

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KİTOSANIN KİMYASAL MODİFİKASYONU

İdris YAZGAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Biyoteknoloji Ana Bilim Dal

Bilim Dal Kodu: 614.02.04

Sunuş Tarihi:08.02.2010

İdris YAZGAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “ Kitosanın Kimyasal Modifikasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08/02/2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Murat ELİBOL
Raportör Üye	: Yrd. Doç. Dr. Sait SARGIN
Üye	: Doç. Dr. Seçil ÖNAL

ÖZET**KİTOSANIN KİMYASAL MODİFİKASYONU**

YAZGAN, İdris

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Şubat 2010, 81 sayfa

Bu çalışmada nötralizasyon metodu ile hazırlanan kitosan boncuklarını lizin ve asparagin ile kimyasal modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kimyasal modifikasyonun etkileri *Bacillus licheniformis* α -amilazının (Termamyl®) modifiye edilmemiş kitosan boncuklarında ve modifiye edilmiş kitosan boncuklarında immobilizasyonu ile belirlenmiştir. Immobilizasyon prosesi sırasında protein bağlanma oranları; modifiye edilmemiş kitosan boncuklarda (NMKB) immobilize edilen enzim için %51,2, lizin ile modifiye edilmiş kitosan boncuklarda (LMKB) immobilize edilen enzim için %75,7 ve asparagin ile modifiye edilmiş kitosan boncuklarda (AMKB) immobilize edilen enzim için %60,3 olarak belirlenmiştir. Immobilizasyon sonucu aktivite geri kazanımları NMKB için %11,1 LMKB için %17,8 ve AMKB için %29,3 tür. Optimum sıcaklık ve pH değerleri kimyasal modifikasyon ile oldukça değişmiştir. Optimum sıcaklık değerleri kimyasal modifikasyon ile serbest enzim için 40 °C, NMKB için 45 °C, LMKB ve AMKB için 55 °C dir. K_m değerleri serbest enzim için 0,702 mg/mL, NMKB için 1,814 mg/mL, LMKB için 0,802 mg/mL ve AMKB için 2,355 mg/mL olarak belirlenmiştir. V_{mks} değerleri ise serbest enzim için 0,479 U/mg, NMKB için 1,112 U/mg, LMKB için 0,384 U/mg ve AMKB için 1,709 U/mg dir.

Anahtar kelimeler: Kitosanın kimyasal modifikasyonu, Enzim immobilizasyonu, α -amilaz

ABSTARCT**CHEMICAL MODIFICATIONS OF CHITOSAN**

YAZGAN, İdris

Master of Science Thesis, Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Murat ELİBOL

February 2009, 81 pages

In this study chitosan beads which were prepared via neutrazalition method were chemically modified with lysine and asparagine. The effects of chemical modifications were determined via immobilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase (Termamyl®) on both unmodified and chemically modified chitosan beads. During the immobilization process protein bonding ratios are 51,2% for immobilized the enzyme on unmodified chitosan beads (NMKB), 75,7 for immobilized the enzyme on lysine modified chitosan beads (LMKB), 60,3 % for immobilized the enzyme on asparagine modified chitosan beads (AMKB). The activity recoveries are 11,1% for NMKB, 17,8% for LMKB, 29,3% for AMKB at the end of the immobilization process. Optimum temperature and pH values were changed distinctly after chemical immobilization. Optimum temperatures are 40 °C for free enzyme, 45 °C for NMKB, 55 °C for LMKB and AMKB. K_m values are 0,702 mg/mL for free enzyme, 1,814 mg/mL for NMKB, 0,802 mg/mL for LMKB and 2,355 mg/mL for AMKB. V_{max} values are 0,479 U/mg for free enzyme, 1,112 U/mg for NMKB, 0,384 U/mg for LMKB and 1,709 U/mg for AMKB.

Keywords: Chemical modification of chitosan, Enzyme immobilization, α -amylase

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince bilgisini, deneyimini ve özel gayretlerini esirgemeyen başta Sayın Prof. Dr. Murat ELİBOL'a, Doç. Dr. Seçil ÖNAL'a ve Araş. Gör. Uzm. Taylan KURTULUŞ'a teşekkürlerimi sunarım. Tez yazımı süresince bilgisayarını kullandığım arkadaşım Cavit Dalkılıç'a, her daim yanımda bulunan aileme ve değerli arkadaşım Gizem'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 Kitin	2
1.2 Kitosan	3
1.3 Kitosanın Modifikasyonu	5
1.3.1 Kitosanın kimyasal modifikasyonu	7
1.3.2 Kitosanın enzimatik modifikasyonu	23
1.3.3 Kitosanın fiziksel modifikasyonu	24
1.3.4 Kitosanın graflanması	24
1.4 Alfa Amilazlar	24
1.4.1 Endoamilazlar	24
1.4.2 Ekzoamilazlar	25
1.4.3 Dallanma kırıcı amilazlar	25
1.4.4 α -Amilazların mikroorganizmalar arasındaki dağılımı	25
1.4.5 α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi	25
1.4.6 α -Amilazların biyokimyasal özellikleri	26
1.6 Bacillus licheniformis	30
1.7 Bacillus licheniformis α -amilazları (BLA)	33
1.7.1 Bacillus licheniformis alfa amilazlarının katalitik mekanizması	35
1.8 Enzim İmmobilizasyonu	36
1.8.1 İmmobilizasyon yöntemleri	37
1.8.2 İmmobilize enzimlerin özellikleri	40
1.8.3 Enzim immobilizasyon materyali olarak kitosan	42
2. MATERYAL VE METOT	47
2.1 Materyal	47

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2 Protein Tayini.....	47
2.3 Alfa Amilaz (Termamyl®) Aktivitesinin Belirlenmesi	48
2.4 Kitosan Boncuklarının Hazırlanması	50
2.5 Kitosan Boncuklarının Kimyasal Modifikasyonu.....	52
2.6 Termamyl® (α -amilaz) İmmobilizasyonu	53
2.7 Amino Asit Tayini	55
2.8 Optimum Koşulların Belirlenmesi	56
2.8.1 Optimum pH'nın belirlenmesi	56
2.8.2 Optimum sıcaklığın belirlenmesi	57
2.8.3 Kararlılık testleri	57
2.8.4 Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	58
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
3.1 Protein Standardı.....	59
3.2 Protein Tayini.....	59
3.3 Maltoz Standardının Oluşturulması	60
3.4 Kitosan Boncukların Hazırlanması	60
3.5 Kitosan Boncukların Modifikasyonu	60
3.6 α -Amilaz (Termamyl®) İmmobilizasyonu	61
3.7 Amino Standart Grafiğinin Oluşturulması	62
3.8 Optimum Koşulların Belirlenmesi	63
3.8.1 Optimum sıcaklığın belirlenmesi	63
3.8.2 Optimum pH'nın belirlenmesi	64
3.9 Kararlılık Testleri.....	64
3.9.1 pH kararlılığı.....	64
3.9.2 Termal kararlılık	68
3.9.3 Depo kararlılığı	69
3.9.4 Operasyonel kararlılık.....	70
3.10 Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi.....	71
4 SONUÇ	73
KAYNAKLAR DİZİNİ	76
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Kitinin birincil yapısı.....	3
Şekil 1.2	Kitosanın birincil yapısı.....	4
Şekil 1.3	Kitosanın potansiyel modifikasyon yolları.....	6
Şekil 1.4	Kitosandan oligokitosanların sentezi.....	9
Şekil 1.5	Kitosanın kuarternizasyonu	10
Şekil 1.6	Kitosanın katyonik türevleri	11
Şekil 1.7	Kitosanın epoksitlerle reaksiyonu	12
Şekil 1.8	Kitosanın karboksilasyonu	13
Şekil 1.9	Şeker bağlı kitosanların sentezi	14
Şekil 1.10	Kitosan-açıl türevlerinin sentezi.....	16
Şekil 1.11	Tiyollü kitosan elde edilmesi.....	18
Şekil 1.12	Sülfatlanmış kitosan elde edilmesi	19
Şekil 1.13	Fosforile kitosan elde edilmesi	21
Şekil 1.14	Kitosan-taç eter komplekslerinin elde edilmesi.....	22
Şekil 1.15	<i>Bacillus Licheniformis</i> in floresans mikroskobu görüntüsü	29
Şekil 1.16	<i>Bacillus licheniformis</i> α -amilazının üç boyutlu yapısı	32
Şekil 1.17	İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	36
Şekil 2.1	Kitosan boncuklarının hazırlanması	49
Şekil 2.2	Elde edilen Termamyl® immobilize edilmiş kitosan boncukları.....	52
Şekil 3.1	Protein standart grafiği	56
Şekil 3.2	Maltoz standart grafiği.....	57
Şekil 3.3	Optimum sıcaklık değerleri	60
Şekil 3.4	Optimum pH grafiği	61
Şekil 3.5a	Serbest enzim pH kararlılığı	62
Şekil 3.5b	NMKB pH kararlılığı.....	63
Şekil 3.5c	LMKB pH kararlılığı	64
Şekil 3.5d	AMKB pH kararlılığı.....	65
Şekil 3.6 a	25 °C için termal kararlılık	66
Şekil 3.6 b	50 °C için termal kararlılık	67
Şekil 3.7	Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depo kararlılığı	68
Şekil 3.8	İmmobilize enzimler için tekrarlanabilirlik grafiği	69

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

ŞekilSayfa

Şekil 3.9	Serbest ve immobilize enzimlere ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	71
-----------	---	----

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1	Kitosanın enzim immobilizasyondaki bazı uygulamaları.....	42
Tablo 3.1	Bağlanan amino asit miktarı	58
Tablo 3.2	Modifiye edilmiş ve edilmemiş kitosan boncuklarda protein bağlanma miktarları (%) ve aktivite geri kazanımları (%)	59
Tablo 3.3	Serbest enzim ve immobilize enzimlerin operasyonel kararlılıklar	69
Tablo 3.4	Serbest ve 3 immobilize enzimlerin kinetik parametreleri	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
k_D	Bozunma sabiti
t	Operasyon süresi
A_o	Başlangıç aktivitesi
A_t	t anındaki aktivite
K_m	Enzimin substrata olan ilgisi
K_i	Enzimin ürüne olan ilgisi
K_{cat}	Enzim turnover sayısı
EC.	Enzim kodu
kDa	Kilo dalton
-SH	Sülfidril gurubu
Kısaltmalar	Açıklama
yy	Yüz yıl
C-1	Glukozun 1 numaralı karbonu
C-2	Glukozun 2 numaralı karbonu
C-3	Glukozun 3 numaralı karbonu
C-6	Glukozun 6 numaralı karbonu
OH-2	Glukozun 2 numaralı karbonuna bağlı hidroksil gurubu
OH-3	Glukozun 3 numaralı karbonuna bağlı hidroksil gurubu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
CD	Halkalı dekstrin
NMKB	Modifiye edilmemiş kitosan boncukları
LMKB	Lizin ile modifiye edilmiş kitosan boncukları
AMKB	Asparagin ile modifiye edilmiş kitosan boncukları

1. GİRİŞ

Biyopolimer terimi doğada sentezlenen polimerler için kullanılan bir terimdir. Polisakkaritler polimerlerin bir sınıfını oluştururlar ve monosakkarit birimlerinden oluşurlar. 20.yy ortalarına kadar polisakkaritler sadece yapısal materyaller ve metabolik enerji kaynağı olarak düşünülmüşlerdir (Khor, 2001).

Kitosan, polisakkaritler içerisinde oldukça önemli bir yeri olan ve doğada yaygın olarak bulunan doğal bir polimerdir. İlk kez 1859 yılında Rouget tarafından kitinin derişik potasyum hidroksit çözeltisinde ısıtılması esnasında keşfedilmiştir. Bu reaksiyon sonucu kitin deasetillenmiştir. Kitosan üzerine yapılan temel çalışmalar 20.yy ilk yarısının ortasında başlamıştır (Goosen,1997). Kitosan doğada kitosan formunda bulunabildiği gibi kitinin alkali deasetilasyonu ile de elde edilebilmektedir. Ticari kitosan ise tamamen kitinin alkali deasetilasyonu ile elde edilmektedir.

Kitin yeryüzünde selülozdan sonra en fazla bulunan biyopolimerdir. Kitin hakkındaki ilk bilgi 1811 yılında Frechman Braconnot tarafından verilmiştir. Kitinin ideal yapısı β -(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz'un lineer polisakkaritidir. Tüm rezidüler N-asetil glukozamin yapısındadır (Khor, 2001)

Kitosanın modifikasyonu, kitosanın iskelet yapısına bir gurubun eklenmesiyle var olan özelliklerin artırılması yada yeni özellikler katılmasını ifade eder. Kimyasal modifikasyon ise modifikasyonun kimyasal yöntemlerle gerçekleştirildiğini ifade eder. Kitosan C2 üzerindeki birincil amino gurubu, C3 deki ikincil hidroksil gurubu ve C6 daki birincil hidroksil gurubu üzerinden kimyasal modifikasyona tabi tutulur (Mourya and Inamdar, 2008).

Enzimler doğada fizyolojik koşullarda, genellikle sulu ortamda, normal sıcaklık, basınç, nötral pH ve reaktantların seyreltik koşullarında reaksiyonları katalizlerler. Enzimlerin doğal ortamlarından uzaklaştırılıp dış ortamlarda istenilen reaksiyonları gerçekleştirilmesi istendiğinde enzimlerin denatürasyonu ve düşük aktivite gösterme gibi olumsuzluklar meydana gelmektedir. Bu durumu

aşmak için enzimler spesifik özelliklere sahip destek materyallerinde tutuklanarak kullanılırlar. (Telefoncu, 1997).

Amilazlar nişastayı parçalayarak dekstrinleri ve glukozdan oluşmuş küçük polimerleri oluşturan hidroliz sınıfı enzimlerdir. Önemli kullanım alanlarına sahip olduklarından biyoteknolojik öneme sahiptirler. Amilazlar bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı olabilirler. Biyoteknoloji açısından ise mikroorganizma kaynaklı olanlar önemlidir (Gupta et al, 2003).

Gerçekleştirilen bu çalışmada, kitosan asparagin ve lizin amino asitleriyle kimyasal modifikasyona tabi tutularak α -amilaz (Termamyl®) immobilizasyonu için destek materyalleri geliştirildi. Nötralizasyon metodu ile oluşturulan kitosan boncuklar hem modifiye edilmeden hem de kimyasal modifikasyona tabi tutularak Termamyl® immobilizasyonu için kullanılmıştır. Kimyasal modifikasyonun pozitif etkisi her üç durumda yapılan immobilizasyonun verimlilikleri kıyaslanarak belirlenmeye çalışılmıştır.

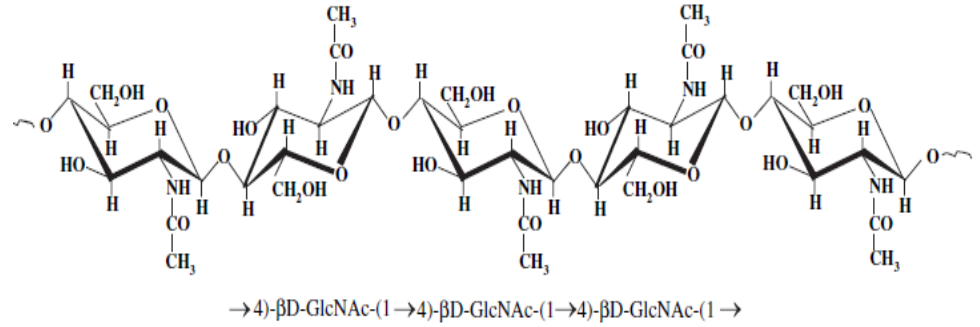
1.1 Kitin

Kitin, yeryüzünde selülozdan sonra en fazla bulunan biyopolimerdir. Kitin hakkındaki ilk bilgi 1811 yılında Frechman Braconnot tarafından verilmiştir. Bracannot bazı yüksek fungilerden izole ettiği alkaliye dayanıklı fraksiyonu “fungine” olarak isimlendirmiştir. 1823 de Odier “fungine” benzer bir materyali böcek kütükilinden izole etmiştir ve bu materyali Yunancada “post ceketi” anlamına gelen “chiton” kelimesinden hareketle “chitin” olarak isimlendirmiştir. Kitinin birincil yapısı şekil 1.1’de görülmektedir.

Kitinin kimyasal yapısının aydınlatılmasında ilk karşılaşılan durum 1843 yılında Payen tarafından kitinin yapısında azotun varlığının bulunmasıdır. 1876 yılında Ledderhose kitinin hidroliz ürünü olarak glukozamini ve asetik asidi tanımlamıştır. Karrer ve Zechmeister birbirlerinden habersiz olarak N-asetilglukozaminin kitinin temel yapısı olduğunu göstermişlerdir. Son olarak da 20.yy ilk yarısında Meyer kitinin 1-4 bağlarını ve β -D- konformasyonunu X-ışını kırılım yöntemi, enzimatik reaksiyonlar ve deaminasyon reaksiyonlarıyla belirlemiştir.

Kitinin ideal yapısı β -(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz'un lineer bir polisakkaritidir. Tüm rezidüler N-asetil glukozamin yapısındadır (Khor, 2001).

Kitin, kaynağına bağlı olarak α - ve β - kitin olarak ikiye ayrılır. Bu tanımlama katı faz NMR ve X-ışını kırılım spektroskopisi verilerine dayanmaktadır. γ -Kitine rastlanmış olsa da detaylı analiz sonucu γ -kitinin α -kitin ailesinin bir türü olduğu detaylı araştırmalar sonucu belirlenmiştir. En yaygın bulunan form α -kitindir. α -Kitin, fungi ve maya hücre duvarlarında, yengeç ve istakoz tendon ve kabuklarında, karides kabuklarında ve böcek kütiküllerinde bulunur. β -formu ise mürekkep balığının proteinlerinde, protozoa ve deniz yosununda bulunmaktadır (Rinaudo, 2006).



Şekil 1.1: Kitinin birincil yapısı (Pranshanth and Tharanathan, 2007).

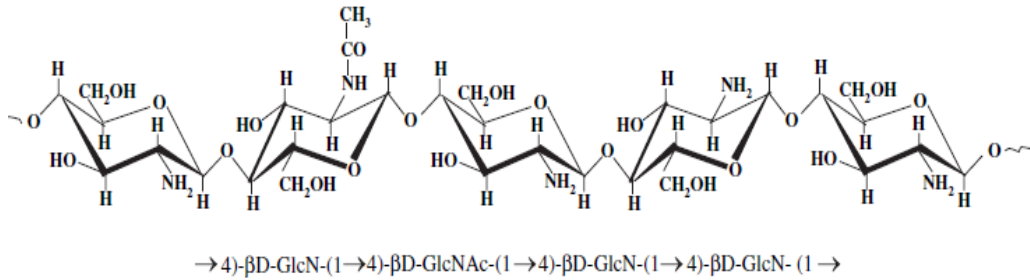
1.2 Kitosan

Kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen katyonik bir polimerdir. Kitosan ilk olarak 1859 yılında Rouget tarafından kitinin derişik potasyum hidroksit çözeltisinde ısıtılması esnasında keşfedilmiştir. Bu reaksiyon sonucu kitin deasetillenmiştir. Kitosan üzerine yapılan temel çalışmalar 20.yy ilk yarısının ortasında başlamıştır. 1934 yılında Rigby tarafından kitosan üzerine 2 patent alınmıştır. Bunlardan ilki kitinden kitosanın eldesi ve ikincisi kitosan film ve fiberlerinin eldesi üzerinedir. Aynı yıl kitosan fiberlerin X-ray örnekleme yapılmıştır. Kitosan üzerine yapılan çalışmaların fazlalığı sadece doğal olarak çok bulunmasından değil aynı zamanda non-toksik ve biyoyıkılabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Kitosan doğal olarak yengeç, istakoz gibi kabuklular ve funguslarda bulunur. Kitosanın birincil yapısı şekil 1.2 de görölmektedir.

Kitosanın en önemli özelliklerinden birisi şelatlamadır. Kitosan seçimli olarak istenen materyale örneğin kolesterol, yağlar, metal iyonları, proteinler ve tümör hücrelerini kuvvetli şekilde şelatlamaktadır. Şelatlama özelliği gıda hazırlama, sağlık, su temizleme ve farmösötik alanında sıkça kullanılmaktadır. Diğer özellikler tümör gelişiminin inhibisyonu, antifungal etki, yaraların iyileşmesinin hızlanması, immün sistemin stimülasyonu ve bitki çimlenmesinin hızlandırılması olarak verilebilir.

Ticari kitosan temel olarak deniz kabuklularının yapısındaki kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Kitosanın kalitesini ürünün saflığı, viskozitesi, deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı ve polimorfoz yapısı belirler. Kitinin, kitosana dönüşümündeki proses şartları bu özelliklerin belirlenmesinde etkindir.

Kitosan, su, alkali ve organik çözümlerde çözünmez fakat pH'nın <6 olduğu durumlar için pek çok organik asit çözeltisinde çözünür. Kitosanın çözünürleştirilmesinde çoğunlukla asetik asit ve formik asit kullanılmaktadır. Bazı durumlarda seyreltik mineral asitler de (nitrik asit, hidroklorik asit, perklorik asit ve fosforik asit) kitosanın çözünürleştirilmesinde kullanılabilir (Goosen, 1997).

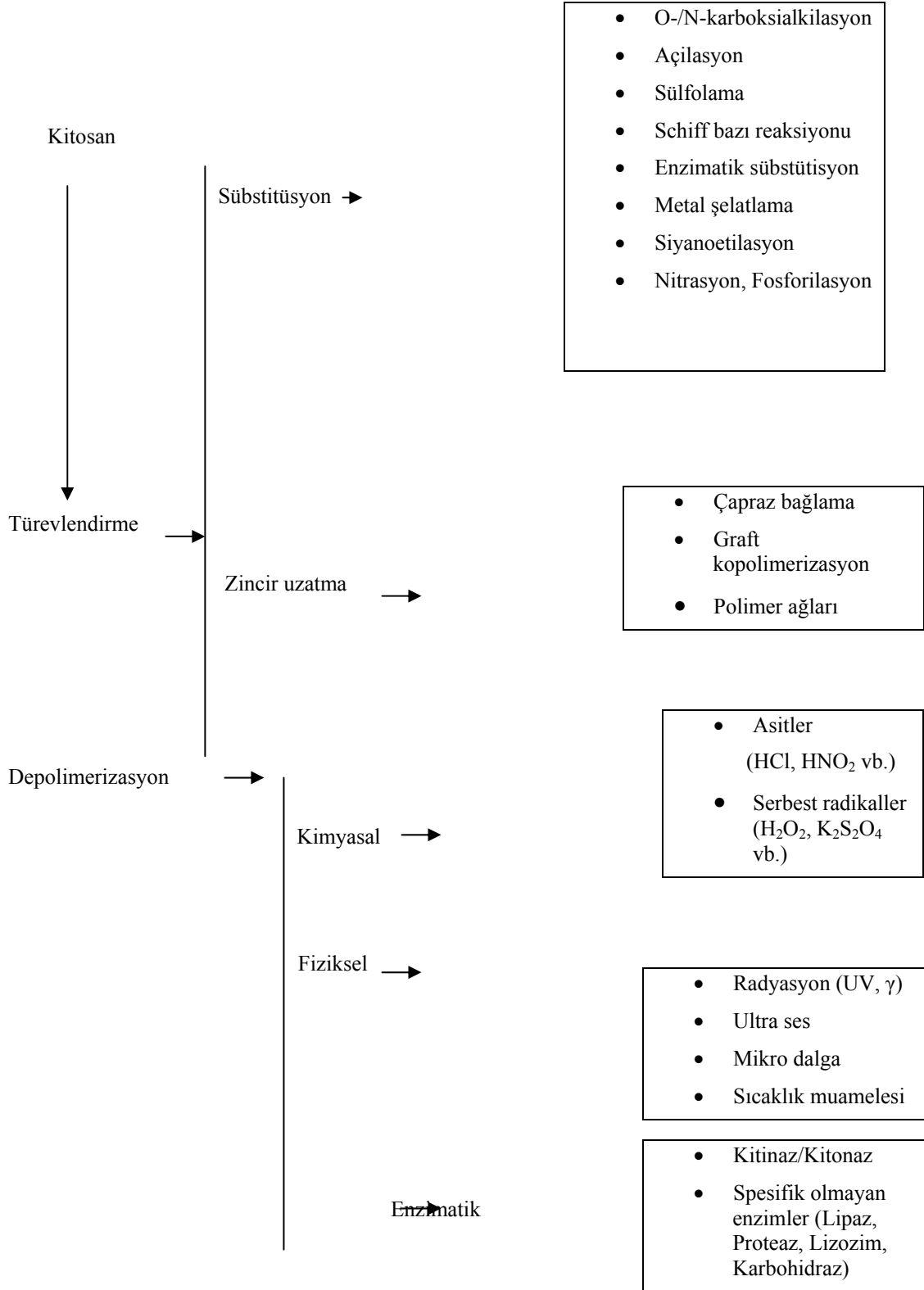


Şekil 1.2: Kitosanın birincil yapısı (Pranshanth and Tharanathan, 2007).

Kitosanın katyonik doğası NH_3^+ ($\text{pK}_a=6,3$)'dan ve antimikrobiyal özelliği ise polikasyonik yapısından kaynaklanmaktadır. Bakteri membranının polianyonik doğası polikasyonik kitosana elektrostatik etkileşime girmesini sağlar ve bu etkileşim sonucu bakteri hayati fonksiyonlarını yerine getirecek yetiden yoksun hale gelir. Ayrıca kitosanın DNA ile etkileşime girebiliyor olması da göz önüne alındığında kitosanın antimikrobiyal ajan olarak kullanımına olanak sağlar (Raafat et al, 2008).

1.3 Kitosanın Modifikasyonu

Kitosanın sahip olduğu özellikleri geliştirmek amacıyla kitosan fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak modifiye edilmektedir. Kimyasal modifikasyon en yaygın olan modifikasyon türüdür (Mourya and Inamdar, 2008). Şekil 1.3 de kitosanın potansiyel modikasyon yolları görölmektedir.



Şekil 1.3: Kitosanın potansiyel modifikasyon yolları (Prashanth and Tharanathan, 2007).

1.3.1 Kitosanın kimyasal modifikasyonu

Kitosanın modifikasyonu kitosanın iskelet yapısına bir gurubun eklenmesiyle var olan özelliklerin artırılması ya da yeni özellikler kazandırılmasını ifade eder. Kimyasal modifikasyon ise, modifikasyonun kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmesidir. Kitosan birincil amino gurubu, C-3 te ikincil hidroksil gurubu ve C-6 da birincil hidroksil gurubu üzerinden kimyasal modifikasyona tabi tutulur (Mourya and Inamdar, 2008)

C-2 deki NH_2 gurubu ile spesifik reaksiyonlar gerçekleştirilirken, C-3 ve C-6 pozisyonlarındaki hidroksil guruplarıyla spesifik olmayan reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Bunlar genellikle esterifikasyon ve eterifikasyon reaksiyonlarıdır. Ana reaksiyon C-2 pozisyonundaki $-\text{NH}_2$ gurubu üzerinden kuarternizasyon ve indirgeyici aminasyonla aldehitik bir fonksiyonun $-\text{NH}_2$ ile reaksiyonudur. C-3 ve C-6 daki reaksiyonlar sulu çözeltilerde ılımlı koşullar altında gerçekleşir ve rastgele dağılmış süstitüsyonlar oluşur (Sashiwa and Aiba, 2004).

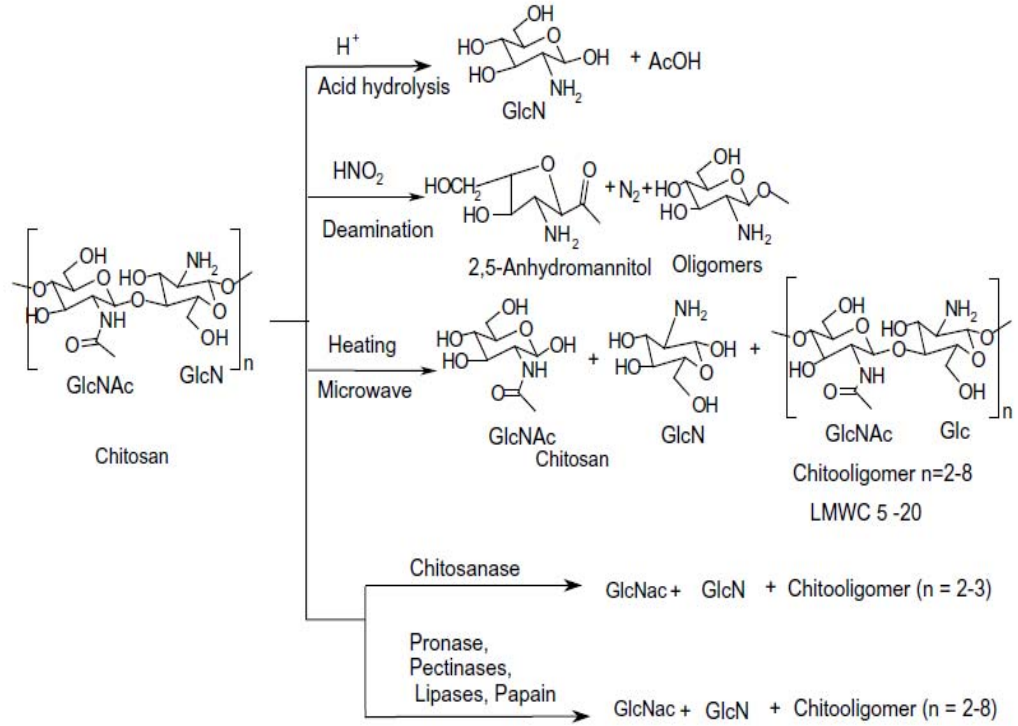
Kitosanın kimyasal modifikasyonu, modifikasyonun yöntemi veya amaç üzerinden sınıflandırmaya tabi tutulamayacak kadar geniş ve birbiri içine girmiş durumdadır. Kitosana gurup eklenmesinde grafting, Schiff bazı reaksiyonu, indirgeyici aminasyon, indirgeyici alkilasyon, iyonotropik karışım oluşturma, çapraz bağlama, amino ve hidroksil guruplarını aktifleyici ajan ile aktifleme yöntemi kullanılan başlıca yöntemlerdir.

Kitosanın modifikasyonu ile elde edilen ürün yalnızca tek bir amaca hizmet edebileceği gibi birden fazla amaca da hizmet edebilmektedir. Bu durum kitosanın mevcut özelliğinin eklenen gurupla birden fazla yönden artırıldığını göstermektedir. Bu duruma bir örnek olarak N-süksinil kitosanın yara iyileşmesi amacıyla ve kozmetik sektöründe kullanılabilmesi verilebilir.

1.3.1.1 Oligomerizasyon

Kitosan yüksek molekül ağırlığına sahip olduğundan viskozitesi yüksektir. Yüksek viskozite kitosanın kullanımını kısıtlamaktadır. Kitosanın depolimerizasyonu (kitonoliziz) ile çözünürlüğü mükemmel oligomerler üretilebilmektedir. Kimyasal, fiziksel ve enzimatik metotlar kullanılarak depolimerizasyon gerçekleştirilebilmektedir. Kimyasal metot yüksek sıcaklık eşliğinde asidik hidrolizle gerçekleştirilir fakat yüksek fiyat ve düşük verim gibi olumsuzlukları barındırır. Asidik hidroliz spesifik olmadığından büyük miktarlarda monomerlerin ve D-glukoz ünitelerinin oluşumuna sebebiyet verir. Asidik hidrolizde HCl, HNO₃, H₃PO₄ gibi kuvvetli asitler ve H₂O₂ gibi radikal oluşturuju ajanlar kullanılmaktadır. Depolimerize kitosan 1-40 ünite arasındadır.

Enzimatik olarak kitosanın depolimerizasyonu lizozim, pektinaz, selüloz, hemiselüloz, lipaz, amilaz, pronaz, kitin deasetilaz enzimleri ile gerçekleştirilir. Enzimatik hidroliz, proses şartlarının ılımlı olması ve oluşturulan ürünlerin istenen doğrultuda olması nedeniyle olumludur, fakat büyük çapta etkin kullanımı şimdilik zor görünmektedir. Kitoooligomerlerin elde edilme yolları şekil 1.4'de gösterilmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



Şekil 1.4: Kitosandan oligokitosanların sentezi (GlcN=glukoz amin, GlcNAc=N-asetil glukozamin, LMWC= Düşük molekül ağırlıklı kitosan).

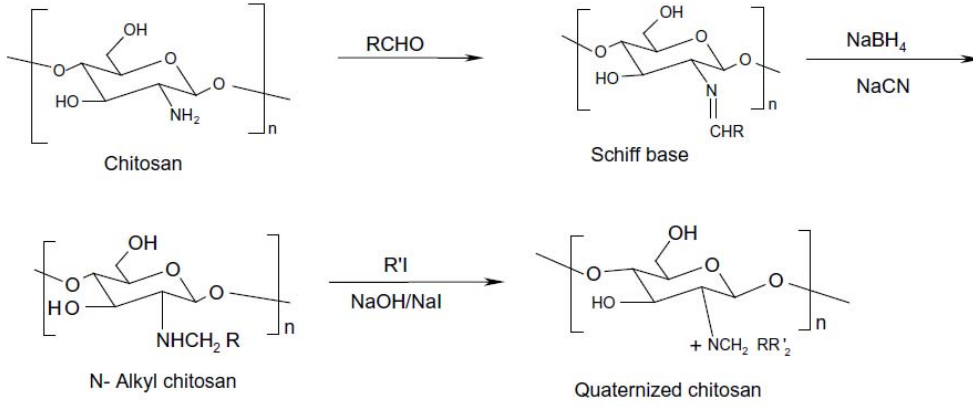
1.3.1.2 Alkilasyon

Kitosan birincil amino grubu üzerinden aldehit ve ketonlarla Schiff reaksiyonu vererek karşılık gelen aldiminler ve ketiminleri oluştururlar. Oluşan bu türevler borhidrit yardımıyla hidrojenleme reaksiyonuna tabi tutularak N-alkil türevleri elde edilir. Daha sonra elde edilen bu alkil kitosan/kitosan tuzlar amaca göre farklı derecelerde kuarternize edilirler.

Alkil kitosanlar en çok ilaç salınımı amacıyla kullanılmaktadır. N,N,N-trimetil kitosan klorür (TMC) buserilin, oktreoid asetat, mannitol gibi ilaçların salınımında test amacıyla kullanılmışlardır. TMC, kitosana göre daha geniş pH aralığında suda çözünabilmekte ve absorpsiyona daha meyillidir. Dodesil kitosan üretilip DNA salınımı için test edilmiştir. Dodesil kitosan hücre membranıyla hidrofobik etkileşimler kurarak hücre içine kolay geçebilmekte ve DNA ile kurmuş olduğu zayıf elektrostatik etkileşimler sayesinde hem DNA'nın nükleazlar tarafından parçalanmasını engelleyecek uygun paket yapıyı oluşturabilmekte hem

de bu paket yapının hedef hücrede kolayca serbest bırakılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Alkil kitosanların diğer bir uygulaması da antibakteriyel özelliklerdir. Bu amaçla, Jia ve arkadaşları (2001) N,N,N-trimetil kitosan, N-propil-N,N-dimetil kitosan türevlerini ve Avadi ve arkadaşları (2004) N-furfuril-N,N-dimetil kitosan ve N-dietil-metilaminokitosanı sentezlemiş ve antibakteriyel özelliklerini incelemişlerdir. Şekil 1.5’de kitosanın kuarternizasyonu görülmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



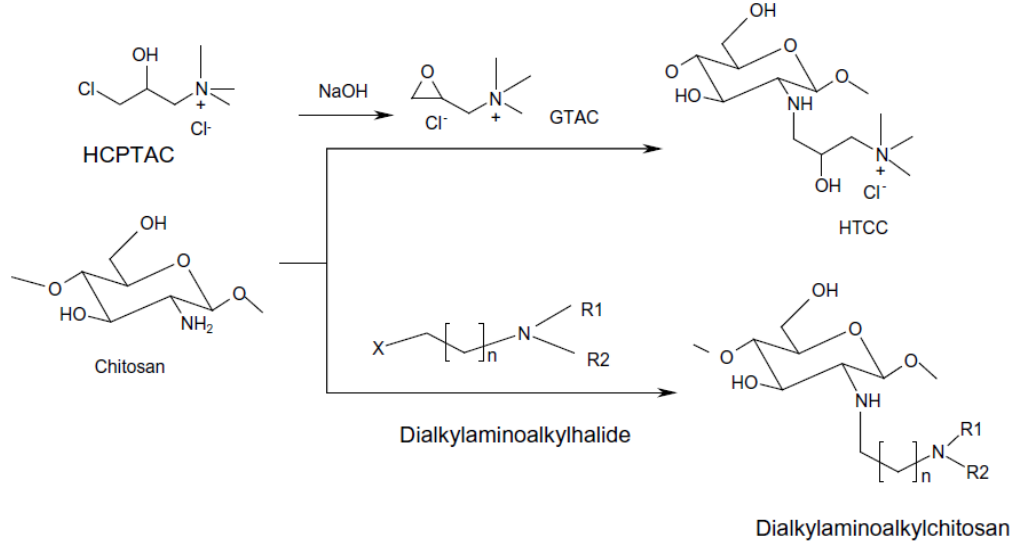
Şekil 1.5 : Kitosanın kuarternizasyonu.

1.3.1.3 Katyonikliği yüksek türevler

Kitosanın katyonik karakteri biyoadhezyonu, absorpsiyonu ve taşınım etkinliğini artırması nedeniyle antitümör, antimikrobiyal, antienflamasyon ve antihiperglisemi amacıyla kullanılmaktadır.

Katyonik polimerler alkali koşullar altında dialkilaminoalkil klorür ve kitosan arasındaki reaksiyonla elde edilmektedir. Zambito ve arkadaşları (2006) N,O-[(N,N-dimetilaminoetil-dietildimetilenamonyum) $_n$] metil kitosan elde etmişlerdir. Elde edilen yüksek katyonikliğe sahip bu polimerin domuz barsak epitelinde yapılan çalışmada hidrofobik ve hidrofilik moleküllerin emiliminin artırıldığı gösterilmiştir.

Kitosan boncukları (Fuji Spinning Co., Japonya) katyonikliği yüksek polimerler arasında sayılmaktadır. Bunlara örnek olarak diizosiyanat ve dieopoksi kitosan türevleri verilebilir. Bu polimerlerin yüksek porozite ve bifonksiyonel özelliklerinden kromatografi ve enzim immobilizasyonu destek materyali olarak yararlanılmaktadır. Şekil 1.6’da kitosanın katyonik türevleri görülmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



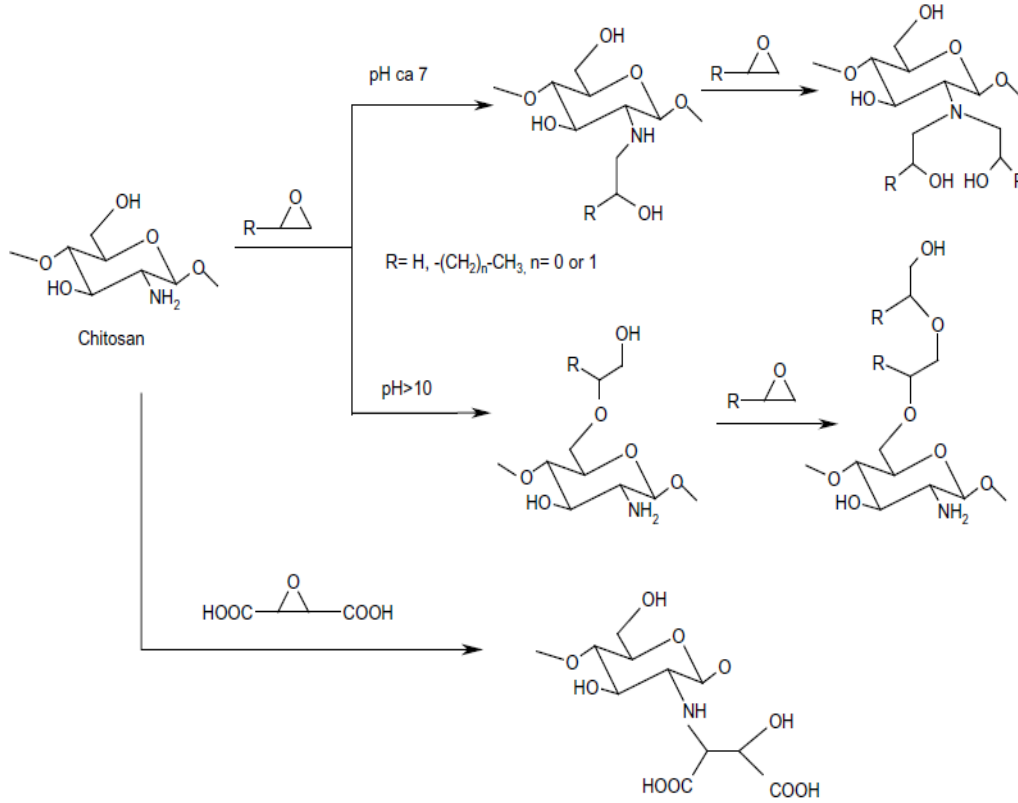
Şekil 1.6: Kitosanın katyonik türevleri (HCPTAC: 2-hidroksi-3-kloro propiltrimetil amonyum klorür, GTAC: glisidil-trimetil amonyum klorür, HTC: N-(2-hidroksil) propil-3-trimetil amonyum kitosan klorür).

1.3.1.4 Hidroksialkil kitosanlar

Hidroksialkil kitosanlar kitosanın epoksitlerle veya glisidol ile gerçekleştirdiği reaksiyonlarla elde edilirler. Epoksit olarak etilen oksit, propilen oksit, bütilen oksit örnek olarak verilebilir. Epoksitin türüne ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak N-hidroksialkil kitosanlar ve O-hidroksialkil kitosanlar veya her ikisinin karışımı elde edilebilir. O/N-sübstütisyon oranı katalist seçimine (NaOH/HCl) ve reaksiyon sıcaklığına bağlıdır. Asit katalizi temel olarak N-ürünlerinin oluşumunu katalizler. 40 °C’nin üzeri ve bazik katalist kullanıldığı durumlarda O-sübstütüveli ürünler tercih edilir.

Hidroksialkil kitosanlar ilaç ve kozmetik sanayisinde kullanım imkanına sahiptirler. Dang ve arkadaşlarının (Dang et al, 2006) yaptığı çalışmada

hidroksipropil kitosan sentezlenmiş ve sıcaklığa duyarlı bir polimer olarak hücre taşıyıcısı olarak denenmiştir. Şekil 1,7’de kitosanın epoksitlerle gerçekleştirdikleri reaksiyonlar ve hidroksialkil kitosanlar görülmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



Şekil 1.7: Kitosanın epoksitlerle reaksiyonu.

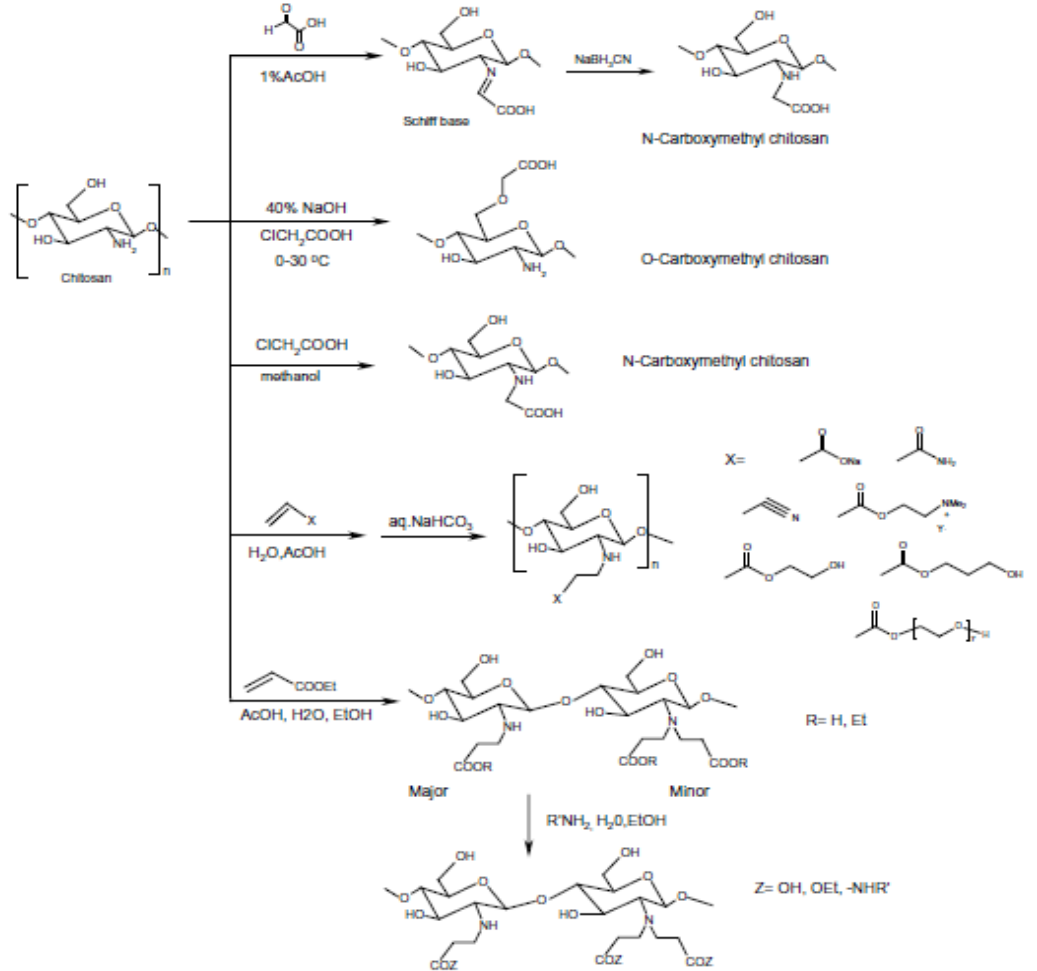
1.3.1.5 Karboksialkil kitosanlar

Karboksialkilasyon prosesi asidik grupların polimer iskeletine eklenmesinden ibarettir. Proses amaca uygun olarak farklı şekillerde gerçekleştirilebilmektedir. Karboksil taşıyan grupların farklı derecelerde eklenmesiyle farklı yük yoğunluklarına sahip amfoterik polimerler elde edilebilir.

İndirgeyici aminasyon ile seçimli olarak N-karboksialkiller elde edilebilir. N-karboksimetil kitosan glioksilik asit kullanılarak elde edilir ve suda iyi çözünbilmesinin yanında üstün kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikler gösterir. Bu nedenle gıda ürünleri ve kozmetik sektörü açısından gelecek vaat etmektedir.

Karboksimetil kitosan süper poroz hidrojel, pH duyarlı hidrojel ve çapraz bağlı hidrojel oluşturabilme özelliği sayesinde protein bazlı ilaçların salınımı için göze çarpmaktadır. Karboksimetil kitosan ile linoleik asit ve hekzanoik asit ile modifiye edilmiş karboksimetil kitosan gatifloksasin, kamptothecin, ibuprofen ve adriamisin ilaçlarının salınımında kullanılabilmektedir.

Lin ve arkadaşları (2007) 2-karboksi benzaldehit-glutaraldehit çapraz bağlanmasının ardından indirgeyici aminasyonla N-karboksi benzil kitosan üretmişlerdir. pH-duyarlı bir hidrojel olan N-karboksi benzil kitosan kolona spesifik 5-florourasil'in salınımında kullanılabilmektedir. Şekil 1.8 de kitosanın karboksilasyonu gösterilmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



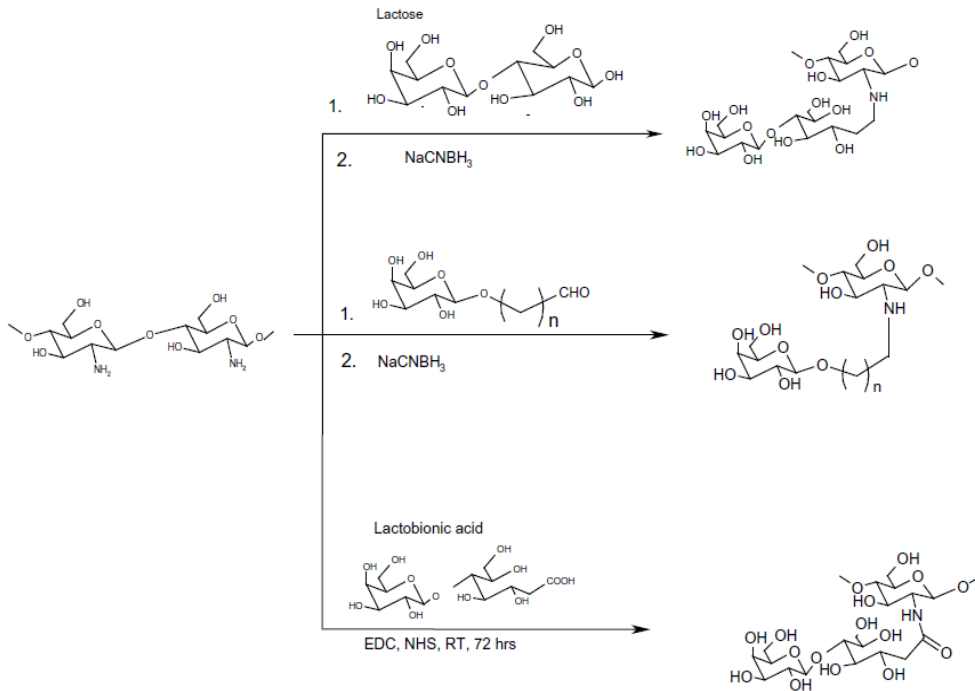
Şekil 1.8: Kitosanın karboksilasyonu.

1.3.1.6 Şeker modifiyeli kitosan

Hall ve Yalpani (1984) sodyum siyanohidrür kullanarak indirgeyici N-alkilasyon ile şeker bağlı kitosan sentezlemişlerdir. Sentezde kullanılan şeker serbest halde olabileceği gibi modifiyeli de olabilmektedir. Şekil 1.9'da şeker bağlı kitosanın hazırlanışı gösterilmektedir (Mourya and Inamdar, 2008)

Sashiwa ve Shigemasa, sulu metanol içerisinde N-alkilasyon metodu kullanarak pek çok aldehit, monosakkarit ve disakkaritlerin kitosana eklenmesini gerçekleştirmiştir. Şeker bağlı kitosanlar hücrelere spesifik olarak üretilerek ilaç salınımında, hücre kültüründe ve bakterilerin, virüslerin belirlenmesi için biyosensörlerde kullanılmaktadırlar.

Morimoto (2001), D- ve L-fukoz bağlı kitosanlar sentezleyerek bunların lektin ve hücrelerle olan spesifik etkileşimlerini göstermişlerdir. Farklı hücre tiplerinin membranlarında bulunan spesifik reseptörlerin varlığı amaca uygun modifikasyonlar yapımına olanak vermektedir. Laktozamin-N-süksinil kitosan karaciğer metastazında mitomisin C'ye yönelik ilaç taşınımı için sentezlenmiştir (Sashiwa and Aiba, 2004).



Şekil 1.9: Şeker bağlı kitosanların sentezi

1.3.1.7 Halkalı dekstrin bağı kitosan

Kitosanın halkalı dekstrinler (CD) ile modifikasyonunun amacı kovalent olmayan etkileşimler ile CD'lerin ve kitosanın benzersizlik özelliklerini birleştirip özel yapılar geliştirmektir. CD'lerin kitosana eklenmesinde pek çok metot mevcuttur. Sakairi ve çalışma arkadaşları N-alkilasyon metodu ile 2-o-formilmetil- α -CD yi kullanarak α -CD bağı kitosan sentezlemişlerdir.

Birçok α -CD kitosan tekstil sularındaki boya atıklarının uzaklaştırılması için sentezlenmiştir. Auzely-Velty ve Rinaudo indirgeyici aminasyonla α -CD bağı kitosan sentezlemişlerdir. Georgeta ve arkadaşları kitosan mikrokürelerini organik bazik çözgen içerisinde kloroasit CD ler ile glutaraldehit varlığında çapraz olarak bağlamışlardır. CD-bağı kitosan uzatma kolu olarak triazinil'in bulunduğu monoklorotriazinil CD türevlerinin kitosana reaksiyonu ile da türetilmektedirler.

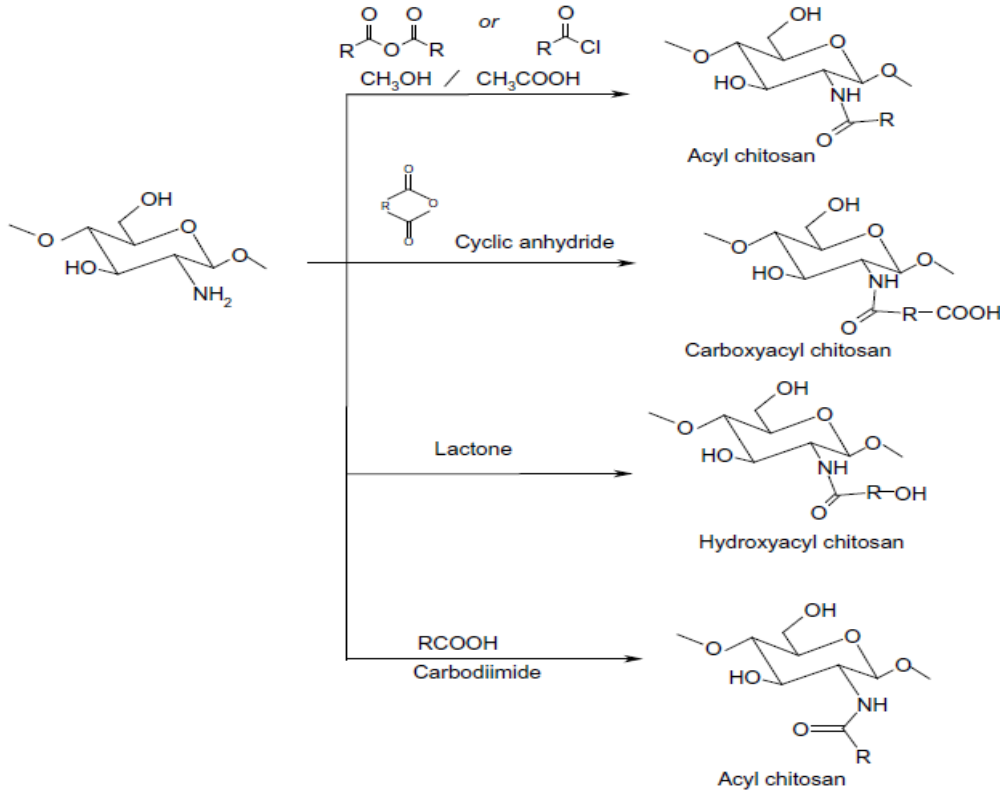
Sreenivasan (1998, 2007), 1,6-hekzametilen diizosiyanat uzatma kolu olarak kullanılarak β -CD bağı kitosan sentezlemiş ve sentezlenen bu bileşik kolesterole karşı etkin adsorbent olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Mourya and Inamdar, 2008).

1.3.1.8 N-açil türevleri

Kitosanın N-açil türevleri kolaylıkla açil klorür ve anhidritlerden elde edilebilir. Açilasyon reaksiyonu sulu asetik asit/metanol, piridin, piridin/kloroform, trikloroasetik asit/dikloroetan, etanol/metanol, metanol/formamid veya DMA-LiCl ortamında gerçekleştirilir.

Kitosanın N-açilasyonu uzun zincirli (C6-C16) asit klorürlerle gerçekleştirildiğinde kazanacağı hidrofobik karakter önemli yapısal değişimlere neden olur. Modifikasyon ile mekanik özellikler biyolojik yapılar için uygun hale geleceğinden kontrollü ilaç salınımında kullanılabilir formlar oluşturulur. Hekzanol kitosan sahip olduğu amfipatik karakter sayesinde mükemmel bir su tutucu özellik göstereceğinden nötral koşullarda amfipatik ilaçların salınımında

etkin olarak kullanılabilir. Hu ve arkadaşları (2007) N-asetil, N-propiyonil ve N-hekzanoil kitosan sentezlenmiş ve *in vitro* antibakteriyal özelliklerini incelemişlerdir. Şekil 1.10 da farklı açıl-kitosan ürevlerinin sentezi gösterilmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



Şekil 1.10: Kitosan-açıl türevlerinin sentezi.

1.3.1.9 Tiyollü kitosan

Kitosanın birincil amino grubuna –SH fonksiyonel grubu taşıyan bir molekül bağlandığında vakit oluşan kitosana “tiyollenmiş kitosan” denir. Bu güne kadar 4 çeşit tiyollü kitosan üretilmiştir. Bunlar kitosan-sistein, kitosan-tiyoglikolik asit, kitosan-4-tiyobütilamidin ve kitosan-tiyetilamidin konjugatlarıdır. Şekil 1.11’de 4 farklı kitosan-tiyol oluşumu gösterilmektedir.

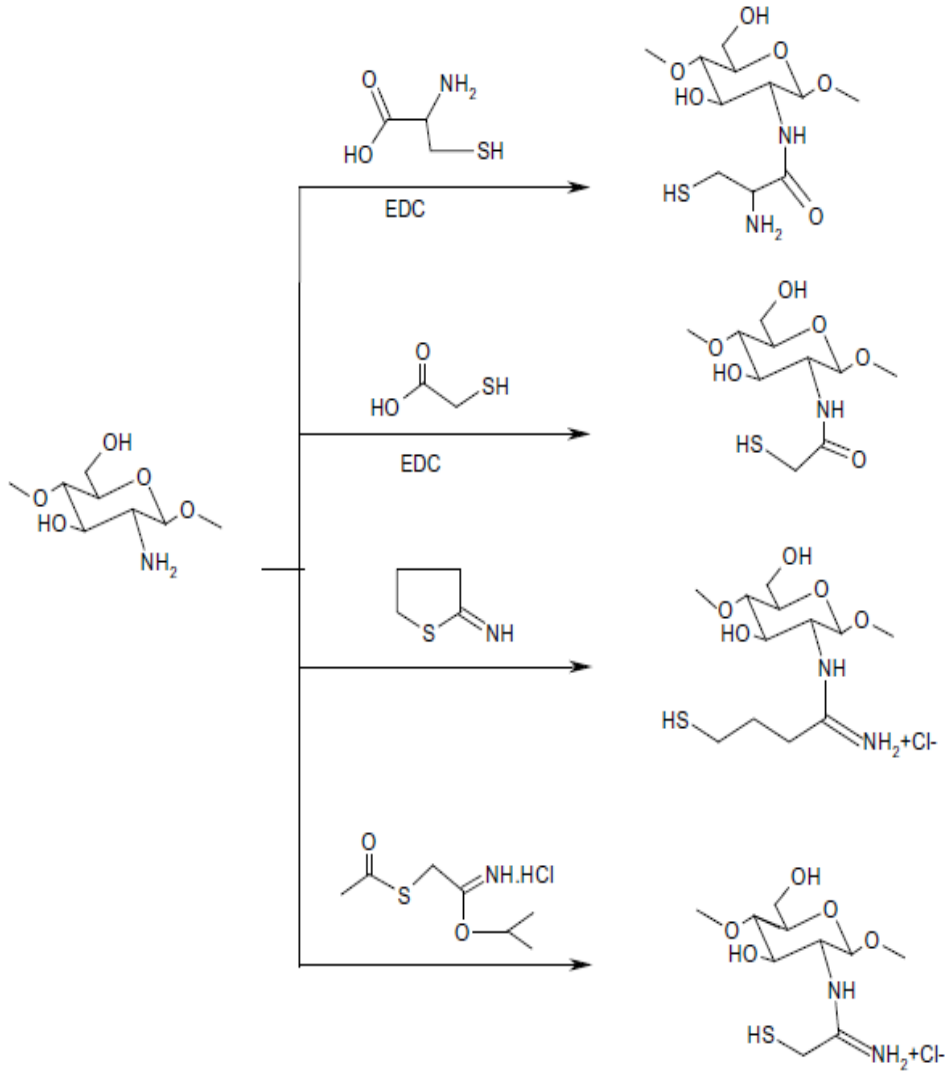
Sülfüdril grubu taşıyan sistein, tiyoglikolik asit gibi yapılar kitosana birincil amin grubu üzerinden amid bağı yaparak bağlanırlar. Reaksiyon süresince tiyol gruplarının istenmeyen oksidasyonlarını engellemek için reaksiyon koşulları pH <5 ve inert koşullara ayarlanmaktadır. Amid bağının

oluşumunu kolaylaştırmak için suda çözünen karbodiimid (EDC) kullanılabilir. Tiyollu kitosanlar farklı alanlarda üstün özellikler göstermektedirler.

Kitosan sahip olduğu polikasyonik yapısı sayesinde mukusta bulunan negatif yüklü sialik asit ve sülfonik asitlerle reaksiyona girerek mukoadhezif özellik göstermektedir. Tiyol gruplarının kitosana eklenmesiyle mukoadhezif özellik artmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmayla kitosan-N-asetil sistein konjugatı üretilmiştir. Üretilen bu kitosan konjugatının serbest kitosana göre 8 kat daha fazla mukoadhezif özellik gösterildiği tespit edilmiştir.

Kitosanın membrandan kolay geçebilme özelliği kitosan-tiyobütilamidin (TBA) kullanılarak 3 kat arttırılmıştır. Bu özellik hidrofilik terapötik peptitlerin ve antisense oligonükleotitlerin membrandan kolay geçişlerinin sağlanması amacıyla etkin kullanım özelliği göstermektedir. Bu hipotez *in vitro* ve *in vivo* olarak kalsitonin, insülin ve düşük molekül ağırlıklı heparin örneklerinin kitosan TBA/Glutasyon (GSH) konjugatının kullanımıyla gösterilmiştir.

Kitosan iskeletine bağlı bulunan indirgenmiş tiyol grupları molekül içi ve moleküller arası disülfid bağları yaparak polimerik zincirlerin oluşumuna imkân verir. Bu özellik uzun süreli ilaç salınımı açısından önemlidir (Mourya and Inamdar, 2008).



Şekil 1.11: Tiyollü kitosan elde edilmesi.

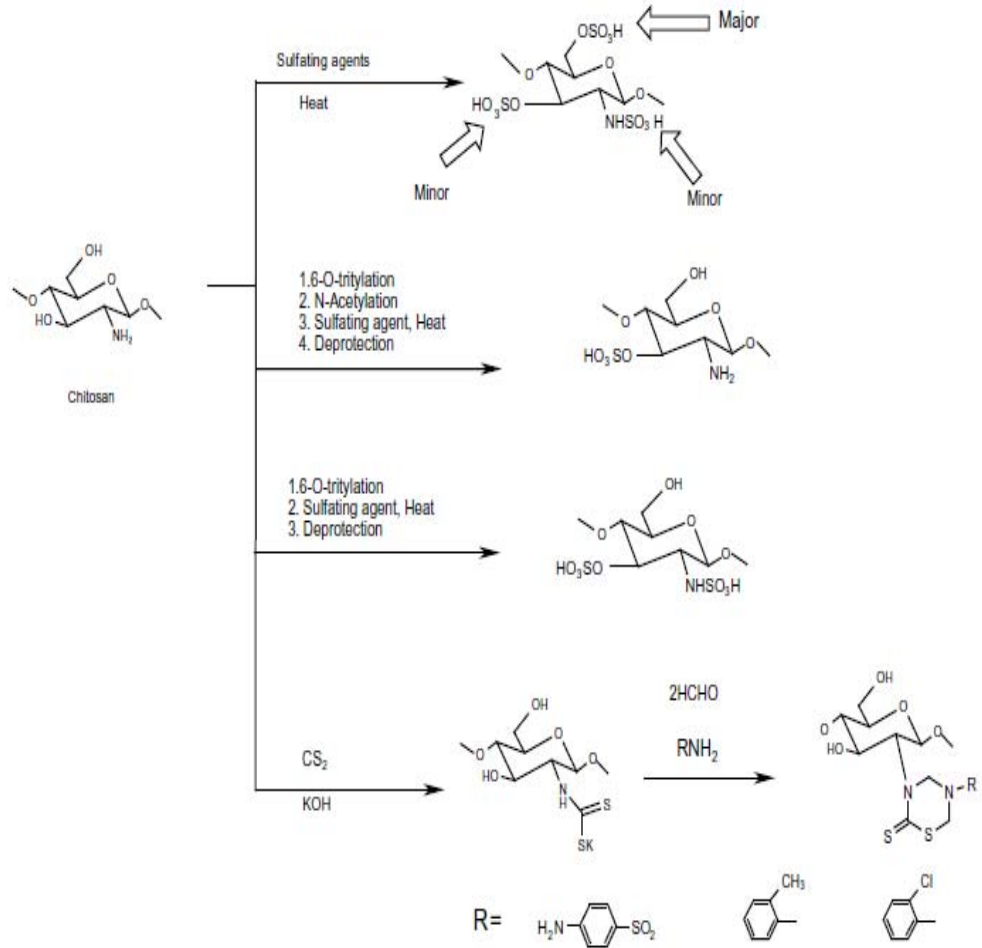
1.3.1.10 Sülfatlanmış kitosan

Sülfatlama için pek çok metot kullanılabilmektedir. Sülfatlı kitosan üretimi için değişik sülfürik asit, oleum, sülfürtrioksit, sülfürtrioksit/piridin, sülfürtrioksit/trimetil amin, sülfürtrioksit/sülfür dioksit, klorosülfonik asit-sülfürik asit reaktifleri kullanılmaktadır.

Tüm reaktiflerin kullanıldığı durumlarda sülfatların sübstütasyonu N,O-disübstütasyon şeklindedir ve bazı durumlarda N,O,O-trisübstütasyon şeklinde de olabilmektedir. Eğer N-açıl veya N-alkil kitosan başlangıç polisakkariti olarak seçilmişse, seçimli olarak O-sülfolama gerçekleşir.

Bununla birlikte başlangıçta O-sübstütiye kitosan kullanılırsa hem O-sübstütisyon hem de N-sübstütisyon gerçekleşir.

Kitosan sülfatlar heparine benzerlikleri nedeniyle antikoagülant ve hemagulünasyon inhibisyonu aktivitesi gösterirler. Kitosan sülfatlar bu aktivitelerinin yanı sıra antisklerotik, antiviral, anti HIV, antibakteriyal, ilaç salınımı, antioksidant ve enzim inhibitörü aktivitelerine de sahiptirler. İlaç salınımı için sentezlenmiş olan N-sülfonat-N,O-karboksimetil kitosan sahip olduğu anyonik karakteri sayesinde reviparin, mannitol, FITC-dekstran gibi makromoleküllerin salınımında etkindir. Şekil 1.12’de kitosanın sülfatlanması şematize edilmiştir (Mourya and Inamdar, 2008).



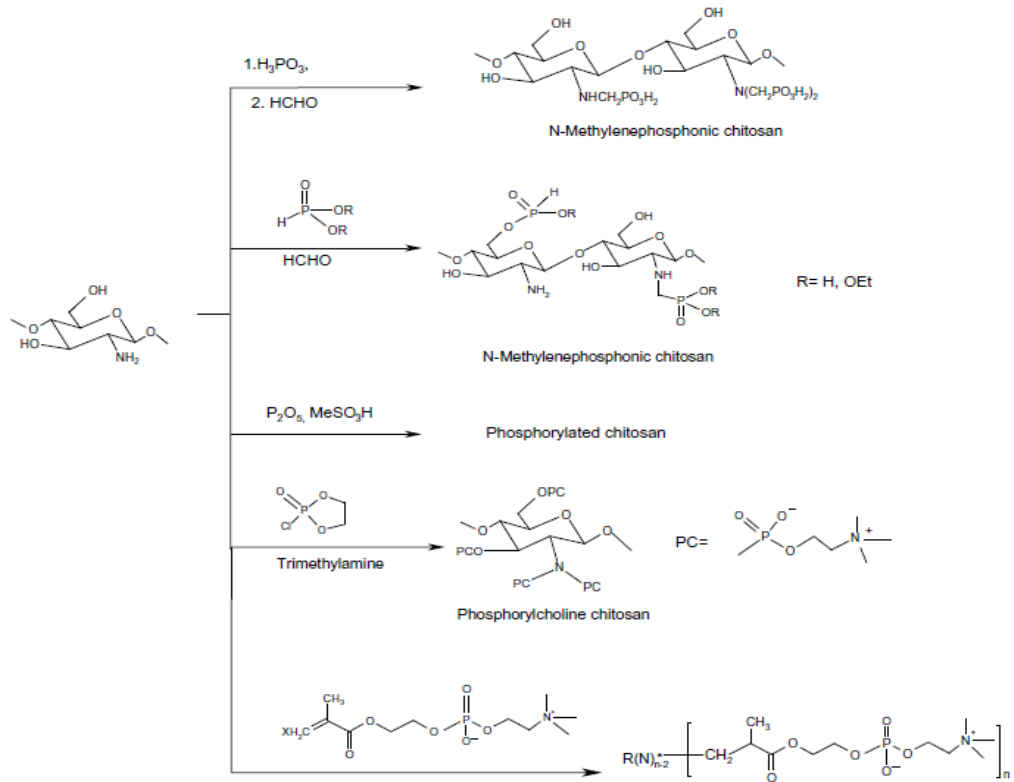
Şekil 1.12: Sülfatlanmış kitosan elde edilmesi.

1.3.1.11 O-açıl kitosan

Hidrofobik yapıların kitosana ester bağlarıyla eklenmelerinde iki olumlu yön vardır. Bunlardan ilki hidrofobik guruplar organik ortamlardaki çözünürlüğü arttırılması ve ikinci özellik olarak ester köprülerinin lipaz enzimlerince parçalanabilmesidir. O-açıl kitosan sahip olduğu bu üstün biyolojik özellikler nedeniyle biyoyıkılabilir kaplama materyali olarak kullanılabilir (Mourya and Inamdar, 2008).

1.3.1.12 Fosforillenmiş kitosan

Sulu asidik ortamda kitosanın aynı anda ya da ardı sıra fosforik asit ve formaldehit ile reaksiyonuyla suda çözünür N-mono ve di-fosfo-nikmetilen kitosan yapıları elde edilir. Reaktant oranları ve reaksiyon koşulları sübstütisyon derecesini belirler. Ayrıca fosforözün pentoksit-metansülfonik asit sistemiyle de fosforillenmiş kitosan üretilmektedir. Fosforillenmiş kitosan doğrudan kullanılabildiği gibi iyonotropik karışımlar olarak da kullanılabilmektedir. Buna örnek olarak fosforile kitosanın tripolifosfatlar ile iyonotropik karışımı verilebilir. Bu karışım ibuprofenin model ilaç olarak kullanıldığı denemede ilaç salınım yönünden incelenmiştir. Şekil 1.13’de kitosanın farklı şekillerde fosforillenmesi gösterilmektedir (Mourya and Inamdar, 2008).



Şekil 1.13: Fosforile kitosan elde edilmesi.

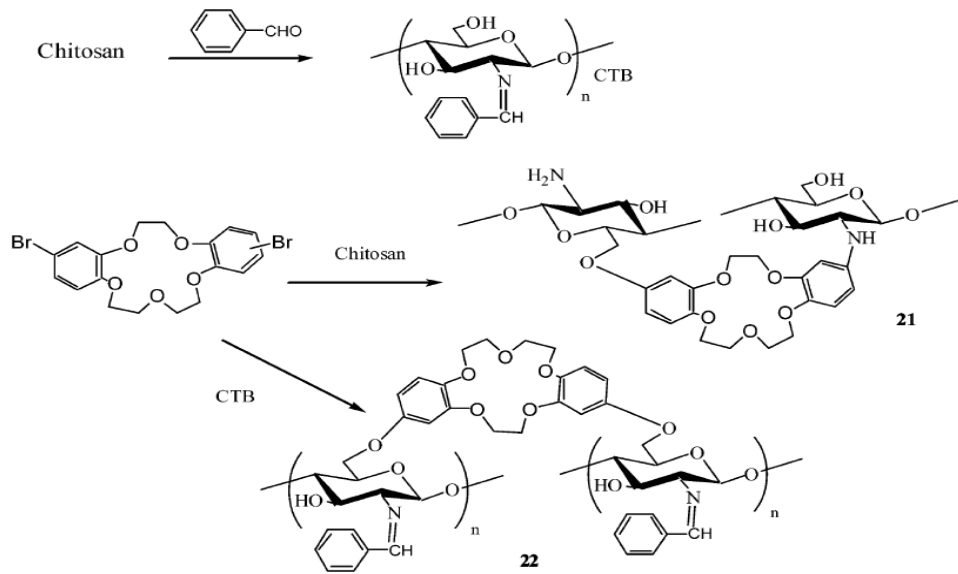
1.3.1.13 EDTA-kitosan

EDTA'nın kitosan iskeletine birincil amin grubu üzerinden eklenmesiyle polimer katyonik yapıdan anyonik yapıya dönüşür. EDTA'nın polimer yapısını bu şekilde değiştirmesi kontrollü bir şekilde kullanılarak kontrollü ilaç salınım materyallerinin üretimine olanak verir. (Mourya and Inamdar, 2008).

1.3.1.14 Taç eter bağlı kitosan

Taç eterler sahip oldukları özel moleküler yapıları sayesinde metal iyonlarının kompleksleşmesinde seçicilik gösterirler. Kitosan-taç eter kompleksinin metal tuzlarına ve metallere karşı olan seçiciliği kitosan-taç eter sinerjistik etkisinden dolayı artar. Taç eter bağlı kitosanlar sulu çevredeki metal iyonlarının ayrılması ve değiştirilmesi için uygundur.

Tang ve arkadaşları (2002) N-Schiff bazı reaksiyonu üzerinden kitosan-taç eter oluşturmuşlardır. Oluşturulan bu polimer Pd^{+2} , Al^{+3} ve Ag^{+} ya da karşı yüksek adsorpsiyon özelliği gösterirken; Cu^{+2} ve Hg^{+2} varlığında Pd^{+2} ya karşı yüksek seçicilik göstermektedir. Şekil 1.14 de taç eter bağlı kitosanların elde edilmesi gösterilmektedir (Sashiwa and Aiba, 2004).



Şekil 1.14: Kitosan-taç eter komplekslerinin elde edilmesi.

1.3.2 Kitosanın enzimatik modifikasyonu

Fenolik bileşiklerin kitosan üzerine enzim kullanılarak graflanması bazik koşullar altında gerçekleştirilir. Tirozinaz fenolik bileşikleri elektrofilik q-kinonlara çevirir ve akabinde q-kinonlar enzimatik olmayan Schiff bazı oluşması ve Michael tipi eklenme reaksiyonu ile kitosana eklenir. Tirozinaz ile hekzil fenolün kitosana graflanması gerçekleştirilmiştir. Tirozinazın yanında karaturp peroksidazı da enzimatik grafting amacıyla kullanılmaktadır. Bu enzim kullanılarak dodesil gallatın kitosana graflanması gerçekleştirilmiştir (Mourya and Inamdar, 2008).

1.3.3 Kitosanın fiziksel modifikasyonu

Kitosan çok geniş kullanım alanına sahiptir. Bununla birlikte kitosanın yüzey alanı $2\text{-}30\text{m}^2/\text{g}$ değerindedir. Bu değer oldukça küçük olduğundan kitosanın adsorbent olarak kullanımını sınırlamaktadır. Kitosan çeşitli şekillerde örneğin çözgen uzaklaştırma ve dondurup-çözme gibi yöntemlerle fiziksel olarak modifiye edilerek adsorbent olarak kullanılabilecek duruma getirilir (Miretzky and Cirelli, 2009).

1.3.4 Kitosanın graflanması

Graftlama, kitosanın kimyasal modifikasyonunda özel ve yaygın bir yöntemdir. Kitosan graft polimerinin özellikleri eklenen yan grupların moleküler yapısına, boyutuna ve miktarına bağlıdır. Graftlama radikal oluşturma, polikondenzasyon reaksiyonu, oksidatif eşleşme, halka açma ile halkalı monomerlerin polimerizasyonu, grafting polimeri üzerine kopolimerleme yöntemleri ile gerçekleştirilir (Jayakumar et al, 2005).

1.4 Alfa Amilazlar

Amilazların tarihi 1811 yılında Kirchhoff'un nişastayı parçalayıcı enzimleri keşfiyle başlar. 1930 yılında Ohlsson nişastayı parçalayan enzimleri enzimatik reaksiyon sonucu oluşan şekerin anomerisine göre alfa (α) ve beta (β)- amilazlar olarak sınıflandırılmayı önermiştir. α -Amilazlar (1,4- α -D-glukan-glukan hidrolaz, E.C. 3.2.1.1) çok yaygın olarak bulunan salgı enzimleridir. Amilazları etki mekanizmalarına göre ayırmak gerekirse üç ana grupta toplanırlar. Bunlar endoamilazlar, ekzoamilazlar ve dallanma kırıcı enzimlerdir.

1.4.1 Endoamilazlar

Sıvılaştırıcı enzimler olarak da adlandırılırlar. α -1,4- bağlarını amiloz, amilopektin ve glikojen gibi polisakkaritlere parçalarlar. Çeşitli boyutlarda zincir uzunluğuna sahip oligosakkarit ürünleri oluştururlar ve bu ürünlerin indirgeyici

glukoz ünitelerindeki C-1 karbonunda α -karbonu mevcuttur. Nişasta iç bölgelerinden parçalandığı için viskozite düşüşü yüksektir.

1.4.2 Ekzoamilazlar

Şekerleştirici enzimlerdir. Amilozu, amilopektini ve glikojeni indirgeyici olmayan uçtan parçalayarak maltoz ve glukoz oluşturan enzimlerdir. Oluşan üründe glukozun indirgeyici C-1 karbonundaki konfigürasyonu β -dır. Reaksiyon süresince viskozite düşüşü yavaştır.

1.4.3 Dallanma kırıcı amilazlar

α -1,6- glikozidik bağları α - ve β - amilaza dirençlidir. Glukoamilazlar ise spesifik olarak α -1,6- glikozidik bağlarını parçalarlar. Glukoamilazın etkinliği aynı işlevi yerine getiren pullanaza göre nispeten düşüktür (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.4 α -Amilazların mikroorganizmalar arasındaki dağılımı

Mikrobiyal kökenli alfa amilazlar üretiminin ekonomik olması ve mikroorganizmaların istenilen doğrultuda manipüle edilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedirler. Bu nedenle mikroorganizmaların α -amilaz üretimleri araştırılmıştır. α -amilazlar pek çok fungi, maya, bakteri ve aktinomisetlerce üretilmektedir. Endüstriyel uygulamalarda daha çok fungi ve bakteri kaynaklı α -amilazlar tercih edilmektedir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.5 α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi

Alfa amilaz aktivitesi genellikle çözünür nişasta ve modifiye nişasta kullanılarak ölçülür. Alfa amilazlar nişastayı α -1,4-glikozidik bağlarından parçalayarak glukoz, dekstrinler ve limit dekstrinleri oluştururular. Reaksiyon indirgen şekerin miktarının artış veya muamele edilen substratın iyotla verdiği renk oluşumunun azalmasıyla gözlemlenir. Aktivite ölçümü dört metolla

yapılmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (Muralikrisra and Nirmala, 2005);

- Nişasta-iyot renk şiddetindeki düşüş
- İndirgen şekerlerin artışı (DNS)
- Nişasta-renk kompleksinin yıkımı
- Nişasta süspansiyonunun viskozitesindeki düşüş

1.4.6 α -Amilazların biyokimyasal özellikleri

1.4.6.1 Substrat spesifikliğı

Substrat spesifikliğı mikroorganizmanın kaynağına göre değişmektedir. Genel olarak α -amilazların spesifikliğı maltotrioz $\rightarrow$ glikojen $\rightarrow$ halkalıdekstrin $\rightarrow$ amilopektin $\rightarrow$ amiloz $\rightarrow$ nişasta sırasını takip eder (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.6.2 Optimum pH ve kararlılık

Mikroorganizmaların optimum pH'sı 2-12 arasında değişmektedir. Fungi ve bakteri α -amilazları çoğunlukla asidik ve nötral skaladadır. Ekstrem asidofilik ve alkalofilik α -amilazlar belirlenmiştir. *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazının optimum pH'sı 3 tür. *Bacillus* sp. den elde edilen α -amilazlara ait optimum pH 11-12 arasındadır. Kararlılık açısından değerlendirildiğinde ise pH değerleri 4-11 arasında bulunmaktadır (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.6.3 Optimum sıcaklık ve kararlılık

Optimum sıcaklık mikroorganizmanın kaynağına bağlı olduğu gibi büyüme koşullarına da bağlıdır. Optimum sıcaklık 25-130 °C arasında değişmektedir. En düşük optimum sıcaklık *Fusarium oxysporum*'a ait olan 25-30 °C dir. En yüksek optimum sıcaklık ise 130 °C ile *Pyrococcus woesei* α -amilazına aittir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.6.4 Moleküler ağırlık

Moleküler ağırlıkları 10-210 kDa arasında değişmektedir. *Bacillus caldolticus* 10 kDa ile en düşük molekül ağırlığına sahip iken 210 kDa'luk molekül ağırlığı ile *Chloroflexus auranticus* en yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Mikrobiyal α -amilazlar genellikle 50-60 kDa ağırlığına sahiptirler. Klonlama ile elde edilen alfa amilazlar da yine 50-60 kDa arasındadır. Bazı mikroorganizmalar enzim yapılarında karbohidrat kalıntıları içerirler ve bu durum α -amilazların molekül ağırlığını yükseltir. *Aspergillus oryzae*, *Lipomyces kononenko*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus subtilis* şuşlarında glikoproteinlerin varlığı tespit edilmiştir. Bağlı karbohidrat oranları genel olarak %10 civarındadır (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.6.5 İnhibitörleri

Pek çok metal katyonu, ağır metal iyonları, -SH gurubu ajanlar, N-bromosüksinimid, p-hidroksi civa benzoik asit, iyodo asetat, BSA, EDTA ve EGTA α -amilazların inhibitörleridir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.6.6 Kalsiyum ve α -amilaz kararlılığı

α –Amilazlar yapılarında en az bir tane Ca^{2+} iyonu içeren metaloenzimlerdir. Ca^{2+} 'nın α -amilazlara olan ilgisi diğer iyonlardan oldukça fazladır. Bağlı kalsiyum iyonu 1-10 arasında değişmektedir. EDTA ile yapılan diyalizlerle Ca^{2+} α -amilaz enziminden uzaklaştırılabilir ve kalsiyumun uzaklaşmasıyla enzim etkinliğini gösteremez. Ortama Ca^{2+} 'nın eklenmesiyle aktivite geri kazanılır(Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.4.6.7 α –Amilazın endüstriyel uygulamaları

Nişasta bazlı endüstride kullanılan en önemli hidrolitik enzim α -amilazlardır. Günümüz sanayisinde α -amilazlar nişastanın hidrolizi amacıyla gıda, deterjan, tekstil ve kâğıt endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu bağlamda mikrobiyal amilazlar ticari açıdan en önemli enzimlerdir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

i- Gıda endüstrisinde anti-bayatlama ajanı olarak α -amilaz kullanımı

Alfa amilazlar fırınlama endüstrisinde yüzlerce yıldır kaliteli ürünlerin eldesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu enzimler ekmek ve fırınlama ürünlerinde daha yüksek bir hacim, daha güzel bir renk ve istenilen yumuşaklığın elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Fungal α -amilazların ekmeğe katkı olarak konması ABD’de 1955 yılında ve İngiltere’de 1963 yılında başlamıştır. Kullanılan enzim ekmeğin yarı ömrünü uzatarak bayatlamayı geciktirmektedir. Bu işlevini dekstrinleri 4-9 lu oligomerler haline getirmesiyle sağlar. Bu durumun ABD’de yılda 1 milyar \$ lık ekmeğin çöpe gittiği göz önüne alındığında önemi anlaşılmaktadır. Konvansiyonel olarak bayatlamanın önüne geçmek için kimyasallar, küçük şekerler, süt tozu ve emülsüfiye edici ajanlar kullanılmaktadır ve bu durum sağlık açısından problem teşkil etmektedir. α -Amilazların kullanımıyla bu sorun ortadan kaldırılmaktadır (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

ii- Nişasta sıvılaştırılması ve şekerleştirilmesinde α -amilazlar

α Amilazların endüstrideki en önemli kullanımı nişastanın glukoz ve fruktoz şeklinde nişasta hidrolizatına dönüştürülmesidir. Burada kullanılan α –amilazlar yüksek sıcaklıklarda kararlılığını uzun süre koruyabilen kaynaklardan elde edilir. Nişastanın yüksek fruktoz mısır şurubuna (HFCS) dönüştürülmesi ile içecek endüstrisinde hafif içeceklerin tatlandırılmasına olanak verir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

iii- Tekstil sanayisinde α -amilazlar

Tekstil ürünleri dokunurken yüksek sıcaklıklara ihtiyaç vardır. Kumaşın yüksek sıcaklıklardan etkilenmemesi için yüzey bir koruyucu ile kaplanmaktadır. Nişasta ucuzluk, kolay bulunabilme ve etkin verim nedeniyle oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Dokuma işleminden sonra nişastanın uzaklaştırılması için en etkin yöntem nişastayı suda çözünabilir hale getiren dekstrinleri oluşturmaktır. Nişastanın parçalanması için α -amilazların kullanılması sağlık ve kalite yönünden tercih edilmektedir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

iv- Kâğıt endüstrisinde α -amilazlar

α –Amilazlar düşük viskoziteli yüksek molekül ağırlıklı nişastaların kâğıtları kaplama materyali olarak üretiminde kullanılmaktadır. Kâğıt ve küspe endüstrisinde α -amilazların kullanım amacı nişastanın kâğıt kaplama materyaline modifikasyonudur. Kâğıtların kaplanmasında α -amilazların kullanımıyla son ürünün kalitesi de artmaktadır. Kâğıt endüstrisinde kullanılan α -amilazların ticari formlarına örnek olarak Amizyme ® ve Termamyl ® verilebilir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

v- Deterjan endüstrisinde α -amilazlar

Günümüzde enzimler deterjanların doğal bir parçasıdır. Enzimlerin deterjanlara eklenmesinin en önemli artışı koşulların ılımlı hale getirilmesidir. α –amilazların çamaşır deterjanlarında kullanımı 1975 yılında başlamıştır. Günümüzde ise sıvı deterjanların %90 ı α -amilaz içermektedir. Avantajlarının yanında düşük Ca^{2+} 'lu koşullarda α -amilazların etkinliğinin düşmesi kullanımı kısıtlayan olumsuz bir özelliktir. Günümüzde genetik rekombinasyon metodunun kullanımıyla deterjan sanayisi için daha verimli α -amilazların üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu anlamda üretilmiş ve ticari önemi olan DurafectOxAm® ve Duramyl ® tescilli markaları örnek olarak verilebilir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

vi- Medikal ve klinik kimya analizlerinde α -amilazların kullanımı

Biyoteknolojideki gelişimle α -amilaz kullanımı yaygınlaşmaktadır. Buna örnek olarak yüksek oligosakkaritlerin belirlenmesinde gümüş nitrat testinin yerini α -amilazların alması verilebilir (Muralikrisra and Nirmala, 2005).

1.5 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis genellikle toprakta ve kuşların tüylerinde bulunan mezofilik bir bakteridir. Kuşlar toprak ve su ile sıkça temas etmelerinden dolayı bu bakterinin genel taşıyıcısı olarak kabul edilmektedirler. *B. licheniformis*,

Bacillus subtilis ve *Bacillus pumilus subtilis* sınıfını oluştururlar. Zararlı bir bakteri olmasına karşın modifikasyonlar ile biyoteknoloji uygulamalarına tabi tutulabilir. Mai,T.Q. “*Bacillus Licheniformis*”,

http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis.

Bacillus licheniformis sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

Kingdom: Bacteria

Filum: Firmicutes

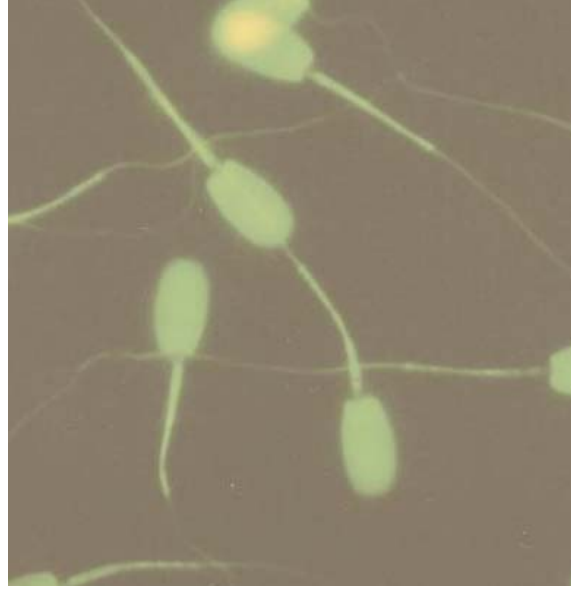
Sınıf: Bacilli

şube: Bacillales

Aile: Bacillaceae

Cins: Bacillus

Tür: Bacillus Licheniformis



şekil 1.15: *Bacillus licheniformis*’in floresans mikroskobu görüntüsü (Salkinoja-Salonen et al, 1999).

Doğada zararlı olmayan *Bacillus licheniformis* suşları insanlar için potansiyel tehlike oluşturmaktadırlar. Süt ürünleri, işlenmemiş süt, ekmek, pişirilmiş etler,

sebzeler ve işlenmiş çocuk mamalarının bozulmalarına sebebiyet vermektedirler. Zehirlenmenin semptomları mide ağrısı, akut ishal ve kusma şeklindedir. İnsanlarda yaptıkları hastalıklar yönünden incelendiğinde gözlerde iltihaplanma, sepsisemi, düşük gebelikler, sperm motilitesinde zayıflamaya neden olmaları en sık rastlanılan durumlardır. Ürettiği toksinler ayrıca hücre membranlarının deformasyonuna, hücre ATP nin azalışına ve akrozomlarda şişmeye neden olmaktadır (Salkinoja-Salonen et al, 1999).

Genom yapı olarak 4,222,336 baz çiftinden (bp) oluşmuş sirküler bir yapı göstermektedir. Baz içeriğinin % 46,2 si GC dir. Tahmini olarak 4,208 protein kodlayıcı gene sahiptir. 7 rRNA operonu ve 72 tRNA geni içermektedir. Plazmid içermemektedir. Genom yapısı itibariyle *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B.pumilus* büyük benzerlikler göstermektedir.

Hücre yapısı ve metabolizması yönünden değerlendirildiğinde çubuk şeklinde spor oluşturabilen gram(+) mezofilik bir bakteri olduğu görülmektedir. Optimum yaşam sıcaklığı 50 °C olmakla birlikte enzim salgısı en iyi 37°C dedir.

Toprakta spor oluşturabilme yeteneğine sahip olduğundan endüstride enzimlerin, antibiyotiklerin ve küçük metabolitlerin üretiminde kullanılabilir. Çamaşır yıkama deterjanları için proteaz kaynağıdır. Alkali koşullarda gelişebildiği için yüksek alkali koşullara uygun (optimum pH 9-10) proteazlar üretilmektedir. Kadmiyum ve civa varlığında *B.licheniformis* protoplastını parçalayabilen *Basitrasin* antibiyotiğini üretebilmektedir. *Bacillus licheniformis* α -amilazları mezofilik olmalarına karşın 37-110 °C arasındaki yüksek sıcaklıklara dayanabilmeleri itibariyle deterjan ve nişasta bazlı sanayi için önemlidirler. Bir diğer önemli kullanım alanı ise antifungal ajanı olarak sporlarından faydalanılmasıdır. Novozymes *B.licheniformis* SB3086 suşunu kullanarak çimenler, kozalaklı ağaçlar ve süs ağaçları için antifungal ajanlar üretmektedir. Bu ajanlar memeli hayvanlarda doğumsal problemlere neden oldukları için dikkatli kullanılmalıdırlar. Mai, T.Q. “Bacillus Licheniformis”, http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis.

Bacillus licheniformis'nin göze çarpan önemli ve gelecek vaat eden bir uygulaması da altın nanoküplerin ılımlı koşullar altında *B.licheniformis* suşları tarafından üretilbilmesidir. Kalasalingam Üniversitesinden bir grup araştırmacı 10-100 nm lik küpleri sentezlemişlerdir. Bradley, D. "Microbial nanotechnologists",
<http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=22017&type=Feature&hId=7&page=1>.

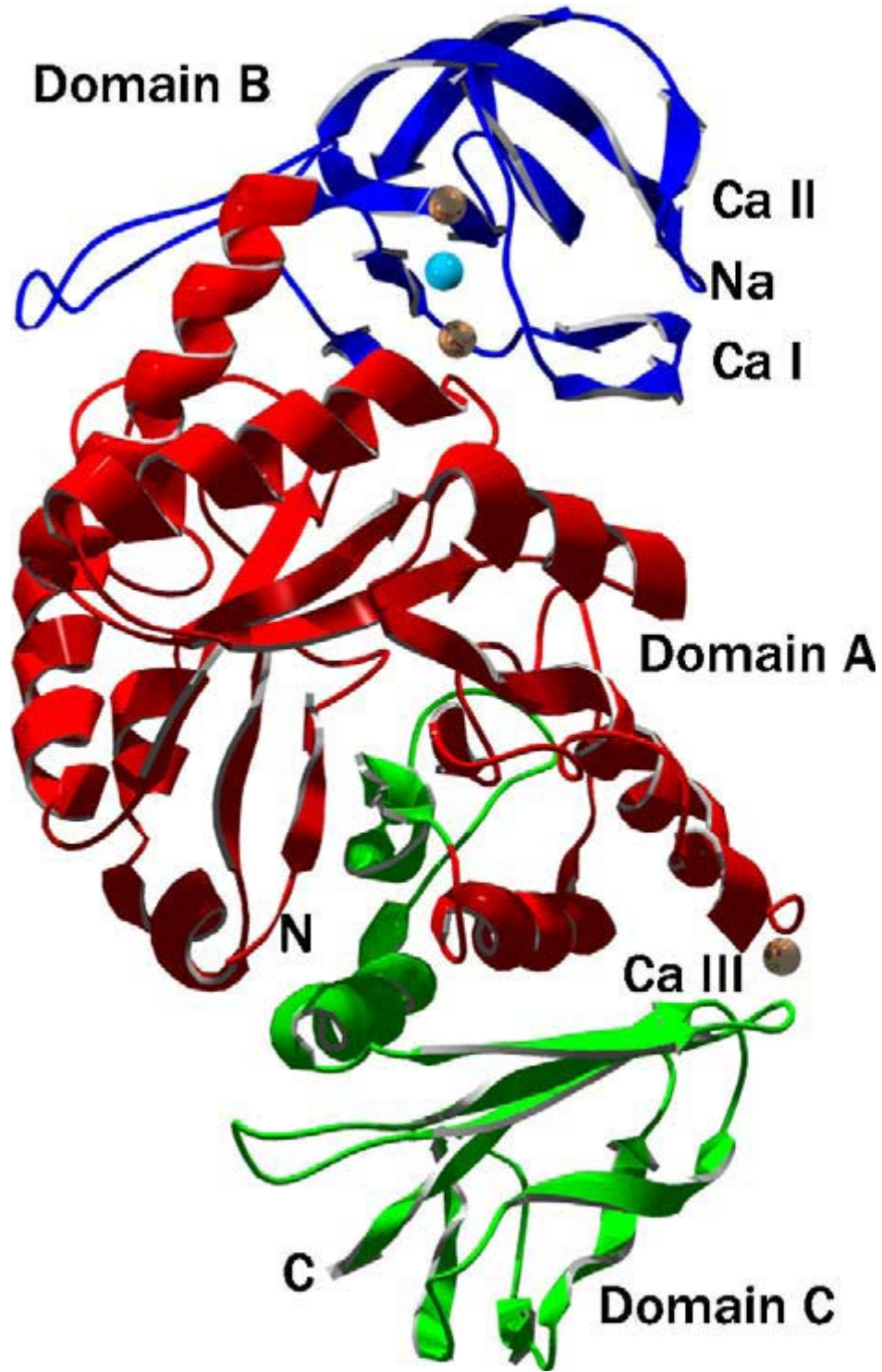
1.6 *Bacillus licheniformis* α -amilazları (BLA)

Bacillus licheniformis (BL) alfa amilazları alkol, şeker ve mayalama endüstrisinde nişastanın başlangıç hidrolizi amacıyla yaygın kullanıma sahiptir. Bu nedenle yapıları detaylı olarak araştırılmıştır.

BL alfa amilazı 483 amino asit içeren 3 domaine sahip yaklaşık 58 kDa ağırlığında, disülfid bağı içermeyen monomerik bir metaloenzimdir . A, B ve C olmak üzere üç domainine sahiptir.

Merkez N-terminal domaini (A domaini) (α/β)₈ TIM sarmalı şeklindedir. A domaini amilolitik enzimler arasında en çok korunmuş domainidir. C terminal domaini (Cdomaini) aktif bölgeyi ve korunmuş kalsiyum bağlanma bölgesini içerir. C domaini greek key motifi içermektedir. B domaini, A domaininin bir çıkıntısı şeklindedir. B domaini α -amilazlar içerisinde en az benzer olan domainidir. B domaini ikili heliks şeklinde iki uzun merkezi sütundan oluşmaktadır ve substrat spesifikliğı yönünden önemli bir yarık oluşturur (Lu, 2009). Şekil 1.15 de BLA'nın renklendirilmiş üç boyutlu yapısı ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

BLA üzerinde Arg229, Asn326 klor; Asp161, Asp183, Asp194, Asp200 ve Ile201 sodyum ve Asn104, Asp200 ve His235 Ca1 ve Asp161, Ala181, Asp202, Asp204, Asp183 Ca2 ve Asp430, His406, Asn407, Gly300 ve Tyr302 Ca3 bağlanmaktadır (Hmidet et al, 2008).



Şekil 1.16: *Bacillus licheniformis* α -amilazının üç boyutlu yapısı: Kalsiyum ve sodyum iyonları proteinin doğal halinde ona bağlı bulunmaktadır. A domaini kırmızı ile gösterilmiştir ve α - β TIM şeklindedir. B domaini mavi ve C domaini sarı renklidir. Üç kalsiyum altın renginde ve bir sodyum mavi renktedir (Hinz et al, 2006).

Lu (2009) BLA'nın termostabilliğini sağlayan mutasyonların çoğunun domain B'de lokalize olduğunu ve tuz köprüleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları BLA'nın termostabilliğini sağladığını söylemektedir. Yapılan çalışmalar His133 ve Ala209 rezidülerinin BL α -amilazların termostabilitesinde etkin olduğunu göstermiştir. Ala209'un etkisi merkezi domaindeki iki heliksin hidrofobik etkileşimlerle katlanmasını güçlendirmektedir. Histidin133 rezidüsü hidrojen bağı kurarak yapının stabilitesini sağlamaktadır (Declerck et al, 1997).

1.6.1 *Bacillus licheniformis* alfa amilazlarının katalitik mekanizması

Aktif merkezdeki glutamik asit asit-baz katalizi ve aspartat nükleofil olarak görev yapar. Reaksiyon 5 basamakta gerçekleşir. İlk basamakta substrat aktif merkeze bağlanarak asit formunda olan glutamik asit glikozidik bağın +1 ve -1 oksijenini protonlar ve sonra aspartat glukozun C1 -1 ünitesine nükleofilik atak gerçekleştirir. İkinci durumda kovalent bağlı ara ürün olarak geçiş halinde bulunan okzokarbonyum iyonu oluşur. Üçüncü durumda ise +1'deki protonlanmış glukoz molekülü aktif merkezden uzaklaşır ve bu esnada aktif bölgeye ya yeni bir glukoz molekülü yada bir su molekülü gelir ve glukoz molekülünün -1 kısmı ile aspartat kovalent bağlanır. Dördüncü durumda ise okzokarbonyum iyonu tekrar oluşur. Son durum olarak glutamat sudan gelen yada yeni gelen glukoz molekülünün +1 kısmından gelen hidrojen molekülünü kabul eder. Sudan gelen veya yeni glukoz +1 molekülünden gelen oksijen okzokarbonyum ile yer değiştirir ve aspartat glukozun C-1 pozisyonundaki hidroksil gurubu oluşturur ve bu şekilde hidroliz gerçekleşir.

Diğer aspartat rezidüsü ise substrattaki OH-2 ve OH-3 guruplarına bağlanarak substrat molekülünün deformasyonunu sağlar. Bu durum substratın aktif merkeze doğru oryantasyonunu, geçiş halinin stabilizasyonunu ve substratın elektronik yapısının polarizasyonunu sağlamaktadır (Maarel et al, 2002).

1.7 Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu; bir enzimin hareketliliğinin ve katalitik fonksiyonunun yapay olarak sınırlandırılmış formuna dönüştürülmesi olarak tanımlanır (Buchholz and Klein, 1987). Bu sınırlandırılmış hareketlilik enzimin geri kazanılmasına olanak sağlar ve bu genellikle ya çözünmez forma dönüştürülmesiyle ya da yarı geçirgen bir membranda tutulmasıyla gerçekleştirilebilir. İmmobilizasyon esnasında enzimler dört avantajlı özellik kazanırlar:

- İmmobilize enzimler çeşitli reaktörlerde tekrar ve sürekli olarak kullanılabilirler.
- Çözünür reaksiyon ürünlerinden ve tepkimeye girmemiş substratlardan kolayca ayrılabilir; böylece son ürün protein kontaminasyonlarından korunmuş olur.
- İmmobilizasyon enzimin katalitik özelliklerini, pH aktivite profilini ve enzim kararlılığı artırır.
- Mikrobiyal kontaminasyonun kontrolü çözünür proteinlere göre katı immobilize preparatlarda daha kolaydır.

Bununla birlikte immobilize enzimlerin uygulamalarında sınırlamalar da vardır:

- Protein bağlanma verimi nadiren kantitatifdir.
- Çoğu durumda taşıyıcının maliyeti enzimin maliyetinden daha fazladır.
- Proteinin kimyasal modifikasyonu, sterik engeller ve kütle transferi sınırlamaları nedeniyle immobilize enzimin aktivitesi genellikle azalmıştır.

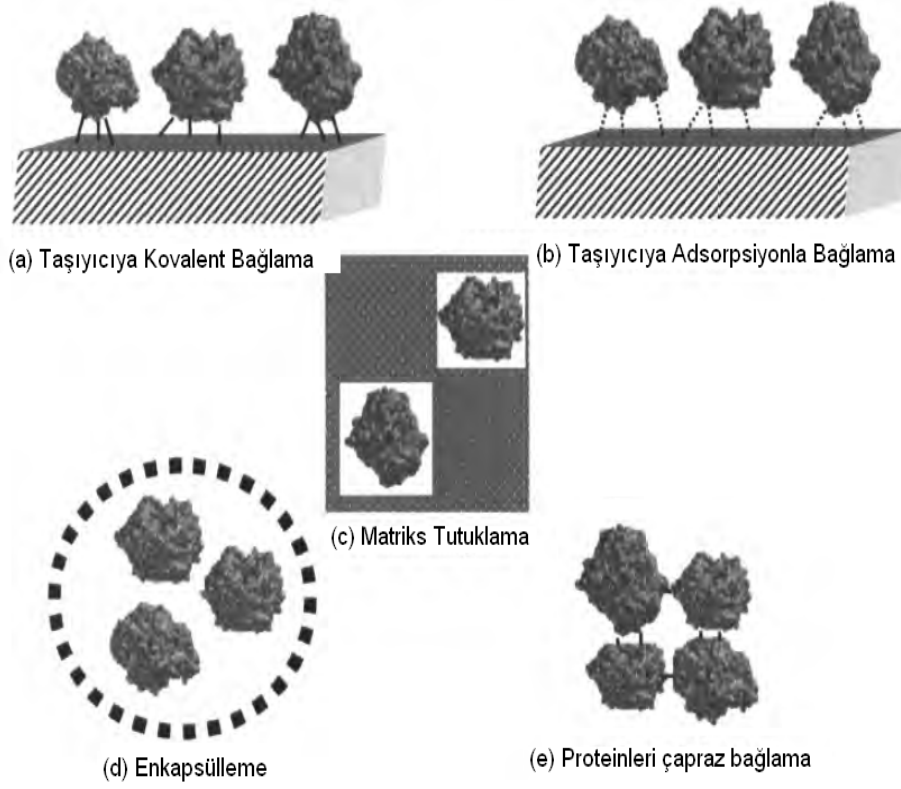
- İmmobilize enzim preparatlarında aktif enzimin taşıyıcı materyale oranı nadiren %5-10 w/w miktarını geçer ve bu nedenle katının ağırlığı başına katalitik aktivite büyük ölçüde düşer.

Dezavantajlarına rağmen immobilize enzimin biyoteknoloji ve endüstride kullanım alanları her gün artmaktadır (Liese et al., 2000).

1.7.1 İmmobilizasyon yöntemleri

Spesifik enzimlerin immobilizasyonu için geliştirilen çeşitli stratejiler binlerce yayın ve patent ile detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Bu immobilizasyon teknikleri dört ana grup içinde incelenebilir:

- Enzimin katı bir destek üzerine non-kovalent adsorpsiyonu;
- Enzimin katı bir destek üzerine kovalent bağlanması;
- Enzimin polimerik jel, membran ya da kapsüle tutuklanması;
- Enzimin polifonksiyonel bir ajan ile çapraz bağlanması



Şekil 1.17: İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Karlheinz and Herbert, 2002)

İlk üç sınıf, enzimin tutuklanması ya da desteklenmesi ve katı taşıyıcının istenen mekanik özelliklerinin sağlanabilmesi için katı bir matrisin kullanımını içerir (Şekil 1.17 a,d). Sonuncusu ise fazladan her hangi bir destek kullanmadan enzimin kendisi ile kovalent bağlanması ile gerçekleştirilen bir yöntemdir (Şekil 1,17 e).

1.7.1.1 Non-kovalent adsorpsiyon

Enzimin katı bir taşıyıcıya adsorpsiyonu, proteinin katı yüzey ile geri-dönüşümlü non kovalent bağlanma yoluyla etkileşimi olarak karakterize edilir. Adsorpsiyon sürecindeki etkileşim güçleri; göreceli olarak daha güçlü olan iyonik bağlardan ve hidrojen bağlarından daha zayıf Van der Waals bağlarına ve proteinin destek ile hidrofobik etkileşimlerine kadar farklılık gösterebilmektedir.

1.7.1.2 Kovalent bağlama

Katı bir taşıyıcıya kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu, proteinin yan zincirlerindeki kalıntılarla destek yüzeyindeki reaktif gruplar arasında kovalent bağ oluşumu ile gerçekleştirilmektedir. Kovalent bağlanma çoğunlukla proteinin değerli olduğu durumlarda dezorpsiyonun istenmediği koşullarda tercih edilir. Taşıyıcı ve protein arasındaki bağ oldukça güçlü olduğundan hazırlanan bileşik adsorpsiyon ya da enkapsülasyon ile elde edilenlere kıyasla çok daha kararlıdır.

1.7.1.3 Tutuklama ve enkapsülasyon

Prensip olarak tutuklama hücreyi ya da enzim molekülünü belli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Hücre ya da enzim bulunduğu çevreden dışarı çıkamaz. Bu işlem için polimer içerisindeki kafeslerde tutuklama, hollow-fiber ultrafiltrasyon membranlarında ya da lipozomlarda enkapsülasyon gerçekleştirilebilir. Bu yöntemleri kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama matrisinin yoğunluğuna göre proteinin mikro çevresi çok az değişebilir ve bu sayede katalitik aktivitedeki kayıp minimize edilebilir.

1.7.1.4 Çapraz bağlama

İnert taşıyıcı ya da matris ilavesi olmadan kimyasal çapraz bağlama ile gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde hacimsel aktivitede kayıp olmaksızın biyokatalizörün tekrar kullanımı ve kararlılığının sağlanması mümkündür. Daha önce bahsedilen immobilizasyon yöntemlerinin temel eksikliği önemli miktarda biyokatalizörün ya da inert in biyokatalizöre bağlanma amacıyla kullanılmasıdır. Çoğu durumda kullanılan taşıyıcı miktarı kullanılan proteine oranla en az iki kat fazladır. Ne yazık ki enzimin doğrudan çapraz bağlanması ve ardından elde edilen amorf katının çöktürülmesi çoğunlukla aktivitede önemli ölçüde düşüş ile sonuçlanmaktadır ve bu nedenle bu yöntem pek tercih edilmemektedir.

Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar çapraz bağlı enzim kristallerinin destek materyaline gereksinim duymaksızın immobilize enzimlerden istenen çoğu özelliği karşılayabildiğini göstermektedir.

1.7.2 İmmobilize enzimlerin özellikleri

İmmobilize enzimler heterojen katalistler olduğundan dolayı moleküler düzeyde karakterize edilmeleri genellikle zordur. İmmobilize preparatların çoğu genellikle kimyasal olarak modifiye protein türlerini içeren kompleks karışımlardır. Total katalitik özellikler, genellikle örnek içinde düzensiz dağılmış ve her biri farklı modifiye edilmiş proteinlerin diziliminin bileşkesi olarak gözlenir. Kütle transfer sınırlamaları ve mikro çevre karakterizasyonu daha karmaşık hale getirir (James and Alexey, 2002).

1.7.2.1 Kütle transferi etkileri

İmmobilize formdaki enzimlerin katalitik davranışları çözünür homojen enzimlerin katalitik davranışlarından büyük ölçüde farklıdır. Özellikle kütle transferi etkileri (substratın kataliste transportu ve reaksiyon ürünlerinin katalistten difüzyonu) total aktivitenin düşmesiyle sonuçlanabilir. Kütle transferi etkileri; dış difüzyon etkileri ve iç difüzyon etkileri olmak üzere 2 gruba ayrılır. Dış difüzyon etkileri substratın ana çözeltiden immobilize enzimin yüzeyine taşınmasından kaynaklanır. İç difüzyon sınırlamaları ise substratın gözenekli taşıyıcılar, polimerik mikro küreler ve membranlar gibi immobilize enzim partikülünün içeri girmesi sırasında oluşur. Heterojen katalizlerde kütle transferinin klasik uygulaması immobilize enzimlerde başarıyla gerçekleştirilmiştir (James and Alexey, 2002).

1.7.2.2 Dağılma

Kütle transferine ek olarak enzimlerin heterojen katalistler olduğu durumlarda gerçekleşen bir diğer önemli olgu ise substratların, ürünlerin, inhibitörlerin, metal ve hidrojen iyonlarının ana çözelti ve taşıyıcı arasındaki dağılımıdır.

Katchalsky grubu (James and Alexey, 2002) tarafından öne sürülen basit bir teori ile immobilize enzim partiküllerinin hareketi esnasında içerideki mikro çevrenin etkileri açıklanmıştır. Bu teori özellikle immobilize enzimlerin aktivitesi esnasında pH profillerindeki kaymanın nedenini açıklamaktadır. pH profilindeki bu kayma hidrojen iyonlarının ana çözelti ve taşıyıcı arasındaki sürekli difüzyonundan kaynaklanmaktadır. Eğer pH profilinin daha alkali pH bölgelerine kayması isteniyorsa negatif yüklü taşıyıcı; eğer pH profilinin daha asidik pH bölgelerine kayması isteniyorsa pozitif yüklü taşıyıcı kullanılmalıdır. Ancak bu elektrostatik etkiler düşük iyonik güçlü çözeltilerde gerçekleşir ve tuz konsantrasyonu arttığında hemen hemen ortadan kalkar. Genel olarak substrat ve ürünlerin çözelti ve taşıyıcı arasındaki ayrımı taşıyıcının karakteri (yükli, hidrofobik vs.) ana çözeltinin karakterinden farklı olduğu zaman oluşabilir. Sonuç olarak immobilize enzimlerde substratlar için (K_m) ve ürünler için (K_i) bağlanma sabiti serbest enzimde gözlenenlerden büyük ölçüde farklılaşabilir.

1.7.2.3 Kararlılık

Enzim immobilizasyonunun en önemli faydalarından biri büyük skalalı kimyasal reaktörlerde enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilme özelliğidir. Bu enzim stabilitesinde önemli bir artış sağlanmadan gerçekleştirilemez. Enzimin katı bir yüzeye bağlanması ile agregatlaşma ve proteoliz gibi inter-moleküler prosesler nedeniyle gerçekleşen enzim deaktivasyonu büyük ölçüde engellenir. Bazı durumlarda sadece immobilizasyon ile stabilizasyon sağlanır. Bazı durumlarda ise immobilizasyon yüksek sıcaklık, yüksek pH, organik çözügen ve oksidanların varlığı gibi durumlarda intra-moleküler protein denatürasyonuna karşı üç boyutlu katalitik yapının stabilizasyonunu sağlar. Proteinin bir desteğe birçok noktadan bağlanmasıyla proteinin katlanmış yapısının bozulması engellenebilir. Ancak bunun genellikle katalitik fonksiyon için yaralı olan rijitliği artırıp arttırmayacağı açık değildir. Bir yaklaşım olarak optimum immobilizasyon, minimum aktivite kaybı ile sonuçlanan maksimum fonksiyon sayesinde sağlanır. Enzimin aşırı modifikasyonu genellikle aktivite ve stabilite kayıpları ile sonuçlanır. Bazı özel durumlarda proteinin katı taşıyıcıya birçok noktadan kovalent bağlanması kimyasal ve termal denatürasyona karşı direnci arttırmaktadır.

Protein molekülleri arasındaki polar (elektrostatik) ve hidrofobik etkileşimlerin artışı, protein serbest çevreden immobilize çevreye geçtiğinde sıcaklığa ve diğer denatüre edici ajanlara karşı katlanmamış protein yapısından, agregatlaşmadan ya da proteinlerin birbirinden ayrılmasını önleyerek önemli ölçüde protein stabilitesini arttırır (Guisan et al., 1993).

1.7.2.4 İmmobilize enzimlerin aktiviteleri

İmmobilize enzimlerin aktivite ölçümü basittir ve çözünür enzimlerin aktivitesinin ölçümünden farklı değildir. Her iki durumda da aktivite belirli koşullar altında (konsantrasyon, sıcaklık, pH vs.) bir gram enzim başına bir dakikada tüketilen substratın μmol olarak ölçülür. Hala immobilize enzimlerin heterojen doğalarından dolayı çelişkiler vardır. Bu çelişkilerden birincisi; immobilize enzimin karakteristiği seçilirken dikkatli olunmalıdır. İkincisi; immobilize enzimin aktivitesi karıştırma gibi dış parametrelere karşı daha hassastır ve difüzyon ile sınırlanabilir. Üçüncüsü; taşıyıcıya bağlanan aktif enzimin miktarının ölçülmesi kolay olmadığından doğru katalitik parametrelerin belirlenmesi daha zordur. k_{cat} , K_m , ve K_i immobilize enzim için ölçüldüğünde efektif olarak verildiği hatırlanmalıdır. Bu durum lipazlarda yüzey aktivasyonunu daha zor bir durum haline getirir (Pavia et al., 2000).

1.7.3 Enzim immobilizasyon materyali olarak kitosan

Enzimlerin doğal ortamlarının dışında kullanılmalarında ekonomik ve pratik olmayan nedenlerden ötürü birçok dezavantaj vardır. Bunlar;

- Enzimlerin izolasyon ve saflaştırılmalarının yüksek maliyetli olması
- Doğal ortamlarından izole edilen enzimlerin fonksiyonel yapılarının çevresel şartlardan olumsuz etkilenmesi
- Ortamda bulunan safsızlıkların enzimi inhibe etmesi

- Enzimin operasyonel kararlılığının ve duyarlılığının düşüş göstermesi şeklinde sıralanabilir.

Bu olumsuzlukların üstesinden gelmek için enzimler immobilize edilirler. Enzim immobilizasyonu ile enzimin tekrar kullanılabilirliği, prosesin sürekliliği, enzimatik reaksiyonun istenilen anda sonlandırılabilmesi, çeşitli biyoreaktör tasarımlarına olanak vermesi ve enzimin çevresel şartlara daha dirençli hale dönüşmesini sağlar.

Bununla birlikte enzim immobilizasyon ile birlikte düşük aktivite ve yüksek K_m değerine sahip olma gibi olumsuzluklara da sahiptir. Bunun nedeni enzimde yapısal değişimin olması ve mikro çevrenin etkisidir. Mikro çevrenin özelliği reaksiyon ortamına, destek materyalinin doğasına ve reaktör dizaynına bağlıdır. Immobilize enzimin özellikleri hem enzim hem de destek materyali tarafından belirlenir. Destek materyali immobilize enzimin performansını ve kinetik parametrelerini etkilemektedir. Tüm enzimlerin en iyi olan ortak bir destek materyali yoktur. Fakat tüm destek materyallerinde istenen belirli özellikler vardır. Bunlar proteine karşı yüksek afinite, enzim veya kimyasal modifikasyon için doğrudan ulaşılacak reaktif grup, hidrofilik yapı, mekanik kararlılık/rijidite, rejenerasyon, farklı geometrik koşullar için kolay hazırlanabilme, toksik olmama, biyouyumluluk ve biyoyıkılabilirliktir. Kitosan bu özelliklerin çoğunu göstermesi yönüyle enzim immobilizasyonu için önemlidir. Kitosanın enzim immobilizasyonunda birçok uygulaması vardır (tablo 1.1).

Tablo 1.1: Kitosanın enzim immobilizasyondaki bazı uygulamaları.

Enzim	Uygulama	Yöntem
Alanin dehidrogenaz	L-alanin belirlenmesi	KB
Alkalın proteaz	Çamaşır deterjanlarının yapımı	KT
Alfa amilaz	Niştastadan glukoz şurubu yapımı	KB
	Sularda BOD analizi	KMB
	Hidrofobik etkileşim kromatografisi	K.T
Beta amilaz	Niştastadan maltoz şurubu yapma	KB
Katalaz	Gıdalardan H ₂ O ₂ 'in uzaklaştırılması	KT
Alfa kimotripsin	Ester ve peptit sentezi	KB
Kreatin deaminaz	Kreatin biyosentezi	KB
Lipaz	Esterifikasyon/transesterifikasyon	KB
Fosfolipaz A2	Kan kolesterolünün düşürülmesi	SKT
Tannaz	Çay taninlerinin hidrolizi	KTPB
Tirozinaz	L-DOPA sentezi	KOSM
Üreaz	Yapay böbrek	AKKB
Lipaz	Lipit Hidrolizi	AMKB

(Kitosanın enzim immobilizasyondaki bazı uygulamaları (KB: kitosan boncuğu, KT: kitosan tozları, KMB: kitosan mikro boncuk, SKT: süksinillenmiş kitosan tozları, KTPB: kitosan trifosfat boncukları, KOSM: kitosan organosilan membranı, AKKB: aljinat kaplı kitosan boncukları).

Kitosan çok farklı kimyasal ve biyolojik özellikler göstermektedir. Yüksek molekül kütleli lineer bir polisakkarit olan kitosan sahip olduğu reaktif amino ve hidroksil gurupları sayesinde kimyasal modifikasyona açıktır. Amino gurupları ($pK_a=6,5$) kitosani polielektrolit yapmaktadır. Bu bazik yapı kitosana spesifik özellikler kazandırmaktadır. Bunlar $pH<6,5$ sulu asidik ortamda çözünürlük, pozitif yükleri sayesinde negatif yüklü yapılara bağlanabilme, polianyonik bileşiklerle agregatlar oluşturabilir ve ağır metallerle şelat yapabilme olarak söylenebilir.

Kitosanın enzim immobilizasyonunda kullanım şekli tozlar, kabuk ve çeşitli geometrik şekillerde jellerdir. Kitosan asetik asit, formik asit, tartarik asit vb pek çok asitte çözünebildiği için boncuk, membran, kapsül, kaplama, fiber, hallow fiber ve süngerimsi jel yapılarında üretimi mümkündür.

Jel yapımından sonra çeşitli muameleler ve kimyasal modifikasyonlar ile jelin kararlılığı ve ömrü arttırılabilir. Kitosan jeller dört farklı şekilde yapılabilmektedir (Krajewkska, 2004).

1.7.3.1 Çözgen uzaklaştırma metodu

Çözgen uzaklaştırma metodu genellikle membran ve film oluşumu için kullanılmaktadır. Bu metot kitosanın organik asitte çözündürülmesi, çözünen kitosanın cam, asetat veya elektrot yüzeyine dökülmesinin ardından seyreltik NaOH ile nötralize edilerek kurutulması esasına dayanır. Membran ve film oluşumu esnasında meydana gelebilecek olan integrasyonları engellemek için çapraz bağlayıcılar kullanılabilir (Krajewkska, 2004).

1.7.3.2 Nötralizasyon metodu

Asidik kitosan çözeltisi alkali ile muamele edildiğinde vakit katı kitosan çökeleği oluşur. Bu temel bilgiden hareketle kitosan çökelekleri, membranlar, fiberler ve çeşitli boyut ve porozitede küresel boncuklar nötralizasyon metoduyla etkin olarak üretilebilir.

Bu metot kitosanın seyreltik organik asitte çözündürülür ve akabinde NaOH çözeltisi içerisinde kitosan damlatılarak boncuk oluşumu sağlanır. Çözelti genellikle Su-Etanol veya Su-Metanol karışımı olur.

Etanol kitosan için çözgen olmadığından kitosanın katılaşmasını sağlar. Boncuk oluşumundan sonra çapraz bağlayıcılar kullanılarak boncuğun mekanik özellikleri güçlendirilir.

Hazırlanan boncuğa enzim immobilizasyonu adsorpsiyon, ağ oluşturma ve kovalent bağlamayla olur. Ayrıca enzim başlangıç kitosan çözeltisi içerisinde çözünmez ise inklüzyon ile immobilizasyon gerçekleştirilebilir (Krajewkska, 2004).

1.7.3.3 Çapraz bağlama

Basit ve kullanışlı bir yöntemdir. Asidik kitosan çözeltisi çapraz bağlayıcı ajan ile muamele edilerek jel oluşumu sağlanır. Jel ana çözelti şeklinde oluşturularak kullanım amacına göre partiküllere ayrılır (Krajewkska, 2004).

1.7.3.4 İyonotropik jel metodu

Kitosan sahip olduğu polielektrolit doğası sayesinde anyonik polielektrolitlerle suda çözünmeyen kompleksler oluşturabilir. Anyonik polielektrolitler olarak aljinat, karragenan, ksantan, polifosfatlar, organik sülfatlar ve enzimler başlıca örnekler olarak verilebilir.

Metot genellikle jel boncuklarının oluşumunda kullanılır. Enzim immobilizasyonu jel oluşumundan önce enzim içeren anyonik polielektrolitlerin hazırlanmasıyla başlar. Oluşturulan bu enzim-polianyonik elektrotlar boncuğa veya kapsüle inklüzyon ile aktararak immobilizasyon tamamlanır (Krajewkska, 2004).

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Alfa amilaz (Termamyl® 120 L, L tipi) novozyme firmasından (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danimarka), Kitosan, BSA, Nişasta, NaCl, Etanol ve Maltoz Fluka-Biochemika'dan, Glutaraldehit, Asparagin ve Lizin Sigma Chemical tarafından (St.Louis, CA) temin edilmiştir. Terazî . Spektro. Su banyosu. Isıtıcı. Peristaltik pompa.

2.2 Protein Tayini

Protein tayini Bradford yöntemine göre yapıldı. Sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanıldı (Bradford, M.M., Anal.Biochem., 1976, 72, 248-252)

Kullanılan Reaktifler:

Bradford reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 %95'lik etanolde çözülür üzerine 55 mL %85'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1L ye tamamlanır ve filtre kâğıdından süzülerek kullanılır.

Standart ve örneklerin protein miktarları aşağıdaki prosedüre göre belirlendi.

- 2-200 µg/mL olacak şekilde BSA içeren standartlar hazırlanır (Albümin derişimi 2-200 µg protein/mL son hacim olacak şekilde A595 0,046-0,248 arasındadır).
- 0,05 mL protein standardı/örneğı üzerinde 1mL Bradford reaktifi eklenir ve vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilir.
- Kör 0,05 mL distile su üzerine 1mL Bradford reaktifi eklenerek hazırlandı
- Absorbanslar 595 nm de 1 mL lik küvetlerde okunur.

2. 3 Alfa Amilaz (Termamyl®) Aktivitesinin Belirlenmesi

α -Amilaz enziminin aktivite tayininde Dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanıldı. Bir α -amilaz aktivite birimi 1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratan substratın mikro mol miktarı olarak tanımlanmıştır.

Kullanılan reaktifler:

DNS reaktifi: 1 g 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), 20 mL 2 M NaOH çözeltisine eklenir, ısıtılarak çözülür ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır. Ardından üzerine 30 g Na/K tartarat ilave edilerek distile su ile 100 mL ye tamamlanır.

Nişasta çözeltisi: 500 mg çözünür nişasta ve 17,5 mg NaCl 30 mL pH 7,0 fosfat tamponunda kaynar su banyosunda çözülür. Nişastanın çözünmesinin ardında buz banyosunda oda sıcaklığına kadar soğutulur ve son hacim distile su ile 50 mL ye tamamlanır. Nişasta çözeltisi 2 günde bir taze olarak hazırlanmıştır.

Fosfat Tamponu: Stok KH_2PO_4 ve 1M NaOH ve distile su yardımıyla 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Fosfat tamponu günlük hazırlanmıştır.

Standart grafiğinin oluşturulması:

- 83-415 μM olacak şekilde maltoz içeren standartlar hazırlanır (maltoz derişimi 83-415 μM son hacim olacak şekilde A546 0,087-0,417 arasındadır).
- Kör olarak 1 mL distile su kullanıldı.
- 1 mL maltoz standardı üzerine 1 mL DNS reaktifi eklenir ve vortekslenerek 10 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilir.
- Buz banyosunda standartlar oda sıcaklığına soğutulur.
- Standartlara 10 mL distile su eklenerek vortekslenir.

- Absorbanslar 546 nm de 2 mL küvetlerde okunur.

Serbest enzimin aktivite ölçümü

- Kör; 0,5 mL tampon 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu + 0,5 mL nişasta çözeltisi 20 mL lik tüpe konur.
- α -Amilaz aktivitesi için; 0,1 mL enzim (0,26 mg/mL protein) + 0,4 mL 100 mM pH 7,0 fosfat tampon + 0,5 mL nişasta 20 mL tüpe konur.
- Tüpler hafifçe vortekslenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
- 1 mL DNS reaktifi eklenerek vortekslenir.
- Tüpler kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir.
- Tüpler buz banyosu yardımıyla oda sıcaklığına soğutulur.
- Tüplere 10 mL distile su eklenerek vortekslenir.
- Absorbanslar 546 nm de 2 mL lik küvetlerle ölçülür.
- Maltoz standart grafiği yardımıyla Termamyl aktivitesi hesaplanır.

İmmobilize enzimlerin aktivite tayinleri:

Modifiye olmamış, Lizin ve Asparaginle modifiye olmuş kitosan boncuklarda immobilize edilen α -amilazların aktiviteleri aşağıdaki prosedüre göre kullanılarak belirlenmiştir.

- K r; 0,5 mL 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu + 0,5 mL nişasta  zeltisi 20mL lik tüpe konur.
- İmmobilize α -amilaz aktivitesi için 0,5 mL tampon + 0,5 mL nişasta ve iki tane enzim immobilize edilmiş kitosan boncuğu 20 mL lik tüpe konur.
- Tüpler hafifçe vortekslenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
- 1 mL DNS reaktifi eklenerek vortekslenir.
- Tüpler kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir.
- Tüpler buz banyosu yardımıyla oda sıcaklığına soğutulur.
- Tüplere 10 mL distile su eklenerek vortekslenir.
- Absorbanslar 546 nm de 2 mL lik küvetlerle ölçülür.
- Maltoz standart grafiği yardımıyla immobilize Termamyl aktivitesi hesaplanır.

2.4 Kitosan Boncuklarının Hazırlanması

Kitosan boncuklar nötralizasyon metoduna göre hazırlandı: Boncuk hazırlanması için %2'lik kitosan %1'lik asetik asitte  z nd r ld . Kitosanın üzüldü işlemi oda sıcaklığında ve yüksek karıştırma hızında gerçekleştirildi. Kitosan  z ltisinin oldukça viskoz olması nedeniyle oluşan hava kabarcıkları giderildi (şekil 2.1).

Kitosan boncuklarının yapımı için kullanılan nötralizasyon çözeltisi %25 (v/v) etanol içeren 2 M'lık sulu çözeltidir. Kullanılan sodyum hidroksit asetik asidin nötralleşmesini sağlamaktadır. Etanol ise kitosanı çözmediğinden kitosan boncuklarının kararlı ve kolay oluşumunu sağlamaktadır.

Kitosan boncuklarının eşit hacim ve küre şeklinde olması için peristaltik pompa ve ucu inceltirilip küt hale getirilmiş pastör pipeti kullanıldı. Peristaltik pompanın hızı sabitleştirilerek dakikada 30 boncuk oluşumu sağlandı. Nötralizasyon çözeltisinin karışma hızı minik bir vokteks oluşacak şekilde ve boncukların damlama yüksekliği 5 cm'ye ayarlandı. Bu şekilde hem boncukların birbirine çarpması engellendi hem de boncukların şekil bozukluğunun önüne geçildi. 10 dakika süreyle boncuk oluşumu gerçekleştirildi. Boncuklar hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyon ve akabinde gece boyunca +4 °C de hafif karıştırma altında inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyonda kalan boncuklar pH 7,0 fosfat tamponu ile bolca yıkanarak etanol uzaklaştırıldı. Yıkanan boncuklar ya doğrudan Termamyl immobilizasyonu için yada asparagin veya lizinle modifikasyon için kullanıldılar.



Şekil 2.1: Kitosan boncuklarının hazırlanması.

2.5 Kitosan Boncukların Kimyasal Modifikasyonu

Kitosan boncukların kimyasal modifikasyonu için fonksiyonel grup taşıyıcısı olarak Asparagin ve Lizin aminoasitleri çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanıldı. Glutaraldehit iki tane karbonil grubu taşımasıyla bifonksiyonel özellik göstermektedir. Glutaraldehit hem kitosan üzerindeki birincil amino grubu hem de amino asitler üzerindeki birincil amino gruplarıyla Schiff bazı reaksiyonu üzerinden amit bağı oluşturur. Bu amaçla;

- 300 tane kitosan boncuk 96 mL 100mM pH 7,0 fosfat tamponuna eklendi ve üzerine son derişimi % 1 olacak şekilde %25 lik stok glutaraldehitten 4 mL eklendi.
- Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından aşırı glutaraldehidin uzaklaştırılması için boncuklar 100 mM (pH 7,0) fosfat tamponuyla birkaç kez yıkandı.
- Aktifleşen boncukların amino asitlerle modifikasyonu için boncuklar 100 mL'lik 100 mM (pH 7,0) fosfat tamponuna kondu ve amino asitlerden 0,1 g eklenerek oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildi.
- Bağlanan amino asit miktarının tayini için ortamdan 1 mL örnek alınarak nuçe erleni yardımıyla süzülür.
- Modifiye edilen kitosan boncuklar 2 defa 100 mL 100mM (pH 7,0) fosfat tamponuyla yıkandı ve bağlanmayan aminoasitlerin tayini için her yıkamanın ardından ortamdan örnek alındı.
- Modifiye edilen kitosan boncuklar Termamyl'in immobilizasyonunda kullanıldı.

2.6 Termamyl® (α -amilaz) İmmobilizasyonu

Alfa amilaz'ın modifiye olmamış ve modifiye olmuş boncuklarda immobilizasyonunda;

- 300 tane boncuk, 92 mL 100 mM fosfat tamponuna (pH 7,0) eklendi. Son glutaraldehit derişimi % 2 olacak şekilde stok %25 lik glutaraldehitten 8 mL eklendi.
- Kitosan boncuklarının aktivasyonu için oda sıcaklığında 3 saat inkübasyona bırakıldı.
- Glutaraldehitin aşırısının uzaklaştırılmak için boncuklar pH 7,0 100 mM fosfat tamponuyla birkaç kez yıkandı.
- Aktifleştirilen kitosan boncuklar 96,2 mL pH 7,0 100 mM fosfat tamponuna kondu ve son protein derişimi 1mg/mL olacak şekilde stok protein çözeltisinden 3,8 mL ortama eklendi.
- İnkübasyon gece boyunca (16 saat) +4 °C de gerçekleştirildi.
- İnkübasyonun ardından ortamdan 1 mL örnek alındı.
- Nuçe erleni yardımıyla immobilizasyon ortamı süzöldü.
- Süzme işleminin ardından boncuklar 2 defa 100 mL pH 7,0 100 mM fosfat tamponu ile yıkandı.
- Yıkama sularından 1 er mL örnek alındı
- Alınan örneklerde protein miktarı ve serbest enzim aktivitesi tayin edildi.

Elde edilen immobilize enzimler modifiye edilmemiş kitosan boncukları (NMKB), lizinle modifiye edilmiş kitosan boncukları (LMKB) ve asparaginle

modifiyeli kitosan boncukları (AMKB) olarak adlandırıldı. NMKB, LMKB ve AMKB aynı fiziksel yapılara sahiptirler ve şekil 2.2’de örnek kitosan boncukları gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Elde edilen Termamyl® immobilize edilmiş kitosan boncukları.

2.7 Amino Asit Tayini

Kitosan boncuklarının kimyasal modifikasyonunda kullanılan ve bağlanmamış olan asparagin ve lizin miktarının belirlenmesi için tayin yapıldı.

Kullanılan reaktifler:

Ninhidrin reaktifi: 20 mg ninhidrin reaktifi 10 mL pH 5,0 20 mM asetat tamponunda çözülerek hazırlandı.

Lizin tayini:

- Standartlar 1mg/mL- 9mg/mL olacak şekilde 10mg/mL lik stoktan hazırlandı (1mg/mL-9mg/mL son derişimi olacak şekilde A570 de 0,083-1,112 arasındadır).
- 1mL lik lizin standardı ve 1 mL lik lizin örneğı üzerine 0,2 mL Ninhidrin reaktifi eklendi.
- Kör 1mL distile su üzerine 0,2 mL Ninhidrin reaktifi eklenerek hazırlandı.
- Tüpler vortekslenerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından buz banyosuyla tüpler oda sıcaklığına getirildi.
- Soğurumlar 570 nm de 2mL lik küvetlerle okundu.
- Örneklerin soğurumları standart grafiğine aktarılarak derişimleri belirlendi.

Asparagin tayini:

- Standartlar 5-10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı (asparagin son derişimi 5-10 mg/mL olacak şekilde soğurum A570 nm de 0,383-0,9 arasındadır).
- 1 mL lik asparagin standardı ve 1 mL lik asparagin örneği üzerine 0,2 mL Ninhidrin reaktifi eklendi.
- Kör 1mL distile su üzerine 0,2 mL Ninhidrin reaktifi eklenerek hazırlandı.
- Tüpler vortekslenerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından buz banyosuyla tüpler oda sıcaklığına getirildi.
- Soğurumlar 570 nm de 2mL lik küvetlerle okundu.
- Örneklerin soğurumları standart grafiğine aktarılarak derişimleri belirlendi.

2.8 Optimum Koşulların Belirlenmesi

2.8.1 Optimum pH'nın belirlenmesi

Serbest enzim ve immobilize enzimlerin optimum pH tayinleri DNS metodu kullanılarak 100 mM'lık pH 4-9 arasındaki tamponlar (pH 4, 5 ve 5,5 için asetat tamponu; pH 6, (6,5), 7, (7,5) ve 8 için fosfat tamponu ve pH 9 için glisin tamponu kullanılmıştır) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ölçülen aktivite değerleri rölatif değerlere çevrilerek serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH değerleri belirlenmiştir. Reaksiyonlar 25 °C ve 0,5 g/mL nişasta derişiminde gerçekleştirildi.

2.8.2 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Optimum sıcaklık tayini serbest ve immobilize enzimler için 25-60 °C aralığında DNS metodu kullanılarak yapılmıştır. 100mM pH 7,0 fosfat tamponu ve 0,5g/mL nişasta kullanılarak aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.8.3 Kararlılık testleri

Kararlılık testleri DNS metodu kullanılarak rölatif aktivite değerleri üzerinden belirlenmiştir.

2.8.3.1 pH kararlılığı

Ortam pH sınırın serbest enzim ve immobilize enzimler üzerine etkisi pH 4-9 arasında 100 mM lık tamponlar kullanılarak (pH 4, 5 ve 5,5 için asetat tamponu; pH 6, (6,5), 7, (7,5) ve 8 için fosfat tamponu ve pH 9 için glisin tamponu kullanılmıştır) incelenmiştir. Ölçümler 25 °C ve 0,5 g/mL nişasta kullanılarak DNS metodu ile ölçülmüştür.

2.8.3.2 Termal kararlılığın belirlenmesi

Serbest enzim ve immobilize enzimler için 25 ve 50 °C sıcaklık değerlerinde ölçülmüştür. Reaksiyonlar 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve 0,5g/mL nişasta koşullarında DNS metoduyla gerçekleştirilmiştir.

2.8.3.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize enzimlerin uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametredir ve uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla immobilize enzimler 50 mM pH 5,5 asetat tamponunda buzdolabında saklandı. Serbest enzim ise hem kendi

stok çözeltisinde hem de 50 mM pH 5,5 asetat tamponunda buzdolabında saklandı. Reaksiyonlar 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C ve 0,5 g/mL nişasta derişiminde DNS metoduyla gerçekleştirilmiştir. Aktivitedeki değişimler belirli zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir ve kararlılık rölatif değerler üzerinden hesaplanmıştır.

2.8.3.4 Operasyonel kararlılık

Operasyonel kararlılık enzim immobilizasyonunun etkinliğini gösteren önemli bir parametredir. Operasyonel kararlılık serbest enzim ve immobilize enzimler için 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C ve 0,5 g/mL nişasta varlığında DNS metoduyla ölçülmüştür. Aktivitenin zamana bağlı artışında lineerlikten sapmalar meydana gelmiştir. Bu sapmalar üzerinden hareketle serbest enzim ve immobilize enzimlerin operasyonel kararlılıkları hesaplanmıştır.

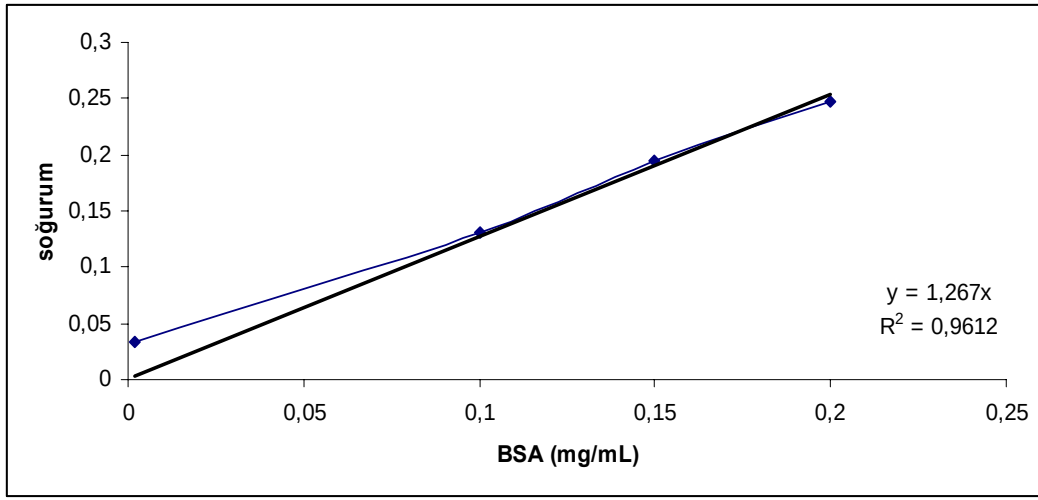
2.8.4 Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Kinetik parametrelerin belirlenmesi için serbest enzim ve immobilize enzimler için reaksiyonlar aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Substrat derişiminin belirlenmesi serbest enzimle yapılan ön çalışmayla gerçekleştirilmiştir. Substrat derişimleri 0,125-0,750 g/mL arasındadır. Aktiviteler 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve 25 °C de DNS metoduyla belirlenmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Protein Tayini

Derişimi bilinen BSA (2-200µg/mL) standartları hazırlandı. Bölüm 2.2 de detaylı olarak anlatılan Bradford metoduna göre standart grafiğı oluşturuldu. Oluşturulan grafik serbest enzim ve immobilizasyon sonrasında süzüntü ve yıkama sularındaki protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Oluşturulan standart grafiğı şekil 3.1’de görölmektedir.

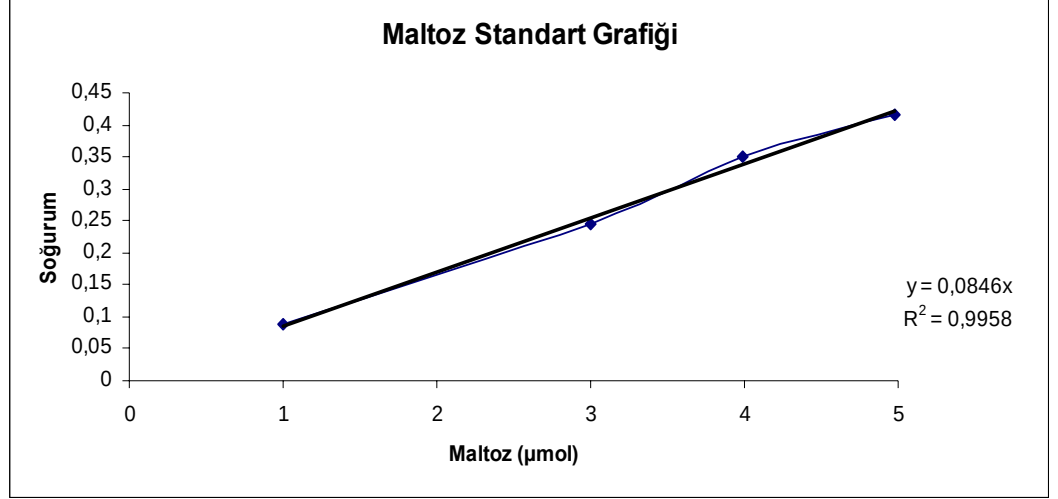


Şekil 3.1: Protein standart grafiğı.

Serbest enzim ve kitosan boncuklarına bağlanan protein miktarı bölüm 2.2 de detaylı anlatılan Bradford metoduna göre yapılmıştır. Kitosan boncuklarına bağlanan protein miktarı immobilizasyonun ardından süzüntü ve yıkama sularındaki protein miktarlarının hesaplanması ile dolaylı olarak belirlenmiştir.

3.2 Maltoz Standardı

Derişimi bilinen maltoz standartları (83-415 μ M) hazırlandı. Bölüm 2.3 de detaylı olarak anlatılan DNS metodu ile standard grafiğı oluşturuldu (şekil 3.2). Maltoz standart grafiğı kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri hesaplandı.



Şekil 3.2: Maltoz standart grafiğı.

3.3 Kitosan Boncukların Hazırlanması

Kitosan boncuklar bölüm 2.4 de açıklanan nötralizasyon metoduna göre hazırlandı. Modifiye edilmeden, Lizinle ve Asparaginle modifiye edilerek kullanılacak olan kitosan boncuklar benzer şekilde aynı miktarlarda hazırlandı.

3.4 Kitosan Boncukların Modifikasyonu

Kitosan boncukların Asparagin ve Lizinle kimyasal modifikasyonu aynı prosedüre göre bölüm 2.5’de anlatıldığı gibi yapıldı. Kullanılan lizin ve asparagin miktarı (10mg/mL) aynıdır. Tablo 3.1 de kimyasal modifikasyon süresince kitosan boncuklarına bağlanan lizin ve asparagin miktarları (%) verilmektedir.

Tablo 3.1: Bağlanan amino asit miktarları.

Bağlanan Amino Asit Miktarı (%)	Asparagin	Lizin
	62	55

(Her iki durum içinde 300 boncuk kullanılmıştır)

Yi *et al* (2009) kitosan boncuklarının lipaz immobilizasyonu için çeşitli amino asitlerle epiklorohidrin aktivivasyonun ardından kimyasal modifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada lizinin kitosan boncuklarına bağlanma oranı % 43,2 ve en yüksek bağlanan amino asit olarak glutamik asit ise % 56,6'dır. Bizim çalışmamızda ise görel olarak lizin (% 55) ve asparagin (% 62) daha yüksek bir bağlanma oranına sahiptir.

3.5 α -Amilaz (Termamyl®) İmmobilizasyonu

Termamyl® immobilizasyonu modifiye olmamış ve kimyasal modifikasyona tabi tutulmuş kitosan boncuklarda 2.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon prosedürü aynı tutularak modifikasyonun ve modifiye edici ajanın immobilizasyon verimi üzerine olan etkisi nicel olarak belirlenmiştir. Tablo 3.2'de immobilizasyon ile bağlanan protein miktarı ve modifiye edilmiş ve edilmemiş 300 kitosan boncuğu için geri kazanılan aktivite değerleri (%) gösterilmektedir.

Tablo 3.2: modifiye edilmiş ve edilmemiş kitosan boncuklarda protein bağlanma miktarları (%) ve aktivite geri kazanımları (%).

	KB	LKB	AKB
Bağlanan Termamyl® Miktarı (%)	51,2	75,7	60,3
Geri kazanılan aktivite oranı (%)	11,1	17,8	29,3

Geri kazanılan aktivite miktarı spesifik aktiviteler üzerinden ve sadece boncukların taşıdığı aktivite değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Bağlanmamış enzim spesifik aktiviteleri hesaplandığı vakit her üç durum içinde aynı aktiviteler elde edilmiştir.

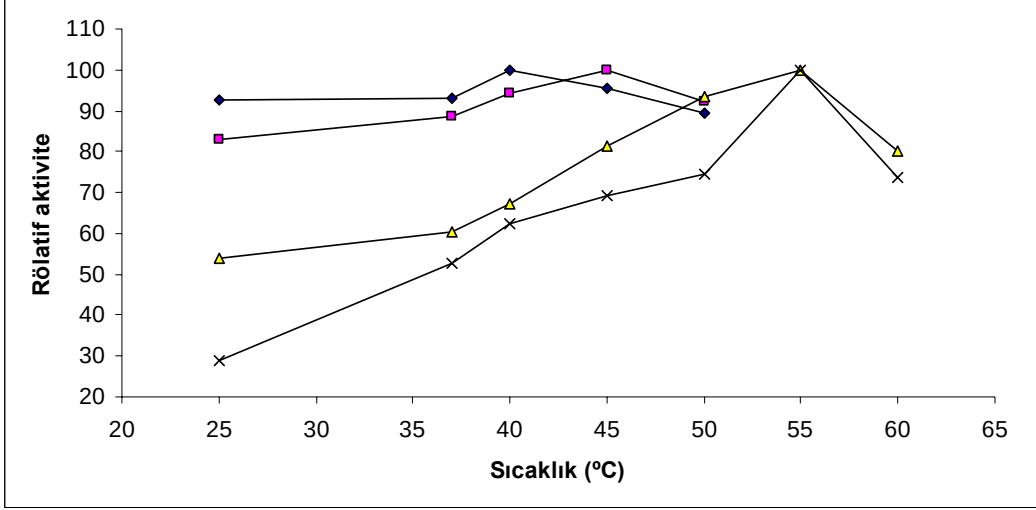
Tripathi *et al* (2007) *Vigna radiata* α -amilazı aynı şekilde yapılmış kitosan boncuklarına ve aynı zamanda amberlit MB 150 üzerine immobilize etmişlerdir. Kitosan boncukları için 1mg/mL protein kullanılınca %55; 4 mg/mL protein kullanılınca %69 protein bağlanması gerçekleşmektedir. Amberlit MB 150 kullanıldığında ise 1 mg/mL başlangıç protein konsantrasyonu olduğu durumda %50; 5 mg/mL olduğu durumda ise % 72 protein bağlanması gerçekleşmektedir. Bu çalışmada 1mg/mL başlangıç protein konsantrasyonu olduğu halde NMKB her iki duruma yaklaşık değer olarak %51,2 bir bağlanma gerçekleştirirken LMKB (%75,7) ve AMKB (%60,3) oldukça yüksektir. Öyle ki LMKB'nın protein bağlama oranları Tripathi *et al* (2007) 4mg/mL başlangıç protein derişimiyle yapılan immobilizasyondan daha yüksek bağlanma sağlamıştır.

3.6 Optimum Koşulların Belirlenmesi

3.6.1 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Bölüm 2.8.2'de detaylıca anlatıldığı gibi serbest enzim ve modifiye edilmemiş kitosan boncuklarına immobilize edilmiş enzim 25-50 °C aralığında;

asparagin ve lizin ile modifiye edilmiş kitosan boncuklarına immobilize edilmiş enzim 25-60°C arasında optimum sıcaklık yönünden incelenmiştir. Optimum sıcaklıklar şekil 3.4’de gösterilmektedir.



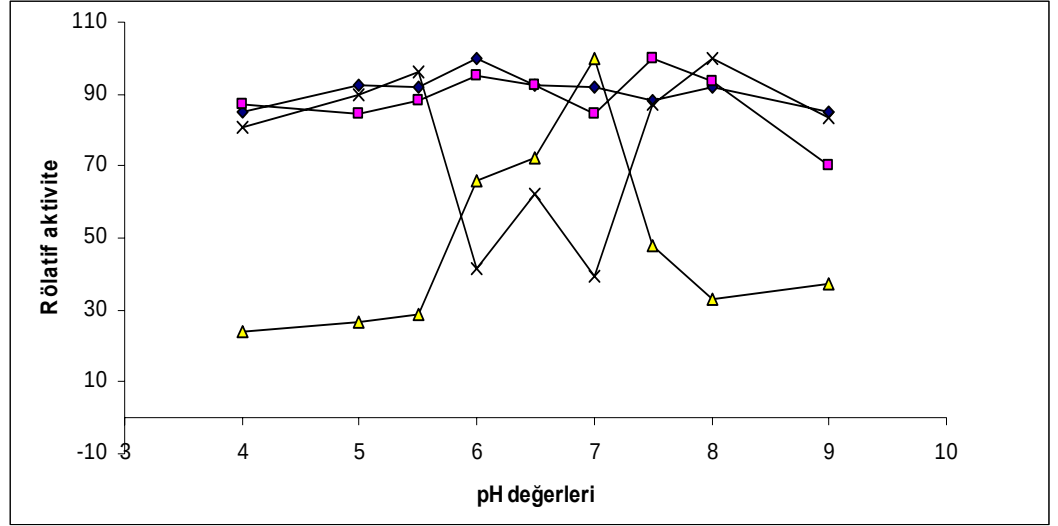
Şekil 3.3: Optimum sıcaklık değerleri (♦: serbest enzim; ■ NMKB; ▲ LMKB; X: AMKB).

Serbest enzim 40 °C, NMKB 45 °C, AMKB ve LMKB 55 °C optimum aktivite göstermektedir. Serbest enzim ve NMKB 25-50 °C arasında sahip oldukları rölatif aktiviteler arasındaki farkın en fazla ~%11 ve ~%18 iken LMKB ve AMKB için ~% 46 ve ~% 71 olması dikkat çekicidir. Bu durum kimyasal modifikasyonun aktivasyon enerjisini oldukça artırdığını göstermektedir. Aktivasyon enerjisindeki bu artış lizin ve asparagin yan guruplarının enzimin konformasyonunu etkilemesinden kaynaklanmış olabilir.

Tripathi *et al* (2007) yaptıkları çalışmada serbest α -amilaz ve amberlit MB 150 immobilize α -amilaz 65 °C de optimum gösterirken kitosan boncuklarına immobilize α -amilaz 75 °C de optimum göstermektedir. Kumar *et al* (2006) Termamyl® (120 L S) aljinat boncuklarında tutuklamışlardır. Bu çalışmada serbest enzim 54 °C de optimum gösterirken aljinat boncuklarına enkapsüle edilmiş enzim ise 60 °C optimum göstermiştir. İlk durumda optimum sıcaklıkta 10 °C’lık ve ikinci durumda 6 °C bir artış gerçekleşmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu değişim 15 °C’dır. Bu durum pratik uygulamalar için bize avantaj sağlamaktadır.

3.6.2 Optimum pH nın belirlenmesi

Bölüm 2.8.1’de anlatılan şekilde serbest ve immobilize enzimler için pH 4-9 aralığında aktivitesi izlenmiştir. Optimum pH değerleri şekil 3.5’de gösterilmektedir. Optimum pH değerleri serbest enzim için (6,0), NMKB için (7,5), LMKB için (7,0) ve AMKB için 8,0 dır.



Şekil 3.4: Optimum pH grafiği (◆: serbest enzim; ■ NMKB; ▲ LMKB; X: AMKB).

Optimum pH belirleme çalışmaları serbest ve immobilize enzimler için pH 4-9 arasında yapılmıştır. Serbest enzim, NMKB ve AMKB sahip oldukları gözetif aktiviteleri açısından optimum pH dan simetrik kaymalar göstermektedir. LMKB açısından durum oldukça farklıdır. LMKB optimum pH’dan uzaklaştıkça yüksek oranlarda kayma göstermektedir. AMKB boncuklarında ki durum ise pH 7 civarında minimum göstermesidir ve diğer üç durumdan farklıdır. AMKB deki dalgalanmanın sebebi olarak yalnızca asetat tamponundan fosfat tamponuna geçişle açıklanamaz çünkü aynı durum NMKB ve LMKB içinde geçerli olmasına rağmen böyle bir duruma rastlanmamıştır. Bu durum pH değişiminin AMKB de immobilize edilmiş α -amilazın konformasyonundaki etkin değişimlerle ilişkili olabilir.

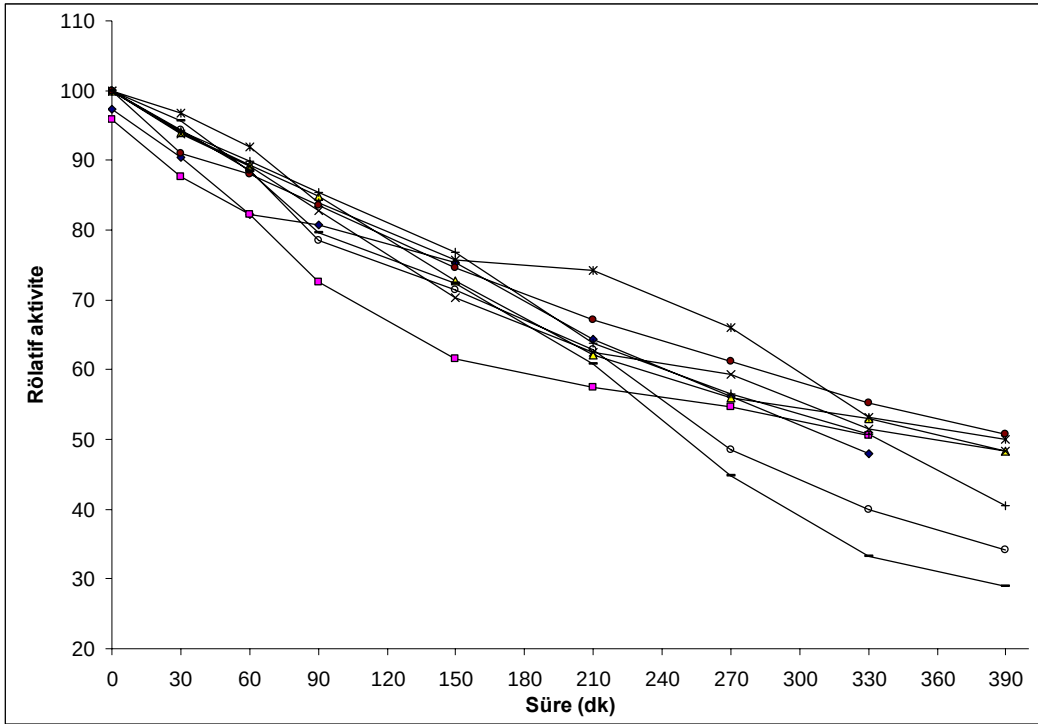
Tripathi *et al* (2007) yaptıkları çalışmada serbest α -amilaz için optimum pH değeri 5,6; amberlit MB 150 ve kitosan boncuklarına immobilize α -amilaz enzimi pH 7,0 da optimum göstermişlerdir. Kumar *et al* (2006) Termamyl® (120 L S) ile

yaptıkları çalışmada ise optimum pH 5,5 dan 6,0 a kaymıştır. Bizim çalışmamızda da aynı şekilde optimum pH bazik bölgeye kaymıştır. NMKB optimum pH'yı 6,0 dan 7,5'a; LMKB 7,0'a ve AMKB 8,0 kaydırmıştır.

3.7. Kararlılık Testleri

3.7. 1. pH kararlılığı

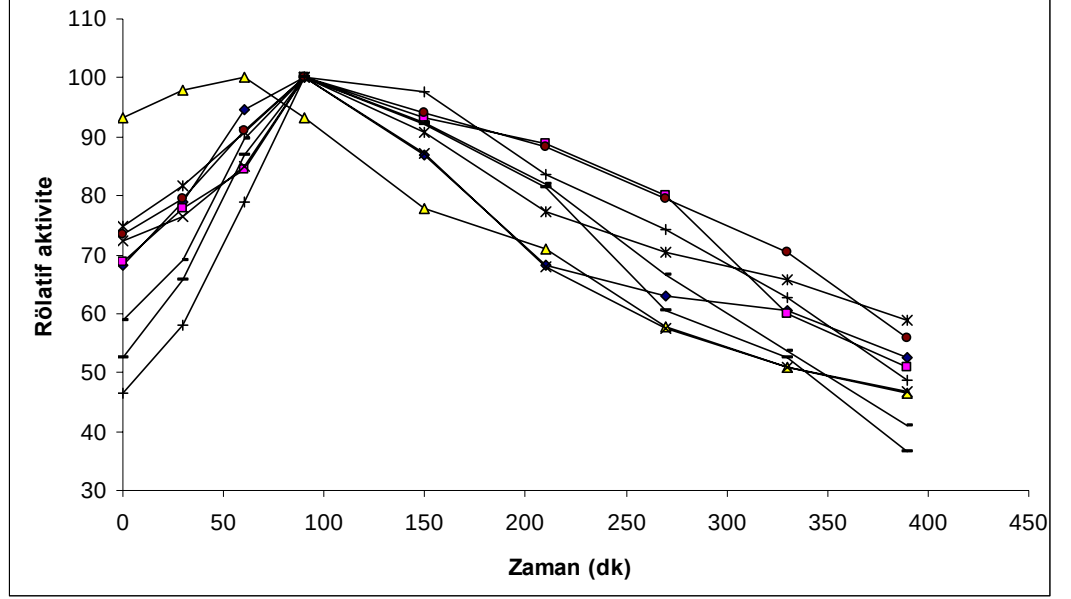
Enzimlerin pH kararlılıkları birçok değişkene (sıcaklık, inkübasyon süresi, tampon türü ve derişimi vb.) bağlıdır. pH kararlılığı bölüm 2.8.3.1 de anlatıldığı gibi pH 4-9 arasında gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim pH kararlılığı şekil 3.6a; NMKB pH kararlılığı 3.6b; LMKB pH kararlılığı 3.6c ve AMKB pH kararlılığı 3.6d'de gösterilmektedir.



Şekil 3.5a: Serbest enzim pH kararlılığı (♦ pH 4,0; ■ pH 5,0; ▲ pH 5,5; X pH 6,0; * pH 6,5; ◇ pH 7,0; + pH 7,5; ○ pH 8,0; - pH 9,0).

Serbest enzim için pH 5 ve 7 hariç tüm pH denemelerinde 390 dakikalık periyotta aktivite kaybı %50 den fazladır. Bilindiği gibi yüksek ve düşük pH değerlerinde aktivite kayıpları daha yüksektir. Burada da pH 4, 8 ve 9 da aktivite kaybı ~% 53, ~% 65 ve ~% 71 civarında gerçekleşmiştir. Serbest enzim optimum

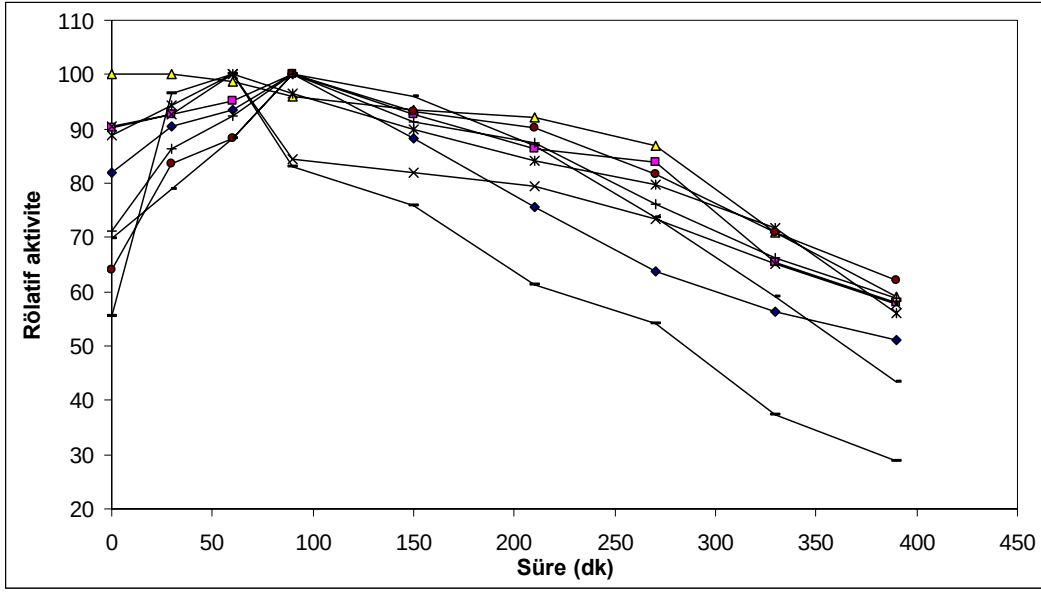
pH değerinde (pH 6,0 da) stabilite düşüktür ve aktivitesinin % 48'ini koruyabilmiştir.



Şekil 3.5b: NMKB'de immobilize edilen α -amilazın pH kararlılığı (♦ pH 4,0; ■ pH 5; ▲ pH 5,5; X pH 6,0; * pH 6,5; ◇ pH 7,0; + pH 7,5; ○ pH 8,0; - pH 9,0).

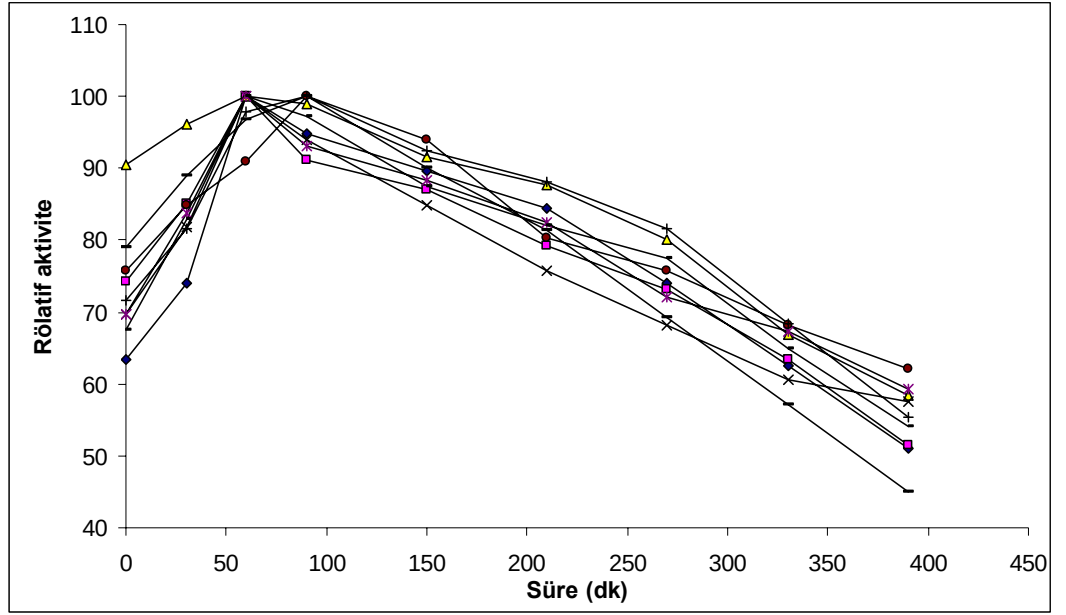
İmmobilize enzimler çevre koşullarına daha dayanıklıdır. Burada da NMKB serbest enzime nazaran genel itibariyle daha yüksek kararlılık göstermektedir.

Bununla birlikte pH 8 ve 9 da aktivite kaybı serbest enzimdeki kayıp kadar olmasada %50'yi geçmiştir. NMKB pH 7,5 da optimum göstermesine rağmen pH kararlılığı açısından oldukça düşüktür ve aktivitesinin ~% 48 ini koruyabilmiştir. Bu değer serbest enzimin optimum pH'sında muhafaza ettiği aktivite değerine eşittir.



Şekil 3.5c: LMKB pH kararlılığı (♦ pH 4,0; ■ pH 5; ▲ pH 5,5; X pH 6,0; * pH 6,5; ◇ pH 7,0; + pH 7,5; ○ pH 8,0; - pH 9,0).

LMKB pH stabilitesi açısından genel olarak serbest enzim ve NMKB göre daha iyi olsada pH 8 ve 9 da aktivitesinin %50 sinden fazlasını kaybetmiştir. Modifikasyon genel olarak pH stabilitesini pozitif yönde etkilemiştir. LMKB optimum pH değerinde (pH 7 de) aktivitesinin ~%62 sini korumuştur. Bu değer serbest enzim ve NMKB'nin optimum pH değerlerinde muhafaza ettiği aktivitesine nazaran daha yüksektir. Bu durum kimyasal modifikasyonun pozitif etkisini göstermesi açısından önemlidir.



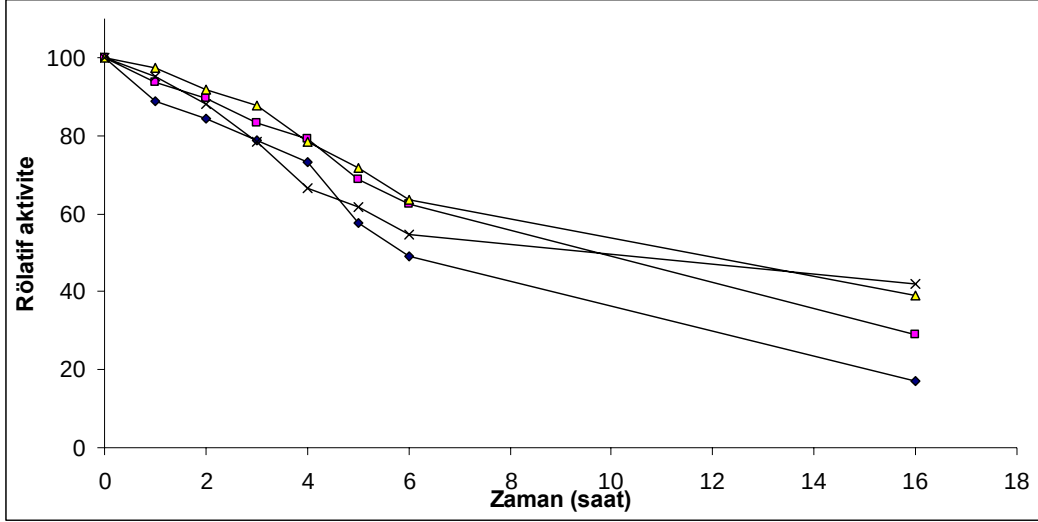
Şekil 3.5d: AMKB pH kararlılığı (◆ pH 4,0; ■ pH 5; ▲ pH 5,5; X pH 6,0; * pH 6,5; ◇ pH 7,0; + pH 7,5; ○ pH 8,0; - pH 9,0).

AMKB pH stabilitesi diğer üç duruma nazaran daha yüksektir. Burada da pH 9 da 390 lık süre sonunda aktivite kaybı %50 yi geçmiştir. Optimum pH değeri 8,0 olmasına rağmen aktivite korunumu ~% 55 dir. Diğer durumlarda ise bu değere ulaşamamıştır.

İmmobilize enzimler serbest enzimden farklı olarak pH stabilitesi 90.dk ya kadar değerlendirilememiştir. Bu durumun sebebi rölatif aktivitelerde artış olmasıdır. Bununla birlikte pH 5,5 değerinde 90.dk ya kadar ya artış olmamış ya da çok az bir artış olmuştur. Bu durumun sebebi olarak kitosan boncuklarının pH 5,5’da saklanmaları gösterilebilir. Dikkat edildiğinde maksimum aktiviteye pH 5,5 civarında daha kısa sürede ulaşılabilmekte ya da maksimum rölatif aktiviteye ulaşıncaya kadar yüksek sıçramalar gerçekleşmemekte. Oysa pH 5,5’den uzaklaştıkça maksimum rölatif aktiviteye ulaşma süresi artmakta ve ya sıçramalar yüksek olmaktadır. Serbest enzim için bu durumun olmaması immobilizasyonun bu durum üzerine bir etkisinin olabileceği fikrini uyandırmaktadır.

3.7.2 Termal kararlılık

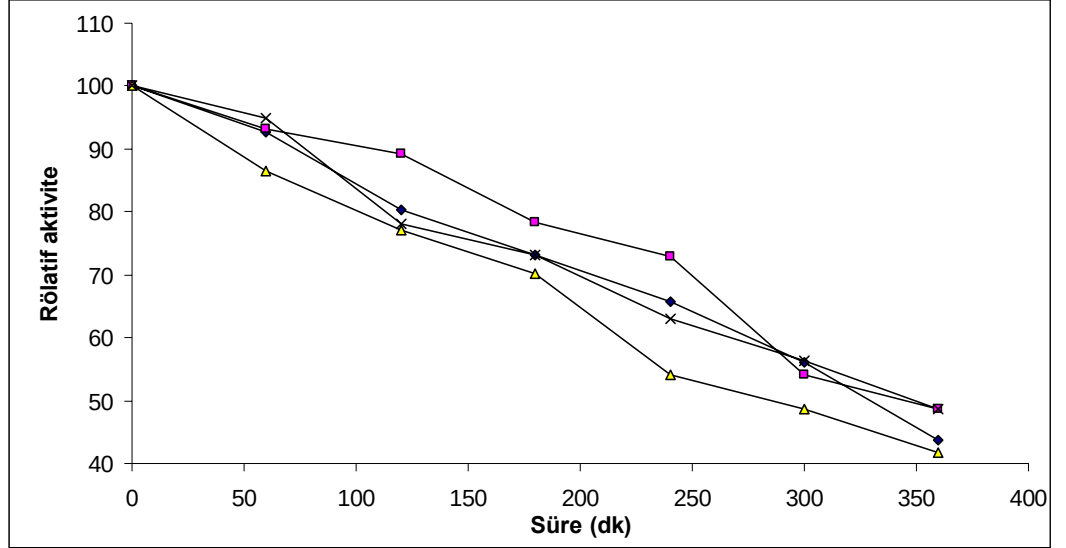
Termal kararlılık immobilize enzimlerin üstünlüğünü belirleyen önemli parametrelerden birisidir. Şekil 3.7a'da 25 °C için ve şekil 3.7b'de 50 °C için serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılıkları gösterilmektedir.



Şekil 3.6a: 25 °C için termal kararlılık (◆ NMKB, ■ LMKB, ▲ serbest enzim ve X AMKB).

Reaksiyonlar pH 7,0 100 mM fosfat tamponu ve 1mg/mL nişasta derişiminde gerçekleştirilmiştir.

Serbest enzim ve immobilize enzimler 25 °C de kararlılıkları yüksektir. 6 saatlik süre içerisinde NMKB AMKB ye göre daha kararlıdır fakat 16.saatte yapılan ölçümlerde bu durumun tersini görmekteyiz. Grafiğe geçirilmeyen ve 16. saatte yapılan ölçümlerde rölatif aktiviteler serbest enzim için 17, NMKB için 26, LMKB için 39 ve AMKB için 42'dir. AMKB aktivitesini ilk durumda hızla kaybedip 6.saatten sonra bu düşüş azalma göstermiştir.

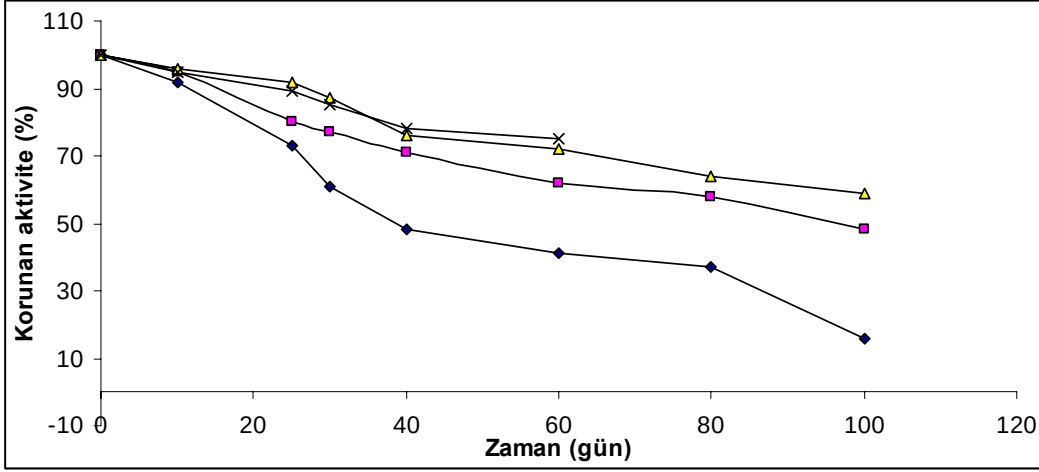


Şekil 3.6b: 50 °C için termal kararlılık (◆ NMKB, ■ LMKB, ▲ serbest enzim ve X AMKB). Reaksiyonlar pH 7,0 100 mM fosfat tamponu ve 1mg/mL nişasta derişiminde gerçekleştirilmiştir.

Termal kararlılığının 25 °C'ın ardından 50 °C de denenmesinin nedeni reaktör aşamasında sıcaklığın 50 °C seçilecek olmasıdır. Serbest ve immobilize enzimler 6 saatlik inkübasyonun ardından aktivitelerinin %50 den fazlasını kaybetmişlerdir. Beklenildiği gibi aktivite kaybı en çok serbest enzimde meydana gelmiştir. İmmobilize enzimler içinde ise AMKB en az NMKB ise en fazla aktivite kaybı yaşamıştır. Aktivite kayıpları arasında çok yüksek farklar olmasa da kimyasal modifikasyonun olumlu bir etkisinin olduğu görülmektedir.

3.7.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Bu nedenle depo kararlılığı immobilize enzimlerin uzun süre saklanabilirliklerini gösteren önemli bir parametredir. Bu amaçla 100 günlük süre ile serbest enzim, NMKB ve LMKB ve 60 gün süre ile AMKB'nin depo kararlılığı belirli sürelerde bölüm 2.8.3.3 de anlatılan şekilde aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Şekil 3.8 de serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılığı gösterilmektedir. 60 günlük depo kararlılığı açısından bakıldığında serbest enzim % 41, NMKB % 62, LMKB % 72 ve AMKB ise % 74 oranında aktivitesini korumuşlardır. 100 günlük sürede ise serbest enzim % 16, NMKB % 48 ve LMKB % 59 oranında aktivitesini korumuştur.



Şekil 3.7: Serbest enzim ve immobilize enzimlerin depo kararlılığı (♦ serbest enzim, ■ NMKB, ▲ LMKB ve X AMKB).

Tripathi *et al* (2007) 100 günlük depolamanın ardından immobilize α -amilazın aktivitesinin % 45 ini koruduğunu hesaplamışlardır. Kahraman ve arkadaşlarını (2007) domuz pankreas α -amilazını cam boncuklar üzerine immobilize etmişlerdir ve 25 günlük depo sonunda aktivitenin % 80'ini koruduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 25 günlük depolanın ardından NMKB % 80, LMKB % 92 ve AMKB ise % 89 oranında aktivitesini muhafaza etmişlerdir. Değerlerimizi bu çalışmalarla kıyasladığımızda her üç immobilize enziminde depo kararlılığının daha yüksek olduğu görülmektedir.

3.7.4 Operasyonel kararlılık

Operasyonel kararlılık enzimin iş yapma süresince aktivitesindeki değişmeyi gösteren önemli bir parametredir. Enzim aktivitesinin yarısının yitirilmesi için geçen zaman olarak tanımlanır ve aşağıdaki eşitlikle hesaplanır;

$$t_{1/2} = 0,693/k_D, \quad k_D = \ln(A_0/A)/t$$

Burada t: operasyon süresini, k_D : bozunma sabitini, A_0 ve A ise sırası ile başlangıç ve t anındaki enzimatik aktiviteyi göstermektedir.

Serbest ve immobilize enzimin operasyonel kararlılıkları bölüm 2.8.3.4 de anlatıldığı gibi bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimlerin operasyonel kararlılıkları tablo 3.8 de görülmektedir.

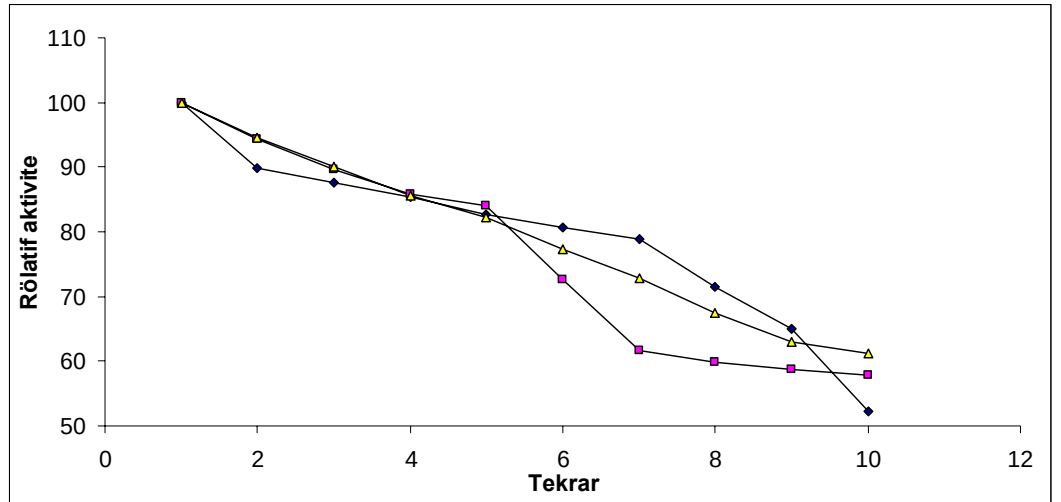
Tablo 3.3: Serbest enzim ve immobilize enzimlerin operasyonel kararlılıklar.

Serbest enzim	NMKB	LMKB	AMKB
102,22 dk	458,69dk	464,83 dk	710,33dk

İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılıkları genel itibariyle serbest enzimlerden yüksektir. Burada da immobilize enzimlerin serbest enzime nazaran operasyonel kararlılıklarının çok yüksek olduğu görülmektedir. AMKB nın LMKB ve NMKB ye nazaran 1,5 katından daha yüksek bir operasyonel kararlılık göstermektedir. Bu durum AMKB nin 25 °C ve pH 7,0 koşullarında NMKB ve LMKB ye göre daha düşük başlangıç aktivitesi göstermesine rağmen uzun süreli operasyonlar için daha kullanışlı olduğunu göstermektedir.

3.8 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik enzim immobilizasyonunun amaçlarından birisidir. Uzun kullanımlar sonrasında yüksek aktivite korunumu immobilizasyonun çekiciliğini artırır. Şekil 3.9 da immobilize enzimlerin tekrarlanabilirliklerini gösteren grafik görülmektedir.



Şekil 3.8: İmmobilize enzimler için tekrarlanabilirlik grafiği. Tekrarlanabilirlik 25 °C de 0,5 mg/mL nişasta-fosfat tamponu (pH 7,0 (100mM)) da gerçekleştirilmiştir (◆ NMKB, ▲ AMKB ve ■ LMKB).

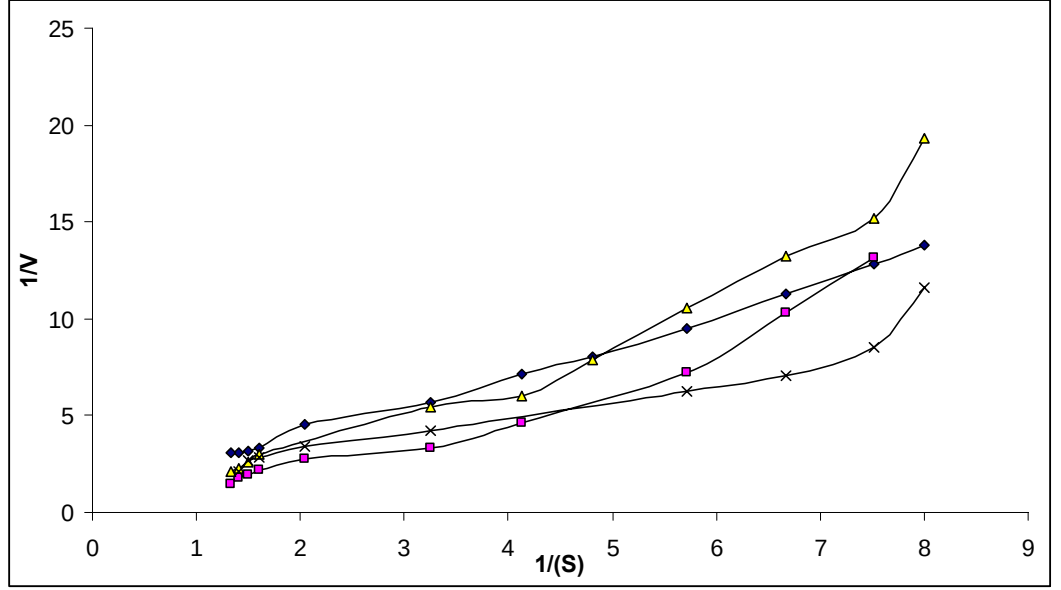
10 tekrar sonrasında immobilize enzimlerin aktivitelerini korumalarını NMKB için % 52,3; LMKB için % 57,9 ve AMKB için % 61,2'dir. Kimyasal modifikasyon ile tekrarlanabilirlik artmıştır.

Kumar *et al* (2006) Termamyl® (120 L S) immobilizasyonunda 6 kullanım sonunda % 70'lik aktivite korunumu olmuştur. Tripathi *et al* (2007) yaptıkları çalışmada 10 kullanım sonrasında aktivite korunumu % 27'dir. Bu çalışmada ise 6 kullanım sonrasında korunan aktivite değerleri görece olarak Kumar *et al* (2006) elde ettiği sonuçlardan daha yüksektir. On kullanım sonrasında korunan aktivite miktarı da aynı şekilde Tripathi *et al* (2007) elde ettiği sonuçlardan daha yüksektir.

3.9 Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Kinetik parametreler enzimin substrata olan ilgisini gösteren en önemli parametredir. Immobilizasyon ile enzimlerin kinetik parametrelerinde değişimler meydana gelir. Bu durum temelde mikro çevrenin ve difüzyon koşullarının değişmesiyle alakalıdır.

Bölüm 2.8.4 anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen reaksiyonlarla serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri şekil 3.10'daki Lineweaver-Burk grafiği oluşturularak belirlenmiştir ve tablo 3.2 de gösterilmiştir. Tablo 3.2 de görüldüğü gibi immobilizasyon ile K_m değerleri artmıştır. V_{mks} değerlerine bakıldığında LMKB serbest enzime nazaran daha düşük değere sahip iken NMKB ve AMKB 2 katından daha yüksek değere sahiptirler.



Şekil 3.9: Serbest ve immobilize enzimlere ilişkin Lineweaver-Burk grafiği. Denemeler 25 °C pH 7,0 (100 mM) fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir (♦ serbest enzim, ■ NMKB, ▲ LMKB ve X AMKB).

Tablo 3.4: Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri.

	Serbest enzim	NMKB	LMKB	AMKB
K_m (mg/mL)	0,702	1,814	0,802	2,355
V_{mks} (U/mg)	0,479	1,112	0,384	1,709

K_m değerinin düşük olması enzimin substrata yüksek afinitesi olduğunu göstermektedir. LMKB, serbest enzime en yakın K_m değerine sahiptir. LMKB, NMKB ve LMKB ye göre daha düşük K_m değerine sahip iken V_{mks} değeri daha düşüktür. AMKB ise K_m değeri yüksek olmasına rağmen V_{mks} değeri de yüksektir. AMKB nin 25 °C de yüksek bir K_m değerine sahip olması bu sıcaklıkta düşük rölatif aktivite göstermesinden dolayı olabilir; optimum sıcaklıkta bir çalışma yapılsaydı daha iyi sonuçlar elde edilebilirdi.

Tripathi *et al* (2007) yaptıkları çalışmada serbest α -amilazın K_m değeri 1,66 mg/mL iken immobilize α -amilazın K_m değeri 3 kattan fazla artarak 5 mg/mL ye çıkmıştır; V_{mks} değeri ise 1,63 U/mg den iki kat azalış ile 0,83 U/mg a düşmüştür. Reshmi *et al* (2007) *Bacillus subtilis* α -amilazını zirkonyuma

immobilize etmişlerdir ve K_m değeri immobilizasyon değeri 2,8 ve 3,8 kat artmıştır. Bizim çalışmamızda ise serbest enzimin K_m değeri immobilizasyon ile genel olarak artış göstermekle birlikte LMKB serbest enzime benzer bir değere sahiptir. V_{mks} değeri ise LMKB de serbest enzime nazaran düşüş vardır fakat NMKB ve AMKB de V_{mks} değeri sırasıyla 3 ve 4 kat artmıştır.

4 SONUÇ

Nötralizasyon metodu ile kitosan boncukları hazırlandıktan sonra lizin ve asparagin aminoasitleriyle kimyasal olarak modifiye edildi. Kimyasal modifikasyonun enzimin immobilizasyonuna etkisi modifiye edilmemiş ve asparagin ve lizin ile modifiye edilmiş boncuklarda α -amilaz enziminin immobilizasyonu ile izlenmiştir.

Kitosan boncuklarına eş koşullarda yapılan immobilizasyonlar ile bağlanan protein (Termamyl®) miktarları ve geri kazanılan aktivite yüzdeleri tablo 3.2 a ve tablo 3.2 b de gösterildiği gibi modifikasyonla beraber artış göstermiştir. NMKB ile yapılan immobilizasyonla % 51,2 lik protein bağlanması gerçekleşirken, LMKB ile % 75,7 ve AMKB ile % 60,3 tür. Kimyasal modifikasyonun boncuk yüzeyinde sterik etkiyi azalttığı ve bu nedenle bağlanma oranını artırdığı düşünülebilir. Bu duruma destek olarak daha uzun molekül yapısına sahip olan lizin ile modifiye edilmiş kitosan boncuklarının asparaginle modifiye edilmiş kitosan boncuklarına nazaran daha yüksek protein bağlandığı söylenebilir. Geri kazanılan aktivitelerde ise AMKB daha yüksek verimle bağlanmıştır. Bu durum *B.licheniformis* α -amilazlarının aktivitesinin yük-yük etkileşimlerinden etkilenmesiyle açıklanabilir.

Optimum sıcaklık ve pH değerlendirildiğinde serbest enzim ve immobilize enzimler arasında belirgin farklılıklar olduğu görülmektedir. Şekil 3.5 de görüldüğü gibi optimum pH serbest enzim için pH 6,0 iken NMKB için 7,5 , LMKB için 7,0 ve AMKB için 8,0'dır. Immobilizasyon ile optimum pH asidik bölgeden bazik bölgeye kaymıştır. Normalde polikasyonik yüzeylere yapılan immobilizasyon ile optimum pH da düşmeler meydana gelmesi beklenirken burada optimum pH da artış görülmüştür. LMKB'nin rölatif aktiviteleri incelendiğinde pH 7,0 de maksimum gösterilirken diğer pH değerlerinde rölatif aktivite çoğunlukla 50'nin altındadır. Termamyl® optimum sıcaklık değerleri immobilizasyon ile artış göstermiştir. NMKB optimum sıcaklığı 40 °C den 45 °C ye yükseltirken, LMKB ve AMKB optimum sıcaklığı 55°C ye yükseltmişlerdir. Optimum sıcaklıktaki bu yükseliş enzimin yüksek sıcaklıklarda daha etkin kullanımı açısından önemlidir.

Termal kararlılık 25 ve 50 °C için yapılmıştır. Şekil 3.8 den görüldüğü gibi her iki sıcaklık değeri için 6 saatlik periyotta termal kararlılık üzerine kimyasal modifikasyonun pozitif etkisi (%5-10) görülmektedir. Grafiğe geçirilmeyen ve 25 °C için 16. saatte yapılan ölçümlerde ise rölatif aktiviteler serbest enzim için 17, NMKB için 26, LMKB için 39 ve AMKB için 42'dir. Kimyasal modifikasyonun pozitif etkisi uzun süreli uygulamalarda kendini göstermektedir.

pH kararlılıkları serbest enzim için şekil 3.9, NMKB için şekil 3.9, LMKB için şekil 3.9 ve AMKB için şekil 3.9 da ki gibidir. 390 dakikalık süre için yapılan pH kararlılığı denemelerinde kimyasal modifikasyonun stabilite üzerine pozitif etkisi düşüğe olsa görülmektedir. pH kararlılığı uygulamalarında ise dikkat çekici bir durum olarak immobilizasyon ile enzimin pH değişimlerinde maksimum aktivitelerini gösterebilmeleri için belirli bir süreye ihtiyaç duymalarıdır.

Operasyonel kararlılık, enzimin operasyon esnasındaki yarı ömrünü göstermektedir. Yüksek operasyonel kararlılık enzimlerin ticari uygulamalarında önemlidir. Serbest enzimin operasyonel kararlılığı 102,22 dk iken NMKB 458,69 dk, LMKB 464,84 dk ve AMKB ise 710,34 dk dır. Operasyonel kararlılığın artmasında hem immobilizasyon hem de kimyasal modifikasyon etkindir. AMKB operasyonel kararlılık yönünden en yüksek değeri göstermektedir. Bu durum ticari uygulamalarda yüksek verimliliğin eldesini sağlar.

Depo kararlılığı +4 °C saklanan serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerindeki düşüşün 40 süreyle izlenmesiyle gözlemlenmiştir. Kimyasal modifikasyonun pozitif etkisi LMKB ve AMKB'nın NMKB ile kıyaslanmasıyla görülmektedir. AMKB %78, LMKB %76 aktivitelerini korurken NMKB ise aktivitesini %71 koruyabilmiştir. Immobilize enzimlerin uzun süre saklanabilmesi ticari anlamda fayda sağlayacağından kimyasal modifikasyon depo kararlılığının artırılması için önemli gözükmemektedir.

Kinetik parametreler enzimin substrata olan ilgisini bize göstermeleri açısından önemlidir. Immobilizasyon ile mikroçevrenin değişmesi, sterik etkilerin oluşması, iç ve dış difüzyon etkileri ve enzimin konformasyonundaki değişimler enzimin substrata olan ilgisini değiştirmektedir. Immobilizasyon ile birlikte K_m ve

V_{mks} değerlerinde bir artış oluşabilir (Telefoncu, 1997). Tablo 3.2 den görüldüğü gibi serbest enzimin K_m değeri (0,702 mg/mL) her üç immobilize enzimin K_m değerlerinden küçüktür. LMKB ait K_m değeri (0,802mg/mL) serbest enzimin K_m değerinden ~%14 daha büyük iken NMKB'nin K_m değerinden (1,814) ~%61 daha düşüktür. AMKB'nin K_m değerinin oldukça yüksek olması çalışma koşullarındaki AMKB aktivitesinin çok düşük olmasından kaynaklanmaktadır. AMKB için daha uygun şartlar sağlandığında K_m değerinin daha düşük olması muhtemeldir. V_{mks} değerleri dikkate alındığında tablo 3.2'den serbest enzimin V_{mks} değerinin (0,479 U/mg), LMKB'nin V_{mks} değerinden (0,384) daha büyük olduğu görülmektedir. V_{mks} değerleri içerisinde AMKB 1,709 U/mg'lık değer ile en yüksek değere sahiptir.

Genel bir değerlendirme yapıldığında bu çalışmada kimyasal modifikasyonun amaçlanan doğrultuda pozitif etkiler oluşturduğu görülmektedir. İmmobilizasyon ile protein bağlanmasında ve immobilize enzimin karakterinde bu etki belirgin olarak ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aksoy, S., Tunturk, H., Hasirci, N.,** 1998, Stability of α -amylase immobilized on poly(methylmethacrylate-acrylic acid) microspheres, *Journal of Biotechnology* 60: 41-45
- Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.,** 1999, Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 65, no: 10: p 4637.
- Bradley, D.,** “Microbial nanotechnologists”, <http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=22017&type=Feature&chId=7&page=1> (Erişim tarihi: 03 Ocak 2009).
- Declerck, N., Machius, M., Chambert, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C.,** 1997, Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: thermodynamic studies and structural interpretation, *Protein Engineering* vol.10 no.5: p 541–542.
- Goosen, F.A.,**1997, Applications of Chitin and Chitosan, CRC Pres LLC, Florida, 336p.
- Guisan, J. M., Alvaro, G., Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Garcia, J.L. and Tagliani, A.,** 1993, Stabilisation of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilisation: PGA from *K. Citrophila*, *Biotechnol. Bioeng*, 42: p 455-464.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, P., Goswami, V.K., Chauhan B.,** 2003, Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry* 38: p1599-1611.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M.,** 2008, Purification and biochemical characterization of a novel α amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*, *Process Biochemistry*: p 43: 507
- James, L., Alexey H.,** 2002, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, , 163-181p, Drauz, K. and Waltman, H. (Eds), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1559p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan, N., Güngör, A.,** 2007, a-Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment, *Food Chemistry* 104: 1391
- Karlheinz, D., Herbert, W.,** 2002, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, p 196-266-165, Drauz, K. and Waltman, H. (Eds), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1559p.
- Khor, E.,**2001, *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*, Elsevier Science & Technology, Singapur, 148p.
- Krajewska, B.,**2004, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations, *Enzyme and Microbial Technology* 35: p 126–139.
- Kumar, R.S.S., Vishwanath, K.S., Singh, S.S., Rao, A.G.A.,** 2006, Entrapment of a-amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization, *Process Biochemistry* 41: 2284-2286
- Liese, A., Seelbach, K. , Wandrey, C.,** 2000, *Industrial Biotrans-formations*, Wiley-VCH, Weinheim, 556p.
- Lu, T.,** 2009, Seeking new mutation clues from *Bacillus licheniformis* amylase by molecular dynamics simulations, *Chemical Physics Letters* 477: p 202.
- Maarel, M.J.C., Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L.,** 2002, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology* 94: p 142–143.
- Mai, T.Q. “*Bacillus licheniformis*”,
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis (Erişim tarihi: 07 Temmuz 2007)
- Miretzky, P., Cirelli, A.F.,** 2009, Hg(II) removal from water by chitosan and chitosan derivatives, *Journal of Hazardous Materials* : p 167: 12.
- Mourya, V.K., Inamdar N.N.,** 2008, Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *Reactive & Functional Polymers* 68: p 1017–1039.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muralikshna, G., Nirmala, M.,** 2005, Cereal α -amylases, *Carbohydrate Polymers* vol 60: p 164
- Nazmi, A.R., Reinisch, T., Hinz, H.J.,** 2006, Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA), *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol 453: p18–19
- Noda, T., Furuta, S., Suda, I.,** 2001, Sweet potato β -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose, *Carbohydrate Polymers* vol 44: p 189-190.
- Pavia, A. L., Balcao, V. M., Malcata, F. X.,** 2000, *Enzymol. Microb. Technol.*, vol27: p 187-204.
- Prashanth, K.V.H., and Tharanathan, R.N.,** Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan, *Trends in Food Science & Technology* 18: p 119.
- Raafat, D., Barga, K., Haas, A., Sahl, H.G.,** 2008, Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol:74, no:12: p 3764.
- Rinaudo, M.,** 2006, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31: p 604–622.
- Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kampfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.,** 1999, Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 65, no: 10: p 4637.
- Sashiwa, H., Aiba, S.I.,** 2004, Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 29: p 887–894.
- Telefoncu, A.,** 1997, Enzimoloji, İzmir, s 446.
- Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P., Kayastha, A.M.,** 2007, Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 49 : 71-73

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yi, S.S., Noh, J.M., Lee, S.Y.**, 2009, Amino acid modified chitosan beads: Improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57: 126

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi/yeri: 1985/Trabzon

Lisans: 2002-2007 Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü

Y.lisans: 2008-2010 Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ABD

Yayınlar:

2008, Idris YAZGAN, Tuba AYDIN, Dilek ODACI, SunaTİMUR: *Use of pyranose oxidase enzyme in inhibitor biosensing*, Analytical Letters 41, 2088–2096