competitive) inhibitör; enzimin aktif bölgesinin dışında bir yere bağlanarak aktif kısımda konformasyonel değişikliğe sebep olan inhibitörlerdir. Konformasyonel değişiklik sonucu enzimin substrata karşı affinitesi düşerek ürün oluşumu engellenir. Tepkime ortamında enzim-substrat-inhibitör yapısı oluştuğunda V_{max} düşer ve bu da K_m 'yi artırır.

Yarı yarışmalı inhibitör ise direkt olarak enzime bağlanmayıp ES kompleksine bağlanır. Oluşan EIS kompleksinin yapısı bozulur ve inaktif duruma geçer. EIS kompleksi ortamda devamlı bulunmaktadır. ES kompleksinin ortamdan uzaklaşması V_{max} değerinin azalmasına neden olur. ES kompleksinin miktarının azalması da K_m değerinin düşmesine neden olur (Lehninger, 2005).

Karışık (uncompetitive) inhibitör; enzim substrat kompleksine bağlanan inhibitörlerdir. Burada inhibitör genel olarak hem K_m 'yi hem de V_{max} 'ı etkiler. V_{max} 'daki düşüş tepkime hızının azalmasını K_m 'deki düşüşten daha fazla etkilemektedir.

Tersinmez (geri dönüşümsüz) inhibitör; ilk olarak aktif bölgeye bağlanıp ardından aktif bölgede kovalent bağ oluşturmak için reaksiyona girerler. Aktif bölge, inhibitör tarafından kalıcı olarak inaktif duruma getirilir (Bugg, 1997; Nelson ve Cox, 2005; Topçular, 2006; Kalaycıoğlu vd., 2010).

Ünite enzim; bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı olup; enzim üniteleri U şeklinde gösterilir (İmamoğlu, 2011).

Spesifik aktivite; bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı olup; ünite/mg proteindir (Yücel, 2008).

$$\text{Enzim Ünitesi (EU)} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{L.dk}} \quad (2.9)$$

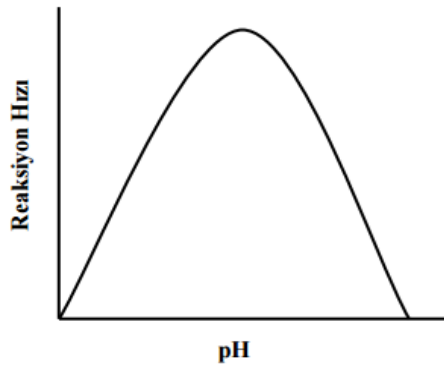
$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{EU}}{\text{mg protein}} \quad (2.10)$$

2.3.5. Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen etmenler; pH, sıcaklık, substrat derişimi, enzim derişimi, reaksiyon süresi, çeşitli fiziksel faktörler, enzim inhibitörleri ve aktivitatörleridir (Işık, 2014).

2.3.5.1. pH'in enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Enzimlerin aktivitesinin maksimum olduğu pH değerine optimum pH denir. Genellikle optimum pH değerinden uzaklaştıkça enzim reaksiyonları yavaşlamakta, aktivite düşmekte, enzim denatüre olmakta veya inaktif hale geçmektedir (Pekin, 1980). pH etkisi enzimlerin yapılarındaki amino asitlerin ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların değişmesinden kaynaklanır. Yüklerdeki bu değişiklikler substratın bağlanmasını ve reaksiyonun gerçekleşme oranını değiştirir. Substrat değıştikçe enzim reaksiyonlarının optimum pH'sı farklılık gösterebilir (Holme ve Peck, 2005)



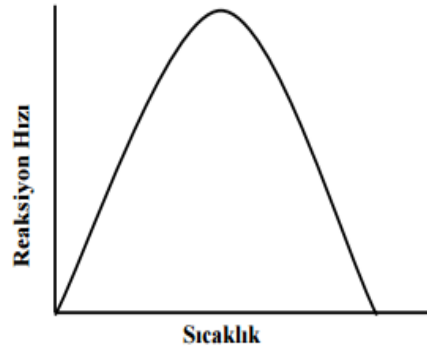
Şekil 2.11. pH'ın reaksiyon etkisi (Denli, 2013)

2.3.5.2. Sıcaklığın enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Belirli bir sıcaklığa kadar olan sıcaklık artışı tepkime hızında artış göstermektedir. Hız ilk başta sıcaklık artışına bağlı olarak artar. Enzimdeki kinetik enerji artışı, enzimin yapısında bulunan zayıf hidrojen ve hidrofobik bağların yıkılmasını sağlayan enerjiyi aşar. Enzimler protein yapısında oldukları için belirli bir sıcaklıktan sonra yapıları bozulmaya başlar, belirli bir süre sonra da enzim tamamen denature olarak aktivitesini yitirir (Murray vd., 2004; Yöntem ve Ünaldı, 2011).

Enzimlerin %100 verimle çalışıp aktivitenin maksimum olduğu sıcaklık değerine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin protein yapılarının farklı olması enzim

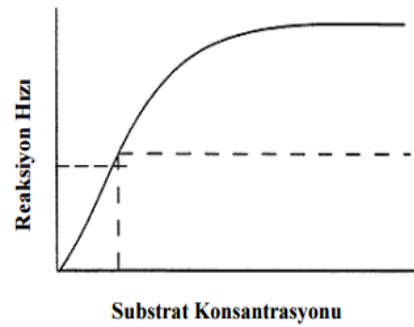
aktiviteleriyle ilgili bir standart oluşturmamaktadır Genel olarak optimum sıcaklık grafiği Şekil 2.12’ de gösterildiği gibidir (Holme ve Peck, 2005).



Şekil 2.12. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi (Denli, 2013)

2.3.5.3. Substrat derişiminin enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Bir tepkimede substrat yüzeyinin artması tepkime hızını artırıcı özellik göstermektedir. Düşük substrat derişimlerinde reaksiyon hızı azalırken, yüksek substrat derişimlerinde reaksiyon hızı artar (Nelson, 2005). Substrat derişimleri belirli bir limite ulaşınca iki ihtimal söz konusudur: Substratı inhibe edici etkisi varsa reaksiyonun yavaşladığı, inhibe edici bir etkisi yoksa substrat derişimleri ne kadar artarsa artsın hızın değişmeden sabit kaldığı gözlemlenmektedir (Pekin, 1980).



Şekil 2.13. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi (Denli, 2013)

2.3.5.4. Enzim derişimlerinin enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Ortamda bulunan enzim miktarı arttıkça, enzimatik reaksiyon hızı da doğru orantılı olarak artmaktadır.



Şekil 2.14. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi (Denli, 2013)

2.3.5.5. Reaksiyon süresinin enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Enzimatik reaksiyonların hızı zamanla düşer. Bunun sebebi oluşan ürünlerin birleşerek ters yönde bir reaksiyon oluşturması, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu, substratın tükenmesi gibi nedenler olabilir (Ası, 1999).

2.3.5.6. Fiziksel etmenlerin enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Kuvvetli çalkalama, bazı ışınlar, basınç, ışık gibi fiziksel faktörler enzimatik aktiviteye etki ederler (Yöntem ve Ünaldı, 2011).

2.3.5.7. Aktivatör ve inhibitörlerin enzimatik reaksiyon hızına etkisi

Bir enzimin etkisini artıran maddelere bu enzimin aktivatörleri denir. Bu aktivatör inorganik iyonlar ve organik gruplardır. Enzimlerin etkinliğini azaltan ya da tamamen bitiren maddelere inhibitör, bu olaya inhibisyon denir. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir (Keha ve Küfrevioglu, 2011).

2.3.6 Enzimlerin kullanım alanları

Enzimlerin kullanım alanları endüstriyel, analitik ve klinik olarak 3 temel başlıkta toplanabilir (Walsh ve Headon, 1994; İspirli, 2008; Körlü ve Altay, 2009).

Endüstriyel enzimler, düşük saflık derecesine sahip kimyasal reaksiyonları gerçekleştirirler ve genelde mikroorganizmalardan üretilirler.

Analitik enzimler, bilimsel çalışma ve tanı kitlerinde kullanılan enzimlerdir. Bu gruptaki enzimlerin saflık dereceleri endüstriyel enzimlerden daha yüksektir.

Klinik enzimler, fizyolojik hastalıkların tanı ve tedavisi amacıyla vücuda alınan enzimlerdir ve saflık dereceleri oldukça yüksektir (Özevci,2012).

Çizelge 2.2’de çeşitli enzimlerin endüstride kullanım alanları verilmektedir.

Çizelge 2.2. Çeşitli enzimlerin endüstride kullanım alanları (Çetin, 1983; Telefoncu,1995)

Enzim	Uygulama Alanları
Laktaz	Laktozu, glukoz ve galaktoza hidrolizler. Gıda sanayisinde, peyiraltı suyunun hidrolizinde ve laktozsuz süt üretiminde kullanılır.
Proteaz	Deterjan, kağıt, deri endüstrilerinde kullanılır. Gıda endüstrisinde ise buğday proteinlerinin modifikasyonunda, etlerin gevrekleştirilmesinde, biralarn berraklaştırılmasında, balık artıklarının değerlendirilmesinde kullanılır.
Selülaz	Tekstil ve deterjan endüstrilerinde, tarımsal artıklardan glukoz üretiminde, sindirimi kolaylaştıran ilaç üretiminde kullanılır.
α -amilaz	Tekstil, gıda, deterjan endüstrilerinde, atık su arıtımında kullanılır.
Lipaz	Deterjan, kağıt, deri endüstrilerinde ve sindirimi kolaylaştıran ilaç üretiminde kullanılır. Gıda endüstrisinde ise yağların hidrolizinde, süt ürünlerinin koku ve tatlarını geliştirmede kullanılır.
Glukoamilaz	Gıda sanayisinde, nişastadan glukoz üretiminde kullanılır.
Glukoz izomeraz	Gıda sanayisinde, şekerleme, çikolata, reçel ve marmelat üretiminde kullanılır.
İntervaz	Gıda sanayisinde, şekerleme, çikolata, reçel, dondurma üretiminde kristallenmeyi önleyici olarak kullanılır.
Keratinaz	Tekstil ve deri sanayisinde kılların deriden ayrılması için kullanılır.
Pektinaz	Meyve suyu üretiminde verimi artırma ve meyve suyunun berraklaştırılmasında kullanılır.
Tripsin ve papain	Etlerin gevrekleştirilmesinde ve biralarn berraklaştırılmasında kullanılır.
Pepsin	Biralarn berraklaştırılmasında, eczacılık alanında kullanılır.
Penisinilaz	Tıp alanında penisilin zehirlenmelerinde kullanılır.
Hemiselülaz	Gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılır.
Pullulanaz	Mısır ve tahıldan yapılan kahvaltılık gıdalarda, içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılır.
Katalaz	Konserve gıdalarda glukoz oksidaz enzimiyle birlikte oksijen çıkarıcı olarak ve sütlerin pastörizasyonunda kullanılır.

2.3.7. Enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon, suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen moleküllerin, suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak bifonksiyonel reaktifler ile çapraz

bağlanarak ve polimer matrikste yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılması olayına denir (İspirli, 2008).

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltielerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden reaksiyon ortamından geri dönüşümleri imkansızdır. Serbest halde bulunan enzimlerin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenildiği anda durdurulması için inhibitör katılması, serbest enzim tarafından kirletilmiş olan ürünlere yeni bir kirlilik unsuru eklenmesine neden olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirliliklerden giderimi ise maliyeti artırır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzim, reaksiyon ortamında aktivitesini kaybedeceği için enzim tekrardan kullanılamaz. Enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları ise maliyeti artıran önemli etmenlerdir (Telefoncu, 1997).

İmmobilize enzimler; çok aşamalı ardışık reaksiyonlar için uygun olup reaksiyon sırasında ürün oluşumu kontrol edilebilir. Çalkalama, karıştırma gibi işlemler (mekanistik) açısından uygundur. Reaksiyonun sonucunda bulunduğu alandan rahatça uzaklaştırılır (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünün enzimler tarafından kirletilmesi gibi sorunlar yaratmazlar. Bazı durumlarda serbest halde bulunan enzimlerden daha yüksek aktivite gösterirler. Tekrar kullanma sayıları fazladır, uzun süreli olarak kullanılabilirler. Çevre şartlarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı dayanıklıdır. Doğal enzimlere göre daha karardır. Enzimlerin kendi kendilerini parçalama olanakları azalır (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon işlemleri enzim üzerinde stres yaratmaktadır. Reaktif gruplarla oluşturulan bağlar, enzimin konformal yapısında değişikliklere neden olarak aktivite kaybı oluşturabilir. İmmobilizasyonun bağlanma bölgesinin enzimin aktif bölgesine olan yakınlığı substratın aktif bölgeye ulaşmasına engel olabilir. Reaktif gruplarla kurulan çoklu bağlar enzimin hareketindeki esnekliği ortadan kaldırmakta ve enzimi tamamen inaktif hale getirebilmektedir (Rodríguez-Alonso vd., 2016).

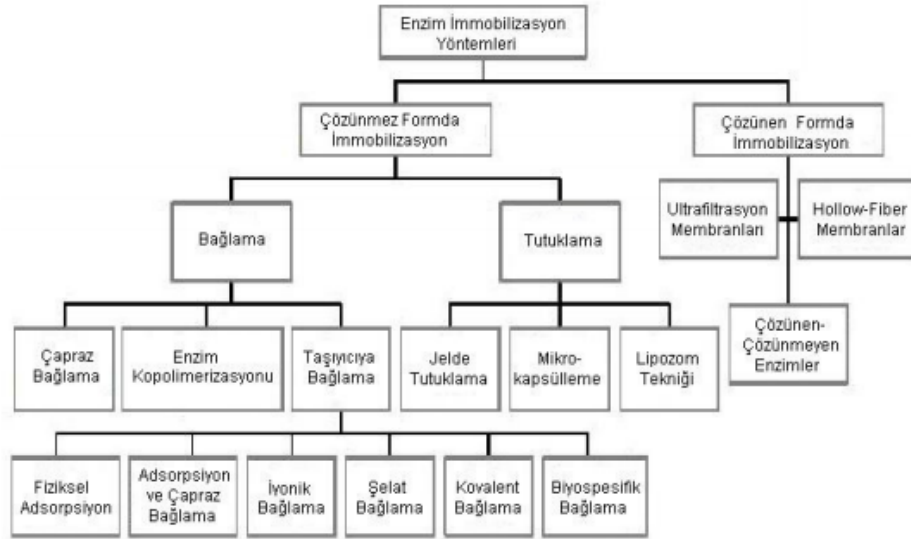
İmmobilizasyon işlemlerinde sıcaklık, pH değişimi ve serbest radikallerin oluşması gibi unsurlar enzimlerin denatüre olmalarına ve aktivitelerini yitirmelerine neden olurlar. Bu nedenlerden dolayı enzimin immobilizasyonu sırasında aktif durumdaki grupların korunması için immobilizasyon işlemleri gerekli koşullar altında yapılmalıdır (Gloger ve Tischer, 1981).

2.3.7.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemin immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzimin aktif merkezine zarar vermemesine dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır (Telefoncu, 1997).

Bir enzimin immobilizasyonunda önemli olan bağlanma metodunun seçimidir. Bu bağlanmada, enzimin kimyasal doğasının değişimi veya enzimin bağlanma bölgesindeki reaktif grupların değişimi ile enzimin aktivite kaybetmesi engellenmelidir (Güleşçi, 2013).

Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.15’te detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

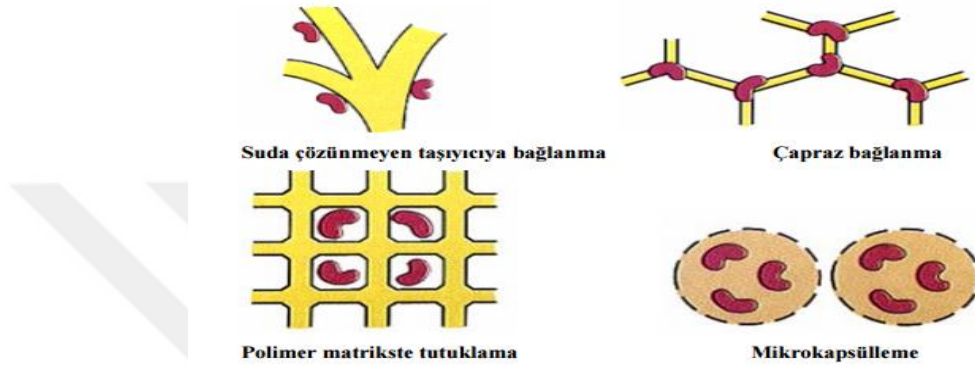


Şekil 2.15. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997)

2.3.7.1.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinde, bir protein olan enzimlerin moleküler yapısından faydalanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar (Telefoncu, 1997).

Enzim immobilizasyonunda doğal ya da sentetik olarak çeşitli organik ve inorganik materyaller kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonu için kullanılacak taşıyıcı; suda çözünmeme, rejenere olabilme, toksik etki yapmama, düşük maliyet, mekanik stabilite, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar için yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen grupların olması, mikroorganizmalara karşı direnç gösterme, gözenekli yapı ve uygun parçacık formu gibi özelliklere sahip olmalıdır.



Şekil 2.16. Taşıyıcı immobilizasyon yöntemleri (İspirli, 2008)

Adsorpsiyon, şelat bağlama, biyospesifik bağlama ve kovalent bağlama en çok kullanılan taşıyıcıya bağlama yöntemlerindendir.

2.3.7.1.2. Adsorpsiyon

Enzim adsorbsiyonu, enzim ve destek materyalinin birlikte inkübe edildiğinde, hidrofobik etkileşimler ve tuz köprüleri nedeniyle oluşan fiziksel bir tutunmadır. Adsorbe olan enzimler yığılma ve hidrofobik ara yüzey etkileşimlerinden korunmuş olur (Datta vd., 2013).

Herhangi bir malzeme, adsorbsiyon için taşıyıcı olarak kullanılabilirken, bütün enzimlerin bütün taşıyıcılar üzerine adsorbsiyonu mümkün olamamaktadır. Başarılı bir adsorbsiyonun sağlanabilmesi için enzim-taşıyıcı etkileşimi olmak üzere yerine getirilmesi gereken bazı şartlar vardır. Taşıyıcı yüzeyindeki aktif gruplar, enzim ile olan etkileşimde önemli rol oynamaktadır. Bu aktif grupların yokluğunda ise bu etkileşim bir takım ara ürünler ile sağlanmaktadır (Jesionowski vd., 2014).

2.3.7.1.3. İyonik bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından, enzim kaçıışı söz konusudur (Cao, 2005).

2.3.7.1.4. Şelat bağlama

Bu yöntemde şelat yapma özelliği bulunan bazı geçiş metalleri (Titan (III), Titan (IV), Zirkonyum (IV)) sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy ve Cabral, 1983).

2.3.7.1.5. Biyospesifik bağlama

Biyolojik sistemlerdeki gelişmiş biyospesifik etkileşme veya tanıma sistemleri kullanılarak yapılan immobilizasyon tekniğidir (Telefoncu, 1997). Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir (Solomon vd., 1987).

2.3.7.1.6. Kovalent bağlama

Bu immobilizasyon yönteminde enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştirmektedir (Zaborsky, 1973). Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir (Önal, 2000; Cao, 2005).

İmmobilizasyon yöntemleri genel olarak ele alındığında her yöntemin olumlu ve olumsuz özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler Çizelge 2.3'te açıklanmış olup Çizelge 2.4'te ise yöntemlerin kendi içinde karşılaştırılması gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Denli, 2013)

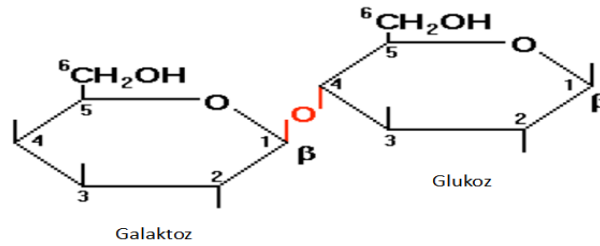
Metot ve Bağlanma türü	Avantaj	Dezavantaj
Fiziksel Adsorbsiyon; zayıf bağlar, hidrofobik, van der waals bağları ya da iyonik bağlar	Basit ve ucuz, enzimde yapısal değişiklikler az	Spesifik olmayan adsorbsiyon, desorbsiyon, kirlenme
Afinite; bir birine ilgisi olan iki bileşen arasındaki bağ	Basit ve yönlendirilmiş immobilizasyon, dikkate değer seçicilik	Destek ve enzim yenilenebilir değil, aktivite de kayıp
Kovalent bağlanma; enzim ve destek üzerindeki fonksiyonel gruplar arasındaki bağ	Enzim kaçağı yok, enzim stabilizasyonu için uygun	Destek ve enzim yenilenebilir değil, aktivite de kayıp
Tutuklama; enzimin polimerik ağ içinde tutuklanması	Geniş kullanım alanı	Kütle transfer kısıtları, enzim kaçağı
Çapraz Bağlanma; Enzim molekülleri fonksiyonel reaktantlarla çapraz bağlanır	Biyokatalizör stabilizasyonu	Yeterince kullanışlı değil, kütle transfer kısıtları, aktivite kaybı

Çizelge 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin kendi arasında kıyaslanması (Telefoncu, 1997; Wiseman, 1986)

Karakteristik özellikleri	Kovalent bağlama	Adsorpsiyon	İyonik bağlama	Çapraz bağlama	Tutuklama
Hazırlama	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Enzim aktivitesi	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Bağ gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli
Substrat spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Genel uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon masrafı	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük

2.3.8. Laktoz

Doğada yalnızca sütte bulunan, 6 karbonlu monosakkaritler glukoz ve galaktozun β -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşmuş 12 karbonlu bir disakkarittir.



Şekil 2.17. Laktozun kimyasal yapısı (Yüce, 2014)

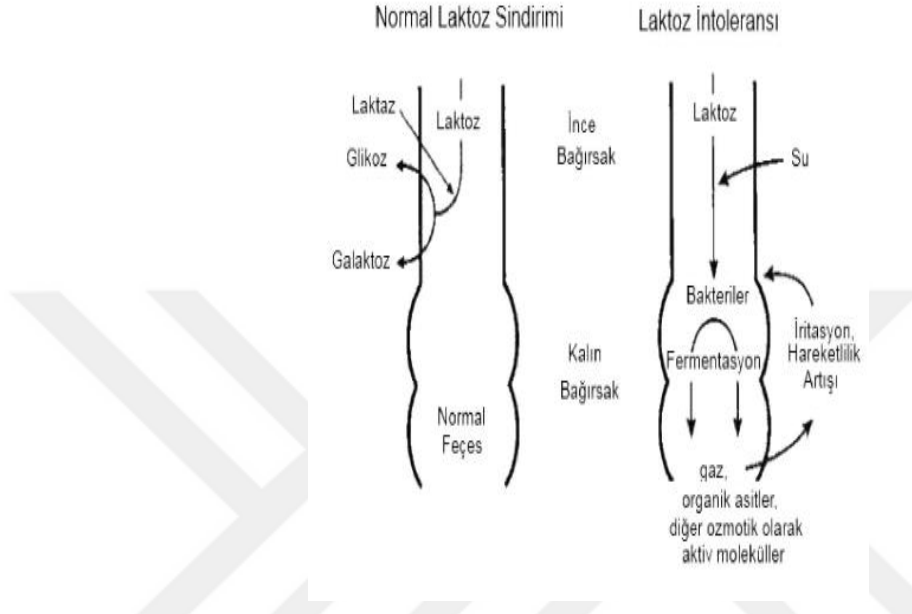
Ticari ismi süt şekeri olan laktoz yalnızca memeli canlılar tarafından sentezlenmektedir. Laktoz, başta gıda sanayi olmak üzere tıpta ve ilaç endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılır. Gıda endüstrisinde öncelikle fırıncılık ürünleri,

şekerlemeler, toz çorbalar, instant içecekler, soslar, et mamulleri, bebek maması, bazı fermente süt mamulleri ve asitli diyet gıdaların üretiminde laktozdan yararlanılır. Laktoz dondurma ve asitli şekerlemelerde şeker tadının dengelenmesinde kullanılır. Ayrıca, tat, koku ve renk maddelerini kolayca absorbe edebildiğinden gıda teknolojisinde taşıyıcı ajan olarak da değerlendirilir. Böylece tuzlu ve acı tat özelliklerini gizler ve ürünün tipik özelliklerinin belirginleşmesini sağlar. Bebek mamalarının ve bazı özel diyet gıdaların hazırlanmasında, inek sütünün anne sütüne benzetilmesinde de laktoza geniş ölçüde yer verilir. Çünkü laktoz, diyetetik etki bağlamında yağ metabolizmasında rol oynayarak karaciğerde yağ birikimini önleyici etki yapmakta ve çok sayıda B vitaminin sentezlenmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, laktozun beslenmede kalsiyum Emilimini belirgin ölçüde iyileştirdiği, kemik ve diş oluşumunu kolaylaştırdığı da anlaşılmıştır. Bu nedenlerden dolayı, anne sütüyle beslenemeyen bebeklerde, inek sütüne sakkaroz yerine laktoz eklenmekte ve bebek mamalarının üretiminde, karbohidrat oranının anne sütüyle dengelenmesinde laktozdan yararlanılmaktadır (Üçüncü, 2004).

İnek sütü yıllarca midede şişkinlik, hazımsızlık, vücutta oluşan kaşıntılı kızarıklıklar gibi istenmeyen rahatsız edici reaksiyonların kaynağını oluşturmuştur. Bu reaksiyonlar laktoz intoleransından kaynaklanır. β -Galaktozidaz enziminin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intoleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı, sütün baskın şekeri laktozun yeterli sindirilememesinden kaynaklanmaktadır.

β -Galaktozidaz enzimi, ince bağırsağın mikrovili denilen, mide ile sınır oluşturan bölgesinden salgılanır. Enzim, bir disakkarit olan laktozu, hücre membranında aktarımlarını sağlamak için glikoz ve galaktoza parçalar ve hidrolize eder. β -Galaktozidaz enziminin aktivitesi ve laktozun jejunum mukozadan geçme süresi, düzgün absorpsiyonun gerçekleşmesi açısından önemlidir. Eğer β -Galaktozidaz enzimi yetersiz ise ya da hiç mevcut değilse (hipolaktazi), absorbe edilemeyen şekerler osmotik olarak bağırsak lümenine sıvı çekerler. Kana, dengeli madde geçişi sağlanamadığından dolayı, bağırsakta biriken sıvı miktarı ortamda bulunan şekerin osmolalitesine bağlı olarak normal değerlerin yaklaşık üç katına kadar çıkar (Lloyd ve Olsen, 1995). Gastrointestinal içeriğin, hacminin ve sıvılığının artmasına ek olarak, kolon bölgesine ulaşan absorbe edilmemiş laktoz, bakteriler tarafından kullanılır. Meydana gelen fermentasyon sonucu gaz oluşur ve laktoz monosakkaritlere parçalanır. Bu monosakkaritler kalın bağırsak yüzeyi tarafından absorbe edilemezler.

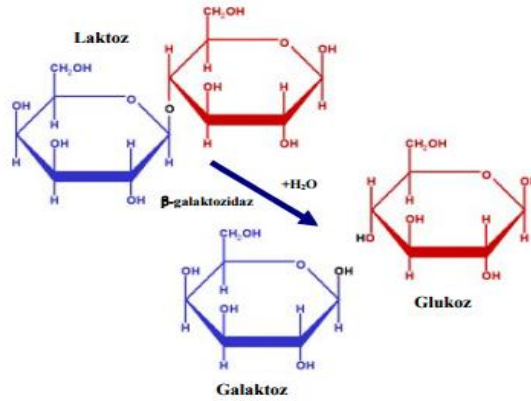
Böylece osmotik basınç artar ve bağırsağa daha çok sıvı geçmeye başlar. β -Galaktozidaz yokluğu gösteren hastalarda, kolona bölgesine ulaşan karbohidratların bir kısmı, bakteriler tarafından metabolize edilerek kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürülerek absorbe edilirler. Ancak laktoz tüketiminin kesin sonucu olarak bağırsaklarda sıvı ve gaz miktarında artış olur (Swagerty vd., 2002).



Şekil 2.18. Laktozun normal ve laktoz intolerant kişilerde bağırsak bölgesinde sindirilmesi (Tonguç, 2012)

Laktoz intoleransı dağılımı toplumlarda değişim göstermektedir. Bazı toplumlarda laktoz intoleransı görülme sıklığı %100'lere ulaşmıştır. Özellikle Afrika ve Asya'da sık görülen bir rahatsızlıktır. Kuzey Avrupa ülkelerinde de laktoz intolerant birey sayısının yüksek olduğu bilinmektedir. Türkiye'de bununla ilgili tam olarak bir çalışma olmamakla birlikte bu oran yaklaşık %66 olarak düşünülmektedir (Bayhan ve Yentür, 1993).

2.3.9. β -Galaktozidaz



Şekil 2.19. β -Galaktozidazın laktozu galaktoz ve glukozu hidrolizinin şematik gösterimi (Sezgintürk vd., 2005)

Molekül ağırlığı yaklaşık 540.000 olan β -Galaktozidaz dört eşdeğer alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt birim yaklaşık 120-135 kDa molekül ağırlığındadır. β -Galaktozidaz açıklanan en uzun protein zincirine sahip enzimdir. Her alt birimi yaklaşık 1021-1170 amino asit içermektedir (Ullman, 2001; Akgül 2010).

β -Galaktozidaz enzimi sarıdan açık kahverengi tonuna giden renkte bir sıvıdır. Yapısında kurşun, arsenik, civa, kadmiyum gibi birçok element bulundurmaktadır (Akgül, 2010). β -Galaktozidazlar kofaktör içermezler. Metal ile aktivite olan, çözeltideki alkali ya da toprak alkali iyonları zayıf kuvvetle bağlayan enzimlerdir. Bu iyonlar substratla birlikte çözeltiden alınırlar. Ortamı optimum pH'a getirerek enzimin aktivitesini artırır (Barker vd., 1971). β -Galaktozidaz Mg^{+2} ve Na^{+} iyonlarının varlığında maksimum aktivitesini sergileyebilir (Wallenfels ve Weil, 1972). Aktif merkezde bir Mg^{+2} iyonunun varlığı, doğal enzimin kristal formları ile kanıtlanmış olup enzimin yapısında daha başka Mg^{+2} bağlama bölgelerinin olduğu da gözlemlenmiştir. Potasyum ve rubidyum çalışmaları, 5 adet muhtemel sodyum bağlayan bölgenin varlığını işaret etmektedir. Bunlardan bir tanesi aktif bölgededir, geriye kalanlar ise proteinin yüzeyinde lokalize olmuşlardır.

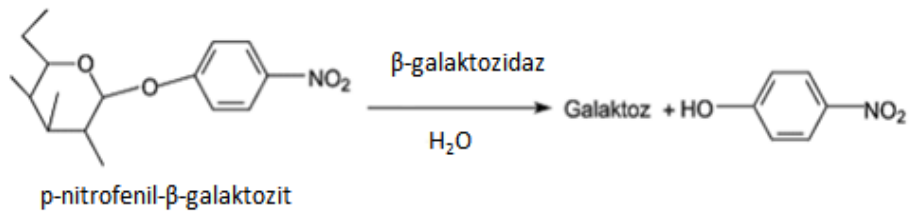
β -Galaktozidaz enzimi bitkilerde, hayvan dokularında, mayalar ve bakterilerde bulunabilmektedir. Ancak kaynağına bağlı olarak enzim özellikleri büyük ölçüde değişim göstermektedir.

Çizelge 2.5. β -Galaktozidaz enziminin bulunduğu kaynaklar (Panesar vd., 2006)

Kaynaklar	
Bitkiler	Yonca tohumu
	Badem
	Şeftali
	Kayısı
Hayvan organları	Bağırsak
Küfler	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Altemana altemata</i>
	<i>Altemana palmi</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Curvularia inaequalis</i>
	<i>Fusarium monilifonne</i>
	<i>Mucor meihei</i>
	<i>Neurospora</i>
Mayalar	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Bullera singularis</i>
	<i>Saccharomyces anamensis</i>
	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>
Bakteriler	<i>Bacillus coagulans</i>
	<i>Bacillus megaterium</i>
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactococcus cremoris</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.
	<i>Thermus rubus</i> , <i>T. aquaticus</i>
	<i>T. thermophilus</i>
	<i>Xanthomonas campestris</i>

2.3.9.1. β -Galaktozidaz enziminin reaksiyon mekanizması

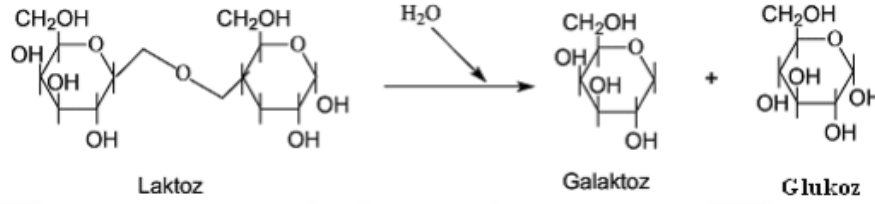
β -Galaktozidaz, substrat olarak p-nitrofenil- β -Galaktozit kullandığında ortamdan su ayrılarak galaktoz ve p-nitrofenol ürünleri oluşur. Şekil 2.20’de bu reaksiyonun mekanizması verilmiştir.



Şekil 2.20. β -Galaktozidaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Can, 2012)

Laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizi, gıda teknolojisi ve beslenme açısından önemlidir. Çünkü hidrolizin temel ürünleri daha tatlı, daha çözünebilir, daha kolay fermente edilebilir ve ince bağırsakta doğrudan absorbe edilebilirler (Boze vd.,1987; Lartillot, 1993).

β -Galaktozidaz, substrat olarak laktoz kullanıldığında α -laktozun β -1,4 bağıını kırarak glukoz ve galaktoz karışımı oluşturmaktadır.



Şekil. 2.21. Laktozun hidroliz reaksiyonu (Can, 2012)

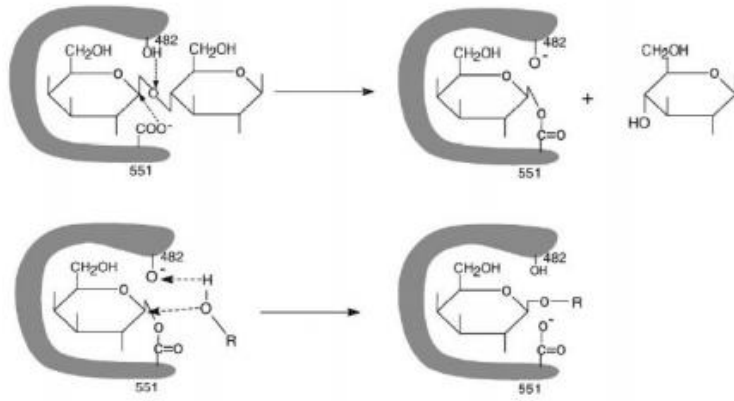
Laktoz hidrolizi, asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir.

Asit hidrolizi: Laktoz hidrolizinde ilk bilinen ve uygulanan yol asit hidrolizidir. Laktoz hidrolizi ya bir asit çözeltisi içerisinde ya da bir iyon değiştirici reçine kullanılarak yapılmaktadır (Gekas ve Lopez-Leiva, 1985).

Enzimatik hidroliz: Laktozun enzimatik hidrolizi gıda endüstrisi için önemli bir biyoteknolojik prosestir.

2.3.9.1.1. Laktoz hidroliz mekanizması

Laktozun β -Galaktozidaz ile hidroliz mekanizması ilk olarak Wallenfels ve Malhotra (1961) tarafından tanımlanmıştır. Wallenfels tarafından tanımlanan laktoz hidrolizinin önerilen mekanizmasında sistenin proton verici gibi ve histidinin nükleofil gibi davrandığını öne sürmüşlerdir. Fakat son yıllarda açıklık kazanan önemli bir gelişme, çok çeşitli mikrobiyal kaynaklardan izole edilen β -Galaktozidaz için yeni bir aktif bölgenin olduğunu ileri sürmektedir. Bu aktif bölgede iki tane glutamik asit artığı bulunmaktadır (Glu^{482} ve Glu^{551} gibi). Bunlardan birisi proton alıcı ve diğeri ise proton verici olarak görev yapmaktadır (Zhou ve Chen, 2001). Reaksiyonun mekanizması Şekil 2.22'de gösterilmektedir. İlk aşamada, enzim galaktozil kompleksi oluşur ve glukoz molekülü serbest kalır. İkinci aşamada, enzim-galaktozil kompleksi hidroksil grubu içeren bir akseptöre transfer edilir (Dağbağlı, 2009).



Şekil 2.22. β -Galaktozidaz ile laktoz hidrolizi (Zhou ve Chen, 2001)

2.3.9.2. β -Galaktozidazın kullanım alanları

β -Galaktozidaz enzimi kullanılarak sütte bulunan laktozun hidrolizi, düşük laktozlu süt, laktozu hidrolizlenmiş süttten peynir üretimi, peynir altı suyu laktozundan tatlı şurup üretimi, laktozu hidrolizlenmiş süttten yoğurt üretimi, düşük laktozlu konsantre dondurma gibi birçok gıda prosesinde kullanılabilir (Uyanık, 2008)

Ayrıca; biyoremediasyon, biyosensör tasarımı, hastalıkların teşhisi ve tedavisi gibi pek çok farklı alanlarda da kullanılmaktadır (Sezgintürk vd., 2005; Asraf ve Gunasekaran, 2010).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışmasında; β -Galaktozidazın adsorpsiyon ve çapraz bağlama tekniği ile yumurta kabuğu membranına immobilizasyonu, immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyonu, aktivite ve kararlılık koşullarının belirlenmesiyle en uygun koşullardaki β -Galaktozidaz immobilize yumurta kabuğu membranı kullanılarak süttten laktoz giderim performansı ve verimi araştırılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

β -Galaktozidaz (*Aspergillus oryzae*), sodyum fosfat monobazik monohidrat, sodyum fosfat dibazik heptahidrat, fosforik asit, Coomassie Brilliant Blue G-250, 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid, D-(+)-glukoz, D(-)-fruktoz, resorcinol, sitrik asit monohidrat, borik asit, sodyum hidroksit, sodyum sitrat dihidrat, hidroklorik asit, asetik asit, sodyum asetat trihidrat, tris, sıgır serum albümin ve etanol Sigma Chemical firmasından satın alınarak temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar ise şunlardır: Ultraviyole-görünür ışık absorpsiyon spektrofotometresi (UV-VIS) (THERMO multiscan ve SHIMADZU UV-1601), taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL JSM-7600 F model), fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR) (THERMO Nicolet iS10), soğutmalı santrifüj (HETTICH micro 220R), santrifüj (NÜVE NF800), su banyosu (NÜVE BM402), çalkalamalı karıştırıcı (NÜVE SL350), pH metre (THERMO Orion 4star), manyetik karıştırıcı (WISESTİR MSH-20A), hassas terazi (SHIMADZU), HPLC (Agilent 1260 Infinity-RI dedektör), vortex (VELP SCIENTIFICA).

3.2. Deneyisel Bölüm

3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscopy-SEM)

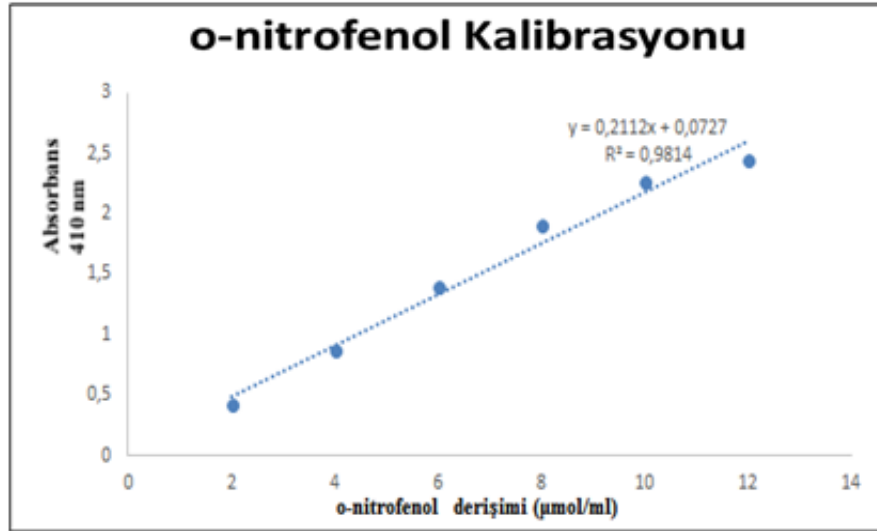
Hazırlanan YKM'lerin morfolojik özelliklerini belirlemek ve incelemek için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezi'nde bulunan JEOL JSM-7600F model SEM cihazı kullanılarak yapıların SEM görüntüleri alındı.

3.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy-FTIR)

Hazırlanan YKM'lerin kimyasal yapısı ve yüzey gruplarını belirlemek ve incelemek için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bulunan THERMO Nicolet iS10 model FTIR cihazı kullanıldı. YKM'lerin IR analizleri yapıldı.

3.3. β -Galaktozidaz Aktivite Tayini

β -Galaktozidaz aktivitesi, o-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid'in (ONPG) substrat olarak kullandığı yöntemle belirlendi (Bahl ve Agrawal, 1969). 20 mM pH 4.5 fosfat-sitrat tamponundan (sitrik asit, sodyum fosfat) 400 μ l ve 10mM o-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (fosfat-sitrat tamponunda hazırlanan)'den 500 μ l eklenerek immobilize β -Galaktozidaz için 30°C'de 10 dakika inkübe işlemi başlatıldı. Serbest β -Galaktozidaz için; β -Galaktozidaz enzim çözeltisinden (0,4 U/mL) 100 μ l alınarak sadece örnek kaba konuldu ve inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon işlemi sonrası 200 mM, pH 9.8 borat tamponundan (borik asit, NaOH) 3000 μ l eklenerek reaksiyon durduruldu. Serbest β -Galaktozidaz için; β -Galaktozidaz enzim çözeltisinden 100 μ l alınarak sadece kör kabına konuldu. 410 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümün absorbans değerlerinden; o-nitrofenol miktar hesaplanması için o-nitrofenol kalibrasyonu oluşturuldu. Kalibrasyon grafiği Şekil 3.1'de ve hesaplamalarda kullanılan denklemler (3.1) ve (3.2)'de verilmiştir.



Şekil 3.1. o-nitrofenol kalibrasyon grafiğı

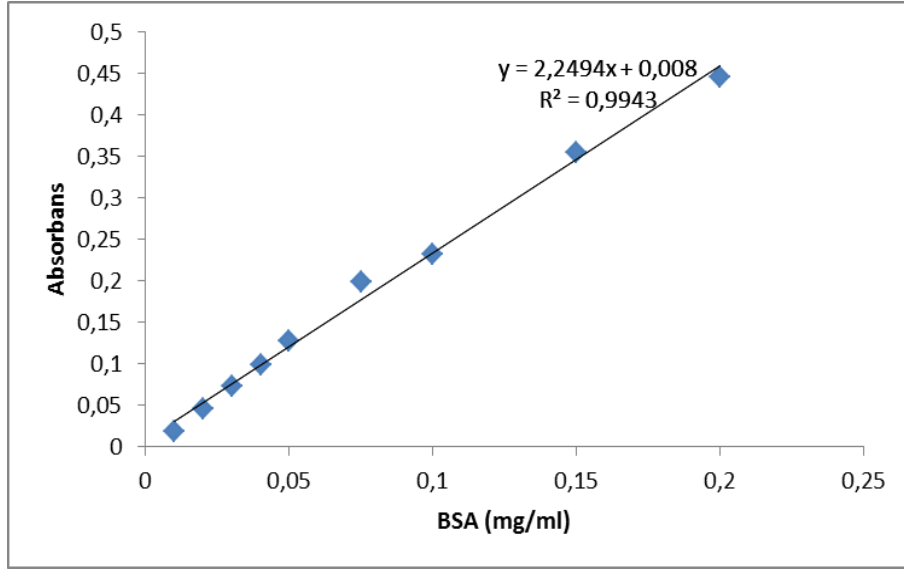
$$Aktivite (U) = \frac{\mu\text{mol } o\text{-nitrofenol} \times \text{Toplam hacim}}{t(\text{dk}) \times \text{örnek hacmi}} \quad (3.1)$$

$$\text{Spesifik Aktivite} \left(\frac{U}{\text{mg protein}} \right) = \frac{\text{Aktivite}(U)}{\text{mg Protein}} \quad (3.2)$$

3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası protein miktarları; hem serbest enzim için hem de immobilize enzim için Bradford protein tayini yöntemi kullanılarak belirlendi (Bradford, 1976). Bradford reaktifi; 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, %95'lik etanolde çözüldü, üzerine 55 mL %88'lik fosforik asit ilave edilerek destile su ile 1 L'ye tamamlandı. Süzme işlemi yapıldı.

Standart kalibrasyon grafiğini oluşturmak için, 0.01-0,2 mg/mL aralığında sığır serum albüminin (BSA) çözeltileri kullanılarak Şekil 3.2'de gösterilen standart kalibrasyon grafiğı oluşturuldu. Bradford protein tayin yöntemi ise Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Protein tayini kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.1. Bradford protein tayini yöntemi

	Kör	Örnek
Destile su	0,05 mL	-
Örnek çözelti	-	0,05 mL
Bradford reaktifi	1 mL	1 mL

Tüpler karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm’de absorbansları okundu.

3.5. İmmobilizasyon İşleminde Taşıyıcı Olarak Kullanılacak YKM’nin Hazırlanması

Yumurta kırılarak sarısı ve beyazı kabuk kısmından ayrıldı. Kabuk su ile yıkanarak hem kabuğun iç kısmında kalan yumurta beyazının uzaklaştırılması hem de membranın daha kolay ayrılması için saf suda bekletildi. YKM bu işlemin ardından elle soyularak kabuktan ayrıldı. Ayrılan membran saf su ile yıkandı. Membran üzerindeki kalıntıları tam olarak uzaklaştırmak amacıyla 0,5 M HCl çözeltisinde bir gece boyunca bekletilen membran, asidi nötralize etmek için de 1 saat boyunca 0,1 M NaOH çözeltisinde bekletildi. Ardından saf su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Bu şekilde immobilizasyon işleminde kullanılacak yumurta kabuğu membranı hazırlanmış oldu. Kullanılacak çözeltiler şu şekilde hazırlandı:

HCl çözeltisi; 10 mL HCl çözeltisinden alınıp balon jode 250 mL saf su ile tamamlanarak çözüldü.

NaOH çözeltisi; 1 g NaOH tartıldı ve balon jode 250 mL saf su ile tamamlanarak çözüldü.

3.6. YKM'ye β -Galaktozidaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu

β -Galaktozidaz enziminin YKM'ye immobilizasyonu için adsorpsiyon ve çapraz bağlama (glutaraldehit) yöntemleri uygulandı. İmmobilizasyon işleminin optimizasyonu için β -Galaktozidaz miktarı (0,1-1 U/mL), taşıyıcı (YKM) miktarı (2,5–15 mg), adsorpsiyon süresi (5-30 dk), glutaraldehit (GA) miktarı (% 0,125-4) olmak üzere dört parametre belirlendi.

3.6.1. Taşıyıcı miktarının belirlenmesi

YKM'ler 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0 mg olacak şekilde tartıldı. Tartılan YKM'ler, 0,4 U/mL β -Galaktozidaz enzimi ile 15 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak β -Galaktozidaz enziminin YKM'ye adsorpsiyonu sağlandı. Bu işlemde sonra derişimi % 2 olan GA eklenip, tekrar 15 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. İmmobilize olan YKM'ler alınıp süpernatantlar ayrıldı. Süpernantların ayrılması işleminden sonra ortamdaki fazla GA'nın uzaklaştırılması için YKM'ler soğuk destile su ile 15'er dakika olmak üzere üç kez yıkandı. İmmobilize enzim aktivitesi belirlendi. Süpernatantta kalan protein Bradford yöntemi kullanılarak tespit edildi.

3.6.2. β -Galaktozidaz miktarının belirlenmesi

Derişimleri 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0 U/mL olarak soğuk destile su ile hazırlanan β -Galaktozidaz enzim çözeltileri; 5 mg YKM ile 15 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırıldı ve β -Galaktozidaz enziminin YKM'ye adsorpsiyonu sağlandı. Bu işlemde sonra derişimi %2 olan GA eklenerek 15 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Enzim immobilize YKM'leri alınıp süpernatantlar ayrıldı. Süpernantların ayrılması

işleminden sonra ortamdaki fazla GA'nın uzaklaştırılması için enzim immobilize YKM soğuk destile su ile 15'er dakika olmak üzere üç kez yıkandı. Immobilize enzimlerin aktiviteleri standart aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Süpernatantta kalan protein Bradford yöntemi kullanılarak tespit edildi.

3.6.3. Adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

5 mg YKM ile 0,4 U/mL β -Galaktozidaz enzim çözeltisi 5; 10; 15; 20; 25; 30 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak YKM'ye adsorpsiyonu sağlandı. Bu işlemten sonra derişimi %2 olan GA eklenip tekrar belirlenen dakikalar boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Enzim ile immobilize olan YKM'ler alınıp süpernatantlar ayrıldı. Süpernantların ayrılması işleminden sonra ortamdaki fazla GA'nın uzaklaştırılması için YKM soğuk destile su ile 15'er dakika olmak üzere üç kez yıkandı. Immobilize enzim aktivitesi standart aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Süpernatantta kalan protein Bradford yöntemi kullanılarak tespit edildi.

3.6.4. Glutaraldehit (GA) derişiminin belirlenmesi

5 mg YKM ile 0,4 U/mL β -Galaktozidaz enzim çözeltisi 20 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak YKM'ye adsorpsiyonu sağlandı. Bu işlemten sonra derişimi %0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 (v/v) olan GA çözeltileri eklendi. Tekrar 20 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Süpernantların ayrılması işleminden sonra ortamdaki fazla GA'nın uzaklaştırılması için YKM'ler soğuk destile su ile 15'er dakika olmak üzere üç kez yıkandı. Immobilize enzim aktivitesi standart aktivite tayin yöntemi ile belirlendi. Süpernatantta kalan protein Bradford yöntemi kullanılarak tespit edildi.

3.7. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonunun karakterizasyonu

YKM'ye bağlanma sonucu enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonunda değişiklik olur, kimyasal kovalent bağlanma durumunda yükü ve kimyasal yapısı değişir. Optimum koşullarda hazırlanan β -Galaktozidaz immobilize

YKM'lerin karakterizasyonu için; optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, tekrar kullanılabilirlik ve kinetik parametreler incelendi.

3.7.1. Optimum sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin katalitik aktivitesinin belirlenmesi için önemlidir. Sıcaklık, değerlerin üzerinde ise enzim proteini denatüre olacağından aktivitede azalma gözlenir.

Serbest ve immobilize β -Galaktozidazın aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını belirlemek için 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70°C'lerde çalışılarak aktivite tayinleri yapıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı. % Bağlı aktivite ise denklem 3.3 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlı Aktivite} = \frac{\text{Herhangi bir sıcaklıktaki aktivite}}{\text{Optimum sıcaklıktaki aktivite}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.7.2. Optimum pH

Ortam pH'ı, enzim aktivitesini etkileyen önemli faktörlerdendir. İmmobilizasyon sonucu oluşan pH-aktivite davranışlarındaki değişimler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini ve hidroliz için optimum çalışma koşullarını belirlemektedir.

Serbest ve immobilize β -Galaktozidazın aktivitelerinin pH'a bağımlılığını belirlemek için 50 mM derişimde pH 3.0; 4.0; 4.5 sitrat tamponunda, pH 5.0; 5.5 asetat tamponunda, pH 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 fosfat tamponunda ve pH 8.0; 8.5; 9.0; 9.5 Tris-HCl tamponunda çalışılarak aktivite tayinleri yapıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı. % Bağlı aktivite ise denklem 3.4 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlı Aktivite} = \frac{\text{Herhangi bir pH'daki aktivite}}{\text{Optimum pH'daki aktivite}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.7.3. Termal kararlılık

Enzimler protein yapısında oldukları için ısıya karşı kararlı değildirler. Sıcaklık artışıyla inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulup inkübasyon süresinin uzatılması bile denatürasyon sonucu aktivite kaybına sebep olur.

Serbest ve immobilize β -Galaktozidazın aktivitelerinin termal kararlılığına bağlılığını belirlemek için sıcaklıkları 50; 60; 70 °C'de sabit olan su banyolarında inkübasyonu devam ederken her 10 dakikada bir aktivite tayinleri yapıldı ve bu işleme 100 dk boyunca devam edildi. Serbest ve immobilize β -Galaktozidazın aktivite tayinleri yapıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı. % Bağlı aktivite ise denklem 3.5 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlı Aktivite} = \frac{\text{Herhangi bir süre inkübasyon sonrası kalan aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.7.4. pH kararlılığı

Serbest ve immobilize β -Galaktozidazın termal kararlılıklarını incelemek için; 50 mM derişimde pH 3.0; 4.0; 4.5 sitrat tamponunda, pH 5.0; 5.5 asetat tamponunda, pH 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 fosfat tamponunda ve pH 8.0; 8.5; 9.0; 9.5 Tris-HCl tamponlarında 1 saat süreyle bekletildikten sonra aktivite tayinleri yapıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı. % Bağlı aktivite ise denklem 3.6 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlı Aktivite} = \frac{\text{Herhangi bir pH'da inkübasyon sonrası kalan aktivite}}{\text{Maksimum aktivite}} \times 100 \quad (3.6.)$$

3.7.5. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize β -Galaktozidazın tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için ardışık standart aktivite tayin koşullarında tayin edildi. % Bağlı aktivite ise denklem 3.7. kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlı Aktivite} = \frac{\text{Tekrar kullanım sonrası kalan aktivite}}{\text{Başlangıç aktivitesi}} \times 100 \quad (3.7)$$

3.7.6. Kinetik sabitlerin belirlenmesi

0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mM derişimlerinde 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid çözeltileri hazırlandı. Serbest ve immobilize β -Galaktozidazın standart aktivite tayinleri yapıldı. Lineweaver-Burk diyagramında K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

3.7.7. β -Galaktozidaz immobilize membranlarla süttten laktoz gideriminin araştırılması

Laktoz gideriminde kullanılacak süttün pH'ı 0,1 M HCl ile 4.5'e ayarlandı. pH'ı ayarlanan süt 10 dakika boyunca 5000 rpm de santrifüjlendi ve çöken kısım atıldı. YKM'lere β -Galaktozidaz immobilizasyonu sırasında belirlenen optimum koşullarda enzim immobilize edildi. Enzim immobilize YKM'ler 2 mL süt içine atılarak 1, 2, 3 ve 4 saat boyunca 45°C'de sürekli olarak karıştırıldı. Bu süreler sonunda YKM'ler reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözelti ortamındaki proteinleri uzaklaştırmak için 100°C'de 10 dk bekletilen süte santrifüjleme işlemi yapıldı. Çöken kısım sıvı kısımdan uzaklaştırıldı. Sıvı kısımdaki laktoz, galaktoz ve glukoz miktarları HPLC yardımıyla belirlendi.

5 mg YKM üzerine 1 U/mL; 12,5 mg YKM üzerine 2,5 U/mL; 25 mg YKM üzerine 5 U/mL; 37,5 mg YKM üzerine 7,5 U/mL enzim ilave edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilizasyon sonrası YKM'ler 4 saat boyunca 45°C'de su banyosunda inkübe edildi.

4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

Enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha kullanışlı ve ekonomik hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Bu gibi problemlerin ortadan kalkması için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Enzim immobilizasyonu; aktivite, stabilite ve substrat spesifikliğini artırması, kullanım kolaylığı sağlaması, reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilmesi, tekrar kullanım sayılarının fazla ve maliyetlerinin ise az olması endüstriyel uygulamalar için çok avantajlıdır. Kullanılan enzimlerin özelliğine göre immobilizasyon teknikleri değişebilir.

Sunulan bu tez çalışması iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu gerçekleştirildi. β -Galaktozidaz immobilizasyonunun optimizasyonu için YKM miktarı, adsorpsiyon süresi, β -Galaktozidaz miktarı ve glutaraldehit miktarı temel parametreler olarak araştırıldı. Optimum koşullarda hazırlanan β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin karakterizasyonunda ise, optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri araştırıldı. İkinci kısım optimum koşullarda hazırlanan β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin süttten laktoz giderimi uygulaması açısından değerlendirilmesinden oluşmaktadır.

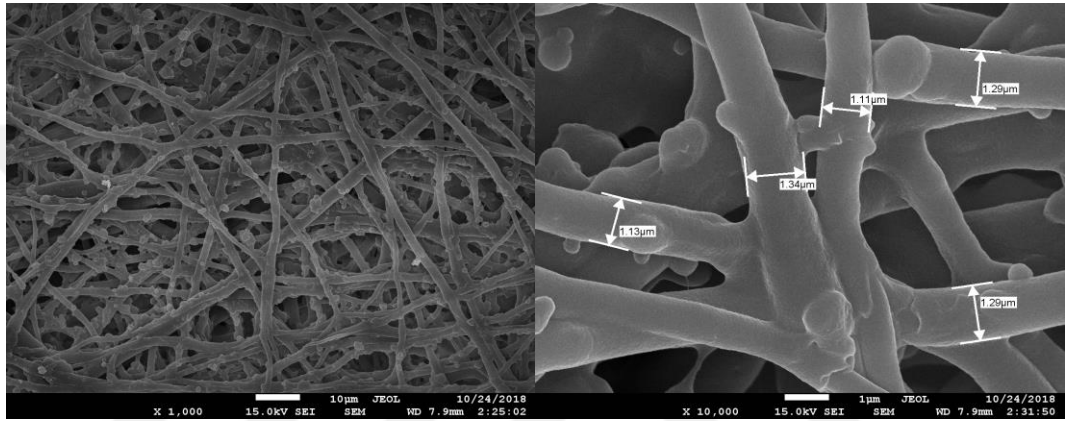
Birinci kısımda, YKM'lerin optimizasyonu sırasında hazırlanan membranların morfolojik karakterizasyonu için SEM, kimyasal bağlanmaların aydınlatılması için ise FTIR analizleri kullanıldı. YKM'lere β -Galaktozidaz immobilizasyonu gerçekleştirildi. β -Galaktozidaz immobilizasyonunun optimizasyonu için YKM miktarı, adsorpsiyon süresi, β -Galaktozidaz miktarı ve glutaraldehit miktarı parametreleri araştırıldı. Optimum koşullarda hazırlanan β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin karakterizasyonunda ise optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, tekrar kullanılabilirlik ve kinetik parametreleri araştırıldı.

İkinci kısımda optimum koşullarda hazırlanan β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin süttten laktoz giderimi uygulaması yapıldı. İki kısımda özetle anlatılan tez çalışması

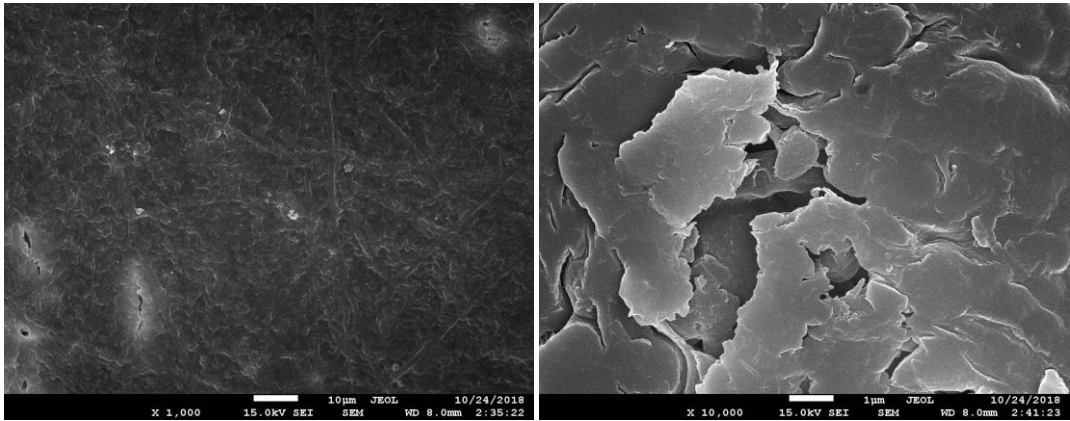
kapsamı, aşağıda verilen sonuçlarla ve literatürdeki benzer çalışmalarla detaylı şekilde anlatıldı.

4.1. SEM Analizi

SEM analizi, malzemelerin morfolojilerini belirlemek için çok güçlü bir teknolojidir. Ham YKM ve çapraz bağlanmış YKM'lerin SEM fotoğrafları Şekil 4.1. ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Ham YKM'nin SEM görüntüsü



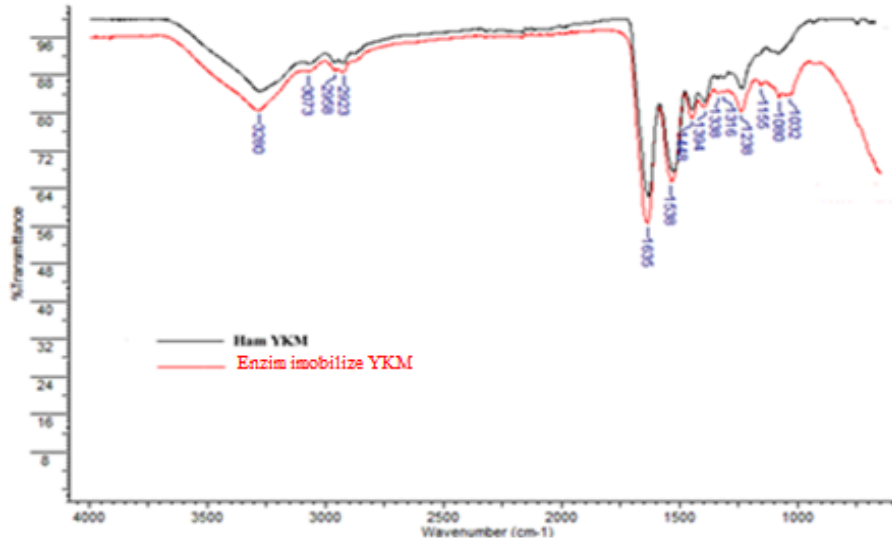
Şekil 4.2. β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrası YKM'nin SEM görüntüleri

Şekil 4.1. incelendiğinde membranların gelişigüzel konumlandığı, ortalama çaplarının ise $1,2 \mu\text{m}$ olduğu görüldü. Şekil 4.2.'de immobilizasyon işlemi sonrasında yüzeylerde doluluk oluşmuştur.

4.2. FTIR Analizi

Ham YKM ve enzim immobilize edilmiş YKM'ye ait ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.3'te görülmektedir. İmmobilize ve ham YKM spektrumları incelendiğinde proteinler için karakteristik olan absorpsiyon piklerini verdiği görülmektedir. Bu durum da literatürde daha önce Sauer ve Wuthier tarafından yapılmış çalışma ile uyumluluk göstermektedir (Sauer ve Wuthier, 1988). Her iki spektrumda da 3280 cm^{-1} protein yapısında bulunan serbest alkol gruplarındaki -OH titreşim bandına ilişkin pik gözlenmektedir. Yine her iki spektrumda protein yapısından kaynaklanan, $2960\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ arasında C-H ve 1448 cm^{-1} de CH_2 gerilim bandına ve 1394 cm^{-1} de ise CH_3 gerilme bandına ilişkin pikler gözlenmektedir. Ayrıca 1635 cm^{-1} (Amid I, C=O), 1538 cm^{-1} (Amid II, N-H) ve 1248 cm^{-1} de (Amid III, C-N) proteinlerin temel olarak gösterdikleri ve yapılarında bulunan amid bağlarından kaynaklı absorpsiyon bantlarında görülmektedir. $1250\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki titreşim frekansları incelendiğinde ham YKM ve immobilize YKM pikleri arasında farklılar görülmektedir. Bu bölge parmak izi bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Parmak izi bölgesindeki bandların oluşturduğu titreşim frekansları, kimyasal olarak etkin olan gruplardan ziyade (fonksiyonel grup) molekülün yapısı ile çok daha ilgilidir. Bu nedenle bu bölgedeki bandlar bir molekülün tamamı için karakteristiktir. Teşhis açısından bu bölge çok önemlidir. Birbirlerinin aynısı olduğu iddia edilen maddelerin bütün pikleri bu bölgede tamamen çakışmalıdır.

Sonuç olarak ham YKM ve immobilize YKM'ye ait ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde parmak izi bölgesi haricinde yer alan bölgelerde her iki yapı için gözlenen piklerin aynı olduğu görülmektedir. Fakat parmak izi bölgesinde her iki yapının vermiş olduğu pikler $1150\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ band aralığında farklılık göstermektedir. Parmak izi bölgesinde bulunan bütün pikler tamamen çakışmadığı için her iki yapıda birbirinden farklıdır. Bu farklılık da ham YKM β -Galaktozidaz enziminin moleküler anlamda başarılı bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Ham YKM ve immobilize YKM'ye ait ATR-FTIR Spektrumları

4.3. YKM'ye β -Galaktozidaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu

β -Galaktozidaz enzimi, YKM'ye ilk olarak adsorpsiyon ve ardından da çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edildi. Optimizasyon parametreleri olarak; β -Galaktozidaz miktarı, YKM miktarı, adsorpsiyon süresi ve glutaraldehit miktarı incelendi. Sonuç olarak; YKM miktarı 5 mg, β -Galaktozidaz miktarı 0.4 U/mL, adsorpsiyon süresi 20 dk, GA miktarı %1 olarak bulundu.

Çizelge 4.1. Serbest β -Galaktozidaz ve immobilize β -Galaktozidazın immobilizasyonunun optimizasyonu sonrası aktivite özellikleri

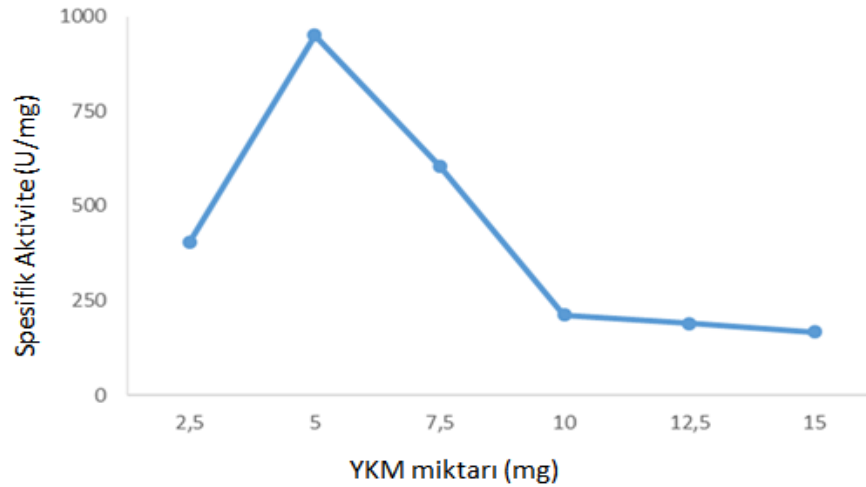
Serbest β -Galaktozidaz			İmmobilize β -Galaktozidaz				
Aktivite (U)	Protein (x10 ⁻³ mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Bağlı protein (x10 ⁻³ mg)	Bağlı protein (%)	Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Spesifik aktivite verimi (%)
345	74	4662	44	56,76	175	3977	85,3

Enzim immobilizasyonunun optimizasyonu sonrası serbest β -Galaktozidaz ve immobilize edilmiş β -Galaktozidazın aktivite özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Serbest enzimin protein miktarı 74x10⁻³ mg ve spesifik aktivitesi 4662 U/mg protein iken, bu değerler immobilize enzimde sırasıyla 44x10⁻³ mg ve 3977 U/mg protein olarak bulunmuştur. Her ne kadar protein miktarı immobilizasyondan sonra % 43,24 azalmış olsa da, spesifik aktivite verimi % 85,3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre,

immobilizasyon için kullanılan ticari serbest β -Galaktozidazların içinde aktif halde bulunan β -Galaktozidazların büyük oranda (%85,3) başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir. Bu sonuç, taşıyıcı olarak kullanılan YKM'nin lifsi doğal protein yapısında olması, β -Galaktozidaz için yapısal benzerlik nedeniyle tam uyumlu ve seçimlilik açısından da oldukça faydalı olduğu sonucunu doğurmaktadır. Ayrıca, ilgili benzer-benzer ilişkisi diğer çalışmalar için de önemli bir fikir kaynağı olacaktır.

4.3.1. YKM miktarı

YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonunda kullanılacak optimum membran miktarının belirlenmesi için 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 mg olmak üzere membran tartıldı ve enzim immobilizasyonu yapıldı. Hem serbest enzim hem immobilize enzim için aktivite tayini yapıldı ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.4.). Aktivite sonuçlarına göre YKM'lerin optimum miktarı; 5 mg olarak belirlendi (0,4 U/mL β -Galaktozidaz miktarı, 15 dk adsorpsiyon, %1 GA parametreleri sabit tutuldu).



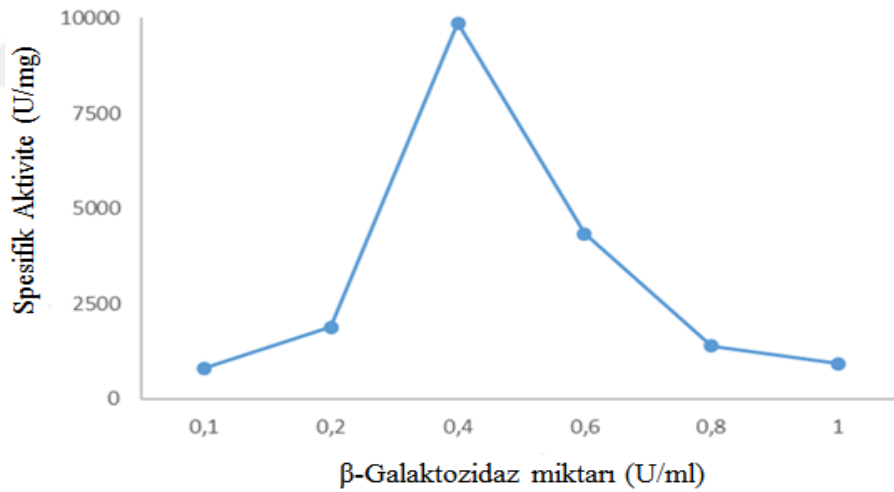
Şekil 4.4. YKM'lere β -Galaktozidaz enzimi immobilizasyonu için uygun YKM miktarının belirlenmesi

Optimum değerın altında kalan yani 2,5 mg için, membran miktarı yetersiz gelmiş olabilir. Bu nedenle enzim moleküllerinin tamamı immobilize olmamış olabilir. Optimum değerın üstündeki membran miktarlarında ise membranın fazla olması enzim-substrat arası etkileşimi sırasında sterik engelle neden olduğu söylenebilir. Literatürde yer alan diğer β -Galaktozidaz immobilizasyonu çalışmalarında taşıyıcı miktarı incelenen parametreler arasındadır. Çinko oksit nanopartiküllere immobilize

edilen β -Galaktozidaz immobilizasyonu ile ilgili bir çalışmada (Husain vd., 2011) optimum taşıyıcı miktarı olarak 100 mg (600 U enzim); 2015 yılında kitosan kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllerine immobilize edilen β -Galaktozidaz enzimi için 0,25g taşıyıcı (10 mg/mL enzim) (Chen ve Duan, 2015); kitosan çapraz bağlı genipinin taşıyıcı olarak kullanıldığı 2016 yılında yapılan diğer bir çalışmada (Klein vd., 2016) ise 0,5 g taşıyıcı (20 U/mL enzim) olarak bulunmuştur.

4.3.2. β -Galaktozidaz miktarı

YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonunda kullanılacak optimum enzim miktarının belirlenmesi için 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 U/mL derişimlerinde β -Galaktozidaz enzimi hazırlandı. Immobilize enzim için aktivite tayini yapıldı ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.5.). Aktivite sonuçlarına göre yumurta kabuk membranının optimum enzim miktarı; immobilize enzim için 0,4 U/mL olarak belirlendi (YKM miktarı 5 mg, 1 μ l enzim çözeltisi, 15 dk adsorpsiyon, %1 GA sabit tutulmuştur).



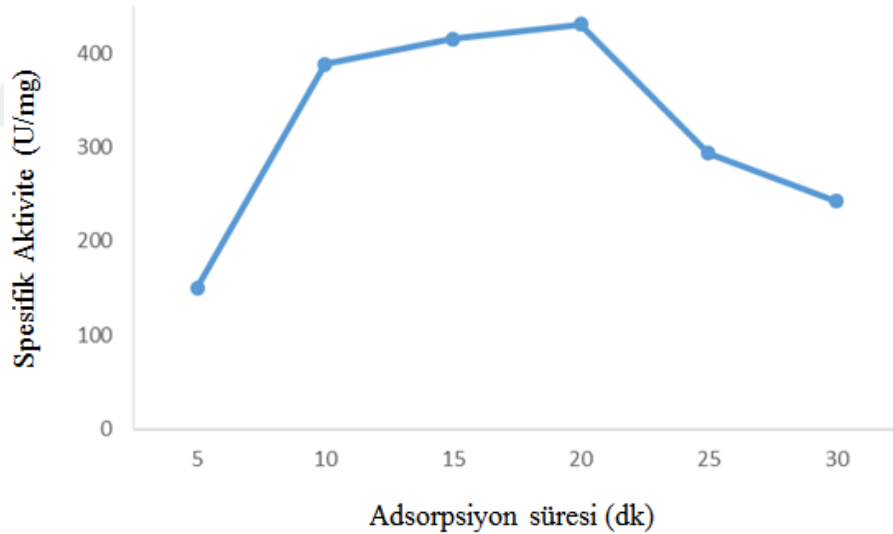
Şekil 4.5. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu için optimum enzim derişiminin belirlenmesi

Optimum β -Galaktozidaz miktarının üzerine çıkıldığında spesifik aktivite azalmaktadır. Bunun nedeni, membran miktarının yetersiz gelmesi ya da enzim moleküllerinin membran yüzeyine multi-adsorpsiyonu meydana gelmesi olabilir. Literatürde yer alan diğer β -Galaktozidaz immobilizasyonu çalışmalarında başlangıç enzim miktarı incelenmiştir. Çinko oksit nanopartiküllere immobilize edilen β -Galaktozidaz immobilizasyonu ile ilgili bir çalışmada (Husain vd., 2011) optimum

başlangıç enzim miktarı olarak 6 U/mg taşıyıcı; 2015 yılında kitosan kaplı Fe₃O₄ nanopartiküllerine immobilize edilen β-Galaktozidaz enzimi için 10 mg/mL (Chen ve Duan, 2015); yine 2015 yılında aljinat boncuklarda tutuklanan β-Galaktozidaz (Das vd., 2015) için ise 8 mg/mL; kitosan çapraz bağlı genipinin taşıyıcı olarak kullanıldığı 2016 yılında yapılan diğer bir çalışmada (Klein vd., 2016) ise 20 U/mL olarak bulunmuştur.

4.3.3. Adsorpsiyon süresi

Adsorpsiyon süresini belirlemek amacıyla 5; 10; 15; 20; 25; 30 dk boyunca β-Galaktozidaz, YKM'ye öncelikle adsorpsiyon ardından ise çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak immobilize edildi. Aktivite tayini yapıldı ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.6.). Aktivite sonuçlarına göre YKM'ye optimum adsorpsiyon süresi 20 dk olarak belirlenmiştir (β-Galaktozidaz miktarı 0,4 U/mL, YKM miktarı 5 mg, %1 GA miktarı sabit tutulmuştur).



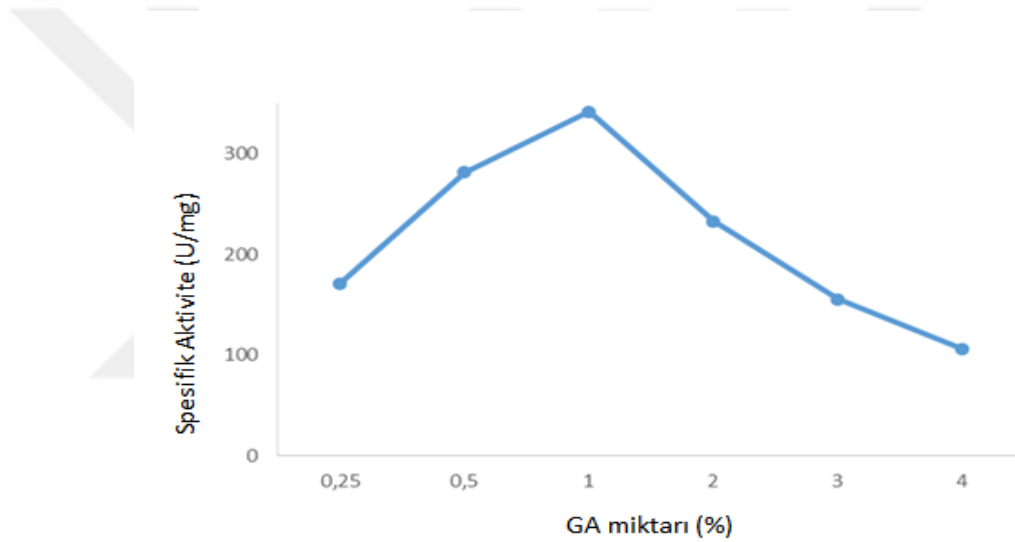
Şekil 4.6. YKM'ye β-Galaktozidaz enzimi immobilizasyonu için uygun adsorpsiyon süresinin belirlenmesi

YKM'lerin yüzeyi 20. dakikada β-Galaktozidaz enzim molekülleri bakımından doygunluğa ulaşmıştır. β-Galaktozidaz enziminin YKM'ye immobilizasyonu için optimum adsorpsiyon süresi 20 dk'dır. 20 dk'nın sonunda YKM yüzeyinde desorpsiyon başlamaktadır. Immobilizasyon süresini, immobilize edilen enzimin yapısındaki aminoasitler ve enzimin YKM'ye olan ilgisi de etkilemektedir.

4.3.4. Glutaraldehit (GA) miktarı

Glutaraldehit düşük maliyetli, elde edilmesi kolay, etkili bir çapraz bağlama ajanıdır. Glutaraldehit ile enzimler arasındaki çapraz bağlama tepkimesi tersinmezdir ve nötr pH'a yakın şartlarda tepkime gerçekleştirilir.

YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonunda kullanılacak optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi için %0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 değerleri ile enzim immobilizasyonu yapıldı. İmmobilize enzim için aktivite tayini yapıldı ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.7.). Aktivite sonuçlarına göre YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu için uygun glutaraldehit derişimi %1 olarak belirlendi (β -Galaktozidaz miktarı 0,4 U/mL, YKM 5 mg, adsorpsiyon süresi 20 dk alınmıştır).



Şekil 4.7. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu için uygun glutaraldehit miktarının belirlenmesi

GA miktarının %1'in üzerine çıktığı değerlerde aktivitenin düştüğü saptandı. Bunun nedeni glutaraldehitin enzimin aktif merkeziyle etkileşime girmesi veya farklı bölgelerle bağlanması sonucu oluşan konformasyonel değişiklik olabilir.

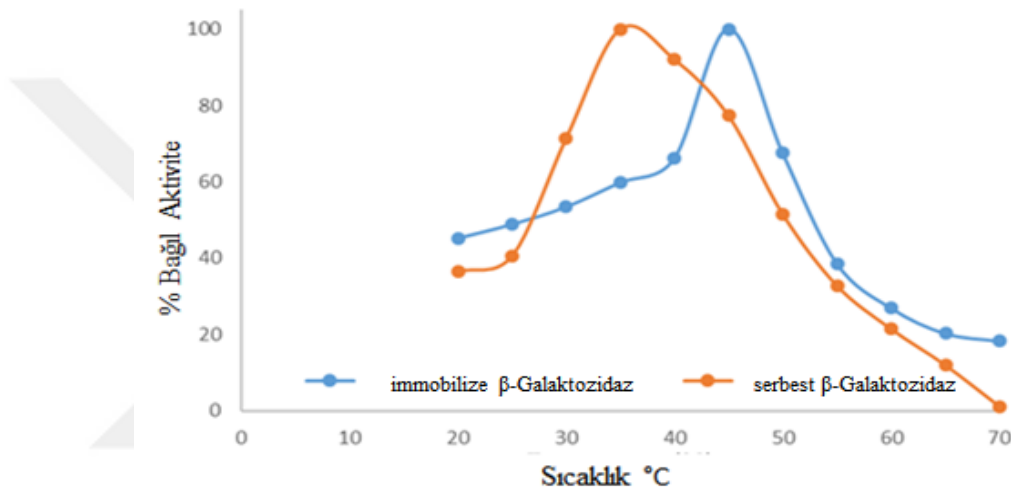
4.4. YKM'ye β -Galaktozidaz İmmobilizasyonunun Karakterizasyonu

Karakterizasyon kısmında; optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, kinetik parametreler ve tekrar kullanılabilirlik parametreleri incelendi.

4.4.1. Optimum sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin katalitik aktivitesini etkileyen önemli faktörlerdendir. Enzimin %100 verimle çalışarak aktivite gösterdiği sıcaklığa “optimum sıcaklık” denir. Belirli sıcaklık değerlerinin üzerine çıkıldıkça protein yapısında olan enzimin üç boyutlu yapısı denatüre olur ve buna bağlı olarak aktivite kaybı oluşur.

Serbest ve immobilize β -Galaktozidaz üzerine sıcaklık etkisi 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70°C sıcaklıklarında yapıldı. % Bağlı aktiviteye karşı sıcaklık grafiği Şekil 4.8’de gösterildiği gibi çizilerek optimum sıcaklık değeri belirlendi.



Şekil 4.8. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında optimum sıcaklık eğrileri

Grafiği incelersek, serbest β -Galaktozidazın optimum sıcaklığı 35°C, immobilize β -Galaktozidazın optimum sıcaklığı ise 45°C olarak bulunmuştur. Taşıyıcı olarak kullanılan YKM'nin doğal protein yapısında ve lifsi özelliği benzer-benzer etkileşimi nedeniyle immobilize enzimin sıcaklığa karşı daha esnek bir yapı kazanmasına katkı sağlamış olabilir.

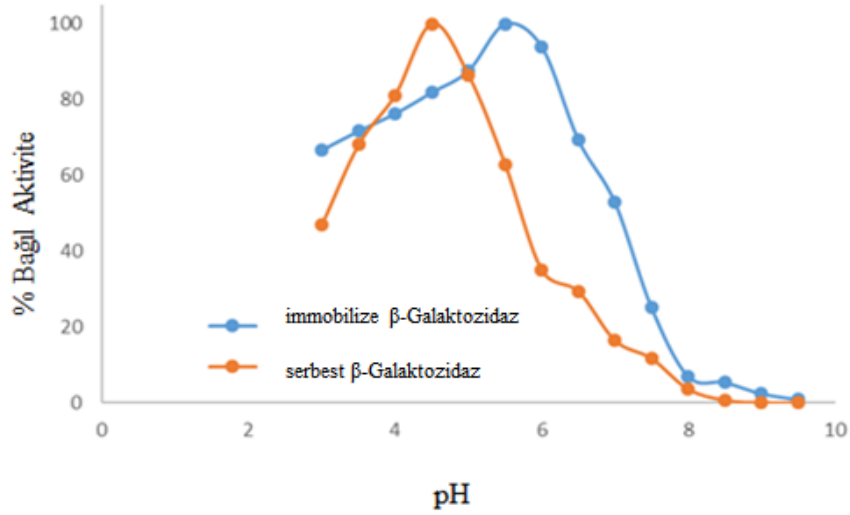
Zhang ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada çapraz bağlayıcı varlığında, β -Galaktozidaz enzimine manyetik poli(GMA-MMA) taneciklerini immobilize ederek enzimin serbest enzime göre daha yüksek sıcaklık değerlerinde aktivite gösterdiği açıklanmıştır. Yüksek sıcaklık değişimlerinde immobilizasyon ile enzimin aktif bölgesi zarar görmeyip korunmaktadır. Immobilizasyon sonunda enzimde gerçekleşen konformasyonel değişiklik enzimi daha kararlı hale getirmiştir. Bu durum immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdiği şeklinde

yorumlanabilir (Zhang vd., 2010). Literatürde immobilize β -Galaktozidaz immobilizasyonundan sonra optimum sıcaklıkta meydana gelen değişim incelenmiştir. Kitosan kaplı nanopartiküllere immobilize β -Galaktozidaz ile yapılan bir çalışmada, immobilizasyon sonrası optimum sıcaklık değerinde bir değişme gözlenmezken, sıcaklık profilinde genişleme gözlenmiştir (Chen ve Duan, 2015).

2016 yılında yapılan ve κ -Karragenan temelli hidrojelere immobilize edilen β -Galaktozidaz ile ilgili bir çalışmada, immobilizasyon sonrasında optimum sıcaklık profilinde gelişme gözlenmiştir (Zhang vd., 2016). Kitosan çapraz bağlı genipinin taşıyıcı olarak kullanıldığı diğer bir çalışmada serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklık profilleri benzer bulunmuştur (Klein vd., 2016). 2018 yılında yapılan bir çalışmada, Eupergit CM üzerine β -Galaktozidaz enzimi kovalent bağlanarak immobilize edilmiş ve serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 55°C bulunmuştur (Taher, 2018).

4.4.2. Optimum pH

Enzim aktivitesi ortam pH'ından etkilenmektedir. Enzimin %100 verimle çalışarak aktivite gösterdiği değere “optimum pH” denir. Enzimlerin aktivitesi ortamın pH'ına göre değişiklik gösterir. Enzimler kuvvetli asidik ve bazik ortamlara çok fazla dayanıklı değildir. Kuvvetli asidik ve bazik ortamlarda enzimler aktivitelerini kaybederek denatüre olurlar. Optimum pH'ın altında ve üzerinde olan pH değerlerinde enzimin ve substratın iyonik durumunda değişiklik söz konusudur. Serbest ve immobilize β -Galaktozidaz üzerine pH etkisini belirlemek için pH 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0; 9.5 değerlerinde çalışma yapıldı. % Bağlı aktiviteye karşı pH grafiği Şekil 4.9'da gösterildiği gibi çizilerek optimum pH değeri belirlendi.



Şekil 4.9. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında optimum pH eğrileri

Grafiği incelersek, serbest β -Galaktozidazın optimum pH'ı 4.5 iken immobilize β -Galaktozidazın optimum pH'ı 5.5 olarak bulunmuştur. Serbest β -Galaktozidaz pH 8 değerinden sonra aktivitesini tamamen kaybetmektedir. İmmobilize β -Galaktozidazın aktivitesi ise pH 8 değerinde halen devam etmektedir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi immobilize enzimin aktive olduğu pH aralığı, serbest enzimin aktive olduğu pH aralığına kıyasla daha geniştir. İmmobilize enzimin bütün pH değerlerinde aktivitesini geliştirmiş olmasının nedeni, tamamen doğal protein yapısında olan taşıyıcının üzerinde bulunan asidik ve bazik fonksiyonel grupların immobilize enzimin mikro çevresinde yoğunlaşmış olabileceği ve bununla birlikte taşıyıcının hem anyonik hem de kationik özellikleri üzerinde bulundurmasının önemli bir tampon özelliği göstermesi nedeniyle optimum pH grafiğinin serbest enzimle benzer fakat aktivite açısından özelliğini ekstrem pH değerlerinde nasıl geliştirdiğinin sebebi olarak açıklanabilir.

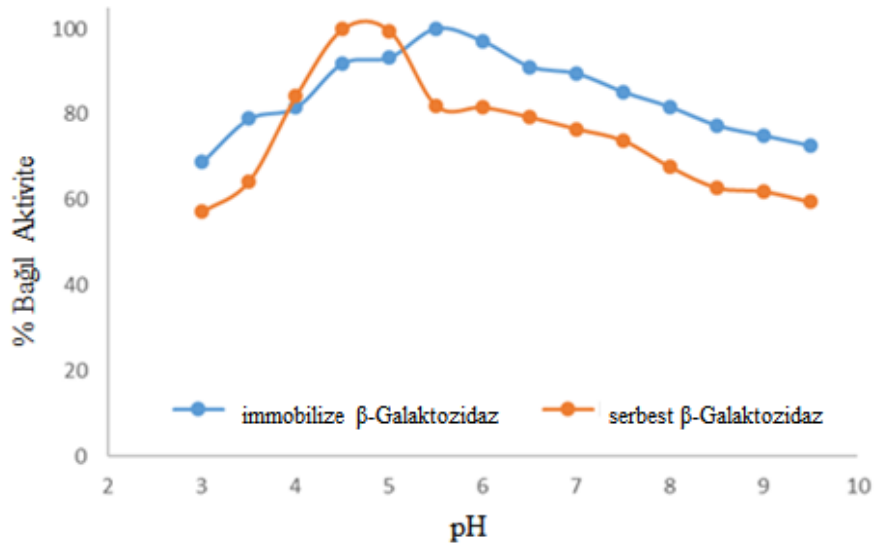
Bir literatür çalışmasında, glutaraldehit ile aktive edilen silika jel üzerine β -Galaktozidaz enzimi immobilize edilmiş ve serbest β -Galaktozidazın optimum pH değeri 7.0, immobilize β -Galaktozidaz için ise 7.5 olarak bulmuşlardır (Song vd., 2013). Diğer bir çalışmada, kitosan kaplı nanopartiküllere immobilize β -Galaktozidaz ile yapılan bir çalışmada, immobilizasyon sonrası optimum pH değerinde ve profilinde değişiklik görülmemiştir (Chen ve Duan, 2015). Diğer bir çalışmada ise, β -Galaktozidaz kitosan ile çapraz bağlanan genipine immobilize edilmiş ve optimum pH profilinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Klein vd., 2016). κ -Karragenan temelli

hidrojellere immobilize edilen β -Galaktozidaz ile ilgili bir çalışmada, immobilizasyon sonrasında optimum pH değerinde bir değişme olmamakla birlikte, immobilizasyon sonrasında optimum pH profilinde gelişme gözlenmiştir (Zhang vd., 2016). Kitosan çapraz bağlı genipinin taşıyıcı olarak kullanıldığı 2016 yılında yapılan diğer bir çalışmada serbest ve immobilize enzimin optimum pH profilleri benzer bulunmuştur (Klein vd., 2016).

Eupergit CM üzerine kovalent bağlanarak β -Galaktozidaz enzimi immobilize edilen bir çalışmada, serbest enzim için optimum pH 4.5 ila 5.5 arasında çıkmıştır. Immobilizasyondan sonra bu değer değişmemiştir (Taher. 2018).

4.4.3. pH kararlılığı

Serbest ve immobilize β -Galaktozidaz üzerine pH kararlılığının etkisini belirlemek için pH 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0; 9.5 değerlerinde tamponlar hazırlandı ve enzimler bu tamponlarda 1 saat inkübe edildi. % Bağlı aktiviteye karşı inkübasyon pH grafiği Şekil 4.10'da gösterildiği gibi çizilerek pH kararlılığı belirlendi.



Şekil 4.10. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında pH kararlılık eğrileri

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi; serbest ve immobilize β -Galaktozidazın aktiviteleri pH 3.0-9.5 değerleri arasında paralellik göstermektedir. Immobilize β -Galaktozidazın en iyi aktive olduğu pH 5.5 değerinde serbest β -Galaktozidazın aktivasyonu %82'dir. Immobilize enzim çok asidik ve çok bazik ortamlarda denatüre olmadan aktivitesini

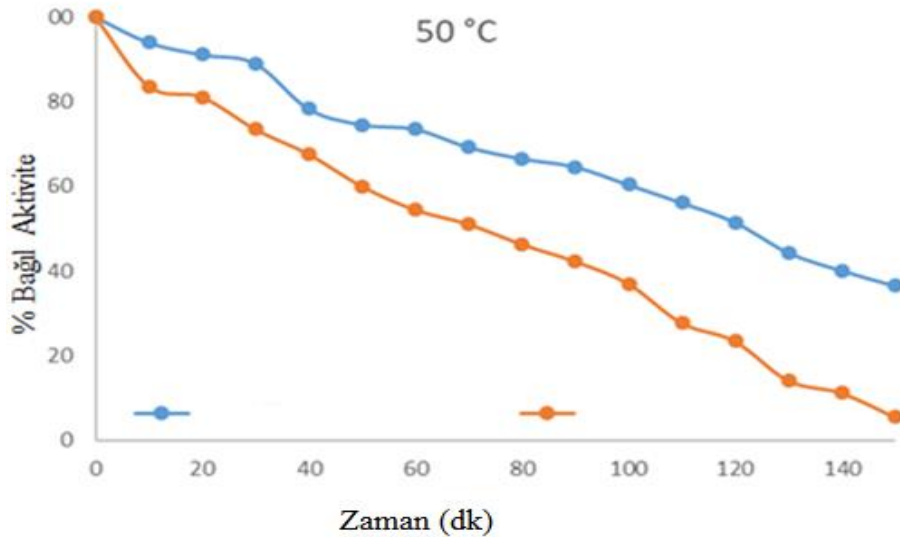
korumayı başarmıştır. Bunun nedeni olarak YKM’de yer alan asidik ve bazik yapıdaki aminoasit gruplarından kaynaklandığı söylenebilir. Optimum pH’nın belirlenmesi kısmında yapılan yorumu pH kararlılık sonuçları da desteklediğinden aynı nedenler burada da geçerliliğini korumaktadır.

Literatürde immobilize β -Galaktozidaz immobilizasyonundan sonra enzimin pH kararlılığı karakteristiği incelenmiştir. κ -Karragenan temelli hidrojellere immobilize edilen β -Galaktozidaz ile ilgili bir çalışmada, immobilizasyon sonrasında enzimin pH kararlılığında pH 5-7 arasında gelişme gözlenmiştir (Zhang vd., 2016).

4.4.4. Termal kararlılık

Sıcaklığın belirli değerin üzerine çıkmasıyla enzim aktivitesinde kayıp yaşanır. İnkübasyon süresine bağlı olarak enzim aktivitesinde bu kaybın oluşumu hızlanır. Enzimlerin geniş bir sıcaklık aralığında aktivitelerini koruyarak kararlılık göstermeleri endüstriyel alanda tercih edilmesini sağlar.

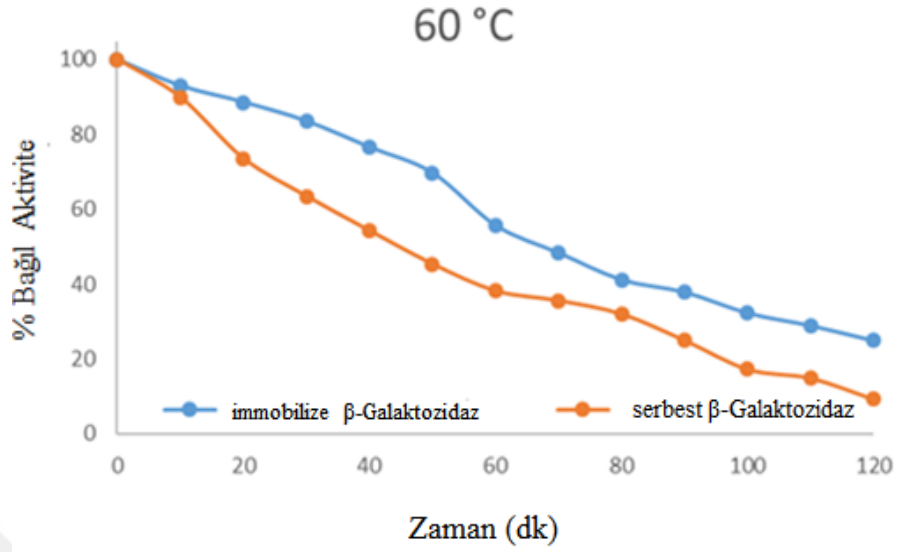
Serbest ve immobilize β -Galaktozidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için 50; 60; 70°C sıcaklık değerlerinde çalışılarak aktivite tayinleri yapıldı (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13.).



Şekil 4.11. YKM’ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında 50°C termal kararlılık eğrileri

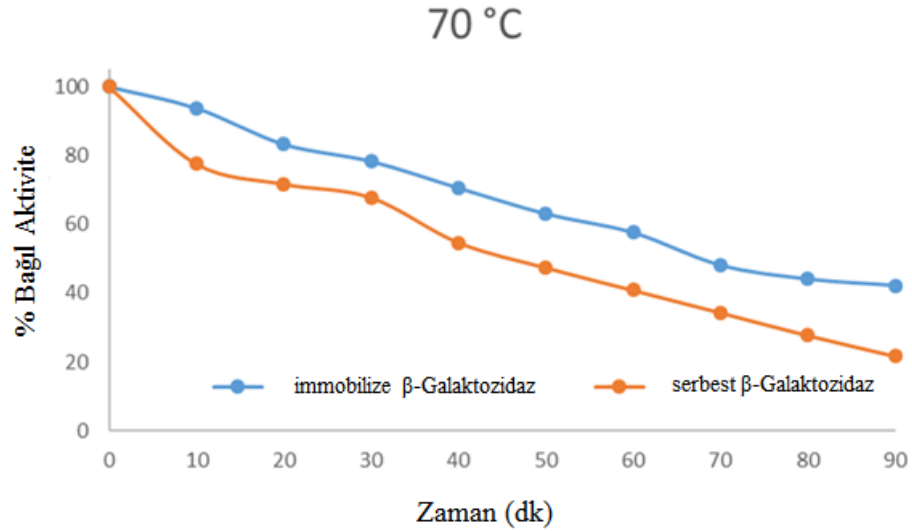
Şekil 4.11.’de görüldüğü gibi; 50°C’de 120 dk inkübasyon sonunda immobilize β -Galaktozidaz aktivitesinin %51,51 ini korurken, serbest β -Galaktozidaz aktivitesini %23,37 oranında korumuştur. Aynı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde serbest β -

Galaktozidaz aktivitesinin yaklaşık tamamını kaybederken, immobilize β -Galaktozidaz aktivitesinin %50 sini korumaktadır.



Şekil 4.12. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında 60°C termal kararlılık eğrileri

Şekil 4.12. incelendiğinde 60°C' de 50 dk inkübasyon sonunda serbest β -Galaktozidaz aktivitesinin yarısından fazlasını kaybederken, immobilize β -Galaktozidazın aktivitesi ~70' tir.



Şekil 4.13. YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında 70°C termal kararlılık eğrileri

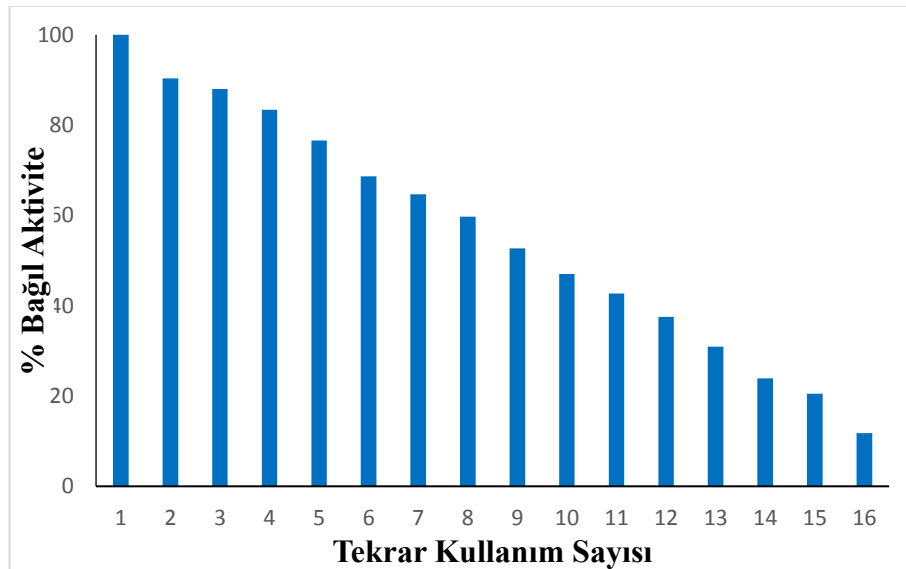
Gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi sonrası, enzim sıcaklığa daha çok dayanıklı hale gelmiştir. Sıcaklık artışına rağmen enzim, aktif merkezini koruyup enzimin denatürasyonunu engellemiştir. YKM'nin yapısında bulunan bileşenlere bağlı olarak

enzim-matriks arasındaki yüzey, nonkovalent etkileşimler artmış ve bunun sonucu olarak immobilizasyon sonrası enzim moleküllerinin olası konformasyonel değişikliklerini azaltmıştır. Böylece enzimin konformasyonel değişikliğini azaltarak termal kararlılığını arttırmıştır. Optimum sıcaklığın belirlenmesi kısmında yapılan yorumu termal kararlılık sonuçları da desteklediğinden aynı nedenler burada da geçerliliğini korumaktadır.

Literatürde immobilize β -Galaktozidaz immobilizasyonundan sonra enzimin termal kararlılık özelliği incelenmiştir. β -Galaktozidaz agregatları ile yapılan bir çalışmada, immobilizasyonun ardından termal kararlılıkta gelişme gözlenmiştir (Guerrero vd., 2015). κ -Karragenan temelli hidrojelere immobilize edilen β -Galaktozidaz ile ilgili bir çalışmada, immobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığında 25-55°C aralığında gelişme gözlenmiştir (Zhang vd., 2016). Kitosan çapraz bağlı genipinin taşıyıcı olarak kullanıldığı diğer bir çalışmada, immobilize enzimin 60°C’de enzimin termal kararlılığı oldukça iyi gelişme göstermiştir (Klein vd., 2016).

4.4.5. Tekrar kullanılabilirlik

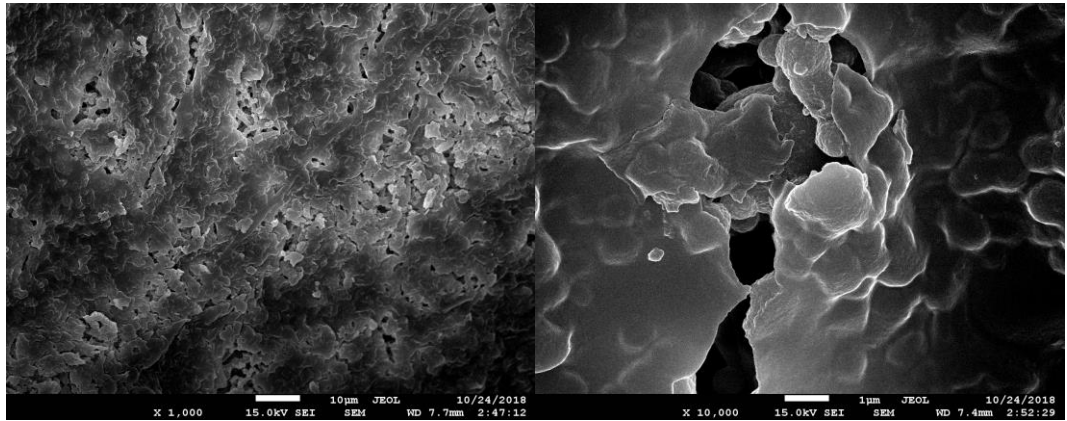
İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım sayılarının fazla olması maliyeti düşürdüğü için endüstride en çok istenilen özelliklerdendir. İmmobilize β -Galaktozidazın tekrar kullanılabilirlik performansını belirlemek için ardışık olarak aktivite ölçümleri yapıldı. % bağıl aktiviteye karşı tekrar kullanım sayısı Şekil 4.14’te verilmiştir.



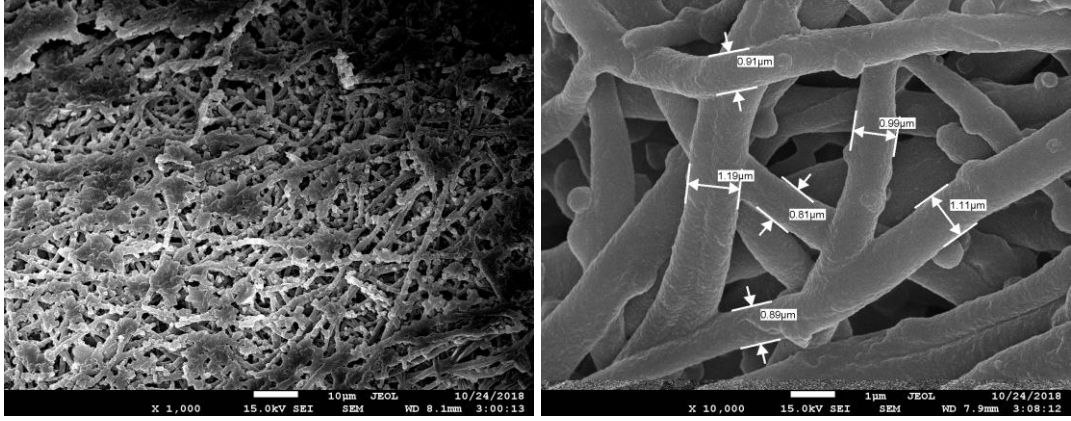
Şekil 4.14. YKM’ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında tekrar kullanım sayısı

İmmobilize β -Galaktozidaz 3. kullanımda aktivitesini %87 oranında; 10. kullanımda ise maksimum aktivitesinin yarısını halen koruduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada selüloz tanecikleri üzerine β -Galaktozidaz enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzimin akışkan yataklı reaktörde performansında herhangi bir azalma olmadan 3 tekrar kullanılabildiği saptanmıştır (Roy ve Gupta, 2003). β -Galaktozidaz immobilize konkanavalin A-selüloz için 6 kullanım sonrası %80 aktivite (Ansari ve Husain, 2010); çinko oksit nanopartiküllere immobilize β -Galaktozidaz için 7 kullanım sonrasında %60 aktivite (Husain vd., 2011); jelatin temelli kapsüllerde immobilize edilen β -Galaktozidaz için 15 kullanım sonrası %30 aktivite (Shen vd., 2011); aljinat boncuklarda tutuklanan β -Galaktozidaz 8 kullanım sonrası %60 aktivite (Das vd., 2015) literatürde çeşitli taşıyıcılara immobilize β -Galaktozidaz için tekrar kullanılabilirlik verilerindendir. Sunulan bu tez çalışmasının da literatür verilerine eş olarak başarılı tekrar kullanılabilirlik sonuçları vermesi, yumurta kabuğu membranının immobilizasyon sırasında, enzim denatürasyonu ve konformasyonel değişikliklere karşı direnci arttırması ile açıklanabilir.

Ayrıca 9 ve 16 kullanım sonrası YKM'lerin SEM fotoğrafları da Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da gösterilmektedir. Şekil 4.15.'te 9 kullanım sonrasında β -Galaktozidazın yüzeyden giderek membranların ortaya çıkması görüldü. Şekil 4.16' da 16. kullanım sonrası β -Galaktozidazın yüzeyden uzaklaştığı görüldü. İmmobilize YKM'nin 16 tekrar kullanım sonrası fiber çapları yaklaşık olarak 1 μ M'ye düşmektedir.



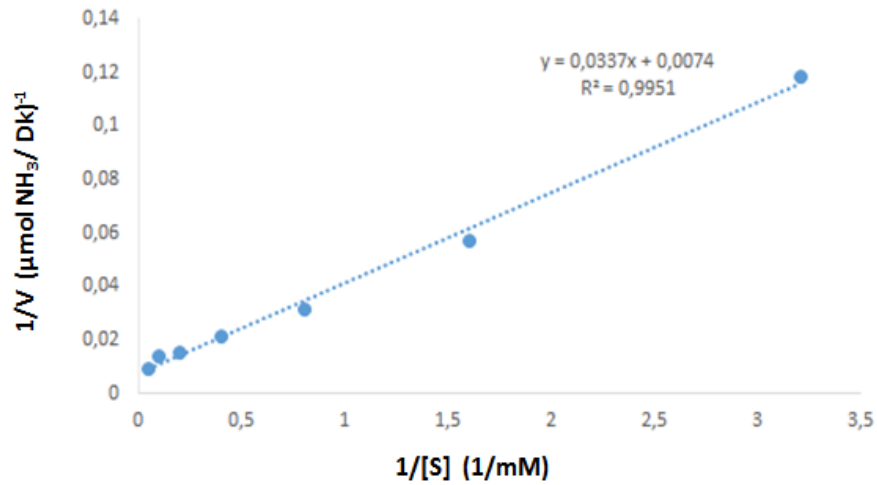
Şekil 4.15. İmmobilize β -Galaktozidazın 9. tekrar kullanımı sonrası YKM'nin SEM görüntüleri



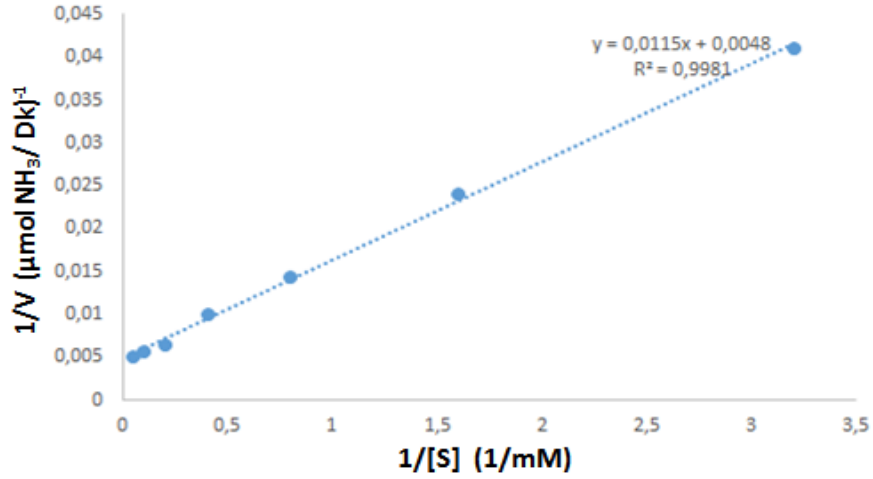
Şekil 4.16. İmmobilize β -Galaktozidazın 16. tekrar kullanımı sonrası YKM'nin SEM görüntüleri

4.4.6. Kinetik parametreler

Enzimler, immobilizasyon işleminden sonra mikro çevre değişikliği yaşayabilirler. Bu değişikliğe sebep olarak difüzyon sınırlaması, sterik engelleme, üç boyutlu yapıdaki değişiklikler gösterilebilir. Bu durumlarda enzimin kinetik davranışında da değişiklikler oluşabilir. Oluşan bu değişiklikleri YKM'ye β -Galaktozidaz immobilizasyonu ile belirlemek için optimum aktivite koşullarında 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mM derişimlerinde 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid substrat olarak kullanılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.'de verilmiştir. Bu grafiklerden K_m ve V_{max} değerleri belirlenerek Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. YKM'ye serbest β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında kinetik Lineweaver-Burk doğrusu



Şekil 4.18. YKM'ye immobilize β -Galaktozidaz immobilizasyonu sonrasında immobilize enzimin kinetik Lineweaver-Burk doğrusu

İmmobilize enzim ile serbest enzim karşılaştırması yapıldığında; immobilize enzimin K_m değerinde bir azalış söz konusudur. Bu da enzimin substrata olan ilgisinin artması ile açıklanır. Yine benzer-benzer ilişkisinin kinetik özelliklerin geliştirilmesine önemli katkı sağlaması ile de anlaşılmaktadır. Bu nedenle yumurta kabuğu membranının enzimin yapısal kararlılığına destek vermesiyle birlikte ilgisinin arttığını söylemek mümkündür. İmmobilize enzimin V_{max} değerindeki artışı ise, reaksiyon hızının artması ile doğru orantılı olarak açıklanabilir.

Çizelge 4.2. İmmobilize ve serbest β -Galaktozidaz enzim sistemlerinin kinetik parametreleri

İmmobilizasyon Taşıyıcısı	İmmobilize β -Galaktozidaz K_m	İmmobilize β -Galaktozidaz V_{max}	Serbest β -Galaktozidaz K_m	Serbest β -Galaktozidaz V_{max}	Kaynakça
Yumurta kabuğu membranı	0,31 mM	6,76 U/mg protein	0,39 mM	5,88 U/mg protein	Sunulan bu tez çalışması
Selüloz asetat membran	48 mM	39 μ mol /dk/cm ² taşıyıcı	38 mM	54 μ mol /dk/cm ² taşıyıcı	Güleç vd., 2010
Aljinat kapsüller	0,84 mM	9,4 U/mL	0,11 mM	7,2 U/mL	Shankar vd., 2011
Doğal ipek elyaflar	0,377 mmol/L	27,71 U/mg	0,193 mmol/L	93 U/mg	Monier, 2013
Aljinat mikropartiküller	0,44 mM	0,11 μ mol/dk	0,47 mM	0,58 μ mol/dk	Estevinho vd., 2014
Kitosan-hidroksiapatit kompleks	9,5 mM	454,5 μ mol/dk mg protei	1,011 mM	1098,9 μ mol/dk mg protein	Cabuk vd., 2014

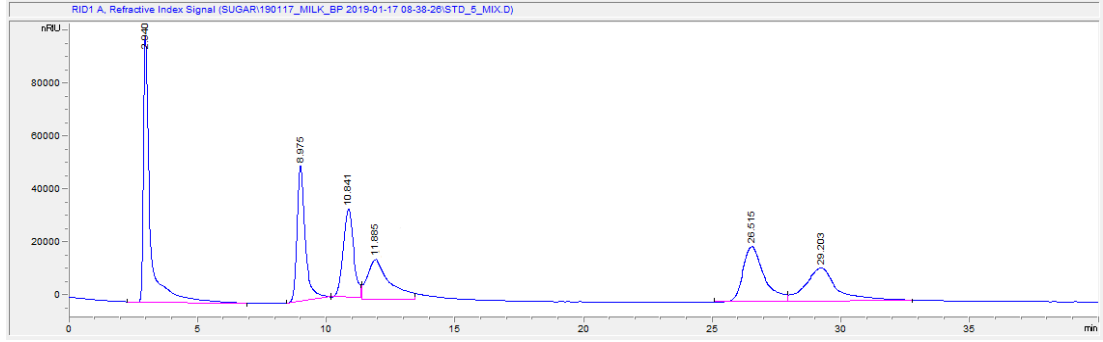
4.5. YKM'ye İmmobilize β -Galaktozidaz Enziminin Karbohidrat Dönüşüm Reaksiyonları Amacıyla Kullanılması

YKM'ye immobilize β -Galaktozidaz enziminin karbohidrat dönüşüm reaksiyonlarındaki performansını belirlemek için, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezi'nde bulunan Agilent 1260 Infinity yüksek performanslı sıvı kromatografi (RI dedektörlü) (HPLC) cihazı ve ticari olarak satın alınan pastörize yarım yağlı süt örnekleri kullanılmıştır. HPLC'de; laktozun β -Galaktozidaz enzimi yardımıyla glukoz ve galaktoza parçalanma oranları belirlenmiştir. Galaktoz ve glukoz enzimlerinin derişimleri artarken laktoz enziminin derişiminde azalma söz konusudur. Bu değişen derişim değerleri ile immobilize β -Galaktozidaz enziminin laktozu parçaladığı gözlemlenmiştir. Glukoz, galaktoz, laktoz şekerlerine ait standart HPLC kromatogramları Şekil 4.19(a), başlangıçta süt örneğinde bulunan şekerlerin HPLC diyagramları Şekil 4.19(b)'de verilmiştir.

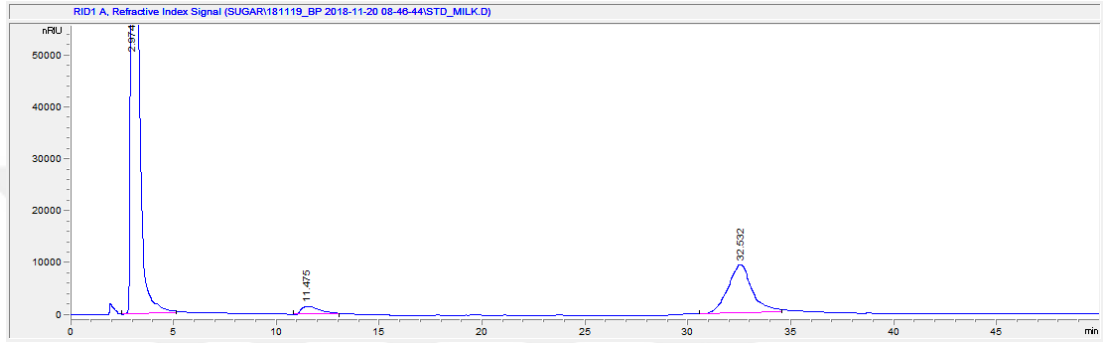
β -Galaktozidaz immobilize YKM'ler 1, 2, 3 ve 4 saat boyunca 45°C'de sütle muamele edildi. Reaksiyon süresi ile ilgili HPLC sonuçları Şekil 4.20 ve Çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyon süresinin optimizasyonu ile ilgili HPLC diyagramlarının hesaplamaları

Reaksiyon süresi	Şekerler	Başlangıç mmol	Harcanan mmol	Oluşan mmol	Reaksiyon sonrası mmol	Reaksiyon verimi %
1 saat	Laktoz	3,8	0,94	-	2,86	% 24,74
	Glukoz	0,6	-	2,19	2,79	
	Galaktoz	-	-	1,21	1,21	
2 saat	Laktoz	3,8	1,36	-	2,44	% 35,79
	Glukoz	0,6	-	3,05	3,65	
	Galaktoz	-	-	2,14	2,14	
3 saat	Laktoz	3,8	1,70	-	2,10	% 44,74
	Glukoz	0,6	-	3,34	3,94	
	Galaktoz	-	-	2,67	2,67	
4saat	Laktoz	3,8	2,12	-	1,68	% 55,79
	Glukoz	0,6	-	3,66	4,26	
	Galaktoz	-	-	2,90	2,90	



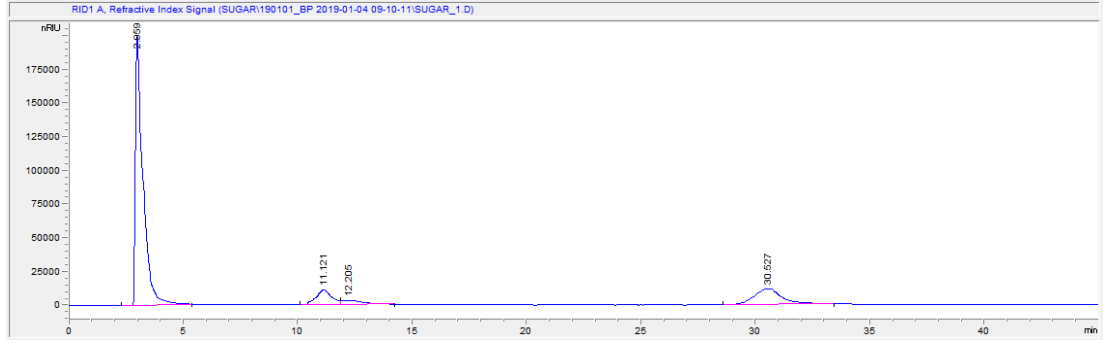
(a)



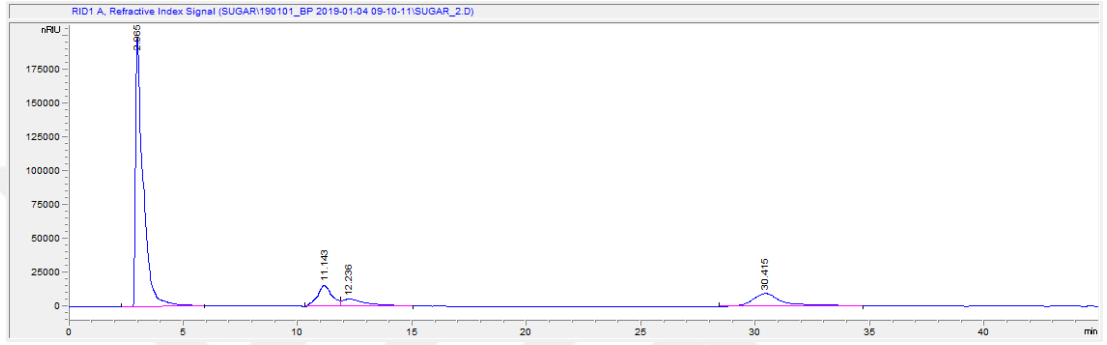
(b)

Şekil 4.19. Standart HPLC kromotogramları (a) Sırasıyla Fruktoz, Glukoz, Galaktoz, Laktuloz, Laktoz şeker karışımına ait standart HPLC kromotogramları (b) Reaksiyon öncesi (başlangıç) süt örneğindeki şekerlere ait HPLC kromotogramları-sırasıyla glukoz ve laktoz

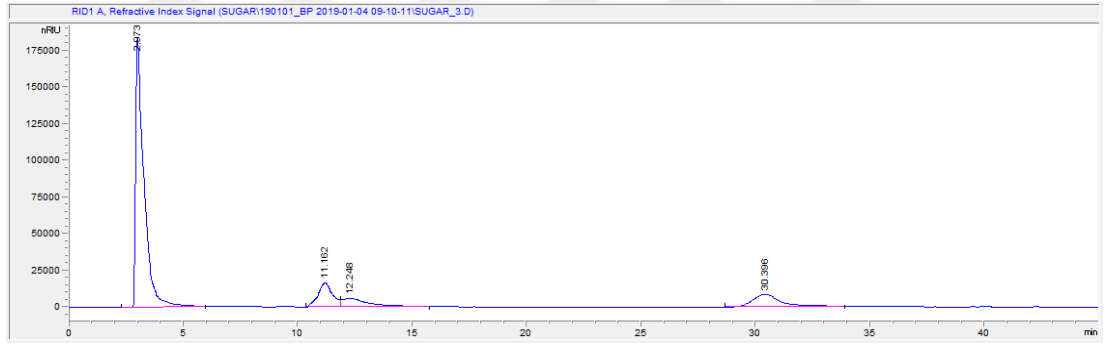
Şekil 4.19 ve Çizelge 4.3'te görüleceği üzere; 3,8 mmol olan laktoz miktarının 1, 2, 3 ve 4 saat reaksiyon süresince sırasıyla 2,86; 2,44; 2,10 ve 1,68 mmole düştüğü görülmüştür. Aynı diyagramda galaktoz piki üzerinden yapılan hesaplamalarla 1, 2, 3 ve 4 saat reaksiyon süresince sırasıyla 1,21; 2,14; 2,67 ve 2,90 mmol galaktoz oluştuğu hesaplanmıştır. İlgili şartlar altında enzimin %55,79 reaksiyon verimi ile 4 saat gerçekleştirilen reaksiyon sonucu laktozun azalan miktarı ve galaktozun oluşan miktarının sitokiyometrik olarak yakın değerler olduğu görülmektedir. Glukoz ve galaktoz piklerinin tam ayrılmaması nedeni olarak da ortamda bulunan diğer biyomoleküllerin girişimi olduğu düşünülmektedir. Literatürde aynı enzimle yapılan benzer çalışmalarda HPLC sonuçları verilmediği için karşılaştırmalı değerlendirme yapma imkanı olmamıştır.



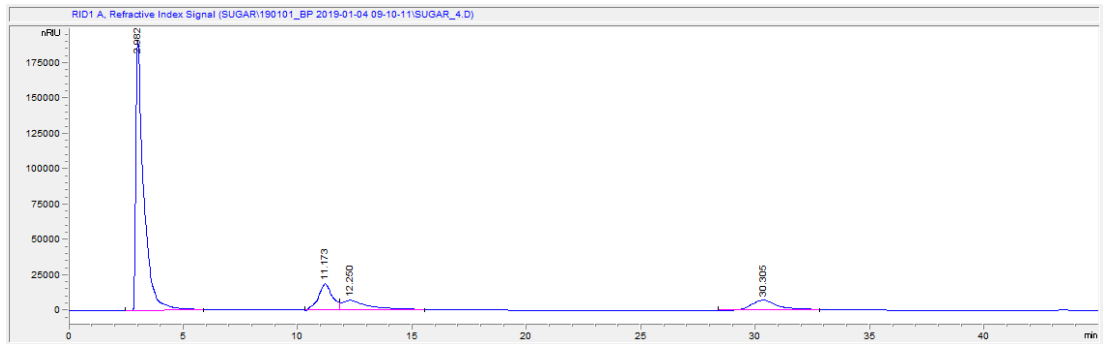
(a)



(b)



(c)



(d)

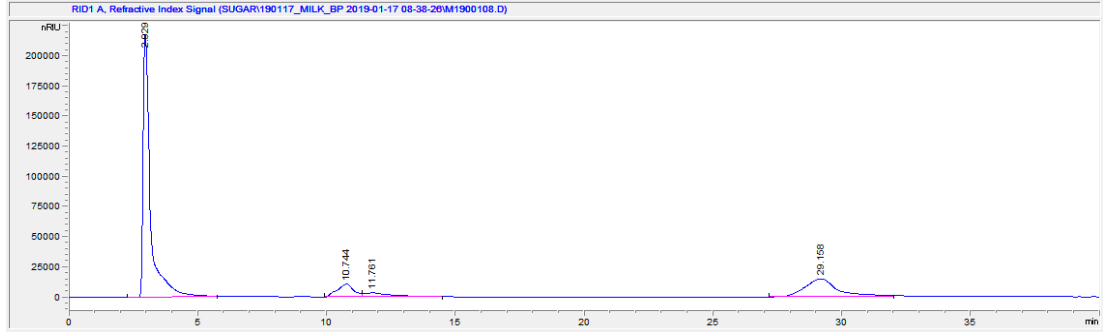
Şekil 4.20. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyon süresi ile ilgili HPLC diyagramları (a) 1 saat (b) 2 saat (c) 3 saat (d) 4 saat

5 mg YKM üzerine 1 U/mL; 12,5 mg YKM üzerine 2,5 U/mL; 25 mg YKM üzerine 5 U/mL; 37,5 mg YKM üzerine 7,5 U/mL enzim ilave edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilizasyon sonrası YKM'ler 4 saat boyunca 45°C'de su banyosunda inkübe edildi. YKM miktarı ile ilgili HPLC sonuçları Şekil 4.21 ve Çizelge 4.4'te verildi.

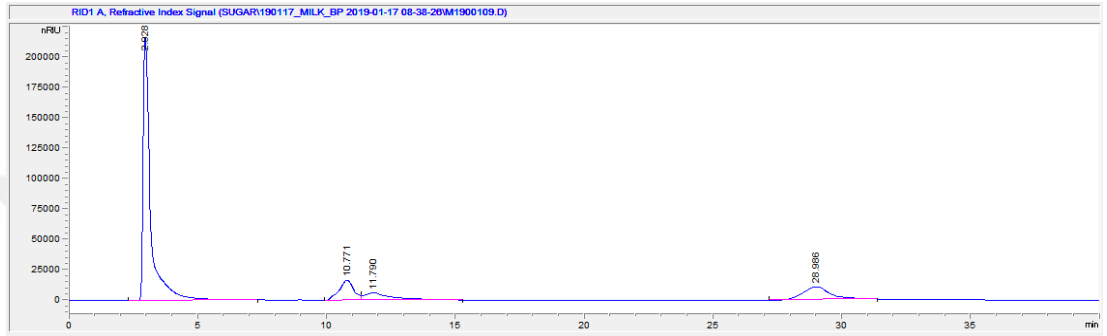
Çizelge 4.4. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin sütteki laktoz yıkım reaksiyonunda kullanılan YKM miktarı ile ilgili HPLC diyagramlarının hesaplamaları

YKM miktarı	Şekerler	Başlangıç mmol	Harcanan mmol	Oluşan mmol	Reaksiyon sonrası mmol	Reaksiyon verimi %
5 mg	Laktoz	3,8	1,05	-	2,75	% 27,63
	Glukoz	0,6	-	2,23	2,83	
	Galaktoz	-	-	1,61	1,61	
12,5 mg	Laktoz	3,8	1,55	-	2,25	% 40,78
	Glukoz	0,6	-	3,27	3,87	
	Galaktoz	-	-	2,95	2,95	
25 mg	Laktoz	3,8	1,74	-	2,06	% 45,79
	Glukoz	0,6	-	3,51	4,11	
	Galaktoz	-	-	3,22	3,22	
37,5 mg	Laktoz	3,8	1,84	-	1,96	% 48,21
	Glukoz	0,6	-	3,4	4,00	
	Galaktoz	-	-	3,51	3,51	

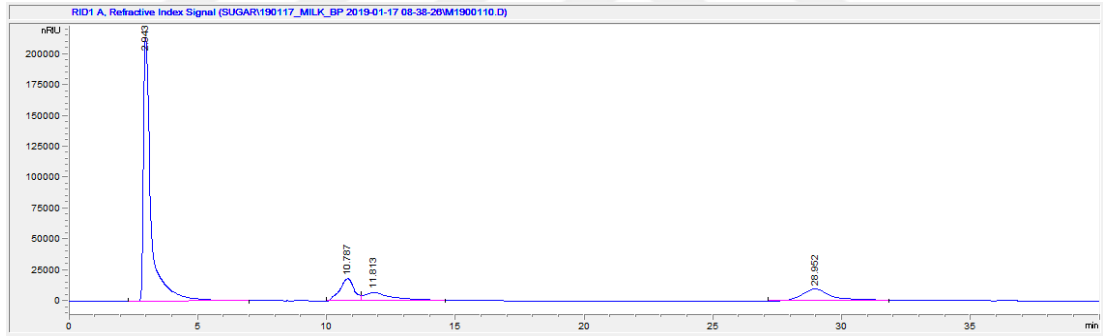
Şekil 4.21 ve Çizelge 4.4.'de görüleceği üzere; 3,8 mmol olan laktoz miktarının 5; 12,5; 25 ve 37,5 mg YKM ile reaksiyonu süresince sırasıyla 2,75; 2,25; 2,06 ve 1,96 mmole düştüğü görülmüştür. Aynı diyagramda galaktoz piki üzerinden yapılan hesaplamalarla 5; 12,5; 25 ve 37,5 mg YKM ile reaksiyonu süresince sırasıyla 1,61; 2,95; 3,22 ve 3,51 mmol galaktoz oluştuğu hesaplanmıştır. İlgili şartlar altında enzimatik reaksiyonun verimi % 48,21 olarak gerçekleşmiştir.



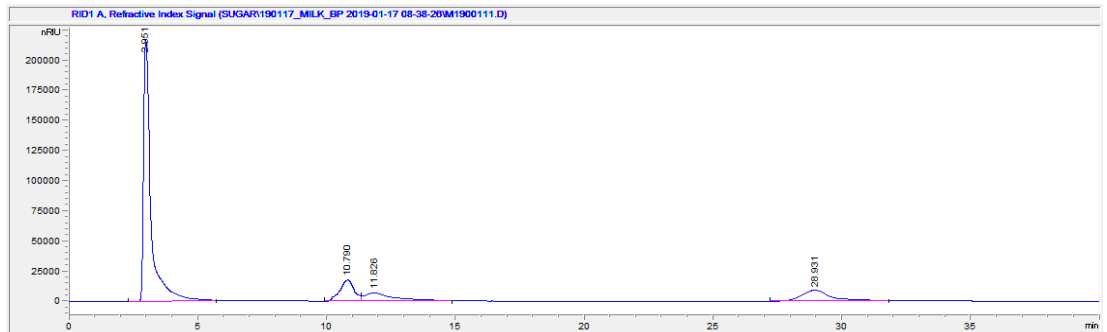
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.21. β -Galaktozidaz immobilize YKM'lerin süttaki laktoz yıkım reaksiyonunda kullanılan YKM miktarının optimizasyonu ile ilgili HPLC diyagramları (a) 5 mg (b) 12,5 mg (c) 25 mg (d) 37,5 mg

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının temel amacı, yüksek yüzey alanına sahip membran yapılı doğal polimer olan yumurta kabuğu membranının kullanılacağı doğal membran platform ile sütteki laktozun giderimi için alternatif bir proses geliştirmektir.

Sunulan tez kapsamında, taşıyıcı olarak membran yapılı doğal polimer olan yumurta kabuğu membranına β -Galaktozidaz enzimi immobilizasyonu yapılarak, hazırlanan doğal membran platformlara immobilizasyon koşullarının optimizasyon ve karakterizyon çalışmaları gerçekleştirildi.

-Birinci kısımda, yumurta kabuk membranına β -Galaktozidaz immobilizasyonu, immobilizasyon koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyonu yapıldı. YKM'lerin karakterizasyonu için SEM β -Galaktozidaz enziminin immobilizasyon optimizasyonu için; taşıyıcı miktarı, enzim miktarı, adsorpsiyon süresi, glutaraldehit miktarı temel parametreler olarak incelendi.

Optimum koşullarda hazırlanan immobilize β -Galaktozidaz membran platformlarının karakterizasyonunda; optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, termal kararlılık, tekrar kullanılabilirlik ve kinetik parametreleri incelendi.

-İkinci kısımda, aktivite ve kararlılık açısından en uygun olan β -Galaktozidaz immobilize yumurta kabuğu membranı ile hazırlanan doğal membran platformu ile süttten laktoz giderim performansı açısından değerlendirilmesi yapıldı.

-Genel karakterizasyon çalışmaları çerçevesinde;

-Sıcaklık parametrelerine bakıldığında; serbest β -Galaktozidaz 70°C'de denatüre olurken, immobilize β -Galaktozidaz aynı sıcaklıkta aktivitesini %18,22 değerinde korumaktadır.

-Asidik ve bazik ortam değerlendirmesi yapıldığında; pH 5.5'te immobilize β -Galaktozidaz göreceli aktivitesi %100 iken serbest β -Galaktozidaz aktivitesi aynı pH'ta %63'tür. Serbest β -galaktozidaz aktivitesinin maksimum olduğu pH değeri ise pH 4.5'tir.

-İmmobilize β -Galaktozidaz enziminin 10. kullanımda göreceli aktivitesi %50'nin altına düşmektedir. β -Galaktozidaz immobilize sistemleriyle yapılan çalışma sonuçları doğrultusunda tekrar kullanım sayıları 16. tekrara kadar devam etmektedir.

-Serbest β -Galaktozidazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,39 mM ve 5,88 U/mg protein ile β -Galaktozidaz immobilize membranların K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,31 mM ve 6,76 U/mg protein olarak hesaplandı.

Dünyada yıllık 10 trilyon yumurta tüketimi sonrası göz ardı edilen yumurta kabuğu ve yumurta kabuğu membranı yıllarca atık olarak düşünüldü. Atık olarak bakılan yumurtanın işlenmesi araştırmacılarda ilgi uyandırmıştır. Yumurta kabuğu membranı, yumurta kabuğu ile yumurta beyazı arasında bulunan doğal bir biyomateryal zardır. Bu doğal biyomateryal membran platformu, yüksek yapısal dayanım, geniş yüzey alanı, gözenekli yapı gibi çeşitli kimyasal ve yapısal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda iyi bir taşıyıcı olarak ön plana çıkmıştır.

Laktoz sadece memeli hayvanların sütlerinde bulunur ve sütün tek karbohidratıdır. Süt ve süt ürünleri ile birlikte alınan laktoz, β -Galaktozidaz enzimi ile glukoz ve galaktoza parçalanır. Bazı kişilerin vücutlarında β -Galaktozidaz aktivitesinin yetersiz kalması ya da hiç olmaması kişilerde laktoz intoleransına yol açmaktadır. Laktoz intoleransına bağlı olarak bu kişilerde şişkinlik, bağırsakta gaz toplanması ve kramplar görülür. Bu kişilerin laktozsuz gıdaları tüketmeleri gerekmektedir. Bu nedenle yeni gıda ürünlerinin geliştirilebilmesi için laktozun hidrolizi büyük önem taşımaktadır. Laktozun hidrolizlenmesinde asidik ve enzimatik yöntem olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Enzimatik hidrolizin; son ürünlerin bozulmadan kalması, besin içeriğinde bir zayıflığın olmaması, pH ve sıcaklık gibi reaksiyon koşullarına daha uygun olması vb. nedenler göz önüne alındığında asitle hidrolizine göre çok daha üstünlükleri vardır. Bu nedenle süt endüstrisinde sütte bulunan laktozun giderimi için enzimatik yöntem tercih edilmektedir. Serbest enzim kullanımı endüstriyel kullanıma elverişli değildir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre birçok üstünlüğünün bulunması çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlamaktadır. İmmobilizasyon, suda çözünen biyomolekülün, suda çözünmeyen reaktif bir polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak; suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorblanarak, polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılmasıdır.

β -Galaktozidaz enziminin membran yapılı doğal bir polimer olan yumurta kabuğu membranına immobilize edilmesiyle oluşturulan kararlılığı artırılmış enzim immobilize membran platformları kullanılarak sütteki laktozun giderilmesi sağlanmıştır. Sütte bulunan laktozun hidrolizi ile birlikte, laktoz intoleransı olan kişiler için laktozsuz süt üretimi başta olmak üzere diğer süt ürünlerinin üretim proseslerinin geliştirilmesi ile yeni gıda katkılarının elde edilmesini, üretim maliyetlerinin düşmesini ve laktozun kristalli yapısından kaynaklanan kumsu dokunun engellenmesini sağlaması açısından özellikle gıda endüstrisi için son derece katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, olumlu sonuçları itibarıyla ilgili çalışmalara ışık tutabileceği kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

- Akgül, F.B. (2010) *β -Galaktosidase enzimi ile yağsız sütte laktoz hidrolizinin incelenmesi ve modellenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 135s.
- Anonim, 2018a, <http://documents.tips/documents/enzimler-profdremel-ulakoglu-zengin-iuecerrahpasa-tip-fakueltesi.html>, Enzimler adlı sunum dosyası İ.Ü. Cerrahpaşa Üniversitesi, Enzimlerin kinetiği ile ilgili şekiller kullanıldı.
- Ansari, S.A. ve Husain, Q. (2010) Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode, *J Mol Catal B-Enzym*, 63(1-2): 68-74.
- Arias, J.L., Fernandez, M.S., Dennis, J.E. ve Caplan, A.I. (1991) Collagens of the chicken eggshell membranes, *Connect Tissue Res*, 26(1-2): 37-45.
- Ası, T. (1999) *Çizelgelerle biyokimya*, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, 206s.
- Asraf, S.S. ve Gunasekaran, P. (2010) *Current trends of β -galactosidase research and application*, Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Microbiology book series Formatex Research Center, Spain, 1.Baskı, Spain, 880-890.
- Aybastier, Ö. (2010) *Bitkisel atık yağların karakterizasyonu ve biyodizel üretiminde değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 121s.
- Bahl, O.P. ve Agrawal, K.M.L. (1969) Glycosidases of *Aspergillus niger* I. purification and characterization of α -and β -galactosidases and β -n-acetylglucosaminidase, *J Biol Chem*, 244(11): 2970-2978.
- Bailey, J.E. ve Ollis, D.F. (1986) *Biochemical engineering fundamentals*, 2. Baskı, McGraw-Hill International Edition, Singapore, 983s.
- Baker, J. ve Balch, D. (1962) A study of the inorganic material of hen's-eggshell, *Biochem J*, 82(2): 352-361.

- Barker, S. A., Emery, A. N., Novois J. M. (1971) Enzyme Reactorfor Industry, *Proc Biochem*, 5:11.
- Bayhan, A. ve Yentür, G. (1993) Laktoz İntoleransı, *Gıda*, 18: 385-388.
- Bellairs, R. ve Boyde, A. (1969) Scanning electron microscopy of the shell membranes of the hen'segg, *Cell Tissue Res*, 96(2): 237-249.
- Boyacı, I.H. (2001) *Dolgulu kolon entegre edilmiş enzim elektrot sistemleri ile gıda örneklerinde glukoz, sukroz ve laktoz miktarının saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 120 s.
- Bradford, M.M. (1976) A rapidand sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dyebinding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Boze, H., Mouilin, G. ve Galzy, P. (1987) Up take of galactose and kluyveromyces lactis biochemical characteristic and attempted genetical analysis, *Gen Microbiol*, 133: 15-23.
- Bugg, T. (1997) *An introduction to enzyme and coenzyme chemistry*, Black well Science Ltd, United Kingtom, 303s.
- Cabuk, B., Tari, C. ve Harsa, S.T. (2014) β -Galactosidase immobilization on chitosan-hydroxyapatite complex: effects of immobilization conditions, *J Nutr Health Food Eng*, 1(1): 13-23.
- Can, Ö. (2012) *β -galaktozidaz kullanımı ile galaktooligosakkarit sentezi ve sentezin yüzey yanıt yöntemi kullanımı ile optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 74s.
- Cao, L. (2005) *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*, Wiley-VCH Verlag Gmb H&Co. KGaA, Weinheim, 174s.
- Chai, Z., Li, Y., Liu, F., Du, B., Jiao, T., Zhang, C. ve Leng, X. (2013) Outer egg shell membrane as delivery vehicle for polysaccharide/protein microcapsules incorporated with vitamin E, *J Agric Food Chem*, 61(3): 589-595.
- Chen, S.C. ve Duan, K.J. (2015) Production of galactooligosaccharides using β -galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with tris (hydroxymethyl) phosphine as an optional coupling agent, *Int J Mol Sci*, 16(6): 12499-12512.
- Çetin, E.T. (1983) *Endüstriyel mikrobiyoloji*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 124s.

- Dağbaşı, S. (2009) *Beta-galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonu ve saflaştırılması*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 216s.
- Das, B., Roy, A.P., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S. ve Bhattacharjee, C. (2015) Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology, *Ecotox Environ Safe*, 121, 244-252.
- Datta, S., Christena, L.R. ve Rajaram, Y.R.S. (2013) Enzyme immobilization: an overview on technique and support materials, *3 Biotech*, 3(1): 1-9.
- Demain, A.L. ve Solomon N. A. (1981) Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, *Scientific American, Freeman & Comp.*, San Francisco, 108s.
- Denli, Z. (2013) *Kiwano (cucumis metuliferus) bitkisinde peroksidaz enzimlerinin kinetik özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 134s.
- Devi, P.S., Banerjee, S., Chowdhury, S.R. ve Kumar, G.S. (2012) Eggshell membrane: A natural bio template to synthesize fluorescent gold nanoparticles, *RSC Adv*, 2: 11578-11585.
- Estevinho, B.N., Damas, A.M., Martins, P. ve Rocha, F. (2014) Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process, *Food Res Inter*, 64: 134-140.
- Fernandez, M.S., Araya, M. ve Arias, J.L. (1997) Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules, *Matrix Biol*, 16(1): 13-20.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S. ve Logue, M.W. (2001) Serbest radikal tepkimeleri: 241–274, Editör: Uyar, T. *Organik kimya*, Güneş Kitabevi, Ankara, 1170s.
- Frey, A. ve Hegeman A.D. (2007) *Enzymatic reaction mechanisms*, Oxford University Press, Oxford, 831s.
- Gekas, V. ve Lopez-Leiva, M. (1985) Hydrolysis of lactose literature review, *Process Biochem*, 20(1): 2-10.

- Guerrero, C., Vera, C., Araya, E., Conejeros, R. ve Illanes, A. (2015) Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking, *Bioresource Techno*, 190: 122-131.
- Güleç, H.A., Gürdaş, S., Albayrak, N. ve Mutlu, M. (2010) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on low-pressure plasma-modified cellulose acetate membrane using polyethyleneimine for production of galactooligosaccharide, *Biotechnol Bioproc E*, 15(6): 1006-1015.
- Güleşci, N. (2013) *Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve karakterizasyonu*, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 124s.
- Güven, Ş.Y. (2014) Biyouyumluluk ve biyomalzemelerin seçimi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3): 303-311.
- Gloger, M. ve Tischer, W. (1981) Determination of catalytic activity of immobilized enzymes, *In Methods of Enzymes Analysis*, 2nd ed, Mc Graw Hill, New York, 142-154.
- Hassan, N.M.N. (2015) Chicken egg shell powder as dietary calcium source in biscuits, *World Dairy Food Sci*, 10(2): 199-206.
- Herdman, R.C. (1993) *Biopolymers: making material snature'sway*, U.S. Government Printing Office, 80s.
- Hincke, M.T., Gautron, J., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J., McKee, M.D. ve Nys, Y. (2000) Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix, *Matrix Biol*, 19: 443-453.
- Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A.B. ve McKee, M.D. (2012) The eggshell: Structure, composition and mineralization, *Front Biosci*, 17: 1266-1280.
- Holme, D.J. ve Peck, H. (2005) *Analytical Biochemistry*, 3. Baskı, Prentice Hall, England, 501s.
- Husain, Q., Ansari, S.A., Alam, F. ve Azam, A. (2011) Immobilization of *aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism, *Int J Biol Macromol*, 49(1): 37-43.

Işık, C. (2014) *Mis zambağının (Lilium candidum) biyokimyasal aktivitelerinin belirlenmesi ve endüstriyel amaçlı kullanılabilirliğinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 155s.

İmamoğlu, Ö. (2011) *Biyokimya ders notları*, Muğla Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Muğla, 132s.

İspirli, Y. (2008) *Taşıyıcısız immobilizasyon yöntemiyle çapraz bağlı glukoz oksidaz (GOD) enzim agregatlarının ve kristallerinin sentezi ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 79s.

Jesionowski, T., Zdarta, J. ve Krajewska, B. (2014) Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption*, 20: 801–821.

John, F.K. (1987) Enzyme technology, *Biotechnol*, 7: 37-62.

Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, A.M. (2010) *Biyokimya*, Nobel Yayınları, Ankara, 237s.

Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2004) *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum, 453s.

Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2011) *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, İstanbul, 632s.

Kennedy, J.F. ve Cabral, J.M.S. (1983) Immobilized enzymes in solid phase biochemistry, Scouten W.H. (editör), *Analytical and Synthetic Aspects*, New York, 253-391.

Klein, M.P., Hackenhaar, C.R., Lorenzoni, A.S., Rodrigues, R.C., Costa, T.M., Ninow, J.L. ve Hertz, P.F. (2016) Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -D-galactosidase immobilization, *Carbohydr Polym*, 137: 184-190.

Körlü, A. ve Altay, P. (2009) Enzimatik yün terbiyesi, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2): 81-91.

Lakshmi, S., Nair ve Laurencin C.T. (2007) Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog Polym Sci*, 32: 762–798.

Lartillot, S. (1993) Immobilization of lactose on silica gel: study of lactose hydrolysis using the immobilized material, *Biochem Edu*, 21(3):157- 159.

- Leach, R., Rucker, R. ve Van Dyke, G. (1981) Egg shell membrane protein: A nonelastin desmosine/isodesmosine-containing protein, *Arc Biochem Biophys*, 207(2): 353-359.
- Leblebici, F. (1999) *Türkiye şeker pancarı fabrikasyonunda dekstranaz kullanımı için optimum koşulların saptanması ve dekstranazın immobilizasyon olanaklarının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 140s.
- Lehninger, A.L. (2005) *Principles of biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York, 1152s.
- Liong, J., Frank, J. ve Bailey, S. (1997) Visualization of egg shell membranes and the interaction with salmonella enteritidis using confocal scanning laser microscopy, *J Food Protect*, 60(9): 1022-1028.
- Liu, J.K., Wu, Q.S., Ding, Y.P. ve Wang, S.Y. (2004) Biomimetic synthesis of BaSO₄ nanotubes using eggshell membrane as template, *J Mater Res*, 19(10): 2803-2806.
- Lloyd, M..L. ve Olsen, W.A. (1995) Disaccharide malabsorbtion, in: haubrich, WS, Schaffner F, Berk JE, eds., Bockus HL. Bockus Gastroenterology, 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1(1): 1087-1100.
- Mittal, A., Teotia, M., Soni, R.K. ve Mittal, J. (2016) Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents: A review, *J Molec Liq*, 223: 376-387.
- Monier, M. (2013) Immobilization of β -galactosidase from *Escherichia coli* onto modified natural silk fibers, *J Appl Polym Sci*, 130(4): 2923-2931.
- Mutlu, B. ve Kurt, M. (2005) Kırık kemik tedavilerinde kullanılan fiksatorlerin mekanik özellikleri ve üç değişik malzemeden yapılmış halka tipi fiksatorlerin mekanik testleri, *Mühendis ve Makine*, 46(543): 29-38.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. ve Rodwell, V.W. (2004) *Harper biyokimya*, Nobel Yayınevi, Ankara, 352s.
- Nakano, T., Ikawa, N. ve Ozimek, L. (2003) Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes, *Poult Sci*, 82(3): 510-514.

- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (2004) *Lehninger - principles of biochemistry*, NewYork, 193s.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (2005) *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 244s.
- Nys, Y., Gautron, J., McKee, M., Garcia-Ruiz, J. ve Hincke, M. (2001) Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens, *World's Poultry Sci J*, 57(4): 401-413.
- Oliveira, D.A., Benelli, P. ve Amante, E.R. (2013) A literature review on adding valuetosolid residues: hells, *J Clean Prod*, 46: 42-47.
- Önal, S. (2000) Karpuz (*Citrullusvulgaris*) α -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 190s.
- Özata, A. ve Kutlu, M. (2000) *Enzimoloji ders notları*, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 117s.
- Özevci, G. (2012) *Tekstil atık suyunda hidrojen peroksidin enzimatik giderimi, modellenmesi ve tasarımı*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 83s.
- Park, S., Choi, K.S., Lee, D., Kim, D., Lim, K.T., Lee, K.H., S, H., K, J., (2016) Eggshell membrane: Review and impact on engineering, *Biosystems Engineering*, 151: 446-463.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F. ve Kumar, H. (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -D-Galactosidase, *J Chem Technol Biot*, 81: 530-543.
- Pekin, B. (1980) *Biyokimya mühendisliği (temel ilkeler)*, Kimya Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi, 771s.
- Pişkin, E. (1987) *Polimer teknolojisine giriş*, Inkilap Kitap Evi, İstanbul, 199s.
- Ponkham W., Limroongreungrat K. ve Sangnark A. (2011) Extraction of collagen from hen eggshell membran ebyusin gorganicacids, *Thai J Agric Sci*, 44: 354-360.

- Rodriguez-Alonso, M.J., Rodriguez-Vico, F., Heras-Vazquez, F.J. ve Clemente-Jimenez, J.M. (2016) Immobilization of a multi-enzyme system for L-amino acids production, *J Chem Technol Biot*, 91: 1972-1981.
- Rose, M.L. ve Hincke, M.T. (2009) Protein constituents of the eggshell: Eggshell-specific matrix proteins, *Cell Mol Life Sci*, 66(16): 2707-2719.
- Roy, I. ve Gupta, M.N. (2003) Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes, *Process Biochemistry*, 39: 325-332.
- Sauer, G.R. ve Wuthier R.E. (1988) Fourier transform infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase-released matrix vesicles in vitro, *J Biol Chem*, 263 (27): 13718-13724.
- Sezgintürk, M.K., Göktuğ, T. ve Dinçkaya, E. (2005) Glucose oxidase- β -galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination, *Anal Chim Acta*, 551: 51-56.
- Shen, Q., Yang, R., Hua, X., Ye, F., Zhang, W., ve Zhao, W. (2011) Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization, *Process Biochem*, 46(8): 1565-1571.
- Shankar, S. K., Kumar, S. P. ve Mulimani, V.H. (2011) Calcium alginate entrapped preparation of α -galactosidase: Its stability and application in hydrolysis of soymilk galactooligosaccharides, *J Ind Microbiol Biot*, 38(9): 1399-1405.
- Solomon, B., Hollander, Z., Koppel, R. (1987) Methods in Enzymology, *Academic Press*, 135: 160-170.
- Song, Y. S., Lee, H. U., Park, C. ve Kim, S. W. (2013) Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase, *Carbohydr Res*, 369: 1-5.
- Stadelman, W.J., Olson, V.M., Shemwell, G.A. ve Pasch, S. (1988) *Egg and poultry meat processing*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 211s.
- Swagerty, D.L., Walling, A.D. ve Klein, R.M. (2002) Lactose intolerance, *Am Fam Physician*, 65(9): 1845-1860.

- Taher, A.Y. (2018) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galaktosidase to produce lactose-free milk, Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi, Siirt, 41s.
- Tekman, Ş. ve Öner, N. (1994) *Genel biyokimya dersleri*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Telefoncu, A. (1995) *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 305s.
- Telefoncu, A. (1997) Enzimoloji, Tübitak Yayınları, Aydın, 193-243, 353-383.
- Tonguç, İ.E. (2012) *Laktoz ve galaktoz intoleranslı bireylerin tüketimine yönelik fermente süt ürünlerinin geliştirilmesi ve kalite özelliklerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 198s.
- Topçular, C. (2006) *Taşıyıcılı ve taşıyıcısız sistemlerde immobilize peroksidaz enziminin karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 71s.
- Tsai, W., Yang, J., Lai, C., Cheng, Y., Lin, C. ve Yeh, C. (2006) Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane, *Bioresource Technol*, 97(3): 488-493.
- Tüylek, Z. (2017) Biyomateryaller ve sağlıkta kullanımı, *Bozok Tıp Dergisi*, 7(4): 80-89.
- Ullman, A. (2001) *Escherichia Coli* Lactose Operan, *Encyclopedia of Life Science*.
- Uyanık, A. (2008) *Beta-galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 83s.
- Üçüncü, M. *A'dan Z'ye peynir teknolojisi*, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir, 2004.
- Yang, D., Qi, L. ve Ma, J. (2002) Eggshell membran etemplating of hierarchically ordered macroporous net works composed of TiO₂ tubes, *Advanced Materials*, 14(21): 1543-1546.
- Yöntem, M. ve Ünaldı, M. (2011) *Biyokimya*, Aybil Yayınevi, Konya, 413s.

- Yu, H., Tang, Q., Wu, J., Lin, Y., Fan, L., Huang, M., Lin, J., Lin, Y. ve Yu, F. (2012). Using eggshell membrane as a separator in supercapacitor, *Journal of Power Sources*, 206: 463-468.
- Yüce, Ö. (2014) *Karın ağrısı ile giden fonksiyonel gastrointestinal hastalıklarda laktoz ve fruktoz intolerans sıklığının araştırılması*, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 105s.
- Yücel, Y. (2008) *Bazı enzimleri kullanarak biyodizel üretimi ve biyodizel özelliklerinin analitik metotlarla araştırılması*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 345s.
- Zaborsky, O.R. (1973) *Immobilizae Enzymes*, CRC Press, Ohio, 175s.
- Zhang, S., Gao, S. ve Gao, G. (2010) Immobilization of β -galactosidase onto magnetic beads, *Appl Biochem Biot*, 160(5): 1386-1393.
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L. ve McClements, D. J. (2016) Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity, *Food Chem*, 200: 69-75.
- Zhou, J., Wang, S., Nie, F., Feng, L., Zhu, G. ve Jiang, L. (2011) Elaborate architecture of the hierarchical hen's eggshell, *Nano Res*, 4: 171-179.
- Zhou, Q.Z.K. ve Chen, X.D. (2001) Effects of temperature and ph on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochem Engi J*, 9: 33-40.
- Wallenfels, K. ve O.P. Malhotra (1961) Galactosidases, *Advan. Carbohydrate Chem*, 16: 239-298.
- Wallenfels, K. ve Weil, R. (1972) 20 β -Galactosidase. In: *The enzymes*, 7.Baskı, Academic Press, London. 617-663.
- Walsh, G. ve Headon, D. (1994) *Protein biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd, England, 365s.
- Wiseman, A. (1986) *Hanbook of enzyme biotechnology*, 2. Baskı, Joh Wiley & Sons Ltd, England, 276s.

Wong, M., Hendrix, M.J., von der Mark, K., Little, C. ve Stern, R. (1984) Collagen in the egg shell membranes of the hen, *Dev Biol*, 104(1): 28-36.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Selen KIZILDAĞ

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi: Muğla–27 /10/1992

Medeni Hali :Bekar

Telefon : 05416242415

E-posta : selenkizil@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Turgutreis Anadolu Lisesi	2011
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2019

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma		X	