



**T. C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PEKTİNAZIN KİTOSAN-BORİK ASİT MATERYALİ ÜZERİNDE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NÜBAR ABBASZADA
(20229247011)**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap ÇETİNKAYA
İkinci Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Osman ÇAYLAK**

**SIVAS
AĞUSTOS 2025**



**T. C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PEKTİNAZIN KİTOSAN-BORİK ASİT MATERYALİ ÜZERİNDE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NÜBAR ABBASZADA

(20229247011)

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap ÇETİNKAYA
İkinci Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Osman ÇAYLAK**

**SİVAS
AĞUSTOS 2025**

Nübar ABBASZADA' nın hazırladığı ve **“PEKTİNAZIN KİTOSAN-BORİK ASİT MATERYALİ ÜZERİNDE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU”** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı **Doç. Dr. Serap ÇETİNKAYA**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Kubilay İNCİ**
Düzce Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nail ALTUNAY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

*Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-2023-698** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Nubar ABBASZADA, 2025

Çalışma süreci boyunca bana destek olan danışmanıma, canım aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim...



ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

05.08.2025

Nübar ABBASZADA

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, anlayışla destekleyen, öneri ve görüşleriyle çalışmamın ilerlemesine büyük katkı sağlayan; deneysel çalışmalar ve tez yazım sürecinde birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, iki yıl boyunca engin bilgilerini bizlerle paylaşan ve kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı değeri asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Serap ÇETİNKAYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her daim desteğini hissettiğim, bilgi ve tecrübeleriyle sürece katkı sağlayan değerli ikinci danışmanım Doç. Dr. Osman ÇAYLAK'a, tez sürecinde bilgisiyle ve dostluğuyla yanımda olan, özellikle uygulama ve metot aşamalarında sonuçların yorumlanmasında büyük desteklerini gördüğüm arkadaşlarım Safa ÇELİK ve Aysun AKSU'ya, tezimin yazım aşamasında beni her yönüyle destekleyen, motivasyonumu artıran ve stresimi paylaşarak yanımda olan değerli arkadaşım Bilge Nur YERSEL'e sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

PEKTİNAZIN KİTOSAN-BORİK ASİT MATERYALİ ÜZERİNDE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

NÜBAR ABBASZADA

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serap ÇETİNKAYA

2025, 55 + xv sayfa

Enzimler, çok çeşitli reaksiyonları katalize eden biyokatalizörlerdir. Enzim immobilizasyonu, bir enzimin katalitik aktivitesini korurken immobilize edilerek bir desteğe bağlandığı bir tekniktir. Bu çalışmada, *Aspergillus niger* pektinaz enzimi kitosan borik asit boncukları üzerine immobilize edilmiştir. Kompozit yüzey, immobilizasyon öncesi ve sonrası Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Moleküler yapıdaki bağlar Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada, pH, sıcaklık, kinetik hesaplamalar, tekrar kullanılabilirlik, immobilizasyon süresi, enzim konsantrasyonu, depolama ve teorik hesaplamalar gibi parametreler incelenmiştir. Sıcaklık (37°C) ve pH (pH: 5) değerleri immobilizasyondan sonra değişmemiştir. İmmobilize edilmiş pektinazın 20 gün boyunca aktivitesinin %65'ini koruduğu belirlenmiştir. İmmobilize edilmiş enzim 6 kullanımdan sonra hala yaklaşık %100 aktivitesini korumuştur.

Anahtar kelimeler: Kitosan, borik asit, enzim immobilizasyonu, pektinaz, *Aspergillus niger*

ABSTRACT

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF PECTINASE ON CHITOSAN-BORIC ACID MATERIAL

NÜBAR ABBASZADA

Master of Science Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Doç. Dr. Serap ÇETİNKAYA

2025, 55 + xv, page

Enzymes are biocatalysts that catalyze a wide variety of reactions. Enzyme immobilization is a technique in which an enzyme is immobilized and bound to a support while retaining its catalytic activity. In this study, *Aspergillus niger* pectinase enzyme was immobilized on chitosan boric acid beads. The composite surface was characterized by Scanning Electron Microscope (SEM) before and after immobilization. The bonds in the molecular structure were determined using Fourier Transform Infrared (FT-IR). In the study, parameters such as pH, temperature, kinetic calculations, reusability, immobilization time, enzyme concentration, storage and theoretical calculations were studied. The temperature (37°C) and pH (pH: 5) values did not change after immobilization. It was determined that immobilized pectinase retained 65% of its activity for 20 days. The immobilized enzyme still maintained nearly 100% activity after 6 uses.

Key Words: Chitosan, boric acid, enzyme immobilization, pectinase, *Aspergillus niger*

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimler	2
1.2 Pektinazlar.....	4
1.2.1 Pektinaz kaynakları	7
1.2.2 Pektinaz kullanım Alanları	8
1.2.2.1 Kahve, kakao ve çay fermantasyonu	8
1.2.2.2 Tekstil endüstrisi.....	9
1.2.2.3 Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi.....	10
1.2.2.4 Yağ çıkarma	11
1.2.2.5 Meyve ve sebze işleme	11
1.2.2.6 Şarap endüstrisi	12
1.2.2.7 Hayvan yemi üretimi	12
1.3 Enzim immobilizasyonu.....	13

1.3.1 İmmobilizasyon yöntemleri.....	14
1.3.1.1 Adsorpsiyon.....	15
1.3.1.2 Kovalent bağlama.....	15
1.3.1.3 İyonik bağlama	16
1.3.1.4 Tutuklanma	17
1.3.1.5 Kapsülleme	17
1.3.1.6 Çapraz bağlama	18
1.3.1.7 Afinite immobilizasyonu	18
1.4 İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Materyalleri	19
1.4.1 İnorganik destek malzemeleri.....	19
1.4.1.1 Seramik.....	19
1.4.1.2 Silika.....	19
1.4.1.3 Borik asit	20
1.4.1.4 Aktif karbon ve cam	21
1.4.2 Organik/doğal destek materyalleri.....	21
1.4.2.1 Kitin ve kitosan.....	22
1.4.2.2 Aljinat	23
1.4.2.3. Jelatin ve kollajen	24
1.4.2.4 Selüloz	24
1.4.2.5 Agaroza.....	25
1.4.2.6 Karagenan.....	25
2. MATERYAL-METOT	26

2.1 Kimyasallar ve Çözeltiler.....	26
2.2 Kitosan-borik asit boncuklarının sentezi.....	26
2.3 Kitosan-borik asit kompozitinde enzim immobilizasyonu	26
2.4 Kitosan-borik asit boncuklarının ve hareketsizleştirilmiş kitosan-borik asit boncuklarının yapısal analizi.....	27
2.4.1 SEM ve FT-IR analizi	27
2.5 Pektinaz deneyleri	27
2.5.1 Protein içeriği ve pektinaz aktivite deneyleri	27
2.5.2 Enzim aktivitesinin belirlenmesi	27
2.6 Optimum pH ve sıcaklık parametrelerinin belirlenmesi	28
2.7 Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	28
2.8 Yeniden kullanılabilirlik analizi	28
2.9 İmmobilizasyon süresi çalışmaları	28
2.10 Depolama kararlılığı.....	28
3. BULGULAR.....	30
3.1 Kitosan-borik asit boncuklarının ve immobilize pektinazın boncuk yüzeyine karakterizasyonu	30
3.2 Protein Miktar Tayini	32
3.3 Enzim tahlili	32
3.4 pH etkisi	33
3.5 Sıcaklığın Etkisi	34
3.6 Kinetik faktörleri	35

3.7 Tekrar kullanılabilirlik.....	37
3.8 Enzim konsantrasyonunun ve immobilizasyon süresinin etkisi.....	38
3.9 Depolama	39
4.TARTIŞMA	41
KAYNAKÇA	45
EKLER	53
EK-1 Materyaller	53
EK-2 Kimyasallar.....	54
EK-3 Çözeltiler	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Pektinaz enzimlerinin etkilerine göre sınıflandırılması.....	6
Şekil 1.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	14
Şekil 1.3 Borik asit yapısı.....	20
Şekil 1.4 Kitin ve kitosan yapısı.....	22
Şekil 2.1 Kitosan-borik asit boncuklarına enzim immobilizasyonu.....	26
Şekil 3.1 Farklı büyütme ölçeklerinde SEM analizi	31
Şekil 3.2 FT-IR.....	31
Şekil 3.3 Bradford standart protein eğrisi	32
Şekil 3.4 D-(+)-galakturonik asit standart eğri grafiği	33
Şekil 3.5 Serbest ve immobilize pektinazın optimum Ph.....	34
Şekil 3.6 Sıcaklığın hidrolitik aktiviteye etkisi.....	35
Şekil 3.7 Serbest ve immobilize pektinazın Lineweaver Burk eğrisi.....	36
Şekil 3.8 Kitosan-borik asit boncukları üzerine immobilize edilmiş pektinazın yeniden kullanılabilirliği.....	37
Şekil 3.9 Enzim konsantrasyonunun etkisi.....	38
Şekil 3.10 İmmobilizasyon süresinin etkisi.....	39
Şekil 3.11 Depolama süresinin etkileri.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Enzim sınıfları, reaksiyon türleri ve karşılık gelen enzimler.....	3
Çizelge 3.2 Kinetik parametreleri.....	36



KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
DEAE	: Dietilaminoetil
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: Di-nitrosalisilik asit
EC	: Enzim Komisyonu
ECH	: Epiklorohidrin
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GRAS	: Genel Olarak Güvenli
GTA	: Glutaraldehit
H₃BO₃	: Borik Asit
HRP	: Yaban Turpu Peroksidazı
IU	: Enzim Aktivitesi
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
K_m	: Substrat Konsantrasyonu
NaTPP	: Sodyum Tripolifosfat
OD	: Optik Yoğunluk
PE	: Pektin Esteraz
PG	: Poligalakturonaz
PGA	: Poligalakturonik asit
PGL	: Poligalakturonat liyaz
PL	: Pektin Liyaz
PMG	: Polimetilgalakturonaz
PMGL	: Polimetilgalakturonat liyaz
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TPP	: Tripolifosfat
V_{max}	: Maximum Reaksiyon Hızı

1. GİRİŞ

Yaşam, iyi organize edilmiş bir dizi kimyasal reaksiyona bağlıdır. Ancak bu reaksiyonların çoğu, kendi başına yaşamı sürdürmek için çok yavaş ilerler. Bu nedenle doğa, bu kimyasal reaksiyonları büyük ölçüde hızlandıracak, enzim olarak adlandırdığımız katalizörleri tasarlamıştır. Enzimlerin katalitik gücü, virüslerden insana kadar esasen tüm yaşam formlarındaki yaşam süreçlerini kolaylaştırır. Pek çok enzim, canlı organizmadan çıkarıldıktan sonra katalitik potansiyelini korur. Bununla birlikte yirminci yüzyılın başlarında gerçekleştirilen biyokataliz tepkimeleri ile enzimler birçok yiyecek ve içecek üretim prosesinde anahtar rol oynamaya devam etmektedir [1].

Enzimler, iyi tanımlanmış bir yol aracılığıyla çeşitli endojen biyokimyasal reaksiyonların oluşmasına izin veren ideal metabolik katalizörlerdir. Aynı zamanda enzimler, reaksiyonun aktivasyon enerjisini kalıcı bir değişime uğramadan düşürerek, insan yaşamının sürdürülmesinde önemli olan çeşitli biyolojik reaksiyonları hızlandırır.

Enzimler, küçük mikroorganizmalardan bitki ve hayvanlara kadar hemen hemen tüm canlılarda doğal olarak bulunur. Bitkilerde ve hayvanlarda enzimler çok az miktarda bulunur ve endüstriyel uygulamalarda yararlanılamaz. Tam tersine, mikroorganizmalardan enzim üretimi, kolay kullanım, kontrollü koşullar altında hızlı çoğalma, genetik manipülasyonun kolay olması, yüksek üretim verimi gibi pek çok avantaj sunmaktadır. Buna ek olarak mikrobiyal enzimlerin endüstriyel kullanımı, katalitik aktiviteleri, özgüllükleri, stabiliteleri, toksik olmamaları, çevre dostu olmaları, maliyet etkinlikleri, üretim kolaylıkları vb. nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir [2].

Enzim immobilizasyonu, bir enzimin substrat ve ürünlerin dışında bir matris ya da destek materyaline kovalent bağla tutturulması şeklinde tanımlanabilir. İmmobilizasyon, ana bileşenleri enzim, enzimin desteğe bağlandığı matris ve geri dönüşümlü fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlardan stabil kovalent bağlantılara kadar değişen bağlanma modu olan bir sistem oluşturur. Bu bağlantılar amid, eter, tiyo eter veya karbamat bağları yoluyla kurulur ve enzimin katalitik aktivite ve termal stabilite

gibi özelliklerinde değişikliklere neden olabilir. Bu değişikliklerde enzimlerin farklı alanlarındaki çok sayıda uygulamasının temelini oluşturmaktadır [3].

1.1 Enzimler

Enzimler, substratın ürüne dönüşüm hızını hızlandıran oldukça spesifik biyomoleküler katalizörlerdir. Bu biyomoleküler katalizörler proteinli makromoleküller veya ribozimler olarak da bilinen katalitik RNA olabilir. Enzimler, molekül ağırlıkları 10 kDa ila 2000 kDa arasında değişen çok büyük makromoleküllerdir ve amino asitlerden (peptid bağları ile birbirine bağlanmış monomerik birimler halinde) oluşurlar. Enzimler, üçüncül veya dördüncül yapılarını aldıklarında farklı tanımlanabilir bölgelere sahiptirler. Üçüncül veya dördüncül yapılarındaki enzimatik aktiviteleri açısından en önemlisi, genellikle enzimdeki hidrofobik bir cebin derinlerinde yer alan aktif bölgeleridir. Aktif bölgeler, bir enzimin substratına yönelik spesifikliğini tanımlar ve böylece belirli bir enzimi diğer enzimlerden benzersiz kılar. Sonuç olarak bu, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan Enzimler Komisyonu (EC) tarafından tanımlanan 3000'den fazla enzimin sınıflandırılması, isimlendirilmesi ve numaralandırılmasının temelini oluşturmaktadır [4].

Bugün itibarıyla, katalize ettikleri reaksiyonların türüne göre yedi enzim sınıfı bulunmaktadır (Çizelge 1.1). Tanımlanan 3000'den fazla enzimin yalnızca %5'i endüstriyel olarak kullanılmaktadır [4]. Enzimlerin endüstriyel uygulaması birçok endüstride enerji talebini önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca endüstriyel enzimlerin kullanımı daha uygun maliyetlidir ve endüstriyel ölçekte daha kararlı ve gelişmiş enzimler üretmek için mikroorganizmaların kullanılması da genetik mühendisliğiyle elde edilebilir durumdadır [5].

Bunlar birçok endüstrinin kimyasal bazlı üretim teknolojileri yerine enzimlerin kullanımını benimsemesini sağlamıştır.

Çizelge 1.1 Enzim sınıfları, reaksiyon türleri ve karşılık gelen enzimler

Sınıfı	Reaksiyonu	Enzimleri
1 Oksidoredüktaz	Moleküller arasında hidrojen veya oksijen veya elektronların transferi.	Dehidrojenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, peroksidazlar
2 Transferaz	Atom gruplarının bir molekülden diğerine aktarılması.	Fruktosiltransferazlar, transketolazlar, asiltransferazlar, transaminazlar
3 Hidrolaz	Bağların hidrolitik bölünmesi.	Proteazlar, amilazlar, açılazlar, lipazlar, fosfatazlar, kütinazlar
4 Liyaz	Eliminasyon veya ekleme reaksiyonlarıyla hidrolitik olmayan bölünme.	Pektat liyazlar, hidratazlar, dehidratazlar, dekarboksilazlar, fumaraz, argino süksinaz
5 İzomeraz	Bir molekül içinde grubun bir pozisyonundan diğerine transferi.	İzomerazlar, epimerazlar, rasemazlar
6 Ligaz	ATP veya benzer trifosfatlardaki enerji açısından zengin bir bağın hidrolizi ile eşleştirilmiş iki molekülün kovalent bağlanması.	Sentetazlar, ligazlar
7 Translokaz	Karnitin-asilkarnitin translokaz transferi.	Karnitin-asilkarnitin translokaz, ADP/ATP translokaz

Enzimlerin endüstride kullanımının mevcut dezavantajı, enzimlerin optimum performansı için belirli üretim koşullarının oldukça zorlu olabilmesidir. Üretim pH'ı, basınç, sıcaklık ve potansiyel inhibitörlerin varlığı, enzimlerin enzimatik aktivitesini

etkileyebilir [4,6]. Örneğin, çoğu enzim (hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen) yaklaşık 37°C sıcaklıkta, nötr pH'da ve inhibitörlerin yokluğunda optimum performans gösterir. Bu dezavantajları hafifletmek veya ortadan kaldırmak için, endüstriyel enzimlerin üretiminde bitki ve hayvan kaynakları yerine mikrobiyal enzim kaynakları tercih edilebilmektedir.

Hidrolitik enzimler, proteazlar, pektinazlar, selülozlar, ksilanazlar, amilazlar ve lipazlar endüstride en sık kullanılan biyokatalizörlerdir. Bu yaygın enzimler özellikle fırınlama, bira yapımı, deterjanlar, fermente ürünler, ilaç, tekstil, deri işleme gibi endüstriyel işlemlerde kullanılır.

Proteazlar, küresel enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Amilazlar, özellikle α -amilaz, nişasta dönüştürme işlemlerinden farmasötik endüstrisinde siklodekstrin üretimine kadar uzanan endüstriyel uygulamalara sahip çok yönlü enzimlerdendir [7].

Öte yandan pektinazlar ise gıda endüstrisinde, özellikle meyve suyu ekstraksiyonunda ve arıtılmasında yaygın olarak kullanılan enzimlerin başında gelmektedir [8].

1.2 Pektinazlar

Pektinazlar (EC 3.2.1.15), pektik maddelerin depolimerizasyon (hidrolazlar ve liyazlar) veya deesterifikasyon (esterazlar) reaksiyonları yoluyla bozunmasını katalize eden bir grup enzimdir [2]. Pektik içerik, bitkilerde ve meyvelerde yaygın olarak bulunan, doğası gereği asidik olan doğal bir heteropolimer bileşiğinin genel adıdır [9].

Pektinazların ilk ticari kullanımı 1930 yılında meyve suyunu berraklaştırmak amacıyla başlamış, daha sonra şarap ve meyve suyu yapımı gibi çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Ancak 1960'tan sonra diğer enzimler de kayıt altına alınınca bitki dokularının kimyasal yapısı ortaya çıktı ve araştırmacılar enzimleri daha verimli kullanmaya başladı. Tüm bu enzimler arasında pektinazlar, stabil ve berraklaştırılmış meyve sularının maksimum verimi için ticari sektörün temel katalizörleridir [10]. Pektinazların uygulamaları sürekli olarak artmaktadır ve dünya çapındaki enzim pazarı, pektinazların %25'ini oluşturmaktadır [2].

Pektinazlar pektik maddeler üzerindeki etki şekillerine göre esterazlar ve depolimerazlar olarak sınıflandırılırlar. Esterazlar pektin üzerinde etki gösterir ve ayrıca iki kategoriye ayrılır: (i) pektin metil esteraz (E.C. 3.1.1.11) ve (ii) pektin asetil esteraz (E.C. 3.1.1.6). Depolimerazlar pektin, poligalakturonik asit ve rhamnogalakturonana etki eder.

Pektin üzerinde etkili olan depolimerazlar ayrıca şu şekilde sınıflandırılır: (i) pektini uçlardan (Exo PMG) veya molekül içinde (Endo-PMG) hidrolize eden polimetilgalakturonaz (PMG, E.C. 3.2.1.1); ve (ii) pektini yalnızca endoaksiyonla (Endo PL) trans-elimine eden pektin liyazı (PL, E.C. 4.2.2.10).

Poligalakturonik asit üzerinde etkili olan depolimerazlar ayrıca şu şekilde sınıflandırılır: (i) poligalakturonik asidi ekzoaksiyon yoluyla hidrolize eden poligalakturonaz (PG) (Exo PG1, E.C. 3.2.1.67 ve Exo PG1 E.C. 3.2.1.82) veya endoaktif (Endo PG, E.C. 3.2.1.15) ve (ii) pektat liyaz (PGL), ekzoaksiyon (Exo PGL, E.C. 4.2.2.9) ve endoaksiyon (Endo PGL, E.C. 4.2.2.2) yoluyla poligalakturonik asidin trans eliminasyonuna neden olur [2].

Pektinaz enzimi ayrıca bir substrat üzerindeki etkisine bağlı olarak üç gruba ayrılabilir: protopektinaz, pektinesteraz ve depolimeraz (hidrolaz ve transeliminaz) (Şekil 1.1) [11].

- (I) Protopektinaz: Bu pektinaz türü genellikle olgunlaşmamış meyvelerde bulunur ve çözünmeyen protopektini çözünebilir pektin formuna dönüştürür.
- (II) Bu nedenle pektinin parçalanması için gerekli olan ilk enzimin protopektinaz olduğu düşünülmektedir. Pektinosinaz, alternatif olarak protopektinaz olarak da adlandırılır [10].
- (III) Pektin esteraz (PE / de-esteraz): Bu pektinaz aynı zamanda pektin metil hidrolaz, pektin metilesteraz ve pektaz olarak da bilinir. PE, pektik asit ve metanol verecek şekilde pektinin galakturon omurgasındaki metil ester bağlantısının de-esterifikasyonunu katalize eden bir karboksilik asit esterazdır. PE'ler yüksek bitkilerin meyvelerinde, yapraklarında, çiçeklerinde, saplarında ve köklerinde bulunur [9].

(IV) Depolimerizasyon Enzimleri: Bu sınıf hidrolize edici enzimleri ve parçalayıcıları enzimleri oluşturur.

A. Hidrolize edici enzimler (hidrolazlar), poligalakturonaz (PG) ve polimetilgalakturonaz (PMG) içerir. Hem PG hem de PMG, su molekülünün varlığında α 1 $\rightarrow$ 4 glikosidik bağa etki ederek pektin zincirini hidrolize eder ve sırasıyla poligalakturonat ve polimetilgalakturonat üretir [11].

B. Pektin transaminaz (transeliminaz), doymamış galakturonatlar üreten transeliminasyon reaksiyonu yoluyla α (1 $\rightarrow$ 4) glikosidik bağlantıyı parçalayan poligalakturonat liyaz (PGL) ve polimetil galakturonat liyazı (PMGL) içerir.

C. Pektin zincirinin kırılması hidrolitik değildir; eylem, C-5'ten H'yi ortadan kaldırmak ve D4:5 doymamış ürünler üretmektir [10].



Şekil 1.1 Pektinaz enzimlerinin etkilerine göre sınıflandırılması

1.2.1 Pektinaz kaynakları

Doğada pektinazlar için birçok kaynak vardır. Bunlar bitkiler, bakteriler, mantarlar, mayalar, böcekler, nematodlar ve protozoalardır. Ancak hızlı büyüme, daha kısa fermantasyon ve daha erişilebilir genetik modifikasyonlar nedeniyle mikrobiyal kaynak önemlidir. Mikrobiyal pektinazlar bitki patogeneğinde, simbiyozunda ve bitki birikintilerinin ayrışmasında hayati bir rol oynar [9].

Ayrıca mikrobiyal pektinaz üretim sürecinin bitkisel ve hayvansal kaynaklarda olduğu gibi politik veya sosyal bir sorunu yoktur.

Pektinazların %35'inin bakteriyel kaynaktan, %55'inin mantar ve mayadan, sadece %15'inin ise bitki veya hayvan kaynaklarından sağlandığı bildirilmektedir [12]. Pektinazların farklı kaynaklardan gelen mikroplardan farklı fizikokimyasal koşullara karşı yüksek stabilitesi gibi yüksek kalitesiyle ilgili birçok çalışma yapılmaktadır.

Saccharomyces fragilis, *Saccharomyces thermantitonus*, *Torulopsis kefir*, *Candida pseudotropicalis* var, *lactosa* ve *Candida pseudotropicalis*, *Cryptococcus türleri*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula dairenensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum klebahnii* ve *Wickerhamomyces anomalus* 'un pektinaz üretim süreçlerinde pektin maddelerini parçalayabilen maya türleri olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca pektinaz üretiminde en popüler ve verimli mantarlar *Aspergillus Niger*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium reitrum*, *Trichoderma viride*, *Mucor piriformis* ve *Yarrowialipolytica*'dır. *Erwinia* türleri, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* ve *Streptomyces* bakterileri de pektinaz üretiminde pektini parçalamak için iyi bir potansiyele sahiptir [8].

Aspergillus niger çoğunlukla pektinazın endüstriyel üretiminde kullanılmaktadır . Mantar kaynaklarından elde edilen pektinazlar genellikle doğası gereği asidiktir ve nötr veya alkalın koşullar yerine yalnızca asit koşullarında çalışabilir; bakteri suşlarının ise alkalın preparatı için uygulanabilecek alkalın pektinazlar ürettiği bilinmektedir [13]. *Aspergillus niger*, biyoteknolojide kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir.

Ayrıca, sitrik asit ve birçok *Aspergillus niger* enzimi, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi tarafından genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilir.

Ek olarak *Aspergillus niger*'in, biyotransformasyonlar ve atık arıtma için kullanıldığı da bilinmektedir. Son yirmi yılda *Aspergillus niger*, gıda enzimlerini aşırı ifade etmek için önemli bir transformasyon konağı olarak geliştirilmiştir.

1.2.2 Pektinaz kullanım alanları

Pektinazlar, geniş etkileri nedeniyle ekonomik açıdan çok önemlidir. Pektinaz enziminin keşfi ekonomik ve ticari sektörlerde devrim yarattı. Geçmişte meyve suyu ve şarap yapımında kullanılmasına rağmen son zamanlarda kullanımı giderek artmaktadır.

Pektinazların meyve suyu endüstrilerinde, şarap endüstrilerinde, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinde, atık su arıtımında, biyoetanol üretiminde, bir bitkiden DNA ekstraksiyonunda ve bir bitkiden protoplast izolasyonunda uygulamaları da önemlidir. Ayrıca pektinazlar; hayvan yemi hazırlanması, biyokütlenin sakarifikasyonu ve sıvılaştırılması, bitki liflerinin çürütülmesi ve zambın giderilmesi, pamuk liflerinin biyolojik olarak yıkanması, kahve ve çayın fermantasyonu ile yağ ekstraksiyonunda kullanılmaktadır [9,14].

1.2.2.1 Kahve, kakao ve çay fermantasyonu

Pektinazlar, kahve çekirdeklerindeki müsilaj tabakasını çıkarmak ve kahvenin, kakaonun ve çayın fermantasyon sürecini hızlandırmak için kullanılır. Çayın özellikleri theaflavinler, thearubiginler ve diğer doğal bileşenler gibi oksidasyon ürünlerine bağlıdır. Genellikle çay yapraklarında polifenoller, flavonoller ve flavanol glikozitler, flavonlar ve fenolik asitler gibi uçucu olmayan bileşikler bulunur. Ayrıca çay yapraklarında amino asitler, klorofil, karbonhidratlar, diğer pigmentler, organik asitler, kafein, enzimler, vitaminler ve mineraller vb. bulunur [15].

Kahve çekirdeğinin iç yapılarını çevreleyen örtüler vardır. Kahve çekirdeklerinin bu sert örtülerine müsilaj adı verilir. Müsilaj ayrıca içilebilir kahve yapmak için uygun olmayan viskoz ve jelatinimsi özelliklere de sahiptir. Alkali pektinaz işlemi sırasında, kahve çekirdeği kullanılmadan önce kahve çekirdeğindeki müsilaj tabakasını çıkarmak için kullanılır [16].

Aynı zamanda kakao fermantasyonunda çikolata aromasını geliştirir. Poligalakturonaz gibi pektinaz, çay prosesinde pektinleri yok ederek hazır çay tozlarının köpük

oluşturma özelliğini ortadan kaldırmak, çayın kalitesini arttırmak, renk değişikliklerini sağlamak ve piyasada oldukça değerli hale getirmek için kullanılmaktadır. Maksimum verim elde etmek için pektinaz konsantrasyonunun korunması gerekir. Ayrıca enzimin uygun seviyede eklenmesi gerekir çünkü enzimin fazlalığı çay yapraklarının sır ve kalitesini düşürür, rengini, lezzetini, aromasını azaltır ve çay yapraklarının bozulma oranını artırır [8,16].

1.2.2.2 Tekstil endüstrisi

Tekstil işlemede enzim kullanımı yoluyla hem evre hem de ürün kalitesi açısından büyük fayda sağlanmıştır. Enzimler spesifiktir; eylem hızlıdır ve enerji, maliyet, hammadde, su ve enerji tasarrufu sağlar; dolayısıyla enzimler, tekstil endüstrilerinde pamuk lifinin temizlenmesine yönelik sert, maliyetli ve çevreyi kirleten kimyasal yöntemin yerini almış bulunmaktadır [17].

İpliğin kumaşa dokunmasından önce zđ iplikleri, ipliği yağlamak ve dokuma sırasında aşınmaya karşı korumak için bir haşıl maddesiyle kaplanır.

Tarihsel olarak, pamuklu kumaşlar için kullanılan ana haşıl maddesi, mükemmel film oluşturma kapasitesi, kullanılabilirliği ve düşük döküm gerçeği nedeniyle nişasta olmuştur.

Kumaş boyanmadan önce uygulanan haşıl maddesinin ve pamukta bulunan doğal selülozik olmayan malzemelerin uzaklaştırılması gerekir [18].

Amilaz enzimlerinin keşfinden önce, nişasta bazlı haşıllamanın giderilmesinin tek yolu, yüksek sıcaklıkta döküm sodası ile genişletilmiş işlemdi. Kimyasal işlem, nişastanın giderilmesinde tamamen etkili olmadı ve aynı zamanda pamuk lifinin bozulmasına yol açtı ve bu da pamuğun doğal yumuşaklık hissinin veya 'tutuşunun' bozulmasına neden oldu. Pektinaz gibi enzimlerin amilazlar, lipazlar, selülazlar ve diğer hemisellolitik enzimlerle konjugasyon halinde haşıl maddelerinin uzaklaştırılmasında kullanılması, tekstil endüstrisinde sert kimyasalların kullanımını azaltmış, bu da kimyasal atıkların çevreye daha az boşaltılmasıyla sonuçlanmıştır.

Bütün bunlar doğrultusunda tekstil endüstrilerinde pektinazlar, amilaz, lipaz, selülaz ve hemiselülaz gibi diğer enzimlerle birlikte haşıl maddelerinin pamuktan güvenli ve evre dostu bir şekilde uzaklaştırılması için kullanılır [17,18].

1.2.2.3 Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi

Biyoteknolojinin ilerlemesi ile kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinin biyolojik ağartma, kâğıt yapımı gibi işlemler için mikroorganizmaların ve bunların enzimlerinin kullanımına olan bağımlılığının artmasıyla birlikte, ksilanaz ve ligninaz dışındaki mannanaz, pektinaz ve -galaktosidaz gibi enzimlerin kullanımı da birçok ülkede kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinde artış göstermektedir.

Kâğıt yapımı sırasında pektinaz, galakturonik asit polimerlerini depolimerize edebilir ve ardından pektin çözeltilerinin katyonik talebini ve peroksit ağartma işleminden elde edilen filtratı azaltabilir. Poligalakturonik asitlerin katyonik polimerlerle kompleks oluşturma yeteneği, büyük ölçüde polimerizasyon derecesine bağlıdır. Pektinazlar poligalakturonik asitleri depolimerize eder ve sonuç olarak termomekanik hamurun peroksit ağartılmasından elde edilen filtrattaki katyonik talebi azaltır [18].

Kâğıt ürünlerinin geri dönüşümü son zamanlarda artmaktadır ve kullanılmış kâğıdın mürekkepten arındırılması gerekli bir adımdır. Enzimatik mürekkep giderme parlaklığı artırır, kimyasal tüketimini azaltır, drenajı iyileştirir ve kâğıtta kalan mürekkebi azaltır.

Bununla birlikte, mürekkep giderme sırasında enzimin aşırı kullanımı, daha fazla depolimerizasyon ve atık sularda yüksek biyolojik oksijen talebi nedeniyle lif kaybına neden olabilir [8].

Enzimatik mürekkep giderme işlemi daha az kirleticidir, enerji tasarrufu sağlar ve dosttur; istenen mürekkepten arındırılmış hamur özelliklerini elde etmek için daha iyi performans sağlar ve bertaraf sorunlarının azaltılmasıyla sonuçlanır.

Kimyasal mürekkep giderme işleminde, enzimatik sürecin aksine çevreye zararlı birçok kimyasal kullanılır. Pektinaz, mürekkep parçacığının yakınındaki bağları değiştirir ve yıkama veya yüzdürme yoluyla yıkanmış yüzeyden mürekkebi çıkarır.

Pektinaz, ksilanaz ile birlikte, zararlı kimyasalların etkilerini %40'a azaltmak ve fiziksel ve optik özelliklerin seviyesini iyileştirmek için atık kâğıdın mürekkepten arındırılmasında kullanılmış ve kâğıt tabakalarının kalitesi artırılmıştır [2,8].

Ayrıca bu enzimatik mürekkep giderme yöntemi, kâğıdın beyazlık ve parlaklık gibi aynı özelliklerinin elde edilmesinde başarılı olmuştur.

1.2.2.4 Yağ çıkarma

Geçmişte kolza tohumu, hindistancevizi tohumu, ayçiçeği tohumu, palmiye ve zeytin gibi yağ üreten ürünlerden yenilebilir yağın ekstraksiyonunda kansere neden olma potansiyeline sahip heksan gibi organik bir çözücü kullanılmıştı [19].

Günümüzde bitkilerden, zeytinden, ayçiçeğinden, hindistancevizinden, kanoladan ve diğer yağlı tohumlardan yağ çıkarmak için pektinazlar ve diğer hücre duvarını parçalayan enzimler, selülozlar ve hemiselülozlar kullanılmaktadır. Öğütme işlemi sırasında, bitki hücrelerinin orta lamellerindeki pektini parçalamak ve yağların tohumların iç kısmından veya tohum tabakasından çıkarılmasını teşvik etmek için enzimler eklenir, böylece bitki hücrelerinden yağ salınımı artar. Pektinaz ilavesi aynı zamanda yağın stabilitesini, verimini ve reolojik özelliklerini artırır ve yağın E vitamini içeriği, polifenol seviyesi ve organoleptik kalitesini iyileştirir.

Aynı zamanda bakterilerden elde edilen pektinazların, susam tohumlarından yağ ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı, verimi ve berraklığı arttırdığı ve yağın bağlı viskozitesinin azalttığı da bilinmektedir [19,20].

1.2.2.5 Meyve ve sebze işleme

Meyve suyu endüstrileri, meyveleri yumuşatmak, ekstraksiyonu kolaylaştırmak, meyve suyu verimini artırmak ve meyve suyunu berraklaştırmak için pektinazlar ve selülozlar ve proteazlar gibi diğer hücre duvarı parçalayıcı enzimleri kullanır [21]. Başta tropik meyveler olmak üzere meyveler daha fazla pektine sahiptir ve etli bir yapıya sahiptir.

Meyvelerin meyve suyu ekstraksiyonunda mekanik olarak öğütülmesi, etrafı negatif yüklü pektin ile kaplanan pozitif yüklü protein nedeniyle jöle, viskoz ve bulut benzeri görünüme sahip ürünlere katkıda bulunabilir. Meyve suyuna pektinaz eklenmesi, pektinin bozulmasına ve pozitif yüklü proteinin açığa çıkmasına neden olacaktır.

Pozitif yüklü proteinin açığa çıkması, bulut parçacıkları arasındaki elektrostatik itmeyi ve daha büyük bir parçacık oluşumunu azaltır; bu parçacık daha da çöker ve berrak bir meyve suyu verir. Ayrıca nişasta kompleksi, meyve suyunun karakteristik viskozitesinden ve bulanıklığından da sorumludur [10]. Ancak pektinaz takviyesi, meyve suyu verimini arttırmak için galakturonik asit monomerleri arasındaki

glikozidik bağları kırar. Ayrıca pektinazlar pektinin su tutma kapasitesini azaltarak viskozitesini ve bulanıklığını azaltır [9,10]. Ayrıca enzimatik işlem, pektini parçalayarak meyve suyunu temizler, asılı parçacıkların çökmesine yardımcı olur ve renk, koku ve stabilitedeki istenmeyen değişiklikleri ortadan kaldırır. Pektinazlar meyve pürelerinin üretiminde, meyve parçalarının soyulmasında ve şarap berraklaştırılmasında uygulanabilir. Biyokatalizörün uygulanması maliyeti düşürür, ürün verimini artırır ve diğer yerleşik proseslere göre oldukça rekabetçidir.

1.2.2.6 Şarap endüstrisi

Pektinolitik enzimlerin şarap yapımı sürecindeki birincil rolleri ekstraksiyona yardımcı olmak, meyve suyu verimini maksimuma çıkarmak, filtrasyonu kolaylaştırmak ve aroma ve rengi yoğunlaştırmaktır [11]. Şarap yapımında temel sorun, pektin varlığından dolayı şarabın filtrelenmesini zorlaştıran bulanıklıktır. Pektinazın eklenmesi pektini hidrolize eder ve şarapta bulunan bulanıklığı giderir. Bu doğrultuda şarabın aromasını ve tadını artırır.

Şarap yapımı işlemi sırasında meyvelerin ezilmesi işlemine pektik enzimlerin eklenmesi, serbest akışlı meyve suyunun hacmini artırır ve presleme süresini azaltır. Aynı zamanda meyve suyunun filtrasyonuna ve berraklığına yardımcı olmanın yanı sıra kırmızı şarapların renkliliğini ve stabilitesini de geliştirir [22]. Hareketsizleştirilmiş pektinaz, son zamanlarda şarap yapımında üzüm şirasının viskozitesini azaltmak ve şarabın temizlenmesini ve filtrelenmesini kolaylaştırmak için kullanılmaktadır.

Pektinaz, şarap yapımında bir biyokatalizör olarak uygulanır çünkü bileşiklerin ekstraksiyonunu artırır ve şarabın özelliklerini, uçucu lezzetini ve aromasını geliştirir [23].

1.2.2.7 Hayvan yemi üretimi

Hayvanın işkembesinde pektinolitik enzimler üreten ve sindirimde önemli rol oynayan bazı bakteri, mantar ve protozoalar bulunur. *Lachnospira multiparus* işkembede yaygın olarak bulunan bir bakteridir. Bu geniş getiren bakteri, gıdada bulunan pektinin parçalanmasına yardımcı olan pektin liyaz ve pektin metilesteraz

üretir. Enzim takviyesi rumende organik madde parçalanmasının tamamlanmasına yardımcı olur [9].

Hayvan yemi üretimine pektinazlar eklendiğinde, viskoziteyi düşürerek ve besin maddelerinin emilimini artırarak yem kalitesini artırır. Benzer şekilde enzimler, yemin lif içeriğini azaltır ve liflerde hapsolmuş besin maddelerinin serbest bırakılmasını artırır . Bazı hayvanlar bitkilerde bulunan pektini parçalayamaz, bu nedenle yeme pektinazların eklenmesi, parçalanamayan liflerin parçalanmasından sonra besin maddelerini serbest bırakarak veya bu lifler tarafından bloke edilen besin maddelerini serbest bırakarak besinlerin yakalanmasına yardımcı olur ve dışkı miktarını azaltır. Pektinazlar, besinlerin emilimini doğrudan yoğunlaştıran ve hayvan dışkısını azaltan yem viskozitesini azaltır ve son olarak kümes hayvanlarının ağırlığını artırır [9,18].

1.3 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler veya 'biyokatalizörler' biyoproses teknolojisi alanında dikkat çekici keşiflerdir. Biyokataliz, üretim kolaylığı, substrat spesifikliğı ve yeşil kimyası nedeniyle çeşitli sektörlerde yaygın olarak kabul görmüştür. Ancak biyolojik olarak türetilmiş bu katalizörlerin büyük ölçüde ticarileştirilmesi için yeniden kullanılabilirlik faktörü zorunlu hale gelir, aksi takdirde artık ekonomik olmazlar. Herhangi bir biyokimyasal reaksiyon sırasında yapısal stabilitelerinin korunması oldukça zordur.

Sonuç olarak, pahalı olmalarına rağmen fonksiyonel etkinliğı ve arttırılmış tekrarlanabilirliğı olan immobilize enzimler alternatif olarak kullanılmaktadır [24].

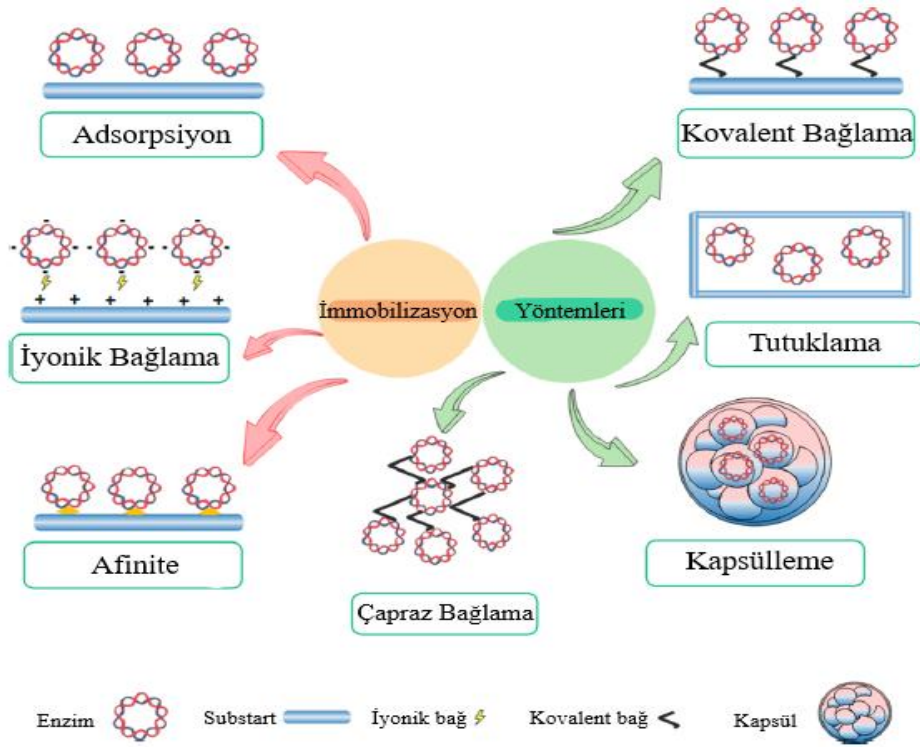
Enzim immobilizasyon tekniklerinin gelişimi, Nelson ve Griffith'in 1916'da yaptığı ilk keşiften bu yana çok büyük bir gelişme göstermiştir. Üstelik, son yıllarda enzim immobilizasyonuna yönelik arayışlar, bibliyografik analizin de gösterdiği gibi, yalnızca aynı ülkenin kuruluşları veya yazarları arasında değil, aynı zamanda farklı ülkelerin ağlarını da kapsayacak şekilde daha belirgindir. Enzimleri immobilize etmek için kovalent yöntemler ancak 1990'ların sonlarında geliştirildi ve çeşitli destek matrisleri üzerindeki enzim yüklemeleri önemli ölçüde iyileştirildi.

Yıllar geçtikçe, enzim immobilizasyonu, enzimler fiziksel kuvvetler (hidrofobik ve van der Waals) ve iyonik etkileşim yoluyla bir yüzeye immobilize edildiğinde geri dönüşümlü olarak yeniden sınıflandırıldı [25].

Enzim immobilizasyonu, enzimin substrat ve ürünlerden farklı bir fazda (matris/destek) tutulmasıdır. Taşıyıcı matrisler olarak genellikle inert polimerler ve inorganik malzemeler kullanılır. Uygun fiyatlı olmasının yanı sıra ideal bir matris, inertlik, fiziksel güç, stabilite, yenilenebilirlik, enzim spesifikliğini/aktivitesini artırma ve ürün inhibisyonunu, spesifik olmayan adsorpsiyonu ve mikrobiyal kontaminasyonu azaltma yeteneği gibi özellikleri içermelidir. Hareketsizleştirme, sürekli ekonomik operasyonlar, otomasyon, yüksek yatırım/kapasite oranı ve daha yüksek saflıkta ürünün geri kazanılmasını sağlar [26].

1.3.1 İmmobilizasyon yöntemleri

Farklı enzim immobilizasyon yöntemleri vardır (Şekil 1.2) ve çeşitli faktörler immobilize enzimlerin aktivite performansını etkileyebilmektedir [27].



Şekil 1.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri [27].

1.3.1.1 Adsorpsiyon

Enzim adsorpsiyonu, fiziksel adsorpsiyon için desteğin enzim içinde yıkandığı veya enzimin elektrot yüzeyleri üzerinde kurutulduğu hidrofobik etkileşimler ve tuz bağlantılarından kaynaklanır. Adsorbe edilen enzimler agregasyondan, proteolizden ve hidrofobik arayüzlerle etkileşimden korunur [28].

Adsorpsiyonla immobilizasyon, geri dönüşümlü immobilizasyonun elde edildiği basit bir taşıyıcıya bağlı tekniktir. Bu teknik temel olarak fiziksel adsorpsiyona bağlıdır. Adsorpsiyonun gerçekleşmesi için uygulanan malzemeler arasında iyon değiştirme reçineleri, alümina, aktif karbon ve çok daha fazlası yer alır. Bu yöntem diğer yöntemlere nispeten daha ucuzdur ve uygulanması kolaydır. Taşıyıcı ve enzim arasındaki bağ oluşumunda van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi birden fazla etkileşim rol alır.

Proteinlerin düzenlemelerine ve matrislerin yüklerine bağlı olarak güçlü bir şekilde adsorbe edilmiş bir enzim üretilebilir. Bu stratejide herhangi bir tür taşıyıcı malzeme kullanılabilir, ancak tüm enzim türleri herhangi bir taşıyıcı malzeme üzerinde immobilize edilemez çünkü uygun bir adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bazı koşulların karşılanması gerekir, yani enzim-taşıyıcının afinitesi hayati öneme sahiptir. Taşıyıcı malzeme üzerinde bulunan spesifik aktif grupların varlığıyla başarılı bir adsorpsiyon garanti edilir. Adsorpsiyon yoluyla enzim immobilizasyonunun avantajları, minimum aktivasyon adımlarının gerekli olması, az sayıda reaktife ihtiyaç duyulması, ucuz bir yöntem olması ve kolay uygulanmasıdır [27].

1.3.1.2 Kovalent bağlama

Enzimin desteğe kovalent bağlanması, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlanmadan çok daha güçlüdür. Bu yöntemde enzim, taşıyıcı malzemenin yüzeyinde bulunan reaktif moleküllere kovalent olarak bağlanır. Çoğunlukla kovalent bağlanmada rol oynayan reaktif amino asitler lizin, arginin, aspartik asit, glutamik asit, serin, treonin ve sisteindir [13].

Kovalent bağlanma, enzimleri çeşitli malzemelere (gözenekli silika, poliakrilamid, agaroz, gözenekli cam vb.) çok güçlü ve dayanıklı bağlarla sabitlemenin temel bir yöntemidir. Kovalent bağlanmanın dayanıklı enzimler üretmesi ve enzimlerin tekrar

kullanılabilecek kadar geri kazanılması gibi birçok avantajı vardır. Kovalent bağlanma, enzimlerin stereo spesifikliğini artırarak stabilitelerini yükseltir.

Bu yöntemin uygulanmasıyla, yüksek konsantrasyonlarda substratların varlığında veya güçlü tampon çözeltilerinin varlığında bile düşük bir enzim sızıntısı olasılığı vardır ve bu genellikle birçok türde denatürasyon reaksiyonunu kolaylaştırır [27].

Kovalent bağlanma temel olarak reaktif moleküllerin eklenmesi ve ardından tüm matrisin etkinleştirilmesi için polimerin omurgasının değiştirilmesi yoluyla desteğin etkinleştirilmesiyle gerçekleşir [29]. Enzimin desteğe kovalent bağlanması, enzimin desteğe doğrudan bağlanmasıyla veya aralayıcı kollar aracılığıyla yapılabilir.

Bu yöntemin kullanılmasının ana dezavantajı, enzimin geri dönüşümsüz deaktivasyonu sonucu hem taşıyıcının hem de enzimin kullanılamaz hale gelmesidir.

1.3.1.3 İyonik bağlama

İyonik bağlanma, esas olarak enzim ve taşıyıcı arasındaki iyonik etkileşime dayanan, enzim immobilizasyonunun başka bir bağlanma yöntemidir [13]. Fiziksel adsorpsiyon ile iyonik bağlanma arasındaki fark etkileşimin gücüdür ve iyonik etkileşimin adsorpsiyona göre daha güçlü olduğu bulunmuştur [27].

Bu immobilizasyon tekniğinde kullanılan destek malzemeleri genellikle yüklüdür çünkü proteinlerin birbirine bağlanabilmesi için zıt yüklere sahip olması gerekir. Bu doğrultuda taşıyıcılar, karbonhidrat polimerleri, sentetik polimerler ve inorganik bileşikler olabilir [30]. İyonik bağlanma, pH'nın değiştirilmesiyle veya enzimlerin tuzlanmasıyla basitçe tersine çevrilir. Enzim, diğer iyonların varlığı ve pH değişiklikleri nedeniyle destekten ayrılabilir, bu nedenle iyonik gücün ve çözeltinin pH'nın korunmasına özel dikkat gösterilmelidir [27].

Reaksiyon boyunca optimum pH'ı sürdürmek için, enzimi hareketsiz hale getiren matris sürekli olarak yüklendiğinden karışımdaki asitlik/alkalinitenin kolay kontrolü sağlanır. Yüklü bir desteğin oluşması, enzim yapısının bozulması, enzim kinetiğinde değişiklikler vb. gibi bazı komplikasyonlara neden olur. Ayrıca aşırı yüklemeler enzim katalizini bozabilir ve bu da yüksek ürün verimi elde edilmesini engelleyebilir [31].

1.3.1.4 Tutuklanma

Tutuklanma, enzimlerin jeller veya lifler içindeki kovalent veya kovalent olmayan bağlarla kafeslenmesidir [26]. Enzimin hapsedilmesi, enzimin monomer çözeltisiyle karıştırılması ve ardından monomerin polimerizasyonu ile enzim tuzağının polimer matris içinde tutulmasıyla sağlanabilir.

Polimerin polimer ağı, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken enzimlerin difüzyonunu önleyecek kadar sağlam olmalıdır. Tuzaklama, biyolojik molekülde ve immobilizasyon işlemi sırasında tutulan enzimlerin aktivitesinde hiçbir konformasyonel değişikliğe neden olmayan basit ve kolay bir immobilizasyon yöntemidir [13].

1.3.1.5 Kapsülleme

Kapsülleme immobilizasyonu tekniği, çeşitli biyomoleküllerin farklı polimerik matrisler içine hapsedilmesini içerir. Kapsülleme hem enzimlerin hem de hücrelerin kontrollü bir alanda çözeltiler içinde serbest olması açısından hapsedmeye benzer [30]. Enzimler, kontrollü gözenekliliğe (1-100µm) sahip küresel, yarı geçirgen polimer membranlar içerisine kapatılarak immobilize edilir.

Yarı geçirgen membranlar, bileşenlerine bağlı olarak kalıcı veya kalıcı olmayan membranlar olabilir. Kalıcı membranlar selüloz nitrat ve polistirenden yapılırken kalıcı olmayan membranlar sıvı yüzey aktif maddeden yapılır [32].

Kapsülleme, gözenekli zarlara sahip küçük kesecikler içinde sınırlanan hassas enzimlerin ve hücre çözeltilerinin hareketsizleştirilmesini amaçlamaktadır. Büyük enzimler kapsüllerin içine veya dışına çıkamaz, ancak küçük substratlar/ürünler yarı geçirgen bir zar boyunca serbestçe hareket edebilir [27]. Kapsülleme yoluyla immobilize edilen enzimler, daha yüksek katalitik etkinliğe sahip olduklarından dolayı son derece geniş yüzey alanlarına sahiptir. Ancak bu teknik ile ilgili bazı sınırlamalar vardır.

Örneğin difüzyon problemi ciddidir ve reaksiyondan çıkan ürünlerin hızlı bir şekilde toplanması durumunda membranların yırtılmasına neden olabilir.

1.3.1.6 Çapraz bağlama

Enzim çapraz bağlama, iki veya çok işlevli reaktifler (örneğin, epiklorohidrin, glutardialdehit, glutaraldehit, glioksal, diizosiyanatlar, heksametilen diizosiyanat, toluen diizosiyanat) gibi çapraz bağlama maddesi kullanılarak tek tek enzim birimlerinin birbirine bağlanmasıyla yapılabilen, bir immobilizasyon yöntemidir [13].

Enzim molekülleri çapraz bağlantı yoluyla birbirlerine doğrudan bağlanabilirler. İmmobilize enzimi daha stabil hale getirmek için aralarında bağlayıcı veya reaktif olmayan bileşikler kullanılır. Kontrol edilebilir parçacık boyutları (1–100 µm) üreten seçkin bir aktif immobilize enzim tekniğidir. Organik solventlere ve yüksek sıcaklıklara karşı önemli bir dirence sahiptir.

Yüksek stabilitesi, optimum katalitik aktiviteyle geri dönüşümü ve hacimsel verimliliği onu endüstriyel biyotransformasyonlar için oldukça cazip kılmaktadır. Hacimsel verimlilik, onu endüstriyel biyotransformasyonlar için oldukça arzu edilir hale getirir.

Çapraz bağlama kullanmanın ana dezavantajı, çapraz bağlama işlemi sırasında enzimin aktif bölgesinin yapısal ve kimyasal değişimlerinden dolayı aktiviteyi kaybetme olasılığıdır. Buna ek olarak çok pahalı bir tekniktir, çünkü enzimlerin kristalize formda olmasını gerektirir, ancak bu da yüksek saflıkta bir enzim elde edilmesini gerektirir [33].

1.3.1.7 Afinite immobilizasyonu

Afinite bağlanması, enzimin spesifik etkileşimlerle destek matrisine immobilizasyonudur. Afinite immobilizasyonu, çeşitli fizyolojik koşullar altında desteğine yönelik enzim spesifikliğini kullanır. Bu, iki yöntemi takip ederek başarılabılır. İlk yöntem, matrisin hedef enzim için bir afinite ligandına önceden bağlanmasıdır. Diğer yöntem ise enzimin matrikse karşı afinite geliştiren başka bir moleküle modifiye edilmesi veya konjuge edilmesinden oluşur. Afinite adsorbanları aynı zamanda enzim saflaştırmasında da kullanılmaktadır.

Agaroza bağlı çok katmanlı konkanavalin A ve alkali stabil kitosan kaplı gözenekli silika boncukları gibi karmaşık afinite destek matrisi üzerinde immobilize edilen enzimler, daha yüksek miktarda enzime sahiptir ve artan verimlilik ve stabiliteyi teşvik

eder. Biyoafinite katmanlama yöntemi kullanılarak enzim bağlama kapasitesi ve tekrar kullanılabilirliği önemli ölçüde artırılabilir. Bunun temel nedeni van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı vb. gibi kovalent olmayan kuvvetlerin varlığıdır [34].

1.4 İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Materyalleri

Destek matrisleri kimyasal bileşimlerine göre iki ana kategori altında sınıflandırılır: (a) inorganik destek malzemesi ve (b) organik destek malzemesi (organik destekler ayrıca doğal ve sentetik destekler olarak alt gruplara ayrılır).

1.4.1 İnorganik destek malzemeleri

Destek materyallerinden cam, silika jel, alümina, metal oksitler, zirkonya ve diğer birçok silika bazlı malzeme en çok tercih edilen malzeme olarak kabul edilir. Ayrıca termal ve mekanik dirence sahip oldukları için yaygın olarak kullanılır. İnorganik desteğin karakteristik özelliği sertlik ve gözeneklilik sağlamasıdır. Ayrıca, desteğe sabit hacim ve şekil sağlayan gözenek çapı/gözenek hacminin değişmezliğini sağlarlar [35].

1.4.1.1 Seramik

Seramikler katı, çözünmeyen, inorganik, metalik olmayan ve plastik malzemelerin pişirilmesiyle elde edilen bir diğer inorganik destek türüdür. Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 ve SnO_2 gibi metal oksitlere seramik adı verilmektedir. Gözenekli yapıları nedeniyle seramikler enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [36].

Yapılan çalışmalar doğrultusunda *Candida antarctica*'dan lipaz enziminin seramik membran üzerine immobilizasyonunun, geri besleme inhibisyonunu kısıtlayarak hidrolitik ve sentetik reaksiyonların gerçekleştirilmesine yardımcı olduğu rapor edilmiştir. Ek olarak seramik köpüklerin spesifik yüzey alanını arttırmada ve difüzyon hızlarını azaltmada da etkili olduğu bulunmuştur.

1.4.1.2 Silika

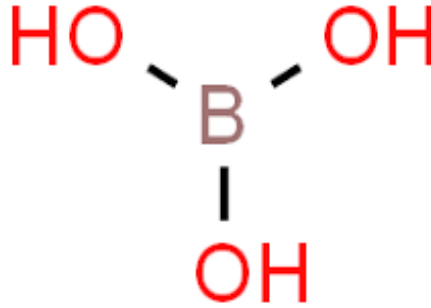
Silika bazlı malzemeler, enzim immobilizasyonu için en popüler taşıyıcı destek seçenekleri arasındadır. Silikanın yüksek yüzey alanı, yüksek derecede fiziksel, kimyasal ve biyolojik direnç sağlamanın yanı sıra, enzim immobilizasyonunu

desteklemek amacıyla farklı fonksiyonel gruplara kolaylıkla değiştirilebilir. Silika ayrıca nispeten yüksek bir termal ve mekanik dirence sahiptir [25].

Hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgelerin bir arada bulunması, ona karmaşık adsorptif özellikler kazandırır. Silisli mikro gözenekli desteğin bir başka örneği, proteinin hareketsizleştirilmesi için yüksek yüzey alanı sağlamasıyla popüler olan zeolittir. Silika taşıyıcılar kimyasal olarak inertsdir ve modifikasyona ve uygun aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, genellikle amino grubunu eklemek için aminoalkil trietoksisilanların işlenmesiyle modifiye edilirler ve ayrıca enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemlerle aktive edilirler [37].

1.4.1.3 Borik Asit

Bor, sülfürik asitle muamele edilerek borik asite dönüştürölür (H₃BO₃) (Şekil 1.3). Suda ortam sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda daha iyi çözölünür ve kristallendirilebilir. Cam türevleri ve seramik üretiminde kullanılır [38]. Bu doğrultuda da enzim immobilizasyonu için muhtemel destek materyalleri arasında sayılır.



Şekil 1.3 Borik asitin kimyasal yapısı.

Borik asit aynı zamanda nano-parçacıklarının madenî ve bitkisel yağlarla hazırlanan kolloidal süspansiyonları seramik veya metal yüzeylerin yağlanması kullanılmaktadır. Bu süspansiyonlar çevre dostu yağlayıcılar olarak bilinmektedir [39].

1.4.1.4 Aktif karbon ve cam

Hem doğal hem de hidroklorik asitle modifiye edilmiş aktifleştirilmiş karbon, enzim adsorpsiyonu için değerli bir destek sağlamıştır.

Son zamanlarda, enzim immobilizasyonu için geniş temas bölgeleri içeren mezogözenekli aktif karbon parçacıkları, asit proteaz ve asidik lipazların immobilizasyonu için kullanılmış olup, burada katalitik verimlilik, 21 döngü yeniden kullanımdan sonra önemli ölçüde muhafaza edilmiştir.

Ayrıca yapılan çalışmalar sayesinde yüksek yüzey alanına ($600\text{--}1.000\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$) ve gözenek hacminin önemli bir kısmının $300\text{--}1.000\text{ Å}$ aralığında olduğu aktif karbonun enzim immobilizasyonu için uygun olduğu bulunmuştur [25].

Nişasta hidrolizi için herhangi bir çapraz bağlama maddesi olmadan amiloglukosidaz gibi enzimlerin hareketsizleştirilmesi için destek sistemi olarak kömürün %90 katalitik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Aktif karbon ayrıca yüksek adsorplama kapasitesi ve daha az partikül madde salınımı ile etkili bir adsorban olarak kullanılmaktadır [34].

Cam oldukça viskoz bir sıvıdır ve a-amilazın hareketsiz hale getirilmesinde kullanılmıştır. Ayrıca amino grubu işlevselleştirilmiş ftaloil klorür içeren cam boncukların işlem için sağlam ve yenilenebilir olduğu bulunmuştur.

Başka bir enzim nitrit redüktaz, sürekli izleme için bir biyoenzimatik cihazı görevi gören kontrollü gözenekli cam boncuklar üzerinde immobilize edildi [24].

1.4.2 Organik/doğal destek materyalleri

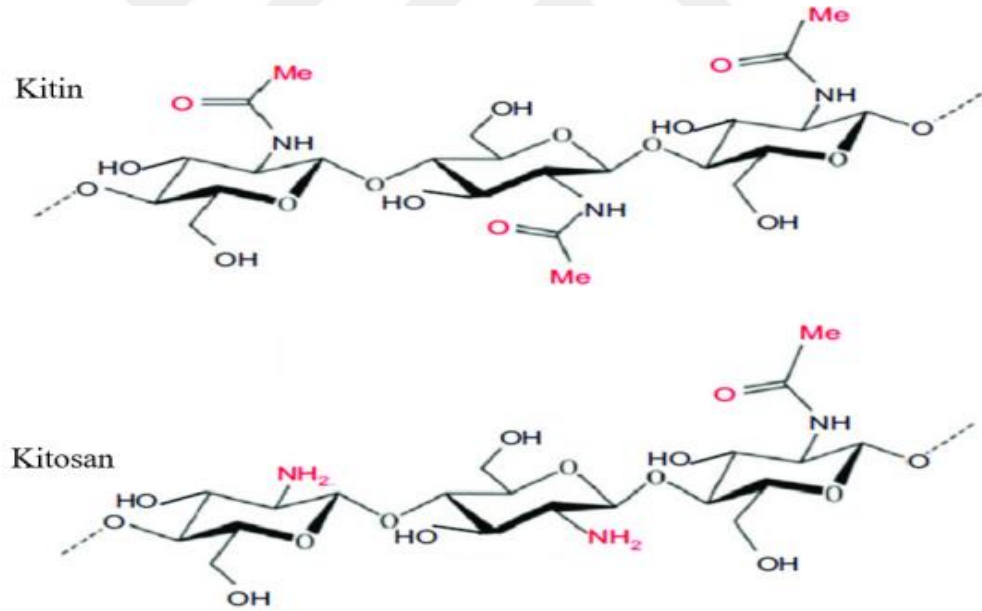
Enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan organik destek malzemeleri arasında sentetik malzemeler (polimerler) ve ayrıca doğal kaynaklardan elde edilen yenilenebilir malzemeler (biyopolimerler) yer alır.

Enzim immobilizasyonu için biyolojik kökenli çevre dostu desteklerin nispeten popüler kullanımı, üretim maliyetlerindeki olası azalmayla ve belirli katalitik süreçlerde ortaya çıkan etik sorunların üstesinden gelinmesiyle ilgilidir [40].

1.4.2.1 Kitin ve kitosan

Kitin ve kitosan gibi doğal polimerler immobilizasyon için destek olarak kullanılmıştır [41]. Kitin, β -(1-4) glikozidik bağlarla bağlanan glukozamin ve N-asetillenmiş glukozamin (2-asetilamino-2-deoksi-D-glikopiranoz) birimlerinden oluşan, doğal olarak bol miktarda bulunan bir polimerdir (Şekil 1.4). Kabukluların böceklerin dış iskeletlerine ve mantarların hücre duvarlarına güç ve stabilite sağlayan önemli bir bileşenidir.

Kitin, canlı organizmalarda düzenli mikrofibriler düzenlemeler sergileyen yarı kristalli bir biyopolimerdir. Yerli kitin lifleri, geniş bir hidrojen bağları ağı aracılığıyla birbirine sıkı bir şekilde bağlanan kristalin mikro fibrillerin ince filamentlerinden yapılıdır. Karakteristik olarak bu fibriller, biyolojik kökenlerine bağlı olarak çapları 2,5 ila 2,8 nm arasında değişen bir protein matrisine gömülüdür [42].



Şekil 1.4 Kitin ve Kitosan Yapısı

Kitin, enzimatik deasetilasyonlar veya kimyasal işlem yoluyla kitosan'a dönüştürülür [42]. Kitinin aksine, kitosan polimeri daha az toksiktir, esnektir ve enzimlerin bağlanmasını desteklemek için daha uyumludur.

Kitosan üzerine yapılan son araştırmalar, biyopolimerin doku mühendisliği yapıları, ilaç dağıtım araçları ve diş bakım ürünleri için bir temel olarak işlevselliğini ortaya çıkar mıştır.

Kitosan boncuk haline getirildiğinde diğer formlara göre iki kat daha fazla enzim tutabilir. Enzim immobilizasyonu için destek olarak saf kitosan boncuklarının sayısız avantajına rağmen, biyopolimer kompozit endüstriyel ortamlarda yaygın kullanım için yeterince sağlam değildir.

Bu boncuklar sulu ortamda kolayca yumuşar, jel benzeri hale gelir ve pH'a, özellikle asidik ortama çok duyarlıdırlar [43]. Kitosanın kırılğan yapısını iyileştirmeye odaklanan kapsamlı araştırmalar, çok sayıda ikili ve üçlü karışımlı kompozitin büyümesiyle sonuçlandı. Bu kompozitler, epiklorohidrin (ECH), glutaraldehit (GTA), 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] ve sodyum sitrat gibi çeşitli tipte çapraz bağlama maddeleri ile kompleks oluşturarak bir arada tutulur.

Kitosan boncuklarının uygun şekilde güçlendirilmesine ek olarak, kitosanın bu hibrit kompozitleri daha yüksek adsorpsiyon kapasitelerine sahiptir ve saf kitosan boncuklarına göre asidik ortama daha dayanıklıdır [25].

1.4.2.2 Aljinat

Kahverengi alglerin hücre duvarlarından türetilen aljinat, aljinik asidin kalsiyum, magnezyum ve sodyum tuzlarıdır. Bu biyopolimer (1,4)-bağlı  -D-mannuronat (M) ve a-L-guluronat (G) kalıntılarını içeren tam bir doğrusal blok kopolimer ailesidir. Geliştirilmiş enzim aktivitesi ve yeniden kullanılabilirliği ile ksantan-aljinat boncukları, aljinat-poliakrilamid jelleri ve kalsiyum aljinat boncukları olarak immobilizasyon için yaygın olarak kullanılmaktadır [24].

Aljinatın keşfi yoğun araştırma faaliyetlerini teşvik etmiş ve biyopolimerin immobilizasyon amacıyla uygulanması ve karakterizasyonuna yönelik birçok yatırıma ilham kaynağı olmuştur.

Bunun nedenleri oldukça açıktır; kayda değer biyoyumluluk, düşük toksisite ve düşük maliyetli aljinat, enzim immobilizasyonu için mükemmel bir destek olarak ortaya çıkmıştır [44].

1.4.2.3. Jelatin ve kollajen

Jelatin, amino asitler açısından zengin bir hidrokolloid malzemedir ve ağırlığının on katına kadar su emebilir. Raf ömrünün uzun ve belirsiz olması, enzim immobilizasyonunda kullanılma potansiyelini arttırmıştır. Jelatin, krom (III) asetat ile çapraz bağlanmanın krom (III) sülfat ve potasyum krom (III) sülfattan daha iyi olduğu kanıtlanan poliakrilamid ile karışık taşıyıcı sistemde kullanılmaktadır. Jelatinli kalsiyum aljinat, enzim immobilizasyonu için kalsiyum fosfat birikimi için iyi bir şablon oluşturur ve polyester filmlerle kombinasyon halinde jelatin, %50 yükleme verimliliğine sahip olan önceki çalışmalara kıyasla kalsiyum aljinat kombinasyonunda %75 yükleme verimliliğini desteklemiştir [24].

Kollajen insanlarda en çok bulunan proteindir ve çoğunlukla fibroblastlar ve osteoblastlar tarafından sentezlenir. Aynı zamanda bu biyopolimer birçok dokunun hücre dışı matrisinin ana bileşenini oluşturur. Kollajen çözeltisi NaOH ile nötrleştirilip ardından fizyolojik sıcaklığa ısıtıldığında kendiliğinden bir hidrojel yapı oluşturabilir. Kollajen, hücreler ve enzimler gibi proteinleri kapsüllemek için kullanıldığında, bu tür bileşenlerin nötralize edilmiş kollajen çözeltisiyle karıştırılması işlemini gerektirir.

Kollajen üzerinde mevcut olan yapışma motifleri, tripeptit RGD (Arg Gly-Asp), kollajenin sayısız protein ile moleküller arası etkileşiminden sorumludur. Kollajen bazlı boncukların bozunma hızı, kimyasal çapraz bağlama veya enzimatik işlemle ayarlanabilir [25].

1.4.2.4 Selüloz

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcı moleküldür. Daha düşük bağlama kapasitesine sahiptir, ucuzdur ve ticari olarak lifli ve küresel formda mevcuttur [34]. Dietilaminoetil (DEAE) ile modifiye edilmiş selülozik destekler daha uzun depolama kapasitesine sahiptir.

Selüloz kaplı manyetik nanopartikülleri, α -amilazın selüloz dialdehit kaplı manyetit nanopartiküllerine bağlanmasının yeni bir nişasta parçalama sisteminin oluşmasıyla sonuçlandığı nişasta parçalanması için kullanılmıştır Glutaraldehit ile aktive edilen iyonik sıvı-selüloz film ile immobilizasyon, daha iyi şekillendirilebilirlik ve esneklik sağlamıştır [45].

1.4.2.5 Agaroz

Agaroz, deniz yosunu veya deniz yosunundan ekstrakte edilen biyoyoumlu bir polisakkarit polimeridir. Biyopolimer, D-galaktoz ve 3,6-anhidro-L-galaktopiranozun tekrarlanan birimlerinden yapılmıştır. Klasik olarak agaroz ekstraksiyon yöntemi, agarın asetilasyonu, metilasyonu ve polieter bileşikleri kullanılarak ekstraksiyonu yapılr, ancak genellikle agaroz ekstrakte edilen ürünlerden tatmin edici olmayan verimler üretir, dolayısıyla daha az çevre dostudur [25].

Agaroz-kitosan hidrojel, boyanın parçalanması için yaban turpu peroksidazının (HRP) immobilizasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Hareketsizleştirilmiş enzimin aktivitesi, serbest HRP'ye kıyasla 3,9 kat daha iyi korunmuştur. Agaroz aynı zamanda hücre dışı matrise benzer, kendi kendine jelleşme, düşük maliyet, mükemmel şişme davranışı ve mekanik özellikler yara iyileştirme gibi özelliklerinden dolayı kompozitinin bir bileşeni olarak, hücre büyümesi, hücre kapsüllenmesi ve morfogenez uygulamaları için de uygundur [46].

1.4.2.6 Karagenan

Sülfat içeren lineer bir polisakkarit olan karagenan, stabiliteyi artırma amacıyla çeşitli enzimleri immobilize etmek için sürekli olarak kullanılmaktadır. Karagenanı verimli bir destek sistemi yapan özellikler iyi jelleşme, yüksek protein tutma kapasiteli psödoplastik içeriğidir [34]. Biyodizel üretimi için bu destek kullanılarak ko-ekstrüzyon yöntemiyle %42,6'lık bir kapsülleme verimliliği elde edebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Karagenan'ın laktik asit ve agalaktosidaz enzimini çok iyi hapseden, ucuz ve dayanıklı bir destek olduğu belirlenmiştir [24].

Karragenanlar, jelleştirici ve kapsülleyici ajanların yanı sıra kontrol salım araçları olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. Jeller, boncuklar ve filmler şeklinde oluşurlar ve tatları, kokuları, probiyotikleri ve enzimleri kapsüllemek için etkili bulunmuştur. Enzimlerin karragenanlarda kapsülleme yoluyla immobilizasyonunun, biyokatalitik performanslarını ve stabilitelerini arttırdığı iddia edilmektedir [47].

2. MATERYAL-METOT

2.1 Kimyasallar ve Çözeltiler

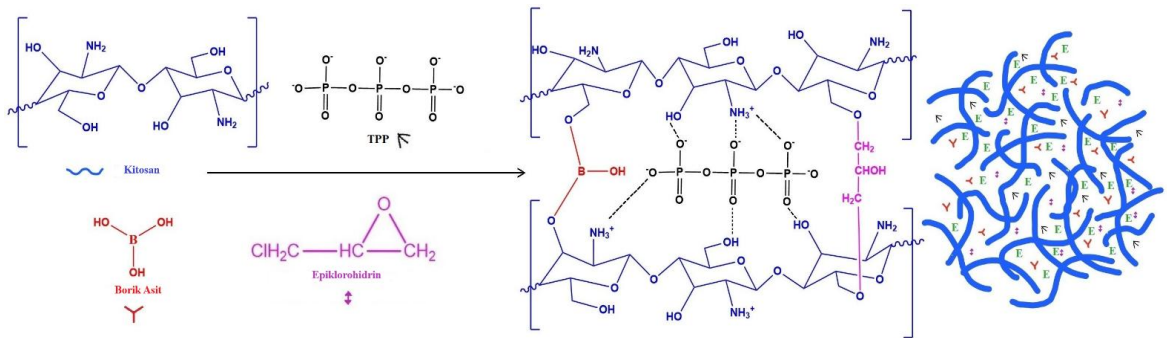
Kullanılan materyaller, kimyasallar ve çözeltiler Ek 1, Ek 2 ve Ek 3 de verildi.

2.2 Kitosan-borik Asit Boncuklarının Sentezi

Çift çapraz bağlı borik asit ve kitosan, 25°C'de iki saat süreyle, 4g kitosan ve 4g borik asit, 200 mL %5 v/v asetik asit ile karıştırıldı. Ortaya çıkan süspansiyona 160 mL ECH (0.01 M, pH 10.0) ilave edildikten sonra bir saat boyunca çalkalandı. Boncuk üretimini teşvik etmek için süspansiyon, damla damla 500 mL (0,05 M) NaTPP eklendi. Üç saat boyunca elde edilen karışım 100 rpm'de çalkalandı. Elde edilen boncuklar çözelti banyosundan süzildükten sonra, NaTPP birer saatlik aralıklarla üç kez damıtılmış su ile yıkama işlemi uygulanarak giderildi. Aktivite analizlerini gerçekleştirmeden önce, yeni yapılmış çapraz bağlı kitosan-borik asit boncukları 37°C'de kurumaya bırakıldı ve ardından oda sıcaklığında tutuldu [48,49].

2.3 Kitosan-borik Asit Kompozitinde Enzim İmmobilizasyonu

Dört saat boyunca dört santigrat derecede 200 mg kitosan-borik asit kompoziti, 0,1 M sodyum asetat (pH 5,0) ve 10 mg/mL pektinaz içerisinde süspanse edildi (Şekil 2.1). Bundan sonra boncuklar 37°C'de kurutuldu, sodyum asetat (0,1 M, pH 5,0) ile temizlendi ve kullanıldı [50].



Şekil 2.1 Kitosan-borik asit boncuklarına enzim immobilizasyonu

2.4 Kitosan-borik Asit Boncuklarının ve Hareketsizleştirilmiş Kitosan-Borik Asit Boncuklarının Yapısal Analizi

2.4.1 SEM ve FT-IR analizi

Kitosan borik asit boncukları ve immobilize kitosan borik asit boncukları, CUTAM Laboratuvarında (Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Türkiye) SEM, FT-IR Spektrometresi (ATR, Bruker, Tensor II) ve ultraviyole görünür spektroskopi (PerkinElmer Lambda 20 UV/VIS) ile analiz edildi.

2.5 Pektinaz Deneyleri

2.5.1 Protein içeriği ve pektinaz aktivite deneyleri

Protein içeriğini belirlemek için Bradford yöntemi kullanıldı [51]. Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metottur.

Standart protein eğrisinin çizimi; 11 adet deney tüpü içerisine sırasıyla 0.01 – 1 mg/mL olan stok proteinlerden 0.1 mL eklendi. Tüplerin her birine 5 mL Bradford reaktifi eklenerek 2 dk oda sıcaklığında karıştırıldı.

Köpük oluşumu engellendi ve 595 nm de absorbanları ölçüldü. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturularak örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanıldı. İmmobilizasyon verimliliği, immobilizasyondan önce ve sonra solüsyondaki protein içeriği arasındaki farktı. 200 mg kitosan-borik asit kompozitinin bağladığı enzim protein miktarı belirlendi.

2.5.2 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin aktivitesini ölçmek için 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) tekniği kullanıldı [52]. Reaksiyon ortamının 25 °C'ye soğutulmasının ardından reaksiyon, 100 rpm'de 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilerek gerçekleştirildi. Çözeltinin OD'si 575 nm'de ölçüldü. D-galakturonik asit eşdeğerleri, açığa çıkan indirgeyici şeker miktarı kullanılarak hesaplandı. Hem serbest hem de immobilize pektinazın enzim aktivitesini ölçmek için, sodyum asetat tamponu (0,1 M, pH 5,0) içindeki 600 µL %1 w/v PGA, 150 µL enzim çözeltisiyle karıştırıldı. İnkübatörde 100 rpm'de ve 37°C'de 30 dakika çalıştırıldıktan sonra reaksiyonu durdurmak için DNS

solüsyonu ilave edildi. Reaksiyon örneğinin 10 dakika kaynatılmasından sonra, spektrofotometrede 575 nm'de OD ölçüldü [53].

Hesaplamalar için aşağıdaki denklemler kullanıldı:

$$U/ML = \frac{\text{Açığa çıkan G.A miktarı (OD 575 nm standart grafiği eğim)} \times \text{Reaksiyon çöz. hacmi} \times S.F}{\text{Enzim hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon süresi (dk)}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = U / \text{mg protein}$$

$$\text{Relative Aktivite} = \text{Spesifik Aktivite} / \text{Optimum Spesifik Aktivite} \times 100$$

2.6 Optimum pH ve Sıcaklık Parametrelerinin Belirlenmesi

İmmobilize ve serbest enzimler sırasıyla (0,1 M sodyum asetat/asetik asit, pH 4,0-6,0 ve 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0-8,0) tamponlarda 30 dakika 37°C'de ve ayrıca değişen (4-60°C) farklı sıcaklıklarda denendi.

2.7 Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin ideal V_{max} ve K_m değerlerinin Lineviwer-Burk eğrileri altında çizilmesi, çeşitli poligalakturonik asit konsantrasyonlarına (%0,5-3,5) karşılık gelen reaksiyon oranlarının ölçülmesiyle yapıldı [54].

2.8 Yeniden Kullanılabilirlik Analizi

%1 poligalakturonik asidin hidrolizi, 0.1 mM asetat tamponu içerisinde 37°C'de 30 dakika boyunca 120 rpm'de çalkalanan hareketsizleştirilmiş pektinaz ile etkileşimi yoluyla elde edildi. Hareketsizleştirilmiş pektinazın pH 5.0 asetat tamponuyla yıkanmasının ardından hidrolitik prosesin altı döngüsü gerçekleştirildi.

2.9 İmmobilizasyon Süresi Çalışmaları

Optimum immobilizasyon süresini hesaplamak için bağıl aktivite hesaplandı. Ayrıca immobilizasyon süresini belirlemek için farklı zaman dilimlerinde (4-48 saat) immobilizasyon uygulandı.

2.10 Depolama Kararlılığı

Enzim homojenatı, enzimin depolama stabilitesini değerlendirmek amacıyla immobilize enzimin filtrelenmesi ve sodyum asetat (0.1 M, pH 5, 4°C'de) tamponunda

saklanmasıyla üretildi. Aktivitedeki değışikliğı tespit etmek için aktivite her 30 günde bir (1-30. günler) düzenli aralıklarla değ erlendirildi.

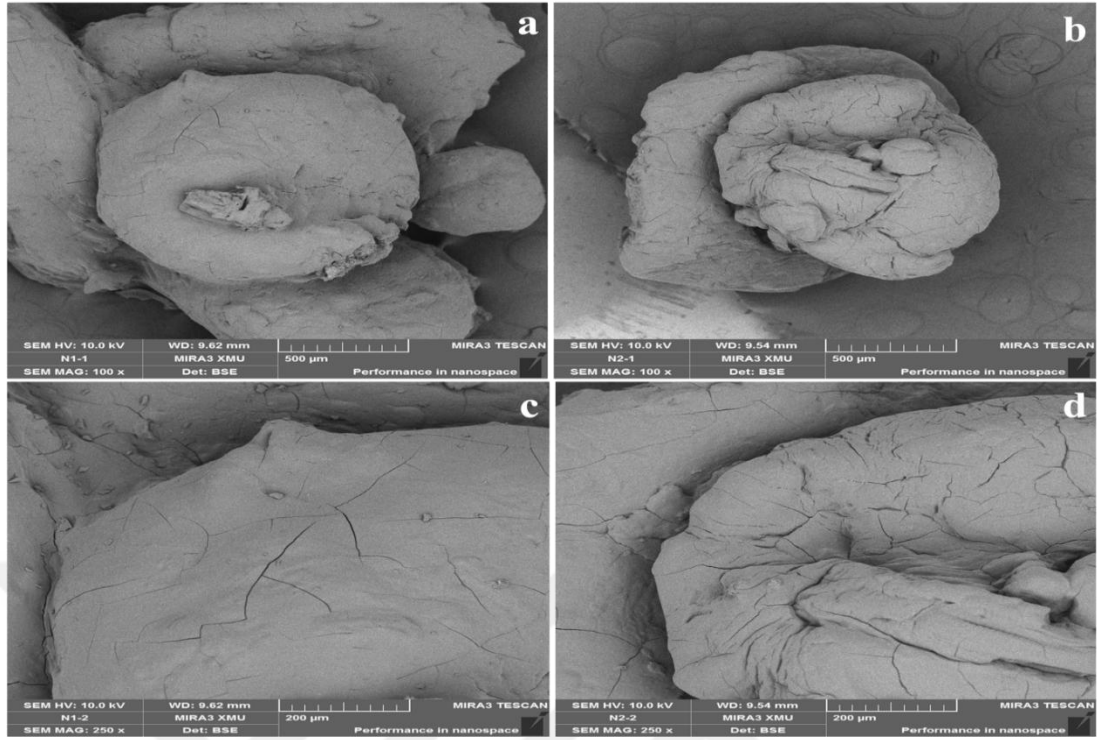


3. BULGULAR

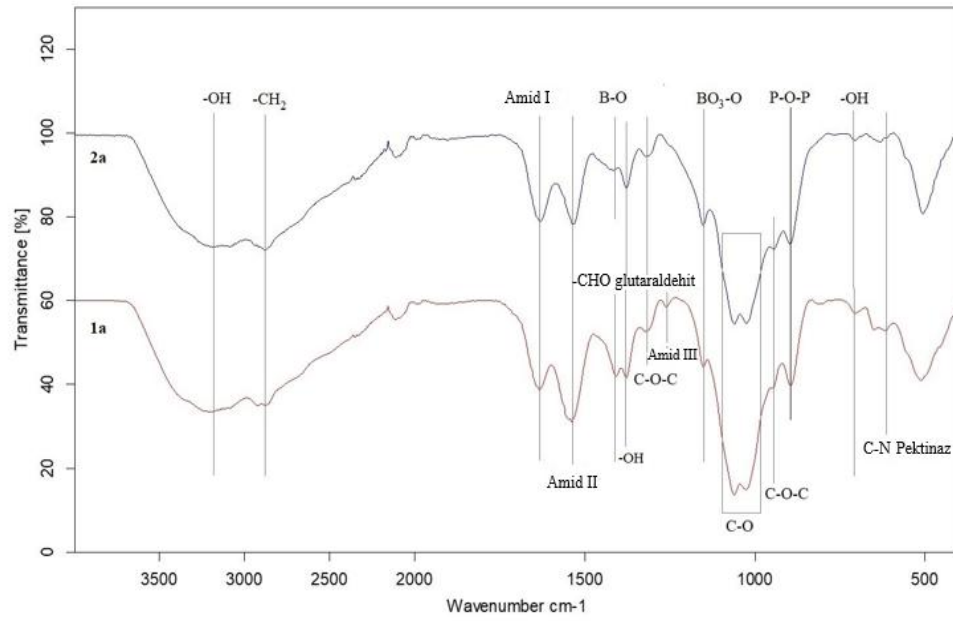
3.1 Kitosan-borik Asit Boncuklarının ve İmmobilize Pektinazın Boncuk Yüzeyine Karakterizasyonu

Kitosan-borik asit boncuklarının immobilizasyon öncesi ve sonrasında yüzey modifikasyonlarını belirlemek için farklı büyütmelerde SEM analizi yapıldı (Şekil 3.1). İmmobilizasyondan önce boncuk yüzeyinde gözle görülür bir pürüzlülük vardır (Şekil 3.1'a,c). İmmobilizasyon sonrası boncuk yüzeyindeki pürüzlülüğün arttığı belirlendi (Şekil 3.1b,d). Şekil 3.2'teki kompozit ve kitosan-borik asit kompoziti üzerinde immobilize edilmiş pektinazın analiz edilmesi için FT-IR spektroskopi analizi kullanılmıştır. Kitosan borik asit kompozitinin spektrumu (Şekil 3.2a), $-OH$ ve $-NH_2$ gruplarının gerilme titreşim bantlarının 3200 ile 2880 cm^{-1} arasındaki bölgede örtüştüğünü göstermektedir. 2874 cm^{-1} 'deki pikler $-CH_2$ grubunun simetrik gerilmesini gösterir ve 1632 ve 1536 cm^{-1} 'deki iki absorpsiyon bandı amid I ve II'nin gerilmesiyle ilişkilidir [55]. Borik asidin asimetrik B-O gerilmesi, BO_3-O gerilmesi ve $-OH$ gerilmesi 1408 , 1152 ve 704 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantlarına bağlanabilir [55]. Birincil alkol grubundaki C-O bağının gerilmesi ve kitosan yapısı 1378 cm^{-1} 'deki piklerle temsil edilir [56].

Şekil 3.1a'da 1633 cm^{-1} ve 1538 cm^{-1} 'de artan yoğunluklara sahip absorpsiyon bantları, C=O bağlarının titreşimi ve C—N gerilmesi ile protein yapısındaki N—H titreşiminin birleşiminden kaynaklanan amid I ve amid II gruplarını gösterir [57]. 1408 , 1321 ve 616 cm^{-1} 'de gözlemlenen yeni tepe noktaları (Şekil 3b), sırasıyla $-CHO$ glutaraldehit grubunun, amid III bandının (C-N gerilme titreşimi) ve pektinazın C-N bağının gerilme titreşimlerinin varlığına karşılık gelir [58,59]. Spektrumdaki bu sonuçlar, pektinin kitosan-borik asit kompoziti üzerine başarılı bir şekilde immobilizasyonunu doğrulamaktadır. Kitosandaki $-OH$ grubu, epiklorohidrin ve kitosan ile reaksiyona girerek C-O-C epoksiye dönüşür. Bu epoksi grubunun pikleri 1320 ve 944 cm^{-1} 'de görülebilir [60]. Gerilme C-O bağları 1060 ve 1025 cm^{-1} 'deki zirvelerle gösterilmektedir [61]. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP'nin P-O-P bağının antisimetrik gerilmesi, spektrumda 881 cm^{-1} 'de görülebilen zirveden sorumludur [62].



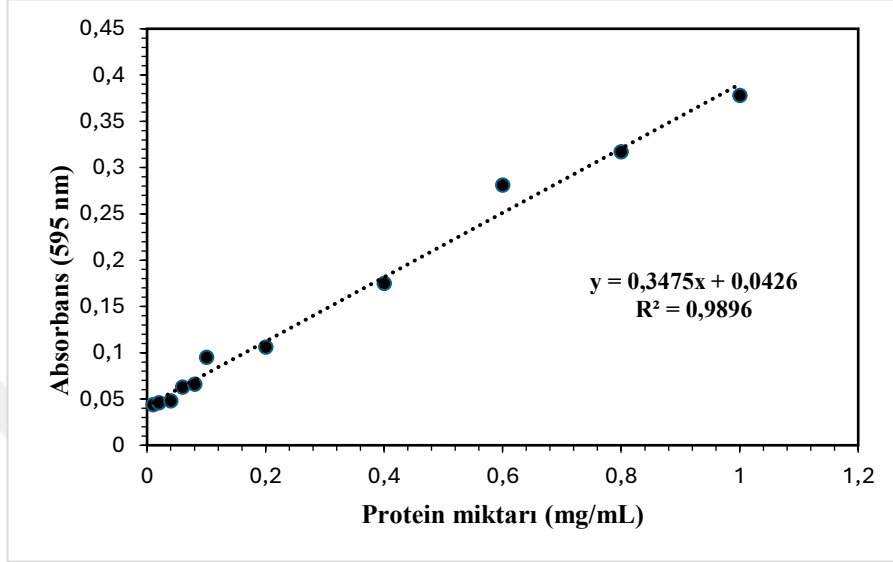
Şekil 3.1 Farklı büyütmelerde SEM analizi (a, c) Kitosan-borik asit boncukları; (b, d) Kitosan-borik asit boncukları üzerinde immobilize edilmiş pektinaz enzimi.



Şekil 3.2a) Kitosan-borik asit boncuklarının FTIR spektrumları; b) kitosan-borik asit boncukları üzerinde immobilize edilmiş pektinaz enzimi.

3.2 Protein Miktar Tayini

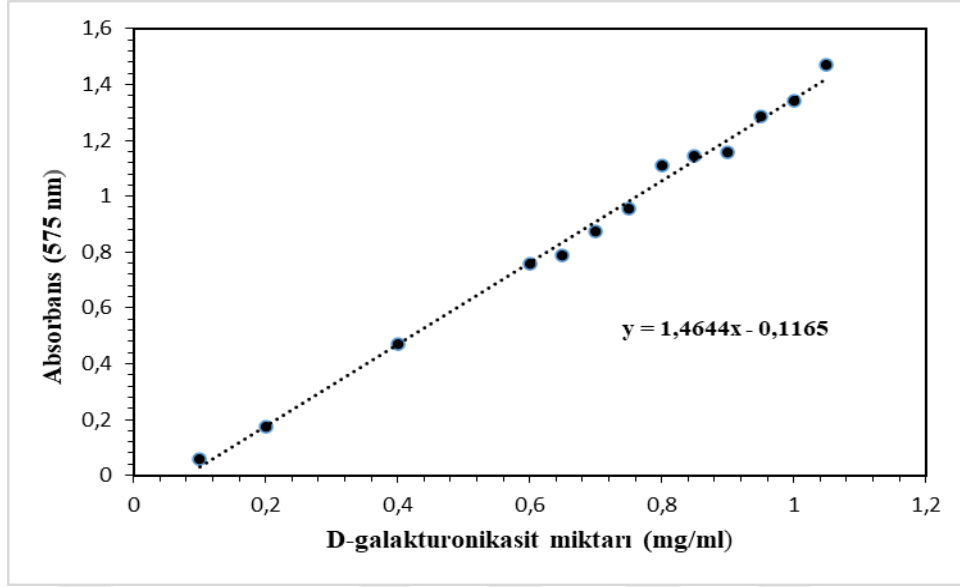
Yapılan immobilizasyon çalışmalarında kitosan boncukları üzerinde bağlanan enzimin miktarının belirlenmesi için serbest kalan enzimle protein tayini yapıldı. Bradford standart grafiği (Şekil 3.3) kullanılarak yükleme etkinliği hesaplandı.



Şekil 3.3 Bradford standart protein eğrisi.

3.3 Enzim Tahlili

Enzim aktivitesini hesaplamak için standart grafiği (Şekil 3.4) olarak D-(+)-galakturonik asit monohidrat kullanılarak DNS yaklaşımı kullanıldı (Miller, 1959). Bu yaklaşımı kullanarak reaksiyon solüsyonu, çalkalamalı bir inkübatörde 30 dakika boyunca 37 °C'de tutuldu. Enzimatik prosesi durdurmak için DNS reaktifi (750 µl) ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı, sıcak su banyosunda 10 dakika ısıtıldı. Son olarak, oda sıcaklığına ulaştıktan sonra çözeltinin 575 nm'deki optik yoğunluğunu değerlendirmek için bir UV spektrofotometresi kullanıldı. İndirgen şeker verimi miktarı, kalibrasyon eğrisi kullanılarak D-galakturonik asit eşdeğeri olarak belirlendi.



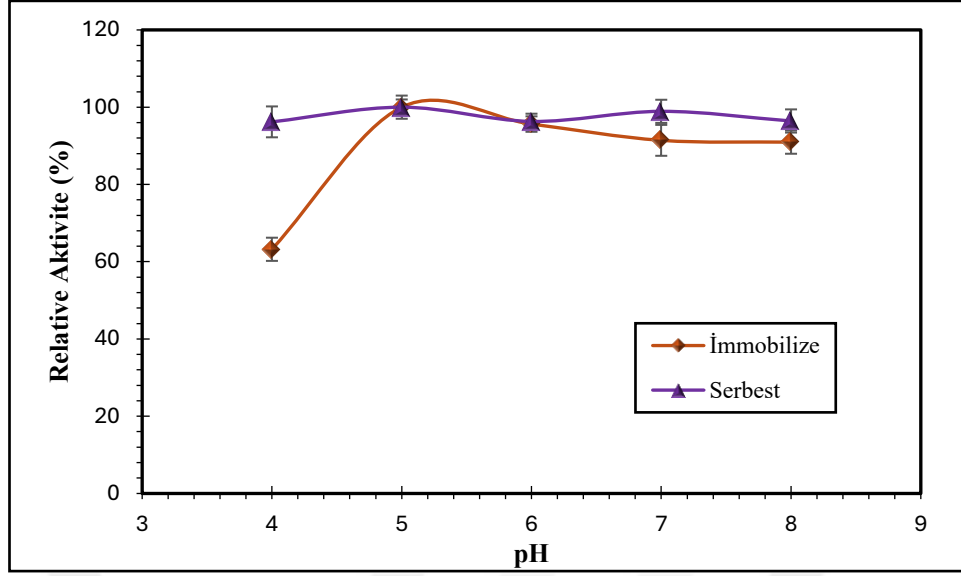
Şekil 3.4 D-(+)-galakturonik asit standart eğri grafiği.

3.4 pH Etkisi

Enzim aktivitesi, aktivitenin ölçüleceği ortamın pH'ına bağlıdır. Bu nedenle bu çalışmada PGA'nın hidrolizi sırasında pH'ın serbest ve immobilize pektinaz aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış ve sonuçlar Şekil 3.5'te sunulmuştur. Serbest enzim, immobilize enzime göre daha geniş bir pH aralığında daha yüksek aktivite sergiledi.

Serbest pektinaz, pH 4-8 arasında geniş sınırlar içerisinde maksimuma yakın aktivite gösterirken, immobilize pektinaz, pH 5-8 arasında geniş sınırlar içerisinde aktivite gösterdi. Her iki enzim için optimum pH 5 olarak belirlendi. pH 4'te immobilize enzim serbest enzime göre daha düşük aktivite göstermiştir.

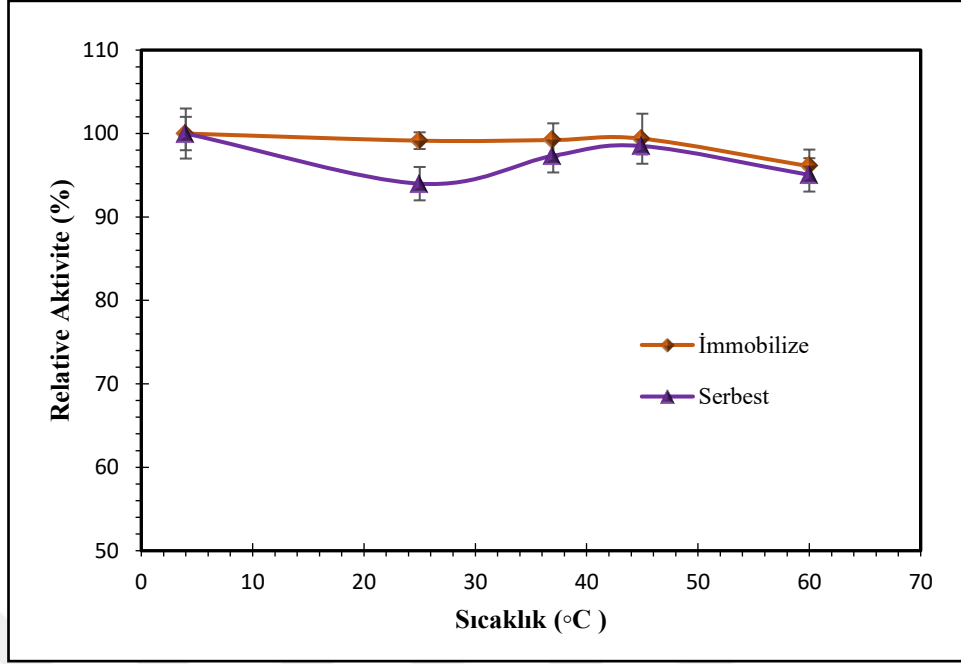
pH 4'te kitosan boncuklarının şişmesi ve immobilize enzimin sızmasının enzim aktivitesinin düşük olmasına neden olduğu söylenebilir.



Şekil 3.5 Serbest ve immobilize pektinazın optimum pH'ı.

3.5 Sıcaklığın Etkisi

Reaksiyon koşulları doğrudan enzimin katalitik etkinliği ile ilgilidir. Böylece farklı sıcaklıkların (4°C-60°C) serbest enzim ve immobilize biyokatalizör aktiviteleri üzerindeki etkileri analiz edildi. Sıcaklığın serbest pektinaz ve immobilize pektinazın hidrolitik aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 3.6'te verilmiştir. Her iki enzimin aktivitesi sıcaklık değişiminden fazla etkilenmemiş ve optimum sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde literatürde pektinaz enziminin aljinat-montmorillonit tanecikleri üzerinde immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir; Immobilizasyon öncesi ve sonrası optimum sıcaklık 40°C olarak kaydedildi. Sıcaklığın daha da artmasının immobilizasyon öncesi ve sonrasında her iki pektinaz formunun aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlendi.



Şekil 3.6 Sıcaklığın hidrolitik aktiviteye etkisi.

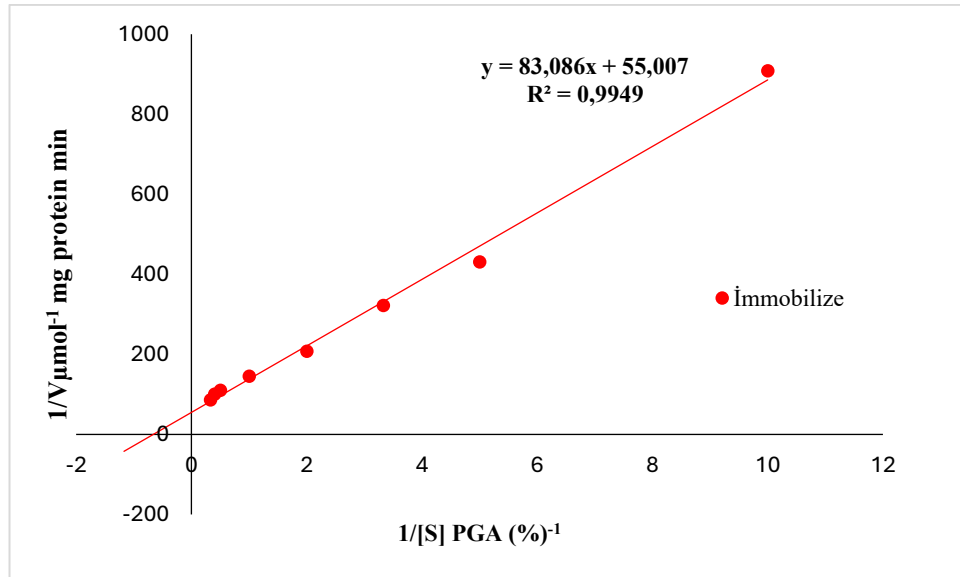
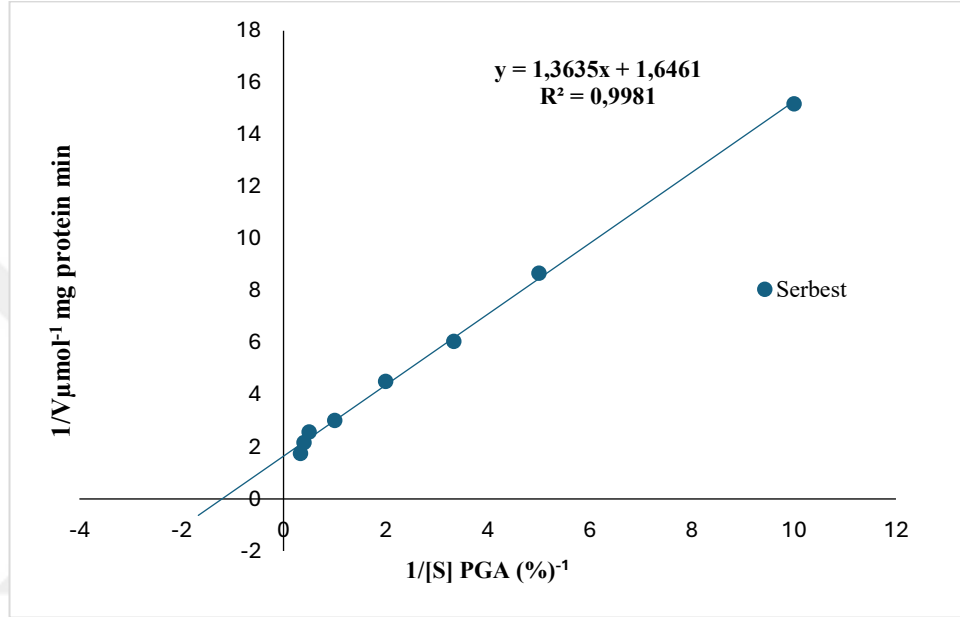
3.6 Kinetik Faktörleri

Pektinazın kitosan borik asit kompozitine immobilizasyonu sonrasında kinetik çalışmalarda kullanılan V_{max} ve K_m değerlerinin değiştiği belirlendi (Şekil 3.7). Hareketsizleştirilmiş enzimin değiştirilmiş yapısı veya enzimin aktif bölgesine substratın azaltılmış erişilebilirliği, enzimin substrata olan afinitesinin nasıl değiştiğini belirler. Bu nedenlerden dolayı immobilize pektinazın serbest pektinaza göre daha düşük V_{max} değerine sahip olduğu gösterilmiştir (Çizelge 3.1). İmmobilize pektinazın bağlanmamış pektinaza göre daha büyük bir K_m değerine sahip olduğu gösterilmiştir. Enzim ve destek arasındaki etkileşim hakkında bilgi verebilmek için serbest ve immobilize enzimin K_m değerlerinin karşılaştırılması hayati önem taşımaktadır. İmmobilizasyonun ardından K_m 'deki artış, immobilize edilmiş enzimin, bağlanmamış enzimle karşılaştırıldığında substratına yönelik afinitesinin azaldığını gösterir; bunun, desteğin aktif bölgeyi sterik bir bariyere koyabilmesi nedeniyle olduğu düşünülüyor.

Enzimin immobilizasyonu sonucu esnekliğinin azalması, substrat bağlanmasının zorlaşmasına ve substrat ya da ürünlerin difüzyonunun sınırlandırılmasına yol açarak K_m değerinin artmasına neden olabilir.

Çizelge 3.1 Kinetik parametreleri.

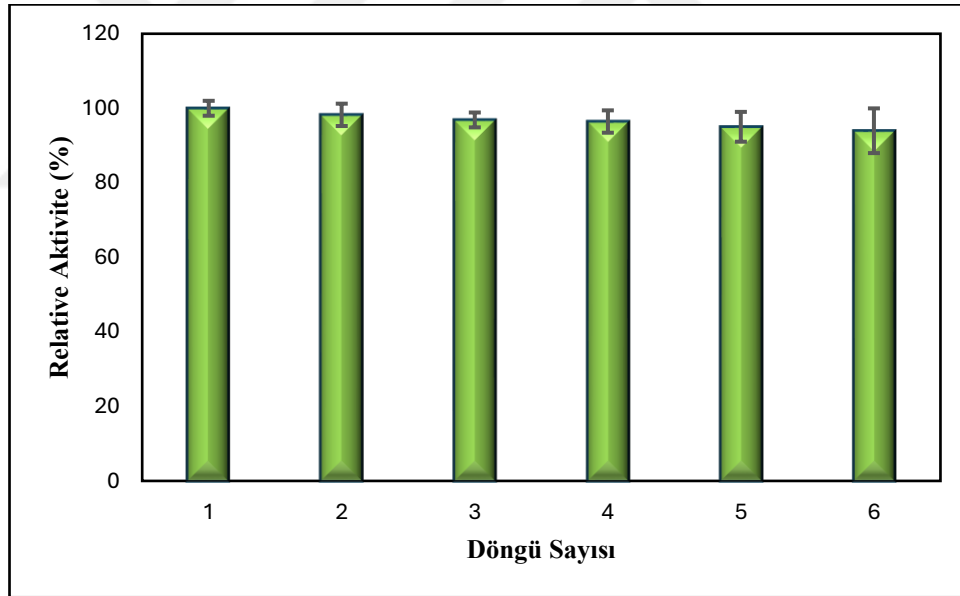
	K_m (% w/v)	V_{max} ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
Serbest	0.83	60.75×10^{-2}
İmmobilize	1.51	1.82×10^{-2}



Şekil 3.7 Serbest ve hareketsiz pektinazın Lineweaver Burk eğrisi.

3.7 Tekrar Kullanılabilirlik

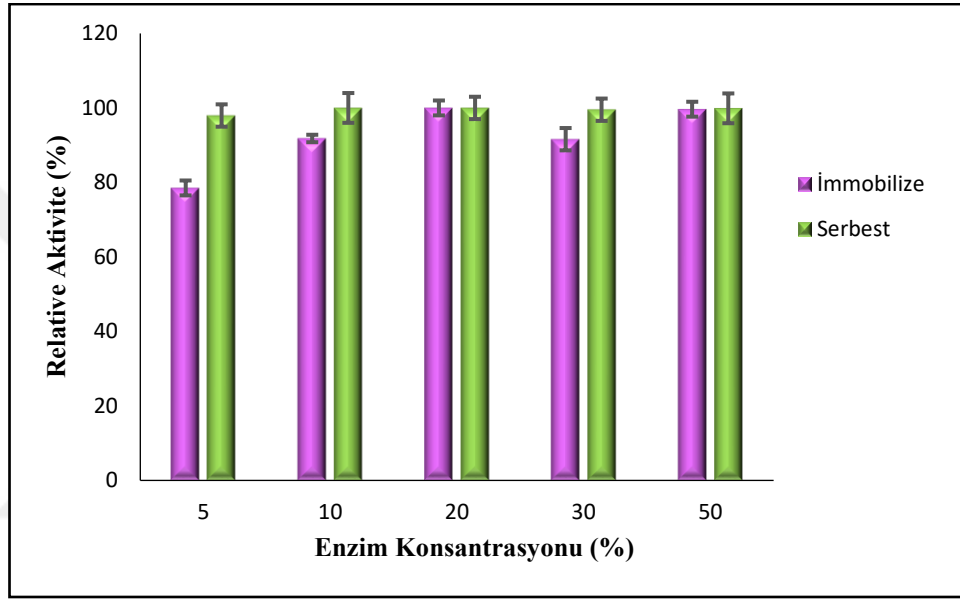
Endüstriyel bağlamda enzimin immobilizasyon yoluyla yeniden kullanılabilirliği önemli bir faktördür. Hareketsizleştirilmiş pektinazın yeniden kullanımı incelenmiş ve Şekil 3.8'de sunulmuştur. Immobilizasyon sonrasında enzimin 6 kullanım sonrasında %94'e yakın aktivitesini koruduğu ve yüksek yeniden kullanım stabilitesine sahip olduğu gözlemlendi. Serbest enzimin tekrar kullanılma durumu saptanmamıştır. Hareketsizleştirilmiş pektinazın aktivitesindeki kaybın, enzimin bozulmasından ya da aktif konformasyonunun mekanik hasar görmesi sonucu doğal olarak meydana gelebileceği belirtilmiştir. Literatürde bildirilen çalışmada immobilize pektinazın 5 tekrarlı kullanımdan sonra başlangıç aktivitesini %45 oranında koruduğu belirlenmiştir [63]. Immobilize pektinaz aktivitesindeki bu azalmanın, enzim bozulması veya aktif konformasyonun mekanik olarak hasar görmesi gibi nedenlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir [64].



Şekil 3.8 Kitosan borik asit boncukları üzerine immobilize edilmiş pektinazın yeniden kullanılabilirliği.

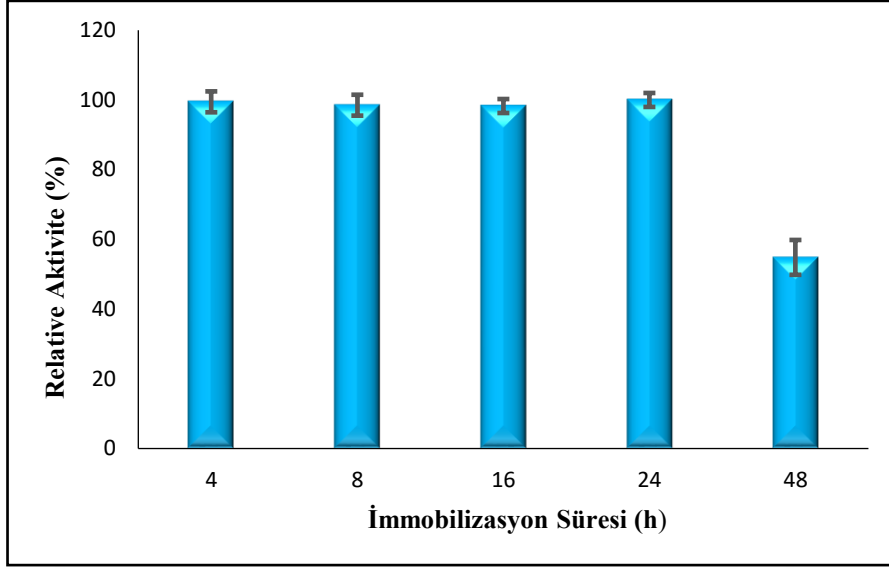
3.8 Enzim Konsantrasyonunun ve İmmobilizasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivite deneylerinde immobilize pektinazın optimum konsantrasyonunu belirlemek için farklı enzim konsantrasyonları kullanıldı (5-50 mg/ml). Serbest enzim için optimum konsantrasyon 10 mg/ml ve 20 mg/ml olarak belirlendi. Konsantrasyon artışının serbest enzimin bağıl aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmadığı belirlendi. İmmobilize enzimde optimum enzim konsantrasyonu 20 mg/ml olarak bulundu (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Enzim konsantrasyonunun etkileri.

Pektinazın kitosan-borik asit boncuklarına immobilize edilmesi için gereken optimum süre araştırılmış ve Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Optimum immobilizasyon süresinin 24 saat olduğu belirlenmiştir. Zaman ve sıcaklığa bağlı denatürasyonla ilişkili olabilecek aktivite kaybı nedeniyle 48 saat sonra aktivitede bir azalma gözlemlenmiştir. Çalışılan immobilizasyon süresi, özellikle zamana bağlı denatürasyona neden olmamak için 4 saat olarak seçilmiştir.

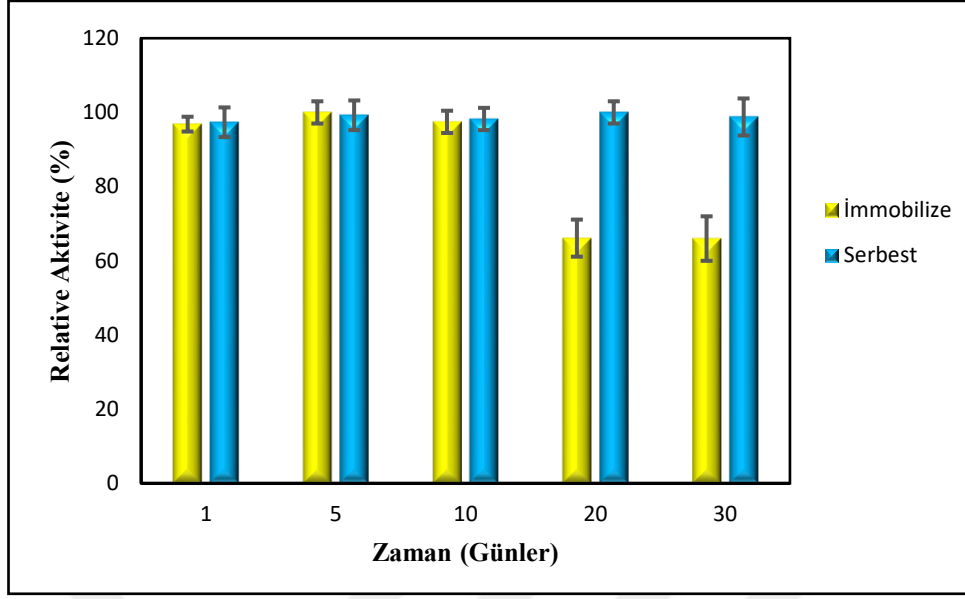


Şekil 3.10 İmmobilizasyon süresinin etkisi.

3.9 Depolama

Serbest ve immobilize pektinaz 4°C'de depolama kararlılığı açısından araştırıldı (Şekil 3.11). İmmobilize pektinaz ve serbest pektinaz aktivitelerini 10 gün boyunca korudu. Serbest pektinaz aktivitesini 30 gün korurken, immobilize pektinazın aktivitesi 20 gün boyunca korundu. Depolama kararlılığı açısından, immobilize pektinaz aktivitesinin ilk on günde yüksek olduğu söylenebilir. İmmobilize pektinazın depolama kararlılığının serbest pektinaza göre daha düşük olduğu bulundu.

Bunun birkaç nedeni olabilir; Enzimin zamanla çözeltiye yavaşça sızma olasılığı, tampon çözeltide depolama sırasındaki çevresel koşullara bağlı olma olasılığı veya immobilizasyonla oluşan yeni ortam zamanla enzimde denatürasyona neden olabilir.



Şekil 3.11 Depolama süresinin etkileri.

4. TARTIŞMA

Çok çeşitli endüstriyel işlemlerde (gıda, temizlik, tıp vb.) hidrolaz olarak kullanılan pektinazların, mikrop, hayvan ve bitkilerden izolasyonu, immobilizasyonu ve bazı biyokimyasal ve endüstriyel özelliklerinin tayini ile ilgili geniş çaplı araştırmalara literatürde sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu çalışma kapsamında da *Aspergillus niger* 'den izole edilen pektinazın kitosan bazlı desteğe immobilizasyonu, serbest ve immobilize enzimin bazı özelliklerinin belirlendi ve birbirleriyle karşılaştırıldı.

Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları genişledikçe, yapılarından kaynaklanan bazı sorunlar ticari kullanımlarında kısıtlamalar getirmektedir. Her ne kadar enzimler uygun koşullar sağlandığında doğal ortamlarının dışında da aktivite gösteriyor olsalar da pH ve sıcaklık gibi çeşitli inhibisyon etkilerine açık olmaları, reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılamamaları, tekrarlı kullanılamamaları gibi çeşitli zorluklarla karşılaşılmaktadır. Ortaya çıkan bu zorlukların üstesinden gelebilmek için enzimler uygun destek materyallerine immobilize edilmektedirler.

Bütün bunlar doğrultusunda mevcut sorunları çözüme kavuşturabilmek amacıyla pektinaz enziminin farklı destekler üzerinde immobilizasyonuna literatürde geniş ölçekte yer verilmiştir.

İmmobilizasyonla ilgili yapılan çalışmada farklı destek materyalleri kullanarak pektinaz enzimini immobilize edip aktiviteleri incelenmiştir [65]. Aynı şekilde aktive edilmiş pektinazı aljinat-montmorillonit boncukları üzerine immobilize edip serbest ve immobilize enzim aktivitelerini karşılaştırılmıştır [54]. Yapılan bu çalışmada mikrobiyal kaynaklı pektinaz enziminin çift çapraz bağlı kitosan-borik asit boncukları üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilerek kinetik parametreleri hesaplanarak özellikleri karşılaştırıldı.

İmmobilizasyon için olası çeşitli yöntemler ve destekler mevcuttur. İmmobilizasyon işleminde uygulanan yönteme uygun destek seçilerek immobilizasyon gerçekleştirilir. Bu tez çalışmasında kullanılan immobilizasyon yöntemi çapraz bağlama yöntemi olup destek materyali olarak kitosan-borik asit seçildi. Çapraz bağlama yöntemi pektinaz enzim immobilizasyonu için sıklıkla kullanılan bir yöntemlerden biridir.

Literatürde çeşitli kaynaklardan izole edilen pektinazları farklı çapraz bağlama yöntemine göre immobilize edip aktivite açısından karşılaştırmaları rapor edilmiştir [66,67].

Yapılan bu çalışma kapsamında, kitosan-aljinat-kil boncuklara immobilizasyon işlemi çapraz bağlama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Protein tayinleri Bradford metodu ile yapıldı. Standart protein çözeltisi olarak sığır serum albümini kullanıldı ve standart grafiği çizildi (Şekil 3.4). Serbest enziminin, protein miktarları bu standart grafikten yararlanılarak belirlendi.

İmmobilizasyonda enzim aktivitesini etkileyen birden çok faktör mevcuttur. Bunlardan bazıları; enzim konstrasyonu, immobilizasyon süresi, sıcaklık, pH ve yeniden kullanılabilirliktir. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonunun, immobilizasyon veriminin maksimum seviyelere ulaşmasını sağlayacağını, enzim yüklü boncukların tekrar kullanılabilirliğinin ve kararlılığının artacağını bildirilmiştir [68].

İmmobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha avantajlı hale getiren bir yöntemdir ve enzimin sıcaklık, pH gibi değerlerinin çalışma aralığı genişletilebileceği gibi aynı zamanda değiştirilebilir.

Optimum pH belirleme çalışmasında tampon olarak 0.1 M sodyum asetat/asetik asit, pH 3,0–6,0 ve 0,1 M $\text{Na}_2\text{HP0}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0-8,0 tamponu kullanıldı. Serbest enzim, immobilize enzime göre daha geniş bir pH aralığında daha yüksek aktivite sergiledi. Her iki enzim için optimum pH 5 olarak belirlendi. Benzer olarak yapılan bir çalışmada pektinaz aktivitesinin ölçümü, serbest ve immobilize enzim için de optimum pH 4-5 arası değere sahip olduğunu ve enzimin pH 4'te yüksek aktivite seviyesini koruduğunu gösterdi [69].

Optimum sıcaklık belirleme çalışmasında serbest ve immobilize pektinaz enzim aktivite çalışması ve 4°C ile 60°C arasında değişen farklı sıcaklıklarda yürütüldü. Her iki enzimin aktivitesi sıcaklık değişiminden fazla etkilenmemiş ve optimum sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir.

V_{max} reaksiyon hızı ve K_m , Micheals Menten sabiti Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulundu (Şekil 3.7 a ve Şekil 3.7 b). Serbest ve immobilize pektinazın

K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri yardımıyla aktivite tayini yapıldı.

Serbest enzim, için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, 0,83 (%w/v) ve $60,75 \times 10^{-2}$ ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$), immobilize enzim için ise 1,51 (%w/v) ve $1,82 \times 10^{-2}$ ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak bulundu. Benzer bir çalışmada pektinazın kitosan manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonu sonucu serbest enzim için sırasıyla K_m ve V_{max} değerleri, 0,68 μM ve 5,98 $\mu\text{mol. min}^{-1} / (\text{mg protein})$ olarak belirlenmiştir [70].

Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında immobilizasyon sonrasında enzimin 6 kullanım sonrasında %94'e yakın aktivitesini koruduğu ve yüksek yeniden kullanım stabilitesine sahip olduğu gözlendi. Polimer destek üzerine immobilize edilen *Aspergillus aculeatus* pektinazının tekrar kullanılabilirlik çalışmasında, immobilize enzimin 10 döngü sonunda aktivitenin %85'e yakın korunduğu belirlenmiştir [71]. Yapılan alışmalar sonucunda immobilize enzimde yaşanan aktivite kayıplarının yıkama sırasında meydana gelen mekanik hasarlardan kaynaklanıyor olabilir olduğu düşünülmektedir.

İmmobilize enzimin depo kararlılığını belirlemek için belirli gün aralıklarında buzdolabı koşullarında 4 °C'de depolanarak aktiviteleri takip edildi. Serbest pektinaz aktivitesini 30 gün korurken, immobilize pektinazın aktivitesi 20 gün boyunca korundu. Depolama kararlılığı açısından, immobilize pektinaz aktivitesinin ilk on günde yüksek olduğu söylenebilir. İmmobilize pektinazın depolama kararlılığının serbest pektinaza göre daha düşük olduğu bulundu. Bu tez çalışmasında pektinazın depolama stabilitesi, immobilizasyon nedeniyle önemli ölçüde iyileştirildi.

Pektinaz enzim miktarının optimizasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (5-50 mg/ml) enzim kullanılmıştır (şekil 3.11). Konsantrasyon artışının serbest enzimin bağlıl aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmadığı belirlendi. İmmobilize enzimde optimum enzim konsantrasyonu 20 mg/ml olarak bulundu. Öte yandan, enzim konsantrasyonu arttıķa biyokatalizörlerin aktiviteleri de artmıştır.

İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için farklı srelerde immobilizasyon gerçekleştirilmiştir (şekil 3.10). *Bacillus licheniformis* pektinazının kitosan boncukları üzerine immobilizasyonu çalışmasında, enzimin

kitosan taneciklerine bağlanma etkinliğinin çapraz bağlama süresinin artmasıyla arttığı ve maksimum etkinliğin 3 saatlik inkübasyondan sonra bulunduğu bildirilmiştir [72].



KAYNAKÇA

- [1] **Copeland, R. A.** (2023). Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. *John Wiley & Sons*.
- [2] **Singh, R. S., Singh, T., and Pandey, A.** (2019). Microbial enzymes—an overview, *Advances in enzyme technology*, 1-40.
- [3] **Khan, M. R.** (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review, *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 1-13.
- [4] **Okpara, M. O.** (2022). Microbial enzymes and their applications in food industry: a mini-review, *Advances in Enzyme Research*, 10(1), 23-47.
- [5] **Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V.** (2013) A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond, *BioMed Research International*, 2013, Article ID: 329121.
- [6] **Singh, S. and Bajaj, B.K.** (2016) Bioprocess optimization for production of Thermoalkali-stable Protease from *Bacillus subtilis* K-1 under Solid-State Fermentation, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46, 717-724.
- [7] **Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., and Zhou, S.** (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives, *Molecular Biotechnology*, 61, 579-601.
- [8] **Haile, S., and Ayele, A.** (2022). Pectinase from microorganisms and its industrial applications, *The Scientific World Journal*, 2022.
- [9] **Shrestha, S., Rahman, M. S., and Qin, W.** (2021). New insights in pectinase production development and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 9069-9087.
- [10] **Tapre, A.R., and Jain, R.K.** (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry, *Int Food Res J*, 21:447–453.
- [11] **Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., and Mahajan, R.** (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries, *3 Biotech*, 6, 1-13.

- [12] **Kavuthodi, B., and Sebastian, D.** (2018). Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species, *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11(1), 18-30.
- [13] **Rehman, H., Baloch, A. H., and Nawaz, M. A.** (2021). Pectinase: immobilization and applications. A review, *Trends in Peptide and Protein Sciences*, 6, 1-16.
- [14] **Kadija Tul Kubra, S. A., and Manam Walait, H. S.** (2017). Potential Applications of Pectinases in Food, *Agricultural and Environmental Sectors*.
- [15] **Chaturvedula, V. S. P., and Prakash, I.** (2011). The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2110-2124.
- [16] **Praveen, K. G., and Suneetha, V.** (2014). A cocktail enzyme-pectinase from fruit industrial dump sites: a review.
- [17] **Bristi, U., Pias, A.K., and Lavlu, F.H.** (2019). A Sustainable process by bioscouring for cotton knitted fabric suitable for next generation, *J Text Eng Fash Technol*, 5:41–48
- [18] **Bhardwaj, V., Degrassi, G., and Bhardwaj, R. K.** (2017). Microbial pectinases and their applications in industries: a review, *Polymer*, 4(8), 829-836.
- [19] **Ortiz, G. E., Ponce-Mora, M. C., Nosedá, D. G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M. C., and Albertó, E. O.** (2017). Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(2), 197-211.
- [20] **Iconomou, D., Arapoglou, D., and Israilides, C.** (2010). Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing, *Grasas y Aceites*, 61(3), 303-311.
- [21] **Patidar, M. K., Nighojkar, S., Kumar, A., and Nighojkar, A.** (2018). Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review, *3 Biotech*, 8(4), 199.

- [22] **Lavanya, S., and Gayatri, R.** (2021). A review on microbial production of amylase and pectinase from agricultural waste: biotechnology and scope, *Asian Journal of Science and Technology*, 12(01), 11468-11479.
- [23] **Martín, M. C., López, O. V., Ciolino, A. E., Morata, V. I., Villar, M. A., and Ninago, M. D.** (2019). Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking, *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 18, 101091.
- [24] **Datta, S., Christena, L. R., and Rajaram, Y. R. S.** (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3, 1-9.
- [25] **Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F., and Ghoshal, S. K.** (2020). On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview, *Reactive and Functional Polymers*, 152, 104613.
- [26] **Singh, B.D.** (2009). Biotechnology expanding horizons.
- [27] **Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., and Azzazy, H. M. E. S.** (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications, *ACS omega*, 8(6), 5184-5196.
- [28] **Spahn, C., and Minteer, S.D.** (2008). Enzyme immobilization in biotechnology, *Recent Pat Eng* 2:195–200.
- [29] **Vineh, M. B., Saboury, A. A., Poostchi, A. A., Rashidi, A. M., and Parivar, K.** (2018). Stability and activity improvement of horseradish peroxidase by covalent immobilization on functionalized reduced graphene oxide and biodegradation of high phenol concentration, *International journal of biological macromolecules*, 106, 1314-1322.
- [30] **Brena, B., González-Pombo, P., and Batista-Viera, F.** (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey, *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, 15-31.
- [31] **Guisan, J. M.** (2013). New opportunities for immobilization of enzymes, *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, 1-13.

- [32] **Dwevedi, A.** (2016). Enzyme Immobilization: Advances in Industry, *Agriculture, Medicine, and the Environment*.
- [33] **Cao, L., van Langen, L., and Sheldon, R. A.** (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current opinion in Biotechnology*, 14(4), 387-394.
- [34] **Sirisha, V. L., Jain, A., and Jain, A.** (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes, *Advances in food and nutrition research*, 79, 179-211.
- [35] **Hartmann, M., and Kostrov, X.** (2013). Immobilization of enzymes on porous silicas—benefits and challenges, *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6277-6289.
- [36] **Bertuoli, P. T., Piazza, D., Scienza, L. C., and Zattera, A. J.** (2014). Preparation and characterization of montmorillonite modified with 3-aminopropyltriethoxysilane, *Applied Clay Science*, 87, 46-51.
- [37] **Burteau, N., Burton, S., and Crichton, R. R.** (1989). Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase, *FEBS letters*, 258(2), 185-189.
- [38] **Martín, C. Ronda, J. C., and Cádiz, V.** (2006). Boron-containing novolac resins as flame retardant materials, *Polym Degrad Stab*, 91, 747.
- [39] **Damera, N.R., and Pasam, V.K.** (2008). Performance profiling of boric acid as lubricant in machining, *J Braz Soc Mech Sci & Eng*, 30, 239-244.
- [40] **Popat, A., Hartono, S. B., Stahr, F., Liu, J., Qiao, S. Z., and Lu, G. Q. M.** (2011). Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers, *Nanoscale*, 3(7), 2801-2818.
- [41] **Kapoor, M., and Kuhad, R. C.** (2007). Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides, *Applied biochemistry and biotechnology*, 142, 125-138.
- [42] **Younes, I., and Rinaudo, M.** (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174.

- [43] Ngah, W. W., Teong, L. C., and Hanafiah, M. M. (2011). Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review, *Carbohydrate polymers*, 83(4), 1446-1456.
- [44] Hussin, F. N. N. M., Attan, N., and Wahab, R. A. (2020). Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies, *Enzyme and microbial technology*, 136, 109506
- [45] Klein, M. P., Scheeren, C. W., Lorenzoni, A. S. G., Dupont, J., Frazzon, J., and Hertz, P. F. (2011). Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization, *Process Biochemistry*, 46(6), 1375-1379.
- [46] Ali, M., and Husain, Q. (2018). Guar gum blended alginate/agarose hydrogel as a promising support for the entrapment of peroxidase: Stability and reusability studies for the treatment of textile effluent, *International journal of biological macromolecules*, 116, 463-471.
- [47] Chakraborty, S. (2017). Carrageenan for encapsulation and immobilization of flavor, fragrance, probiotics, and enzymes: A review, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 36(1), 1-19
- [48] Wan Ngah, W.S., Teong, L.C., Wong, C.S., and Hanafiah, M.A.K.M. (2012). Preparation and characterization of chitosan–zeolite composites, *Journal of applied polymer science*, 1253, 2417-2425.
- [49] Çetinkaya, H. F., Cebeci, M. S., Kaya, S., Jalbani, N. S., Maslov, M. M., and Marzouki, R. (2023). Removal of erythrosine B dye from wastewater using chitosan boric acid composite material: Experimental and density functional theory findings, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 36(12), e4400.
- [50] Romo-Sánchez, S., Arévalo-Villena, M., García Romero, E., Ramirez, H. L., and Briones Pérez, A. (2014). Immobilization of β -glucosidase and its application for enhancement of aroma precursors in muscat wine, *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1381-1392.

- [51] **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- [52] **Miller, G. L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- [53] **Bernfeld, P.** (1955). Amylases α and β . Methods, *Enzymol*, 1 (1959). 149–158.
- [54] **Mohammadi, M., Heshmati, M.K., Sarabandi, K., Fathi, M., Lim, L.T., and Hamishehkar, H.** (2019). Activated alginate-montmorillonite beads as an efficient carrier for pectinase immobilization, *International journal of biological macromolecules*, 137, 253-260.
- [55] **Dornjak, L., Kovačić, M., Ostojić, K., Angaits, A., Szpunar, J., Urlić, I., and Rogina, A.** (2022). Chitosan-boric acid scaffolds for doxorubicin delivery in the osteosarcoma treatment, *Polymers*, 14(21), 4753.
- [56] **Rahmi, R., Marlina, M., and Nisfayat, N.** (2017). Effect of Eggshell on Mechanical Properties of Epichlorohydrin Cross-linked Chitosan/Eggshell Composites, *Orient J Chem*, 33(1).
- [57] **Liu, Y., Li, Q., Feng, Y. Y., Ji, G. S., Li, T. C., Tu, J., and Gu, X. D.** (2014). Immobilization of acid pectinase on graphene oxide nanosheets, *Chemical Papers*, 68, 732-738.
- [58] **Mahesh, M., Arivizhivendhan, K. V., Maharaja, P., Boopathy, R., Hamsavathani, V., and Sekaran, G.** (2016). Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 43-54.
- [59] **Sun, P. P., Liu, Y., Wang, W., Song, G. J., and Ren, Y. Y.** (2023). Regulation mechanism of magnetic field on pectinase and its preliminary application in postharvest sapodilla (*Manilkara zapota*), *Food Chemistry*, 409, 135300.
- [60] **Regina Dewi, S., Mimpin, G., and Jamaran, K.** (2009). A New Adsorbent Chitosan-based That Modified using Epichlorohydrin and Diethylene Triamine for

Treating Heavy Metal (Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+}), *In Proceedings of the 1st International MIPAnet Conference on Science and Mathematics - Volume 1: IMC-SciMath*, ISBN 978-989-758-556-2 pages 65-70.

[61] **Queiroz, M. F., Teodosio Melo, K. R., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., and Rocha, H. A. O.** (2014). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation, *Marine drugs*, 13(1), 141-158.

[62] **Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasan, M. T. M., and Abdellah, A. M.** (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.

[63] **Çetinus, Ş.A., Şahin, E., and Saraydın, D.** (2009). Preparation of Cu (II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization, *Food Chemistry*, 114(3), 962-969.

[64] **Bilal, M., Rasheed, T., Iqbal, H.M.N., Hu, H., Wang, W., and Zhang, X.** (2017). Novel characteristics of horseradish peroxidase immobilized onto the polyvinyl alcohol-alginate beads and its methyl orange degradation potential, *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 328–335.

[65] **Vaz, R. P., Vici, A. C., Teixeira de Moraes Polizeli, M. D. L., Magalhães, P. O., and Filho, E. X. F.** (2021). Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(1), 197-208.

[66] **Wu, H., and Zong, Z.** (2023). Preparation of cross-linked chitosan magnetic microspheres and immobilization of pectinase, *Applied Mathematics and Nonlinear Sciences*.

[67] **Amadi, O. C., Awodiran, I. P., Moneke, A. N., Nwagu, T. N., Egong, J. E., and Chukwu, G. C.** (2022). Concurrent production of cellulase, xylanase, pectinase and immobilization by combined cross-linked enzyme aggregate strategy-advancing tri-enzyme biocatalysis, *Bioresource Technology Reports*, 18, 101019.

- [68] **Alsarra, A., Neau, S. H., and Howard, M. A.** (2004). Effects of Preparative Parameters on the Properties of Chitosan Hydrogel Beads Containing *Candida rugosa* Lipase, *Biomaterials*, 25, 2645-2655.
- [69] **Qi, D., Gao, M., Li, X., and Lin, J.** (2020). Immobilization of pectinase onto porous hydroxyapatite/calcium alginate composite beads for improved performance of recycle, *ACS omega*, 5(32), 20062-20069.
- [70] **Sojitra, U. V., Nadar, S. S., and Rathod, V. K.** (2017). Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker, *Carbohydrate polymers*, 157, 677-685.
- [71] **Rajdeo, K., Harini, T., Lavanya, K., and Fadnavis, N. W.** (2016). Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice, *Food and Bioproducts Processing*, 99, 12-19.
- [72] **Rehman, H. U., Nawaz, M. A., Aman, A., Baloch, A. H., and Qader, S. A. U.** (2014). Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 282-287.

EKLER

EK-1 Materyaller

Cihaz	Marka/Model
Hassas Terazı	PRESİCA XB220A (0.01G-220G)
Manyetik karıştırıcı (Tekli)	IKA RH B2
pH metre	METTLER TOLEDO S210 K
Etüv	Ecocell 55
Etüv (çalkalamalı)	SHELLAB SI6-2
Buzdolabı (+4°C)	ARÇELİK 4243TMB
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-1800

EK-2 Kimyasallar

Kimyasallar	
Asetik asit	NaOH
Borik Asit	<i>o</i> -fosforik asit
CH ₃ COONa	Pektinaz (from <i>Aspergillus niger</i>)
Comassie Brilliant Blue G-250	Poligalaktronik asit
3,5-dinitrosalisilik asit	Potasyum sodyum tartarat
D-galaktronik asit	Sodyum aljinat
Epiklorohidrin	Sodyum tripolifosfat
Etanol	Sığır serum albumin
Kitosan	NaH ₂ PO ₄

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analizler için uygun analitik saflıktadır.

EK-3 Çözeltiler

3.1 Bradford belirteci

Malzemeler	
Comaasie Brilliant Blue	100 mg
%95'lik Etanol	50 ml
%8,5'lik o-fosforik asit	100 ml
dH ₂ O	850 ml

50 ml Etanolün üzerine 100 mg Comassie Brilliant Blue eklenerek karıştırılır. Çözündükten sonra üzerine 850 ml dH₂O eklenir. Son olarak da o-fosforik asit eklenerek 15 dk daha karıştırılır.

3.2 DNSA belirteci

Malzemeler	
3,5-dinitrosalisilik asit	1 g
Sodyum potasyum tartarat	30 g
2 N NaOH	20 ml
dH ₂ O	80 ml

1 gram 3,5-dinitrosalisilik asit 50 ml suda çözünür. Üzerine yavaş yavaş 30 gram sodyum potasyum tartarat eklenerek sarı renk oluşması beklenir. Üzerine 2 ml 2N NaOH eklenerek karıştırılır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

3.3 NaOH (2N)

1,6 gram NaOH tartılarak 20 ml suda çözündürülür.

3.4 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5)

2,14 gram CH₃COONa.3H₂O tartılarak 200 ml suda çözündürülür. Üzerine damla damla 0,52 ml asetik asit eklenerek pH'sı 5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.