

**POLİ(PHE-LYS) İLE MODİFİYE EDİLEN
POLİSTİREN YÜZEYLERDE
İNVERTAZIN İMMOBİLİZASYONU
VE
KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

34277

**POLY(PHE-LYS) MODIFICATION OF
POLYSTYRENE SURFACES
FOR INVERTASE IMMOBILIZATION
AND
INVESTIGATION OF KINETICS**

Kamile Nazan TURHAN

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

1994

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
Prof. Dr. İbilge SALDAMLI

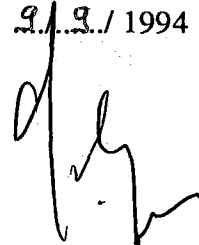
Üye :
Prof. Dr. Serdar S. ÇELEBİ

Üye :
Doç. Dr. Mehmet MUTLU

ONAY

Bu tez/...../ 1994 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

9.9.1994



Prof. Dr. Gültekin GÜNAY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, polistiren taşıyıcı matriks yüzeyinin poli(phe-lys) kullanılarak modifiye edilmesi ve enzim immobilizasyonu için uygunluğunun araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, polistiren küreciklerin yüzeyleri poli(phe-lys) kullanılarak amino gruplarıyla zenginleştirilmiş ve model enzim olarak seçilen invertaz glutaraldehit kullanılarak kovalent bağlama yöntemiyle yüzeye immobilize edilmiştir. İvertazın, poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeye en iyi immobilize edilebildiği optimal koşullar belirlenmiş ve bu koşullarda hazırlanan immobilize invertazın kinetik davranışı serbest invertazinkiyle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Polistiren ve poli(phe-lys) ile kaplanan polistiren yüzeylerin kimyasal yapısı, FTIR-ATR spektroskopik tekniği ile incelenmiştir. Poli(phe-lys) modifikasyonu ve glutaraldehit aktivasyonu sonucu enzim immobilizasyonu için hazırlanan polistiren yüzeylerde, invertaz immobilizasyonuna etki eden parametreler, başlangıç poli(phe-lys) derişimi, başlangıç glutaraldehit derişimi, sıcaklık, pH, ve başlangıç invertaz derişimi olarak incelenmiştir. Bu grup deneyler sonunda en uygun immobilizasyon şartları % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) başlangıç derişimi, % 2 (v/v) glutaraldehit başlangıç derişimi, 8 mg/ml' den büyük başlangıç invertaz derişimi, 25°C sıcaklık ve pH 4.5 olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünde serbest ve immobilize invertaz ile sakkaroz hidroliz kinetiği kesikli bir düzenekte optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 55°C' de, ortam karıştırma hızı, serbest enzim sistemi için 550 dev/dk ve immobilize enzim sistemi için 1200 dev/dk' da incelenmiştir. Serbest ve immobilize invertazın Michaelis-Menten sabiti, K_m , ve maksimum tepkime hızı, V_{max} , değerleri karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır ve K_m değerleri sırasıyla 81 ve 114 mM olarak saptanırken, V_{max} değerleri de sırasıyla 10.13 ve 9.20 μmol glikoz/dk/mg invertaz olarak bulunmuştur.

İvertazın işletme koşullarındaki deaktivasyonu her iki sistem için, invertaz aktivitesine birinci dereceden kinetik ile bağımlı olduğu kabul edilerek deaktivasyon katsayıları, k_d , saptanmış ve invertaz aktivitesi yarı ömür değerleri, $t_{1/2}$, hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize invertaz için k_d değerleri sırasıyla 0.0347 dk^{-1} ve 0.0098 dk^{-1} olarak saptanırken, $t_{1/2}$ değerleri de sırasıyla 20 dk ve 71 dk olarak hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Enzim immobilizasyonu; Taşıyıcı polimer matriks; Polistiren; Poli(phe-lys); Yüzey modifikasyonu; İvertaz; Enzim kinetiği

ABSTRACT

Ultimate purpose of the study was to modify polystyrene surfaces with poly(phe-lys) and to investigate its usability for enzyme immobilization. Surface of the polystyrene beads were enhanced with amino groups by using poly(phe-lys) and invertase as a model enzyme was covalently attached to the surface by using glutaraldehyde. Conditions were searched for optimum invertase immobilization and the kinetic behavior of the immobilized enzyme was investigated by comparing with that of the free invertase.

Chemical properties of the polystyrene and modified polystyrene surfaces were investigated by using FTIR-ATR spectrophotometer technique. Initial poly(phe-lys) concentration, initial glutaraldehyde concentration, temperature, pH, and initial invertase concentration were investigated for their effect on immobilization of invertase to modified polystyrene surfaces. The optimum conditions have been determined as 0.01 % (w/v) initial poly(phe-lys) concentration, 2 % (v/v) initial glutaraldehyde concentration, 25°C and pH 4.5, and initial invertase concentration greater than 8 mg/ml.

In the second part of the study, the kinetics of sucrose hydrolysis by free and immobilized invertase was investigated in a batch reactor system at the optimum conditions of pH 4.5 and 55°C. Stirring rate was fixed at 550 rpm and 1200 rpm for the free and immobilized enzyme systems, respectively. Values of the Michaelis-Menten constant, K_m , and the maximum reaction velocity, V_{max} , were discussed comparatively for both systems. K_m values were estimated as 81 and 114 mM for free and immobilized invertase, respectively. V_{max} values were estimated as 10.13 and 9.20 $\mu\text{mol glucose/min/mg enzyme}$ for free and immobilized invertase, respectively.

Invertase deactivation was assumed to be dependent on active invertase concentration through first order kinetic behavior in working conditions. Deactivation reaction rate constant, k_d , and then enzyme half-life, $t_{1/2}$, was determined for both systems. k_d values were estimated as 0.0347 min^{-1} and 0.0098 min^{-1} for free and immobilized invertase, respectively. $t_{1/2}$ values were estimated as 20 min and 71 min for the free and immobilized invertase, respectively.

KEY WORDS: Enzyme immobilization; Carrier polymer matrixs; Polystyrene; Poly(phe-lys); Surface modification; Invertase; Enzyme kinetics

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleŐmesine her bakımdan destek olan tez danıŐmanım, Sayın Doç.Dr. Mehmet Mutlu' ya ve özellikle enzim kinetiği ile ilgili çalışmaların gerçekleŐtirilmesi için her türlü imkanı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen, Sayın Prof.Dr. Serdar S. Çelebi' ye, polistiren küreciklerin temininde bize yardımcı olan Sayın Prof.Dr. Ahmet R. zdural' a ve H.Ő. Kimya Mühendisliği Bölümü' ne, ayrıca çalışmanın yürütülmesinde H.Ő. Nükleer Tıp Anabilim Dalı' nda bana çalışma imkanı sağlayan Sayın Doç.Dr. Meral Ercan' a, çalışmalar sırasında samimi yardımlarını gördüğüm zen zboy, Levent Koç, Belgin Al, Dr.Selma Mutlu ve her zaman yanımda olan sevgili eŐim Mahir Turhan' a içtenlikle teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzimler	2
2.1.1. Enzimlerin Yapısı	2
2.1.2. Enzimlerin Katalitik Özellikleri.....	2
2.1.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	3
2.2. Enzim Tepkimelerinin Kinetiği.....	5
2.2.1. İmmobilize Enzim Kinetiği.....	8
2.2.2. Enzimlerin Deaktivasyonu.....	10
2.3. Enzimlerin İmmobilizasyonu	11
2.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri	12
2.3.2. Enzim İmmobilizasyonunda Yöntem ve Taşıyıcı Seçimi.....	20
2.4. İnvertaz	21
2.4.1. Genel Bilgiler	22
2.4.2. İnvertazın Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	24
2.4.3. İnvertaz İmmobilizasyonu	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Kullanılan Maddeler	27
3.1.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.2. Polistiren Yüzeylerin Karakterizasyonu	28
3.3. Polistiren Yüzeylerin Poli(phe-lys) ile Modifikasyonu	30

	<u>Sayfa</u>
3.3.1. Poli(Phe-Lys) ile Kaplanmış Polistiren Yüzeylerin Karakterizasyonu.....	31
3.4. Modifiye Polistiren Yüzeylerin Glutaraldehit ile Aktivasyonu	31
3.5. İnvertzın Radyoaktif İşaretlenmesi	31
3.5.1. Radyoaktif İşaretlenmiş İnvertzın Kalite Kontrolü.....	32
3.6. Modifiye Polistiren Yüzeylerde İnvertz İmmobilizasyonu	33
3.7. Sakkarozun İnvertz ile Hidroliz Kinetiğinin İncelenmesi	33
3.7.1. Deney Düzenegi	33
3.7.2. Deneylerin Yapılışı	34
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Polistirenin Yüzeylerin FTIR-ATR Tekniğı ile Tanımlanması	36
4.2. Polistiren Yüzeylerin Poli(phe-lys) ile Modifikasyonu	38
4.3. Poli(Phe-Lys) ile Kaplanmış Polistiren Yüzeylerin FTIR-ATR Tekniğı ile Tanımlanması	40
4.4. Modifiye Yüzeylerin Glutaraldehit ile Aktivasyonu	42
4.5. İnvertzın Radyoaktif İzleyici ile İşaretlenmesi	44
4.6. Polistiren Yüzeylerde İnvertz İmmobilizasyonu	44
4.6.1. Poli(phe-lys) Derişiminin Etkisi	45
4.6.2. Glutaraldehit Derişiminin Etkisi.....	46
4.6.3. Fizikokimyasal Parametrelerin Etkisi	47
4.6.4. Başlangıç İnvertz Derişiminin Etkisi.....	49
4.7. Sakkarozun İnvertz ile Hidroliz Kinetiğinin İncelenmesi	49
4.7.1. İnvertzın Deaktivasyonu	56
5. SONUÇLAR	58
6. KAYNAKLAR	60

EKLER

Ek 1 Glikozun Mutorotasyonu

Ek 2 Bazı Polimerik Yapıların Kimyasal Bağlarına Ait Enerji Seviyeleri

SİMGELER VE KISALTMALAR

a	Enzim Aktivitesi,
a_0	Başlangıç Enzim Aktivitesi
[E]	Serbest Enzim Derişimi (mol/l)
[E _i]	Herhangi Bir Andaki Enzim Derişimi (mol/l)
[E ₀]	Başlangıç Enzim Derişimi (mol/l)
[ES]	Enzim-Substrat Arabileşigi Derişimi (mol/l)
k_d	Enzim Deaktivasyonu Hız Sabiti (dk ⁻¹)
K_m	Michaelis-Menten Sabiti (mol/l)
k_1, k_2, k_3	İleri ve Geri Yöndeki Tepkime Hız Sabitleri
[P]	Ürün Derişimi (mol/l)
[S]	Serbest Substrat Derişimi (mol/l)
[S _i]	Ara Yüzey Substrat Derişimi (mol/l)
$t_{1/2}$	Aktivite Yarı Ömrü (dk)
v	Başlangıç Tepkime Hızı (µmol substrat/dk/mg enzim)
v_t	Herhangi Bir Andaki Tepkime Hızı (µmol substrat/dk/mg enzim)
v'	Difüzyon Direnci Olduğu Durumda İmmobilize Enzim Sisteminde Ölçülen Tepkime Hızı (µmol substrat/dk/mg enzim)
V_{max}	Maksimum Tepkime Hızı (µmol substrat/dk/mg enzim)
η	Etkinlik Faktörü
ATR	Attenuated Total Reflectance
E.C.	Enzyme Commission
E.U.	Enzim Birimi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GA	Glutaraldehit
ITLC	Impregnated Thin Layer Chromatography
Poli(phe-lys)	Fenilalanin ve lizin polimeri
PS	Polistiren
YSI	Yellow Springs Instruments

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Tepkime hızının substrat derişimi ile değişimi 5
2.2	Enzimatik tepkime hızının Lineweaver-Burk grafiği ile değerlendirilmesi 9
2.3	Enzim immobilizasyon yöntemleri 14
2.4	Taşıyıcı yüzeye enzimin doğrudan ve spacer yardımıyla kovalent bağlanması 16
2.5	Cam yüzeyin aminoalkiletoksisilan ile aktivasyonu 17
2.6	Glutaraldehit yardımıyla enzimin cama bağlanması 18
2.7	Oksiran gruplarca zengin taşıyıcıya enzim bağlanması 18
2.8	Taşıyıcının klorit ile aktivasyonu ve enzim immobilizasyonu 19
2.9	Siyanojen bromür aktivasyonu ve enzimin yüzeye immobilizasyonu..... 20
2.10	Sakkarozun hidroliz tepkimesi 23
2.11	Sakkaroz-invertaz arabileşinin oluşumu 24
3.1	Polistiren membran üretimi 29
3.2	Deney düzeneğinin şematik görünümü..... 34
4.1	Polistirenin yapısı 36
4.2	Çalışmada kullanılan polistirenin (Petkim, Türkiye) ATR-FTIR spektrumu 37
4.3	Ticari bir polistirenin ATR-FTIR spektrumu (Krause, 1983) 38
4.4	Fenilalanin, lizin ve poli(phe-lys)' in kimyasal yapısı 38
4.5	Poli(phe-lys)' in FTIR spektrumu 41
4.6	Polistiren ve poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylerin karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumları 42
4.7	Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylere glutaraldehit aracılığı ile enzim immobilizasyonu 43
4.8	Farklı başlangıç invertaz derişiminin enzim immobilizasyon verimine etkisi 50
4.9	Karıştırma hızının maksimum enzimatik tepkime hızı ve Michaelis-Menten sabitine etkisi 51
4.10	Serbest invertaz için başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi 53

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
4.11	İmmobilize invertaz için başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi	53
4.12	Serbest invertaz için Lineweaver Burk grafiği	54
4.13	İmmobilize invertaz için Lineweaver Burk grafiği	55
4.14	Tepkime hızının zamanla değişimi	56
4.15	Invertaz aktivitesinin zaman ile değişimi	57



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	Enzimlerin kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar	17
2.2	İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	22
4.1	Polistiren yapısında bulunan temel gruplar ve ilgili spektral bölgeler	37
4.2	Kovalent bağlanma için amino asitlerin bağlı kullanılabilirliği	40
4.3	Poli(phe-lys) yapısında bulunan temel gruplar ve ilgili spektral bölgeler..	41
4.4	Yüzey modifikasyonunda kullanılan poli(phe-lys) derişiminin invertaz immobilizasyon verimine etkisi	45
4.5	Yüzey modifikasyonunda kullanılan glutaraldehit derişiminin enzim immobilizasyon verimine etkisi	46
4.6	Enzim immobilizasyonuna sıcaklığın etkisi	48
4.7	Enzim immobilizasyonuna pH' nın etkisi	49
4.8	Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişim değerler	52

1.GİRİŞ

Enzimler yüksek seçicilik ve aktivite gösteren biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları çoğunlukla sıvı ortamda gerçekleştirildiğinden, enzimin geri kazanımı mümkün değildir. Bunun sonucu olarak enzimin yeniden kullanılamaması maliyeti önemli ölçüde artırır. Serbest enzim, tepkime ortamından istenildiği anda uzaklaştırılmadığından tepkimenin kontrolü güçtür, hatta olanaksızdır. Tepkimeyi istenilen anda durdurmak için enzimi inaktive edici işlemler uygulanır. Bunlardan biri olan inhibitör katılması, tepkime ürünlerine bir kirlilik unsuru olarak ekleneceğinden ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti yükseltir. Ayrıca serbest enzimlerin kısmen kararsız olmaları, sürekli üretim sistemlerinde uygulanamamaları, mekanik dayanıksızlıkları gibi sorunları çözümlenebilmek için enzimler, çeşitli yöntemlerle immobilize edilmektedirler (Telefoncu, 1986).

İmmobilize enzim kullanımı, serbest enzim kullanımının yarattığı kısıtlayıcı koşulları azaltabilmektedir. Böylece sürekli sistemde çalışabilmekte, sistemin denetimi kolaylaşmakta, enzimlerin işletme koşullarında etkin oldukları süre daha uzun olmakta ve enzimin uzun süre aktivitesini kaybetmeden birden fazla kullanımıyla prosesin katalizör bileşeninin fiyatı, maliyeti azaltmaktadır. Bu nedenle endüstriyel öneme sahip enzimlerle ilgili immobilizasyon çalışmaları günümüzde, her alanda yaygın olarak sürmektedir (Gemeiner, 1992).

Bu araştırmanın amacı, endüstriyel öneme sahip enzimlerin polimerik taşıyıcı matrikslerin yüzeyine immobilize edilebilmeleri için uygun bir polimer yüzey modifikasyonunu gerçekleştirmektir. Araştırma kapsamında, poli(phe-lys) ile modifiye edilen polistiren kürecik yüzeylere, model enzim olarak seçilen invertazın immobilizasyonu ve poli(phe-lys) derişimi, glutaraldehit derişimi, pH, sıcaklık, başlangıç invertaz derişimi gibi çeşitli parametrelerin immobilizasyona etkileri, immobilizasyon verimi ve invertaz kinetiği yönünden incelenmiş, serbest ve immobilize invertaza ait kinetik parametreler hesaplanarak karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimlerin çeşitli amaçlarla kullanılmaları çok eski çağlara dayanır. İnsanlar daha ilk çağlarda ekmek, peynir, kıymız gibi gıda maddelerinin hazırlanmasında bilinçsiz olarak geniş çapta enzimlerin işlevlerinden yararlanmışlardır. Gelişen bilim ve teknolojiye paralel olarak enzimlerin yapısı ve tepkime mekanizması aydınlatılmış ve bir çok alanda bilinçli kullanım imkanları arttığı gibi yeni kullanım alanları da doğmuştur.

Günümüzde enzimler, gıda, ilaç, kozmetik, tekstil, temizlik gibi çeşitli endüstri dallarında, üretime yönelik çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde, bilimsel araştırma ve diagnostik çalışmalarda, çeşitli fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinde, tıpta tanı çalışmalarında kullanılmaktadır. Ancak enzimlerin pahalı olması, etkin oldukları sürenin kısa olması ve sürekli sistemde kullanılamamaları, endüstriyel boyutlardaki uygulamalarda dezavantaj yaratmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmaya yönelik yöntemlerden biri olan enzim immobilizasyon çalışmaları bilimsel ve teknolojik çalışmalarda önemli bir yer tutmaktadır.

2.1.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler biyolojik tepkimeleri katalizleyen protein yapısındaki maddelerdir. Her enzimde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin konformasyonu belirli bir düzen içindedir ki bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar.

Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken, bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde, enzimin protein kısmına "apoenzim", protein olmayan kısmına, enzimden kolayca ayrılabiliriyorsa "koenzim" veya "kofaktör", sıkıca bağlı ise "prostetik grup" adı verilir. Apoenzim ve koenzim birlikte "haloenzim" diye adlandırılır. Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite gösteremez. Enzimin katalitik olma özelliğini veren koenzim tek başına gerçek enzime göre çok düşük aktivite gösterir. Gerçek enzim aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir (Bailey and Ollis, 1977).

2.1.2. Enzimlerin Katalitik Özellikleri

Enzimler biyokimyasal tepkimelerin hızlarını, kendileri bir değişikliğe uğramadan ve ortamda harcanmadan artırma yeteneğine sahiptirler. Enzimler tepkimenin kinetik özelliğini etkiler. Buna karşılık, tepkimenin termodinamik özellikleri üzerinde etkisi

yoktur. Yani aynı kimyasal tepkime dengesi hem enzimli ve hem de enzimsiz ortamda oluşabilir.

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup "aktif merkez" olarak tanımlanır. Substrat ve koenzim (koenzime gereksinim duyan enzimler için) bu merkeze, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve/veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşüme katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitler de aktif merkezden sayılırlar (Telefoncu, 1986).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, katalizledikleri tepkimenin hızı saptanarak belirlenir ve enzim aktivitesi "turnover sayısı" ya da "enzim birimi" ile ifade edilir. Turnover sayısı, standart koşullarda, dakikada 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanır. Bir enzim birimi (1 E.U.) ise dakikada 1 μ mol substrat katalizleyebilen enzimin mg olarak miktarıdır. Enzim birimi genel olarak enzimin optimum pH ve sıcaklığında verilir.

Enzimleri kimyasal katalizörlerden ayıran en önemli özelliklerden biri de enzim seçiciliğidir. Enzimler, belirli tepkimeleri katalizler. Bu duruma, "enzim seçiciliği" denir. Tepkime seçiciliği açısından enzimler dört gruba ayrılırlar (Pekin, 1979).

Mutlak seçicilik: Enzim yalnız bir tek tepkimeyi katalizler, dolayısıyla tek substrata seçicidir. Örneğin, ürüyü hidrolizleyen üreaz ve maltozu monosakkaritlerine hidrolize eden maltaz, bu türden seçicilik gösterirler.

Grup seçiciliği: Enzim, yapısında belirli bir grup bulunan substrat ile ilgili tepkimeleri katalizler. Protein parçalayan enzimlerin pek çoğu grup seçiciliği gösterir.

Tepkime ya da bağ seçiciliği: Bu gruptaki enzimler, belirli bir tepkime türünü katalizler ve substrat yapısında bulunan belirli bir bağa seçicidir. Lipid bağı içeren organik esterlerin hidrolizini katalizleyen lipazlar bu tür seçiciliğe örnek oluştururlar.

Sterokimyasal seçicilik: Enzim substratın sterokimyasal şekli üzerine etki yapıyorsa sterokimyasal seçicidir. Laktik dehidrojenaz, laktik asidin yükseltgenmesinde D-Laktik aside karşı katalitik aktivite göstermemesine karşın, L-Laktik asit üzerine etki yapar.

2.1.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

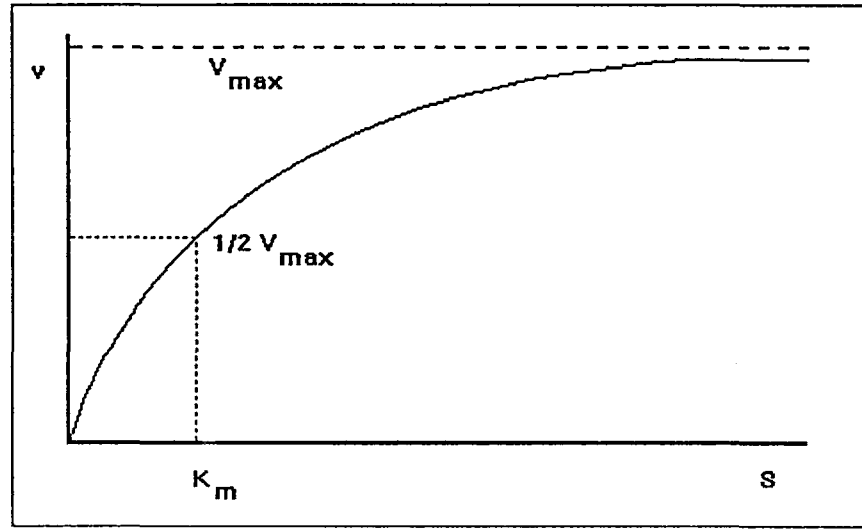
Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin hızını etkileyen faktörler arasında enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH, iyonik aktivite, inhibitör veya aktivatörlerin derişimi, tepkime ürünlerinin derişimi ve özellikleri, sistemdeki akışkan kuvvetler, ışık ve diğer fiziksel faktörler gelir. Bu faktörlerin enzim tepkimeleri üzerine olan etkilerini

tayin etmek için farklı koşullar altında enzim tepkime hızı saptanır. Enzim aktivitesini ölçmek için ya dönüşen substrat miktarı ya da oluşan ürün miktarı ölçülür. Her iki halde de enzim aktivitesi hız olarak tanımlanır (Gözükara, 1989). Enzimatik tepkimelerin hızını etkileyen parametrelerden bazıları aşağıda verilmiştir:

Enzim derişimi: Tepkimenin hızı, enzim derişimi substrat derişiminden çok az olduğu durumlarda enzim derişimiyle lineer bir şekilde artar. Enzim derişimi substrat derişiminden çok az olmadığı durumlarda da tepkime hızı enzim derişimine bağlı olarak artar. Fakat bu artış ilk duruma göre daha yavaştır ve belli bir enzim derişiminden sonra durur.

Substrat derişimi: Belirli bir miktardaki enzimin tepkime hızı başlangıçta substrat derişimine bağlı olarak artar. Başlangıçta bu ilişki doğrusal olarak artarken daha sonra Şekil 2.1' de görüldüğü gibi hiperbolik bir şekil alır. Başlangıçta tepkime lineer bir şekilde ilerlemekte ve tepkime hızı substrat derişimine bağlı olarak artmaktadır. Enzim tepkimesi bu durumda birinci dereceden bir kinetik gösterir. Substrat derişimi çok fazla olduğunda platoya erişilmekte ve tepkime, hızı değişmeden devam etmektedir. Bu durumda enzim tepkimesi sıfırıncı dereceden bir kinetik gösterir. Bu noktada enzim tepkime hızı, maksimum hıza (V_{max}) erişmiştir. Diğer bir deyişle, enzimin substrata doydugu yani enzim moleküllerinin pratikte tamamının substrat ile kompleks oluşturduğu duruma ulaşılmıştır. Enzim moleküllerinin yarısı enzim-substrat kompleksi halinde iken yani yarısı çalışırken gözlenen tepkime hızı, maksimum tepkime hızının yarısıdır. Maksimum hızın yarısını veren substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti (K_m) denir. Bir enzimin K_m değeri, enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Eğer enzimin substrata olan ilgisi fazla ise K_m değeri küçüktür. Eğer enzimin substrata olan ilgisi zayıf ise K_m değeri büyüktür.

Sıcaklığın etkisi: Genel olarak enzimatik tepkimelerin hızı sıcaklık arttıkça önce artar, daha sonra bir maksimum vererek azalır. Bu maksimuma karşı gelen sıcaklık, optimum sıcaklık olarak bilinir. Azalmanın nedeni enzimlerin yapısını oluşturan proteinlerin sıcaklıkla denatüre olmaları şeklinde açıklanır. Yüksek sıcaklık nedeniyle proteinin ikincil (sekonder) ve üçüncül (tersiyer) yapıları bozulur ve böylece enzim aktivitesini yitirir. Enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları elde edildikleri kaynağa göre değişir. Hayvansal kaynaklı enzimler için optimum sıcaklık 40-50°C arasında iken, bitkisel kaynaklı enzimler için optimum sıcaklık 50-60°C arasındadır (Gözükara, 1989).



Şekil 2.1. Tepkime hızının substrat derişimi ile değişimi

pH etkisi: Her enzimin yüksek aktivite gösterdiği optimum pH olarak bilinen karakteristik bir pH değeri vardır. Bu değerden sapıldıkça, enzim aktivitesi azalır ve enzim bir noktada tamamen inaktif hale gelir. Optimum pH, enzimden enzime farklılık gösteren asidik ve bazik grupların sayı ve dağılımına bağlı olarak değişir ve genellikle optimum pH 2-10 aralığındadır.

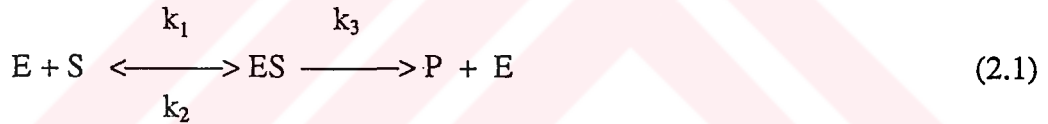
İnhibitör etkisi: Tepkime ortamında bulduklarında, enzimatik tepkime hızını azaltan maddelere "inhibitör" denir. İnhibitörler, tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Tersinmez inhibitörler, ya aktif merkeze doğrudan bağlanarak veya enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek, aktif merkezi tamamen bozarlar. Bu maddeler enzim etkinliğini tümüyle yok ettiklerinden enzim kinetiği açısından fazla önem taşımazlar (Başçı, 1985). Tersinir inhibitörler ise enzimlerle arabileşik oluşturarak ya Michaelis-Menten sabiti ya da maksimum tepkime hızı değerlerini veya her ikisini de azaltıcı yönde etkiler. Diğer bir inhibisyon türü olan ürün inhibisyonunda, enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünler belirli derişim değerlerinden sonra tepkime hızını düşürücü işlev görür. Bazı enzim tepkimelerinde de, yüksek substrat derişimlerinde enzim aktivitesinin azaldığı görülür.

2.2. Enzim Tepkimelerinin Kinetiği

Enzim kinetiği, enzim katalizli tepkimelerin davranışlarını ve bu davranışları etkileyen faktörleri inceleyen bir enzimoloji dalıdır. Bölüm 2.1.3' de söz edilen bu faktörlerin enzimatik tepkimeler üzerine etkileri bilinirse tepkimenin davranış özellikleri açıklanabilir. Kinetik incelemeler sayesinde substrat ve ürün derişimindeki değişimler

yoluyla tepkime derecesi bulunabilir, oluşan enzim-substrat komplekslerinin düzenli veya gelişigüzel bir sırada oluştuğu hakkında bilgi edinilebilir, enzim-substrat kompleksinin türü ve kararlılığı hakkında açıklamalar getirilebilir. Bazı kinetik sabitler bulunarak, substrat ve ürünlerin hücre içi derişimleri ölçülebilir ve tepkimenin fizyolojik gidişi ve canlıda enzim aktivitesinin regülasyon yolu izlenebilir. Kinetik sabitler üzerine pH ve sıcaklığın etkisi incelenerek, enzim aktif merkezindeki amino asitler hakkında bilgi edinilebilir ve bir tepkime modeli geliştirilebilir veya geliştirilmiş bir enzim katalizli tepkime modeli, tepkime kinetiği incelenerek deneysel olarak doğrulanabilir (Uslan, 1986).

Enzimatik tepkimelerde önce enzim ile substrat arasında bir arabileşik oluşur. Kararsız olan bu arabileşik, enzim ve ürünlere dönüşür. Ürün oluşum hızı, ortamdaki enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Substrat derişiminin kısıtlayıcı olmadığı durumda, tepkime hızı enzim derişimi ile belli bir değere kadar doğrusal olarak artar. Eğer enzim derişimi sabit tutulup substrat derişimi arttırılırsa, tepkime hızı belli bir maksimum değere erişir. Bu değerden sonra, substrat derişimi arttırılırsa bile tepkime hızında bir artış gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin artan substrat moleküllerini karşılayamamasıdır (Bölüm 2.1.3.). Enzimlerin bu davranışı 1913 yılında L. Michaelis ve M. Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır:



Burada; E enzim, S substrat , ES arabileşik ve P ürün, k_1 , k_2 , k_3 ilgili tepkimelerin hız sabitlerini göstermektedir.

- [E₀] : Başlangıç enzim derişimi
- [E] : Serbest enzim derişimi
- [S] : Serbest substrat derişimi
- [P] : Ürün derişimi
- [ES] : Enzim-substrat arabileşiği derişimi

olarak gösterilirse, arabileşiğin oluşum hızı 'Eş.2.1' e göre ;

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - [ES] (k_2 + k_3) \quad (2.2)$$

ürün oluşum hızı ise,

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = k_3 [ES] \quad (2.3)$$

olarak ifade edilir. Yatışkın durumda arabileşğin oluşma ve bozunma hızları birbirine eşit olduğundan,

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

olur. Buradan 'Eş. 2.2' nin düzenlenmesiyle

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

denkliği elde edilir. Diğer yandan enzim kütle denkliği $[E] = [E_0] - [ES]$ olacağından, K_m ;

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.5)$$

olarak tanımlanır ve bu değer 'Eş. 2.4' de yerine konup düzenlenirse,

$$[ES] = \frac{[E_0] [S]}{K_m + [S]} \quad (2.6)$$

bulunur. Ürün oluşum hızı ise 'Eş. 2.3' den

$$v = \frac{k_3 [E_0] [S]}{K_m + [S]} \quad (2.7)$$

olarak bulunur. Maksimum tepkime hızı enzimin tamamının arabileşik halinde bulunduğu durumda gözleneceğinden

$$V_{max} = k_3 [E_0] \quad (2.8)$$

şeklinde ifade edilir. Sonuç olarak enzimatik tepkime hızı ,

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.9)$$

eşitliği olarak bulunur. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği olarak bilinir ve K_m de "Michaelis-Menten sabiti" diye adlandırılır. K_m değeri, enzim ve substratın birbirine olan ilgisini gösterir (Bölüm 2.1.3). Aynı zamanda K_m , maksimum tepkime hızının, V_{\max} , yarısını sağlamak için gerekli olan substrat derişimi olarak tanımlanır.

Michaelis-Menten eşitliği hiperbolik bir eğrinin denklemdir. Denklemi doğrusallaştırmak amacıyla $1/[S]$ ' e karşı $1/v$ grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir ve buna "Lineweaver-Burk Doğrusu" denir. Bu doğrunun denklemi,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.10)$$

şeklinindedir. Doğrunun $1/[S]$ eksenini kestiği nokta $-1/K_m$, $1/v$ eksenini kestiği nokta $1/V_{\max}$, eğimi de K_m/V_{\max} dir (Lehninger, 1975).

2.2.1. İmmobilize Enzim Kinetiği

İmmobilize enzim sistemlerinde difüzyon kısıtlaması aktiviteyi düşüren en önemli faktörlerden birisidir. Difüzyon kısıtlamasının, immobilize enzim aktivitesine etkisinin tartışılmasında kullanılan yaklaşımlardan biri de "etkinlik faktörü" dür (Gemeiner, 1992). Etkinlik faktörü, η , şu şekilde tanımlanmaktadır:

$$\eta = \frac{v'}{v} \quad (2.11)$$

Burada, v' : difüzyon kısıtlamasının substrat dönüşüm hızını etkilediği sistemde gözlenen tepkime hızı, ve v : enzim tepkimesinin Michaelis-Menten eşitliğine uyduğu difüzyon kısıtlamasının etkin olmadığı durumdaki tepkime hızıdır. v , Bölüm 2.2' de gösterildiği gibi şu şekilde ifade edilir:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.9)$$

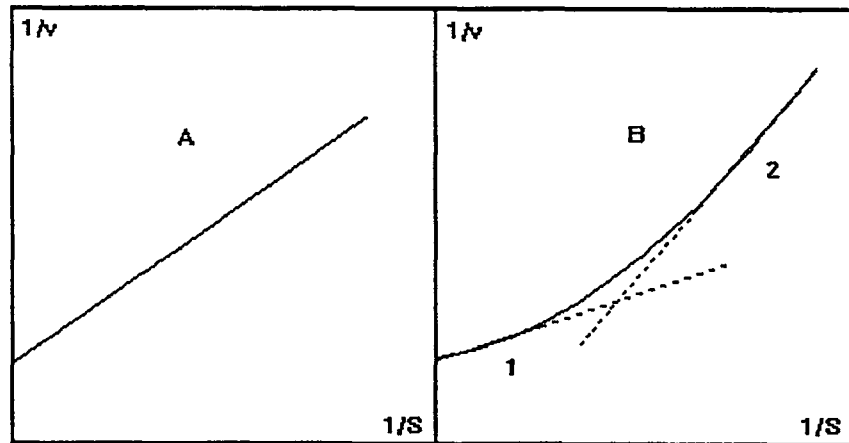
v' ise 'Eş. 2.11' ve 'Eş. 2.9' dan yararlanılarak aşağıdaki şekilde elde edilir:

$$v' = \eta \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.12)$$

Bu eşitliğin Lineweaver-Burk metoduyla (Eş. 2.10) kullanılan şekli ise şöyledir:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{\eta V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\eta V_{\max}} \quad (2.13)$$

Bu eşitliğe göre $1/[S]$ ' e karşı $1/v$ grafiğe alınırsa Şekil 2.2.B' de verilen eğri elde edilir. Görüldüğü gibi eğer sistemde difüzyon kısıtlamaları yoksa, Şekil 2.2.A' daki gibi bir doğru elde edilir. Bu durumda etkinlik faktörü, $\eta=1$ ' dir. Difüzyon kısıtlamaları olduğu durumda ise B' deki eğri ile verilen türden ilişkiler elde edilir. Şekil 2.2.B' deki eğriyi difüzyon kısıtlamasının etkin olduğu (2. bölge) ve olmadığı (1. bölge) iki bölgede incelemek mümkündür. Eğer tepkime hızı, substrat transferinden çok düşük ve enzimin doygunluğa ulaşması için gerekli substrat derişimi yeteri kadar yüksek ise ($[S_i] \gg K_m$), tepkime hızı 0^o kinetiğe göre oluşur (1 bölge). Bu koşullarda, proses substratın difüzyonu ile kontrol edilmez. Böyle bir durumda, ve diğer kısıtlamalar olmadığında, deneysel olarak tanımlanan kinetik sabitler gerçek değerlere karşı gelir. Buna karşın, bağlı enzimin çevresindeki substrat derişimi çok düşük olduğu zaman ($[S_i] \ll K_m$), enzim tepkime hızı, substrat difüzyonuna (çözültiden immobilize enzimin yüzeyine) ve makroçevredeki enzim derişimine bağlıdır (2 bölge).



Şekil 2.2. Enzimatik tepkime hızının Lineweaver-Burk grafiği ile değerlendirilmesi
(A) Difüzyon kısıtlaması olmayan sistem (B) Difüzyon kısıtlaması olan sistem

Enzim tepkime hızının, difüzyon kısıtlamasından etkilendiği sistemlerde, Şekil 2.2.B' de Lineweaver-Burk grafiğinde farklı bölgeler için verilen doğrusal ilişkiler (kesikli çizgilerle gösterilen) kullanılarak K_m , v ve η değerlerinin bulunması mümkündür. Şekil 2.2.B' deki eğride 1. bölgeyi tanımlayan doğrusal ilişkinin (Eş. 2.10) ordinatı kesim noktası $1/V_{max}$ ' ı verirken, doğrunun eğimi, K_m/V_{max} değerini göstermektedir. Bu iki değer birleştirilerek K_m ve V_{max} değerleri saptanır. 2. bölgeyi tanımlayan doğrunun eğimi ise bu bölgede geçerli olan difüzyon etkisini içeren kinetik ilişkisine (Eş. 2.13) dayanarak $K_m/\eta V_{max}$ değerini vermektedir. Daha önce bulunan K_m ve V_{max} değerleri, $K_m/\eta V_{max}$ ilişkisinde kullanılarak η değeri hesaplanabilir.

2.2.2. Enzimlerin Deaktivasyonu

Enzimler tepkime sırasında zamanla aktivitelerini yitirirler. Enzimlerin deaktivasyonu ürün inhibisyonu, enzim zehirlenmesi ve enzim denatürasyonu gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Ürün inhibisyonunda tepkime sırasında oluşan ürün, aktif bölgede toplanarak tepkime hızını düşürür. Enzim zehirlenmesi, aktif bölgelerin bazı maddelerle tersinmez tepkimeye girerek aktif olmayan hale dönüşmesi sonucu görülür. Enzim denatürasyonu ise işletme koşulları nedeniyle enzimin molekül yapısında oluşan değişimlerden kaynaklanır (Bailey and Ollis, 1977).

Tepkime sırasında işletme koşullarına bağlı olarak enzim molekülünün yapısındaki değişimler aktivite kaybına neden olur. Enzim derişimine birinci dereceden bağlı deaktivasyon tepkimelerinde aktif bölge derişimi zamanla azalır. Sıcaklık, pH ve karıştırmanın neden olduğu aktivite kayıpları bu türdendir. Çünkü enzimin seçici ve aktif olmasını sağlayan sarmal yapı kolayca bozulabilir ve enzimin katalitik özellikleri kaybolur. Sabit sıcaklık ve pH' da yürütülen bir tepkimede, enzim deaktivasyon hızı, aktif enzim derişimine bağımlı olarak, çoğunlukla bir üstel model ile verilir.

Üstel deaktivasyon modeli: Enzim derişimine birinci dereceden bağlı olan deaktivasyon modelinde, aktif enzim derişiminin değişimi aşağıdaki şekilde verilmektedir (Cardoso and Emery, 1978):

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_d [E] \quad \text{veya} \quad E_t = E_o \exp(-k_d t) \quad (2.14)$$

Burada, k_d enzim deaktivasyonu hız sabitidir.

Enzim aktivitesi, a , herhangi bir andaki tepkime hızının başlangıç tepkime hızına oranı olarak tanımlanır. Diğer bir şekilde, tepkime hız sabitinin tepkime süresince

değişmediği düşünülürse enzim aktivitesi, herhangi bir andaki enzim derişiminin başlangıç enzim derişimine oranı olarak da aşağıdaki şekilde ifade edilebilir;

$$\frac{v_t}{v_o} = \frac{[E_t]}{[E_o]} = a \quad (2.15)$$

v_t : Herhangi bir andaki tepkime hızı

v_o : Başlangıç tepkime hızı

$[E_t]$: Herhangi bir andaki enzim derişimi

$[E_o]$: Başlangıç enzim derişimi

olarak simgelenmektedir. 'Eş.2.14', 'Eş.2.15' de yerine konulursa deaktivasyon hızı için,

$$-\frac{da}{dt} = k_d a \quad (2.16)$$

denkliği elde edilir. Bu denkliğe göre, enzim deaktivasyonu

$$a = a_o e^{-k_d t} \quad \text{veya} \quad \ln \frac{a}{a_o} = -k_d t \quad (2.17)$$

a_o : Başlangıç enzim aktivitesi

ifadesiyle gösterilir. Tepkimenin yürütüldüğü koşullarda enzim kararlılığı, işletme kararlılığı olarak bilinir. İşletme kararlılığının ölçüsü olarak, enzimin "aktivite yarı ömrü", $t_{1/2}$, kullanılabilir. Aktivite yarı ömrü, enzimin başlangıç aktivitesinin yarıya düşmesi için geçen zaman olarak tanımlanır. 'Eş. 2.17' kullanılarak aktivite yarı ömrü şöyle ifade edilir:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (2.18)$$

2.3. Enzimlerin İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon genel anlamda enzim hareketinin sabit bir yüzey üzerinde sınırlandırılması olarak bilinir (Shuler and Kargı, 1992). İmmobilize enzimin serbest

enzime göre sağladığı avantajlardan en önemlisi, tepkime sonunda aktivitesini yitirmeden ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmesidir. Bu durum, immobilize enzimlerin kesikli proseslerde birden fazla kullanımına veya sürekli proseslerde çalışmasına olanak sağlar. Böylece sürekli proseslerin yüksek kapasite, standart kalitede ürün eldesi ve işletme kolaylıkları gibi avantajlarından faydalanılır. Immobilize enzimler tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilirdikleri için enzimin safsızlık olarak ortamda kalmasının istenmediği durumlarda, karmaşık ayırma işlemleri gerekmediği gibi istenilen anda çözelti ile enzimin ilişkisi kesilerek istenmeyen bir dengeyin veya yan ürünlerin oluşumu ve ürün inhibisyonu engellenebilir. Böylece bu problemlerin neden olduğu maliyeti arttırıcı ek işlemlere gerek kalmaz. Immobilize enzimler çevre koşullarına karşı (pH, sıcaklık, karıştırma hızı vs.) serbest enzime göre daha dayanıklı ve daha karardır. Genellikle immobilize enzimlerin işletme koşullarında aktif oldukları süre serbest enzimlere göre daha fazladır. Bu nedenle immobilize enzimlerin başlangıç aktivitesi düşük olsa bile prosesin katalizör bileşeninin fiyatı yani işletme maliyeti düşer. Ayrıca bu durumun sonucu olarak daha fazla ve daha saf yüksek aktiviteli enzim kullanılarak işlem süresi kısılır ve daha saf ürünler elde edilebilir. Immobilize enzimler birbirini izleyen çok adımlı enzim tepkimeleri için de uygundur. Örneğin, serbest formda pH optimumları birbirine uymayan iki enzim ya farklı destek maddelerine immobilize edilerek ya da bir membranın zıt iki tarafında kendi mikroçevrelerine sahip olmaları sağlanarak kullanılabilir veya enzimlerden biri çözeltide, diğeri bir desteğe bağlanmış şekilde çalışılabilir (Çelebi ve Çağlar, 1986).

1916' da Nelson ve Griffen sakkarozun hidrolizini katalizleyen invertazın aktif kömürün üzerine adsorplanmasını gözlemesi üzerine enzimlerin bir taşıyıcıya bağlanabileceği düşünülmüş ve bu çalışmalarının ilk sonuçları 1950' li yıllarda birçok çalışma grubu tarafından aynı anda yayınlanmıştır. Daha sonra bu alandaki çalışmalar büyük ilgi çekmiş ve değişik amaçlarla çeşitli enzimler immobilize edilmiştir (Telefoncu, 1986).

2.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmışsa da (Bailey and Ollis, 1977; Hartmeier, 1988; Shuler and Kargı, 1992) bu yöntemleri kimyasal ve fiziksel yöntemler olarak iki ana grupta toplamak mümkündür (Şekil 2.3).

1- Fiziksel Yöntemler

- a) Polimer matrikste tutuklama
- b) Mikrokapsülleme

c) Membran reaktörler

2- Kimyasal Yöntemler

- a) Adsorpsiyon
- b) İyonik bağlama
- c) Çapraz bağlama
- d) Kovalent bağlama

Bu bölümde immobilizasyon yöntemleri hakkında kısaca bilgi verilecek, ayrıca bu çalışmada da kullanılan polimerik yüzeylere çeşitli teknikler ile gerçekleştirilen kovalent bağlama yöntemi detaylı olarak anlatılacaktır.

1. Fiziksel yöntemler

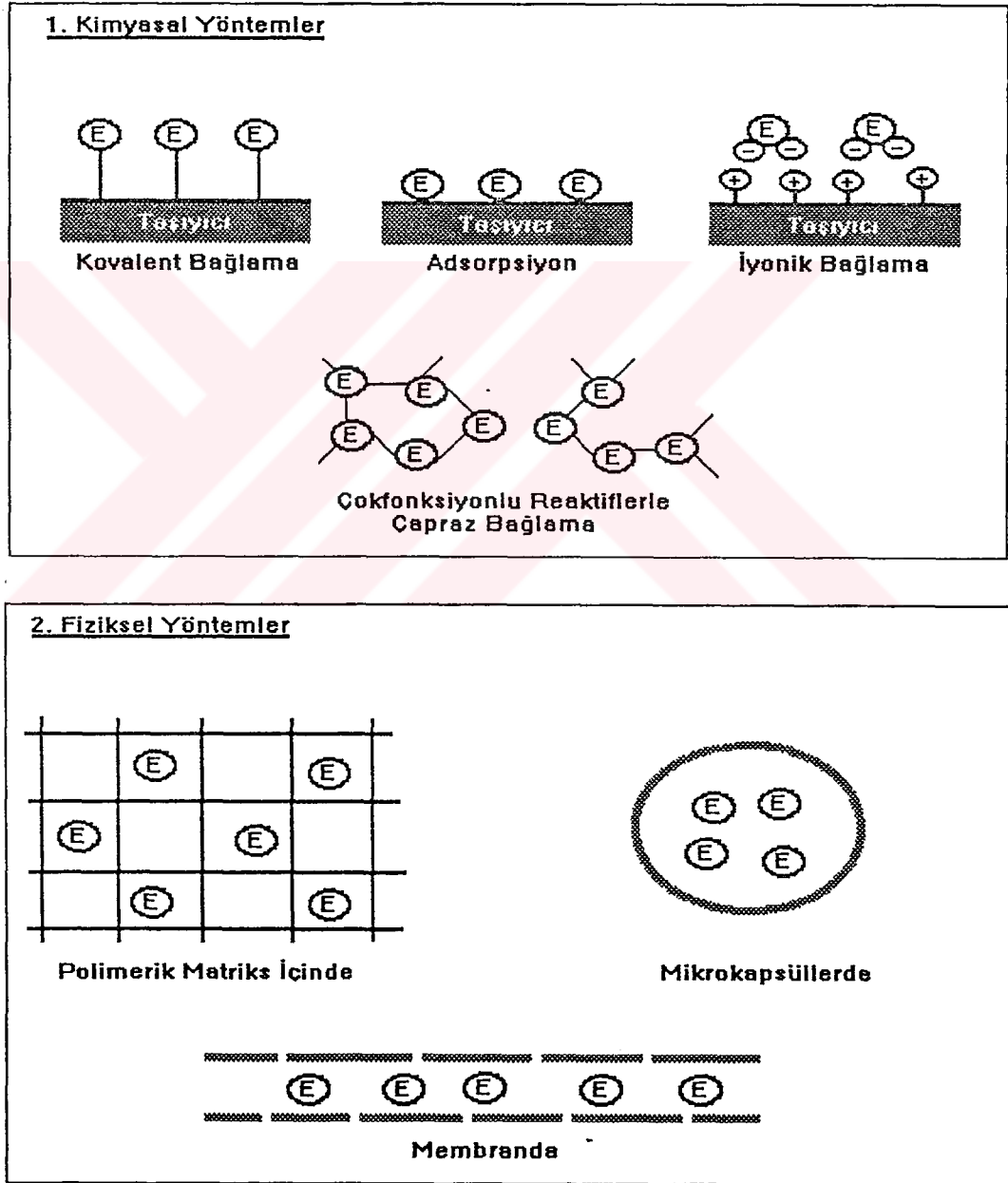
Fiziksel yöntemlerin temeli enzim molekülünün bir taşıyıcıya tutuklanmasına dayanır. Bu yöntemi, kimyasal yöntemden ayıran en önemli özellik, enzim molekülünün herhangi bir şekilde bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Polimer matrikste tutuklama: Yöntemin esası, enzim moleküllerinin etrafında polimer bir ağ oluşturulmasına dayanır. Tutuklanan enzimin katalitik fonksiyonunu yerine getirebilmesi için, tepkimeye ait substrat ve ürünlerin matriksten kolayca geçebilmesi gerekir. Aynı zamanda polimer ağın gözenekleri enzim moleküllerinin yapıdan kaçışına izin vermeyecek büyüklükte olmalıdır. Bu tür immobilizasyon işleminde en çok kullanılan matriks materyalleri poliakrilamid, pektin, jelatin, agar, silikajeldir. Polimer ağı oluşturan zincirler arasındaki çapraz bağlanma değişik fonksiyonel reaktiflerle sağlanır. Örneğin, poliakrilamidin çapraz bağlanması N,N-metilenbisakrilamid kullanılarak gerçekleştirilir. Yöntemin avantajları, kolay uygulanabilmesi, az miktar enzimle immobilizasyonun gerçekleştirilebilmesidir. Yöntemin dezavantajları arasında, yapıdan enzim kaçışı ve difüzyonel kısıtlamalar nedeniyle enzim aktivitesinin azalması ve mikroçevresel koşulların kontrolündeki güçlükler gelir. Enzim kaçışı matriks gözeneklerini küçültülerek, difüzyon kısıtlamaları ise matriks boyutlarını küçültülerek engellenebilirse de enzim aktivitesinin azalmasının kontrol edilmesi güçtür. Ancak değişik matriksleri ve kimyasal bileşikleri kullanarak, proses koşullarını değiştirerek ve matriks boyutlarını ayarlayarak daha uygun mikroçevresel ortam yaratılabilir (Shuler and Kargı, 1992).

Mikrokapsülleme: Yöntemin temeli, enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran tarafından kuşatılmasına dayanır. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile

immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır. Ayrıca membran, enzim moleküllerinin dış etkilerden korunmasını sağlar (Telefoncu, 1986).

Membran reaktörler: Mikrokapsülasyon yönteminin büyük ölçekli ve mekanik olarak akış dinamiğine uygun, sürekli sistem amaçlı bir immobilizasyon yöntemidir. Membran reaktörler, oyuk fiber, tübüler ve kaskat yapılarında olabilirler. Zarın özelliği, substrat ve ürün giriş ve çıkışına izin verecek şekilde yarı geçirgen olması ve prosesin mekanik etkilerinden enzimi koruyacak şekilde dayanıklılığıdır (Hartmeier, 1988).



Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

2- Kimyasal Yöntemler

Adsorpsiyon: Enzim molekülü suda çözünmeyen bir taşıyıcıya adsorptif bağlayıcı kuvvetlerin yardımıyla bağlanır. Adsorpsiyon, faz ve yüzey sınırlarında fiziksel ve kimyasal kuvvetlerin etkisiyle ortaya çıkan yüzeye tutunma olayıdır. Yüzeye tutulan madde ile katı arasında, yüzey gerilimiyle açıklanabilen bir etkileşim söz konusudur. Adsorpsiyon bir denge tepkimesine benzer ve çözeltideki çözünenler, yüzeydekilerle dengeye gelene kadar çözeltiden yüzeye adsorpsiyon devam eder. Çözeltilerde adsorpsiyon üç tür olarak incelenebilir (Mutlu, 1988):

a-Yer değiştirme adsorpsiyonu: Çözünen ile adsorplayıcı arasındaki elektriksel etkileşme sonucu meydana gelir.

b-Van der Waals adsorpsiyonu (fiziksel adsorpsiyon): Bu tür adsorpsiyonda fiziksel karakterde zayıf Van der Waals kuvvetleri etkindir.

c-Kimyasal adsorpsiyon (Kemisorpsiyon): Adsorplanan ile adsorplayan yüzey üzerindeki aktif merkezlerde, kuvvetli kimyasal bağlar oluşur.

Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Enzim adsorpsiyonunda, en çok kullanılan taşıyıcılar gözenekli cam, diatome toprağı, bentonit, seramik, kollodyum, silikajel, hidroksiapatit, kül, aktif karbon, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Yöntemin avantajları; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, enzime zarar verebilecek maddeler kullanılmadığı için enzim konformasyonu üzerine etkinin az oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağının olmasıdır. Adsorpsiyon yönteminin en önemli dezavantajı enzimin desorpsiyonudur. Enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmadığından genellikle şiddetli hidrodinamik kuvvetlerin varlığında, desorpsiyon sonucu enzim serbest halde tepkime ortamına geçmektedir (Hartmeier, 1988).

İyonik bağlama: Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlanma, ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişiklik görülmez. Yöntemin dezavantajı, enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışının meydana gelmesidir. Sephadex, amberlite, dowex gibi iyon değiştirici reçineler taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Shuler and Kargı, 1992).

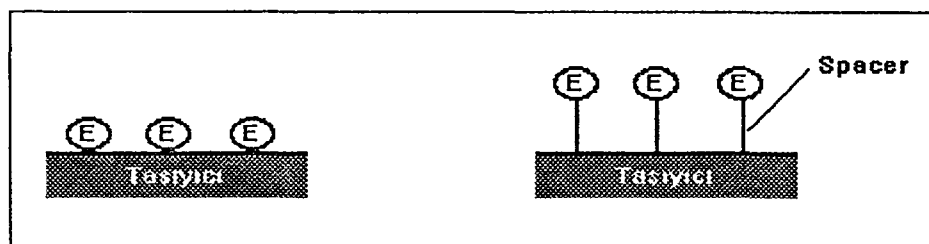
Çapraz bağlama: Enzim moleküllerinin birbirleriyle glutaraldehit, bis-diazobenzidin, 2,2- disülfonik asit gibi maddeler kullanılarak bağlanması da diğer bir immobilizasyon

yöntemidir. Çapraz bağlanma bir çok değişik yolla gerçekleştirilir; enzim yalnızca çift veya çok fonksiyonlu reaktif kullanılarak çapraz bağlanır, örnek olarak enzimin çözünmez agregatlar yapmak üzere glutaraldehit ile çapraz bağlanması verilebilir. Diğer bir yol, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya adsorbe edilmiş enzimlerin ya da ikinci bir protein varlığında serbest enzimlerin çift fonksiyonlu reaktif kullanılarak çapraz bağlanmasıdır. Alternatif bir yol da, çift fonksiyonlu reaktif ile aktive edilmiş polimer taşıyıcılara enzimin bağlanmasıdır. Çapraz bağlama yöntemi, enzimlerin aktif bölgelerinde çok önemli değişikliklere yol açabilir, ayrıca difüzyon kısıtlamaları görülebilir. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnızca immunolojik testlerde kullanılmışlardır (Telefoncu, 1986).

Kovalent bağlama: Destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile taşıyıcı yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturulur. Enzim molekülleri taşıyıcı yüzeye α - ve ϵ -amino grupları, karboksil, hidroksil, imidazol, sülfidril grupları, fenol halkaları gibi bazı özel fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanır. Bu gruplardan -SH ve ϵ -amino grupları taşıyıcı yüzeyindeki uygun gruplar ile doğrudan tepkimeye girebilir. Bunun yanında -OH grupları gibi bazı grupların taşıyıcı grupla tepkimeye girmeden önce aktive edilmeleri gerekir.

Bağlanması istenilen grubun aktivasyonu taşıyıcı yüzeyinde gerçekleşir, böylelikle katalitik aktivite azalma riski ortadan kaldırılır. Grupların aktivasyonu için yaygın olarak başvurulan metodlardan bazıları; -OH gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktivasyonu veya -COOH gruplarının klorla aktivasyonudur (Hartmeier, 1988).

Taşıyıcı ile enzim arasındaki birleşme ya doğrudan bileşikler arasındaki bağlantı ile veya "spacer" denilen bağlantı ajanları aracılığıyla gerçekleştirilir. Spacer enzimlere büyük ölçüde hareket serbestliği vermekte, böylelikle enzimin aktivitesi, bazı özel koşullar altında doğrudan taşıyıcıya bağlanmış enzimin aktivitesinden daha fazla olabilmektedir. Şekil 2.4' de şematik olarak bir enzimin doğrudan veya bir spacer molekülü üzerinden yüzeye kovalent bağlanmasını göstermektedir.



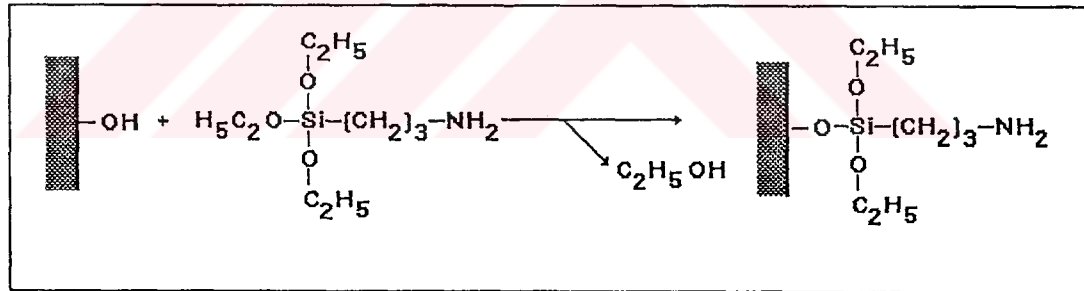
Şekil 2.4. Taşıyıcı yüzeye enzimin doğrudan ve spacer yardımıyla kovalent bağlanması

Enzimlerin, yüzeye kovalent bağlanmasında kullanılan taşıyıcı yüzeyler Çizelge 2.1' de görüldüğü gibi inorganik taşıyıcılar, sentetik ve doğal polimerler olmak üzere üç ayrı grupta incelenebilir (Hartmeier, 1988).

Çizelge 2.1. Enzimlerin kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

İnorganik taşıyıcılar	Sentetik polimerler	Doğal polimerler
Gözenekli cam	Polistiren	Dextran
Gözenekli kieselguhr	Poliakrilamid	Selüloz
Borosilikat cam	Poliakrilat-polietilen kopolimeri	Mısır dövmesi
Silokrom	Stiren-maleik anhidrit kopolimeri	Agaroz
	Polimetilenglutamat membranı	Sepharoz

İnorganik taşıyıcılar: Enzimlerin kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda en çok kullanılan inorganik taşıyıcı gözenekli camdır. Cam yüzeyinde çok fazla sayıda -OH grubu bulunur ve aminoalkiletoksisilan, aminoalkilchlorosilan gibi silanlarla yüzey aktif hale getirilir. Aminoalkiletoksisilan ile cam yüzeyin aktivasyonu Şekil 2.5' de görüldüğü gibi gerçekleşir.

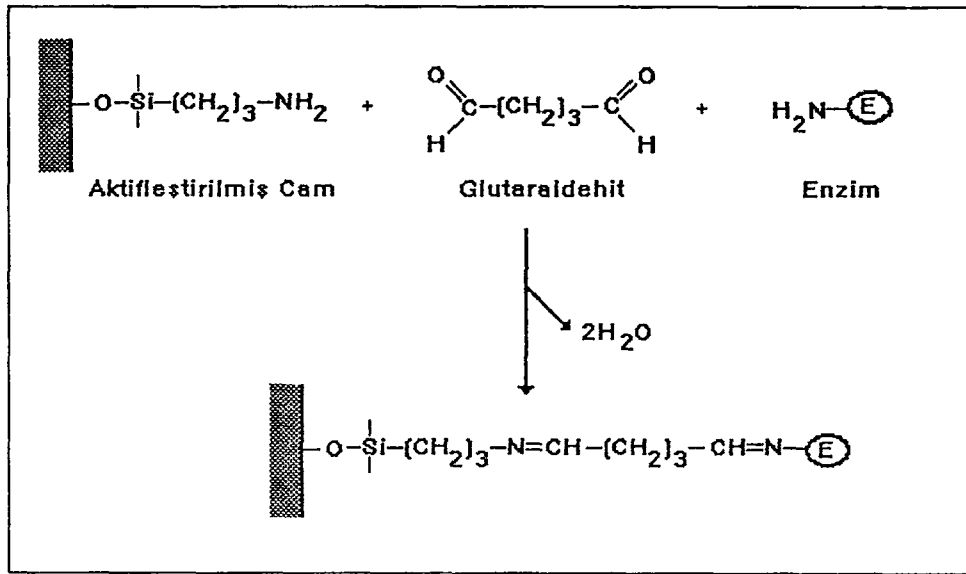


Şekil 2.5. Cam yüzeyin aminoalkiletoksisilan ile aktivasyonu

Şekilden de görüldüğü gibi aktivasyon işlemiyle cam yüzey alkil amin gruplarıyla zenginleştirilir. Aktive edilen cam yüzeylere enzim diglutaraldehit, diizosiyanat gibi çift fonksiyonlu maddeler yardımıyla bağlanır. Şekil 2.6' de enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan çift fonksiyonlu glutaraldehit yardımı ile enzimin cama bağlanması gösterilmektedir.

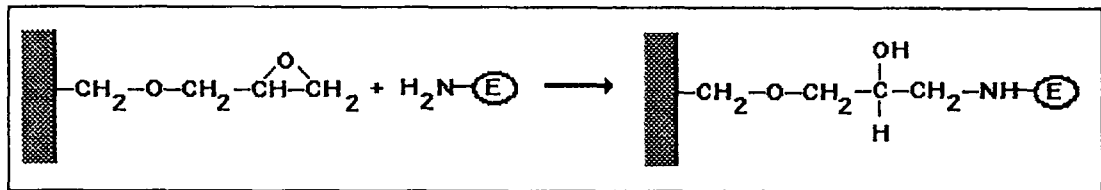
Çizelge 2.1' de verildiği gibi camın yanı sıra birçok inorganik taşıyıcı madde, enzimlerin kovalent bağlanması için kullanılır. Enzimlerin inorganik taşıyıcılara kovalent bağlanmasında kullanılan diğer bir yöntem, sentetik ve doğal polimerler

yardımla inorganik taşıyıcıların polimer bir tabaka ile çevrenmesi ve bu tabakaya enzimin immobilize edilmesidir.



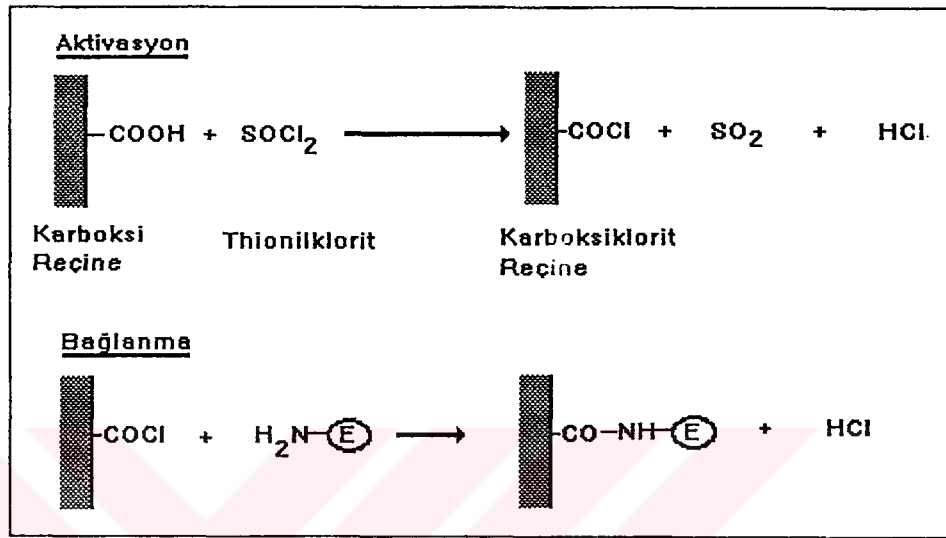
Şekil 2.6. Glutaraldehit yardımıyla enzimin cama bağlanması

Sentetik polimerler: Sentetik polimerler, 1950' li yıllardan beri biyolojik aktif materyallerin bağlanmasında, yaklaşık son 20 yıldan beri de enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Önceleri enzim immobilizasyonunda farklı amaçlar için geliştirilmiş, mevcut polimerler kullanılmış, daha sonra özellikle immobilizasyon amaçlı kopolimerler geliştirilmiştir. Bir çok reaktif kopolimer, esas olarak akrilik ve metakrilik asit türevlerinden üretilir. Stiren-maleik anhidrid kopolimeri, naylon-akrilat kopolimeri, poliakrilat-poliyeten kopolimeri, metakrilat-akrilat kopolimeri, poliakrilamid, polistiren gibi sentetik taşıyıcılar enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Özellikle bunlar arasında reaktif oksiran veya asit anhidrit gruplu akrilat ve metakrilat taşıyıcılar yaygın olarak kullanılmakta ve enzim doğrudan taşıyıcıya bağlanmaktadır. Şekil 2.7' de enzimin oksiran gruplarca zengin bir taşıyıcıya kovalent bağlanması görülmektedir. Bu tipteki taşıyıcılar ticari (Röhm GmbH, W.Germany) olarak satılmaktadır (Hartmeier, 1988).



Şekil 2.7. Oksiran gruplarca zengin taşıyıcıya enzim bağlanması

Değişik aktivasyon yöntemlerinden biri de klorit aktivasyonudur ve Şekil 2.8' de gösterilmiştir. Karboksi grubu taşıyan reçineler thioniklorit ile aktifleştirilir. Aktive edilen karboksiklorit reçineler Şekil 2.8' de de görüldüğü gibi peptid bağı oluşturmak üzere enzimin serbest amino grupları ile tepkimeye girebilen reaktif klorit gruplarına sahiptir.



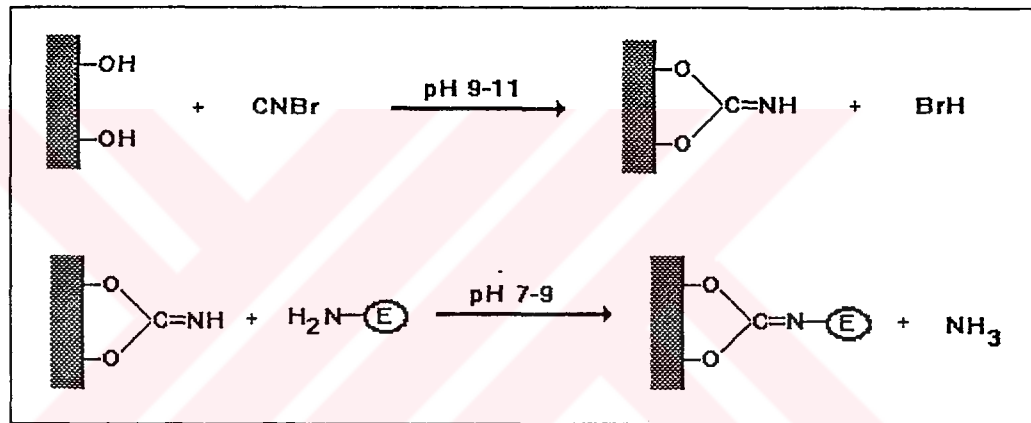
Şekil 2.8. Taşıyıcının klorit ile aktivasyonu ve enzim immobilizasyonu

Doğal polimerler: Selüloz, dekstroz, agaroz, nişasta gibi polisakkarit veya poliüronit yapısındaki doğal polimer taşıyıcılar enzim immobilizasyonu çalışmalarında büyük ilgi görmektedir. Doğal polimerlerden bir çoğu fazla sayıda hidroksil grubu içerir ve bu gruplar doğrudan enzim proteinleri ile bağlantıya girmeye uygun değildir. Bir çok doğal polimer genellikle siyanojen bromür ile aktive edilir. Bu aktivasyon işlemi sonucunda yüzeyde oldukça reaktif imido karbonatlar oluşur. Bunu izleyen birleşme tepkimesinde aktifleştirilmiş taşıyıcı, enzimin serbest amino grupları ile tepkimeye girer (Şekil 2.9). Doğal polimerlerin siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş türevleri enzim immobilizasyonunda çok yaygın kullanılan taşıyıcılar arasındadır ve ticari olarakta temin edilebilirler.

Kovalent bağlama işleminden sonra, proteinin aktif konformasyonunu muhafaza etmesi önemlidir. Doğal konformasyonun belirlenmesinde, primer amino asit yapı önemlidir. Sekonder, tersiyer, kuaterner yapıdaki bağlar, disülfid bağları dışında, kovalent olmayan bağlardır. Tuzların kovalent olmayan etkileşimleri, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimlerin hepsi tek tek ele alındığında kararsızdır. Fakat çok sayıda zayıf bağın toplamı, protein molekülüne stabilite kazandırır. Proteinin aktif konformasyonunu koruyabilmesi için çözelti koşulları, kolay kırılabilir bağlara göre

sınırlandırılır. Bundan dolayı genellikle, 35°C' nin üzerindeki sıcaklıklar, pH' sı 3-4' den düşük asidik veya pH' sı 9-10' dan büyük alkali çözeltiler kullanılmamalıdır (Mosbach, 1976).

Kovalent bağlama yönteminin en büyük avantajı bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajları, tutuklama sırasında enzimin aktif bölgelerinin bağlayıcı ajan tarafından kullanılabilme olasılığı ve ortamın kimyasal yapısı dolayısı ile enzimin zehirlenme ihtimalidir. Ayrıca destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozar (Gerhartz, 1990).



Şekil 2.9. Siyanojen bromür aktivasyonu ve enzimin yüzeye immobilizasyonu

2.3.2. Enzim İmmobilizasyonunda Yöntem ve Taşıyıcı Seçimi

En uygun immobilizasyon yöntemi ve destek materyali enzime ve uygulamalara bağlı olarak değişir. İmmobilizasyon işlemi esnasında ve immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmemesi gerekir. Eğer immobilizasyon, enzim üzerinde bazı konformasyonel değişikliklere yol açıyorsa veya enzimin aktif bölgesinde bulunan reaktif gruplar bağlanmada yer alıyorsa, enzim aktivitesinde kayıp ortaya çıkabilir. Bu nedenle immobilizasyon işlemi ılımlı koşullarda gerçekleştirilmelidir. İmmobilizasyon sırasında yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz derişimleri ile muamele denatürasyona, dolayısıyla aktivite kaybına neden olur.

Enzimin taşıyıcı bir yüzeye immobilize edildiği adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlanma yöntemlerinde, taşıyıcı seçimi, enzim aktivitesi ve diğer enzim özellikleri açısından önemlidir. Destek materyalin seçiminde iki temel kriter vardır. Bunlardan

biri; yük yoğunluğu, fonksiyonel gruplar, porosite ve destek yüzey hidrofobikliğinin bir fonksiyonu olan destek yüzeyin bağlama kapasitesidir. Diğer kriter ise destek yüzey üzerindeki fonksiyonel gruplar ve mikroçevresel koşulların bir fonksiyonu olan bağlanan enzim miktarı ve enzim aktivitesinin stabilitesidir (Shuler and Kargı, 1992).

Destek materyali immobilize edilecek enzime uygun bir fonksiyonel grup içermelidir. İmmobilizasyon için, taşıyıcı ile enzim arasında bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli veya immobilizasyon sırasında aktif merkez korunmalıdır. Destek materyali fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak kararlı olmalı, mekanik olarak dirençli olmalı, toksik olmamalı ve ekonomik olmalıdır. Ayrıca enzim farklı reaktörlerde kullanılabilirdiğinden destek materyali de kolayca şekil alabilmelidir (Gerhartz, 1990). Destek materyali genellikle hidrofilik olmalıdır. Çünkü enzimler sulu ortamda çalışırlar ve organik çözücülerle denatüre olurlar. Ayrıca destek maddesi substratla aynı tip elektrik yüküne sahip olmamalıdır. Taşıyıcı matriksin elektrik yükü enzimin optimum çalışma pH' sını önemli ölçüde etkileyebilir. Bölgesel yüklerin optimum pH' yı ne kadar değiştireceğini kolayca kestirmek mümkün olmasa da genel olarak (-) yüklü bir destek, optimum çalışma pH' sını yükseltecek, (+) yüklü bir destek, optimum çalışma pH' sını daha düşük değerlere çekecektir. Optimum pH' daki bu değişimler 2-3 pH birimi kadar çok olabilmektedir (Stanley and Olson, 1974).

Bir enzimin immobilizasyonu için kullanılacak yöntemin seçiminde önemli kriterler, yeterince enzim immobilize edilmesi, enzim aktivitesinin korunması ve kararlılığı, substrat ve ürün moleküllerinin yapısı, yöntemin kullanım güvenliği ve maliyetidir. Ayrıca tepkime ve reaktör tipi de göz önüne alınmalıdır. Bazı kimyasal immobilizasyon yöntemlerinde kullanılan reaktifler zehirli yan ürünlerin oluşmasına neden olabilir. Diğer yandan, laboratuvarında gerçekleştirilen bir çok immobilizasyon tekniği endüstride büyük miktarlarda üretim için uygun olmayabilir; ya maliyet çok yüksektir ya da immobilizasyon yöntemi birçok işlem gerektirmektedir. Ucuz bir enzim için pahalı bir immobilizasyon yöntemi, ancak çok uzun bir işlem ömrü ve önemli proses avantajları sağladığında söz konusu olabilmektedir. Çizelge 2.2' de çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin genel bir karşılaştırılması verilmiştir (Chaplin and Bucke, 1990).

2.4. İvertaz

Poli(phe-lys) ile modifiye edilen polistiren yüzeylerde kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonunun amaçlandığı bu çalışmada gıda endüstrisinde önemli bir yeri olan invertaz, test enzimi olarak seçilmiştir. Bu bölümde invertazın genel

özelliklerine ve kullanım alanlarına kısaca değinildikten sonra invertazın immobilizasyonu ile ilgili değişik çalışmalardan bahsedilecektir.

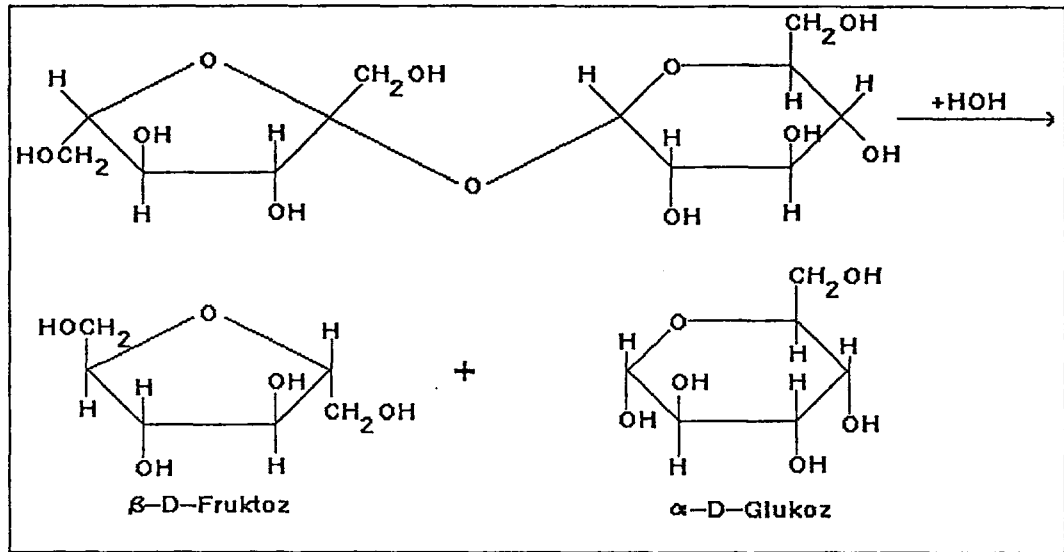
Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Özellik	Kovalent Bağlanma	Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Çapraz Bağlanma	Mikrokapsülasyon	Matriks içi tutuklama
İşlem	zor	kolay	kolay	zor	kolay	zor
Enzim Aktivitesi	yüksek	düşük	yüksek	orta	yüksek	yüksek
Bağ Gücü	kuvvetli	değişken	orta	kuvvetli	orta	zayıf
Enzim Kaçışı	düşük	yüksek	orta	düşük	düşük	yüksek
Difüzyon Engeli	düşük	düşük	düşük	düşük	yüksek	yüksek
Genel Uygulanabilirlik	orta	düşük	orta	düşük	yüksek	yüksek
Geri Kazanım	mümkün değil	mümkün	mümkün	mümkün değil	mümkün değil	mümkün değil
Substrat Seçiciliği	değişebilir	değişmez	değişmez	değişebilir	değişmez	değişmez
Yöntem maliyeti	yüksek	düşük	düşük	orta	yüksek	orta

2.4.1. Genel Bilgiler

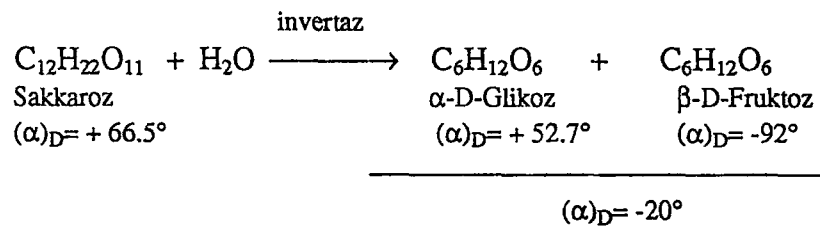
Hidroliz enzimlerinin alt grubu olan karbohidrazlardan invertaz (E.C. 3.2.1.26) sakkarozun hidrolizini katalizler. Sakkarozun hidrolizi sonucu, glikoz ve fruktozun oluşumu Şekil 2.10' da Haworth formülü ile gösterilmiştir. İvertaz yaygın olarak ekmek mayası ve bira mayasından elde edilir. İvertaz eldesinde, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces carbergensis* mikroorganizmaları endüstriyel öneme sahiptir. Maya invertazının optimum pH değeri 4.0-5.5 aralığındadır ve bu aynı zamanda invertazın en kararlı olduğu pH aralığıdır. Katı haldeki invertaz ısıya çok dayanıklıdır. İvertazın çözeltideki ısıl kararlılığı kullanılan preparatın saflığına

bağlıdır. Bu nedenle, değişik enzim preparatları için ortak bir optimum sıcaklık saptamak zordur. Ticari invertaz için düşük sakkaroz derişimlerinde optimum sıcaklık 55°C olarak verilir (Başçı, 1985).



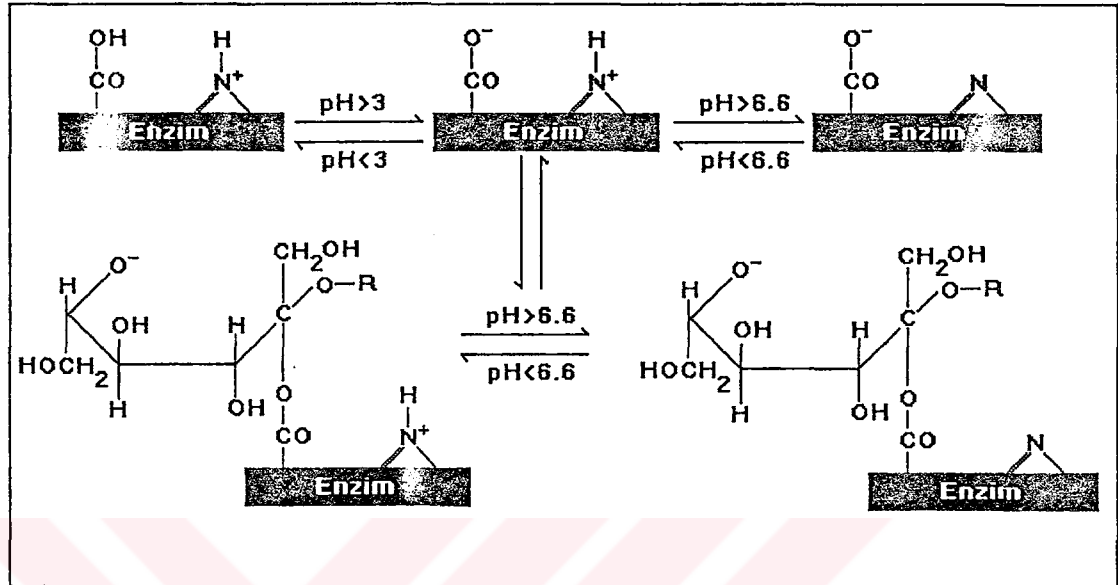
Şekil 2.10. Sakkarozun hidroliz tepkimesi

Sakkaroz molekülünün fruktoz ve glikoz kısmına etkimesine bağlı olarak iki tip invertaz saptanmıştır. Bunlar, fruktosidaz (β -D-fruktofuranosidaz, β -h-fruktosidaz, fruktoinvertaz) ve glikosidaz (α -n-glikosidoinvertaz, α -glikopiranosidaz) dır. İvertaz (β -D-fruktofuranosidaz) sakkarozu etki ederek glikoz hidrolizini veya değişik derecelerde fruktosil aktarımını gerçekleştirir. İvertaz sadece terminal β -D-fruktofuranosil kısmı üzerine aktiftir, aglikon kısmına karşı seçiciliği düşüktür (Pitcher, 1980). Bunun için substrat β -D-fruktofuranosil grubu içermelidir. Hidroliz tepkimesi sonucunda oluşan karışım sakkaroz çözeltisinin gösterdiği optik çevirmeden farklı bir optik çevirme gösterir. Bu nedenle, oluşan şekerler karışımı "İvert şeker", olaya ise "İnversiyon" denir (Lehninger, 1975):



İvertaza katalitik aktivitesini -SH grupları ve substrata bağlanmasını -COOH grupları sağlar. Enzimin çalışabilmesi için substratın β -D-fruktofuranosil grubunu içermesi

gerekir. Enzim özellikle C-6 ve C-3 karbonlarında bulunan -OH ve glikozidik oksijenle birleşir. Ortam pH' sına göre enzim-substrat arabileşiminin oluşumu Şekil 2.11' de verilmiştir.



Şekil 2.11. Sakkaroz-invertaz arabileşiminin oluşumu

Sakkarozun invertaz ile hidrolizi ve invertazın deaktivasyonu enzim kinetiği çalışmalarında yaygın olarak incelenmiştir. Maya invertazı ağır metallerle, özellikle Ag^+ , Zn^{+2} , Hg^{+2} varlığında tersinir, ayrıca düşük üre derişimlerinde tersinir ve yüksek üre derişimlerinde tersinmez şekilde inhibe olur. İvertaz için en önemli inhibitör, tepkime ürünü olan D-Fruktoz' dur. Diğer bir inhibisyon, yüksek sakkaroz derişimlerinde (>20% (w/w)) görülen substrat inhibisyonudur (Chaplin and Bucke, 1990).

2.4.2. İvertazın Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Sakkarozun glikoz ve fruktoza hidrolizini katalizleyen invertaz, özellikle şeker endüstrisinde sakkarozdan invert şeker (D-Fruktoz) eldesinde kullanılır. İvert şeker, tatlılığının sakkarozdan daha fazla olması, kaynama noktasının daha yüksek, donma noktasının daha düşük olması, hidroliz sonucu oluşan monosakkaritlerin sakkarozdan daha fazla çözünür olması gibi özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. İvert şeker, özellikle şekerin kristallenmesinin istenmediği likör, dondurma, yapay bal üretiminde önemlidir (Frazier ve Westhoff, 1978).

2.4.3. İnvvertaz İmmobilizasyonu

Nelson ve Griffen'in 1916 yılında, sakkarozun aktif kömüre adsorplanmasını gözlemesi üzerine başlayan immobilizasyon çalışmalarından bu yana invertaz çeşitli yöntemlerle immobilize edilmiştir (Pitcher, 1980).

İnvvertaz immobilizasyonunda kullanılan yöntemlerden biri olan kovalent bağlama yönteminde çeşitli taşıyıcı materyallerle çalışılmıştır. Bunların arasında aminonaylon (Onyezili, 1987), çeşitli reçineler (Ooshima et al., 1980; Pitcher, 1980), polistiren (Filippusson and Hornby, 1970; Mansfeld and Schellenberger, 1987), Amberlit® ve Duolite® (Pitcher, 1980) gibi petrol kaynaklı materyaller sayılabilir. Bunlardan başka cam (Mason and Weetall, 1972; Ooshima et al., 1980), kabuklu hayvanların kabuklarından elde edilen kitin (Synowiecki et al., 1981) ve mısır dövmesi (Monsan et al., 1984) gibi materyaller de invertazın kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilen yüzey immobilizasyonunda kullanılmıştır.

Mansfeld ve Schellenberger (1987), invertazı gözenekli polistiren anyon değiştiriciye benzoquinone ve glutaraldehit yardımıyla kovalent bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Yazarlar, invertazın kesikli ve sürekli sistemlerdeki kinetik davranışlarına immobilizasyonun etkisini farklı yöntemlerle modifiye edilmiş polistiren yüzeyler için incelemişlerdir. Bu çalışmada serbest invertazın K_m değeri ile immobilize invertazın K_m değeri arasındaki oran 0.18-0.71 aralığında bulunmuştur. Ayrıca polistiren küreciklerin mekanik ve hidrodinamik özelliklerinin yanı sıra polistiren-invertaz kompleksinin yüksek seçiciliğe ve bağlı aktiviteye sahip olması nedeniyle fruktoz-glikoz karışımı üretimindeki teknik uygulamalar için uygunluğu belirtilmiştir.

İnvvertazın kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan yüzeylerden biri de camdır. Mason ve Weetall (1972) tarafından yapılan bir çalışmada, invertaz gözenekli cam partiküllere kovalent olarak bağlanmış, immobilize ve serbest invertaz için pH 4.6 ve 37°C' de saptanan K_m değeri (0.448 M) aynı bulunmuştur. Ayrıca işlem kararlılığını araştırmak için, cam partiküle bağlanan invertaz ile selüloza azo bağı ile bağlanan invertaz aynı çalışma şartlarında sürekli sistemde test edilmiş ve invertaz aktivite yarı ömrü sırasıyla 42.5 ve 3.7 gün olarak bulunmuştur.

Monsan et al. (1984), invertazın mısır dövmesi üzerine kovalent bağlama ile immobilizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Yüzeyin modifikasyonunda oksidasyon için sodyum metaperiodat, amino gruplarınca zenginleştirme için etilendiamin, indirgenme için sodyum siyanoborohidrid ve aktivasyon için glutaraldehit kullanılmıştır. Bu işlemler için optimal koşullar belirlenmiş ve maksimum aktivite olarak $7.2 \cdot 10^4$ μmol invert şeker/dk/g taşıyıcı elde edilmiştir. Bu değer daha önce gözenekli silika yüzeye

bağlanan invertaz için elde edilen aktiviteden 25 kat daha fazla bulunmuştur. İmmobilize invertazın yarı ömrü 40° C' de, 2 M sakkaroz çözeltisi için 365 gün olarak bulunmuştur.

İnvertaz muhtemelen büyük ölçekte, immobilize formda kullanılan ilk enzimdir. 1941-1946 yıllarını kapsayan dönemde, Altın Şurup (Golden Syrup) üretiminde kullanılan asit yerini maya invertazına bırakmıştır. Önce maya hücreleri otoliz edilmiş, elde edilen madde pH 4.7' ye ayarlanarak berraklaştırılmış, sonra kalsiyum sülfat yatak içinden geçirilerek filtre edilip aktif kömür üzerine adsorpsiyonla immobilize edilmiştir. İnvertaz içeren aktif kömür, şurup dekolorasyonunda kullanılan aktif kömür yatağı içine yerleştirilmiştir. Üretim büyük ölçekte ve düzenli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Fakat mikrobiyal kontaminasyon, dekolorasyon gücündeki azalma, ürünün asit hidrolizasyonu ile elde edilen tat ve kokuya sahip olamaması ve asitin tekrar kullanılabilirliğinin başarılması sebebiyle immobilize enzim prosesi terk edilmiştir. Fakat yarılanma ömrü pH 5.5 ve 55°C' de 90 gün olan çapraz bağlama ile stabilize edilmiş invertaz-aktif kömür karışımının, Brimac™, geliştirilmesiyle immobilize invertaz kullanımı yeniden başlamıştır. Bu canlanma kısmen, tatlandırıcı olarak kullanılan Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu üretiminde ürünün yüksek kaliteli ve açık renkli olarak elde edilebilmesinden kaynaklanmıştır. İmmobilize invertaz kullanımı hiçbir zaman asit hidrolizi ile eşit kalitede invert şurup vermemesine rağmen, asit hidroliz yönteminin koyu renk, yüksek tuz-kül içeriği, düşük kapasite ve kesikli sistem problemlerini ortadan kaldırmıştır (Gerhartz, 1990).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde enzim immobilizasyonu amacı ile polistiren kürecik yüzeylerinin modifikasyonu ve bunun sebep olacağı kimyasal değişimlerin belirlenmesi için yapılan testler açıklanacaktır. Yüzeyin amino gruplarınca zenginleştirilmesi ile ilgili yöntem anlatılacak ve yüzey özellikleri modifiye edilmemiş polistiren yüzeylerle karşılaştırmalı olarak FTIR tekniğiyle incelenecektir. Bunu, enzim immobilizasyonunu belirleyen parametrelerin saptanması izleyecektir. Son olarakta immobilize enzimlerin kinetik davranışlarını belirlemek amacı ile izlenen yöntem ele alınacaktır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Maddeler

Enzim immobilizasyonu amacı ile taşıyıcı matriks olarak kullanılan polistiren kürecikler (çap: 100-300 µm) H.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü' nde çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilmiştir (Yenigün, 1991). Ön denemelerde kullanılan büyük çaplı (6.5 mm) polistiren kürecikler Northumbria Biological LTD. (İngiltere) firmasından temin edilmiştir. Polistiren küreciklerin yüzey modifikasyonunda kullanılan ana kimyasal poli(phe-lys), çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehit (%25 lik sulu çözeltisi), immobilizasyonu gerçekleştirilen ve kinetik çalışmalarda kullanılan invertaz enzimi (E.C. 3.2.1.26) Sigma (A.B.D.) firmasından, substrat olarak kullanılan sakkaroz, BDH (İngiltere), asetat tamponunun (pH 4.5) hazırlanmasında kullanılan asetik asit ve NaOH, Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. İvertazın taşıyıcı yüzeye bağlanmasını nicel olarak izlemek amacıyla, radyoaktif işaretleme yönteminde kullanılan ^{99m}Tc-perteknetat, Amersham (İngiltere), SnCl₂.2H₂O, NaOH, Merck (Almanya) ve işaretlemenin kalite kontrolünde kullanılan Gelman ITLC-SG şeritler, Gelman Scientific Corp. (ABD), çözücü olarak kullanılan aseton Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Poli(phe-lys) çözeltisinin hazırlanışı: Poli(phe-lys) stok çözeltisi 1 g/lit olacak şekilde hazırlanmış, çözelti buzdolabında 4°C' de depolanmış ve saklama süresince mikrobiyal üreme gözlenmemiştir. Poli(phe-lys)' in % 1.0, % 2.5 ve % 5.0 (v/v)' lik sulu çözeltileri, stok çözelti kullanılarak hazırlanmıştır.

Glutaraldehit çözeltilerinin hazırlanışı: Taşıyıcı matris ile enzim arasında çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehitin, % 1.0, % 2.0 ve % 5.0 (v/v)' lik sulu çözeltileri, glutaraldehitin %25 lik sulu çözeltisinden hazırlanmıştır.

İnvertaz çözeltilerinin hazırlanışı: Deneylerde kullanılan invertaz, ekme mayası (Bakers' Yeast) kökenlidir ve protein içeriği % 25.7' dir (Kara, 1994). Etiket aktivitesi pH 4.5' da ve 55°C' de 500 ünite/dk/mg katı' dır. İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılan farklı derişimdeki (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/ml) invertaz çözeltileri, kullanılmadan hemen önce, gerekli miktarda enzimin tampon çözelti içinde köpürtülmeden karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Kinetik çalışmalarda kullanılan, bir seri deney için gerekli invertaz, 0.02 M pH 4.5' luk asetat tamponunda 2 mg/ml olacak şekilde magnetik karıştırıcıda, köpürme olmadan 5 dk. süreyle karıştırılarak iyice çözülüp her bir deneyde kullanılacak miktar kadar tüplere ayrılarak, -25°C' deki derin dondurucuda depolanmıştır. Enzim çözeltisi kullanılacağı zaman, dondurucudan çıkarılan tüp, 25°C' deki suya daldırılarak çözelti eritilip kullanılmıştır.

Sakkaroz çözeltilerinin hazırlanışı: Sakkarozun 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 M çözeltileri, 0.02 M pH 4.5' luk asetat tamponunda hazırlanır. Mikrobiyal gelişmeye engel olmak amacıyla sakkaroz çözeltileri günlük hazırlanmıştır.

Tampon çözeltilerin hazırlanışı: İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılan pH 6, 7 ve 8' lik fosfat tampon çözeltileri, 0.2 M' lık $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerinin farklı oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. pH 3 ve 4.5' luk asetat tampon çözeltileri, NaOH ve CH_3COOH farklı oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır (Altman and Dittmer, 1972).

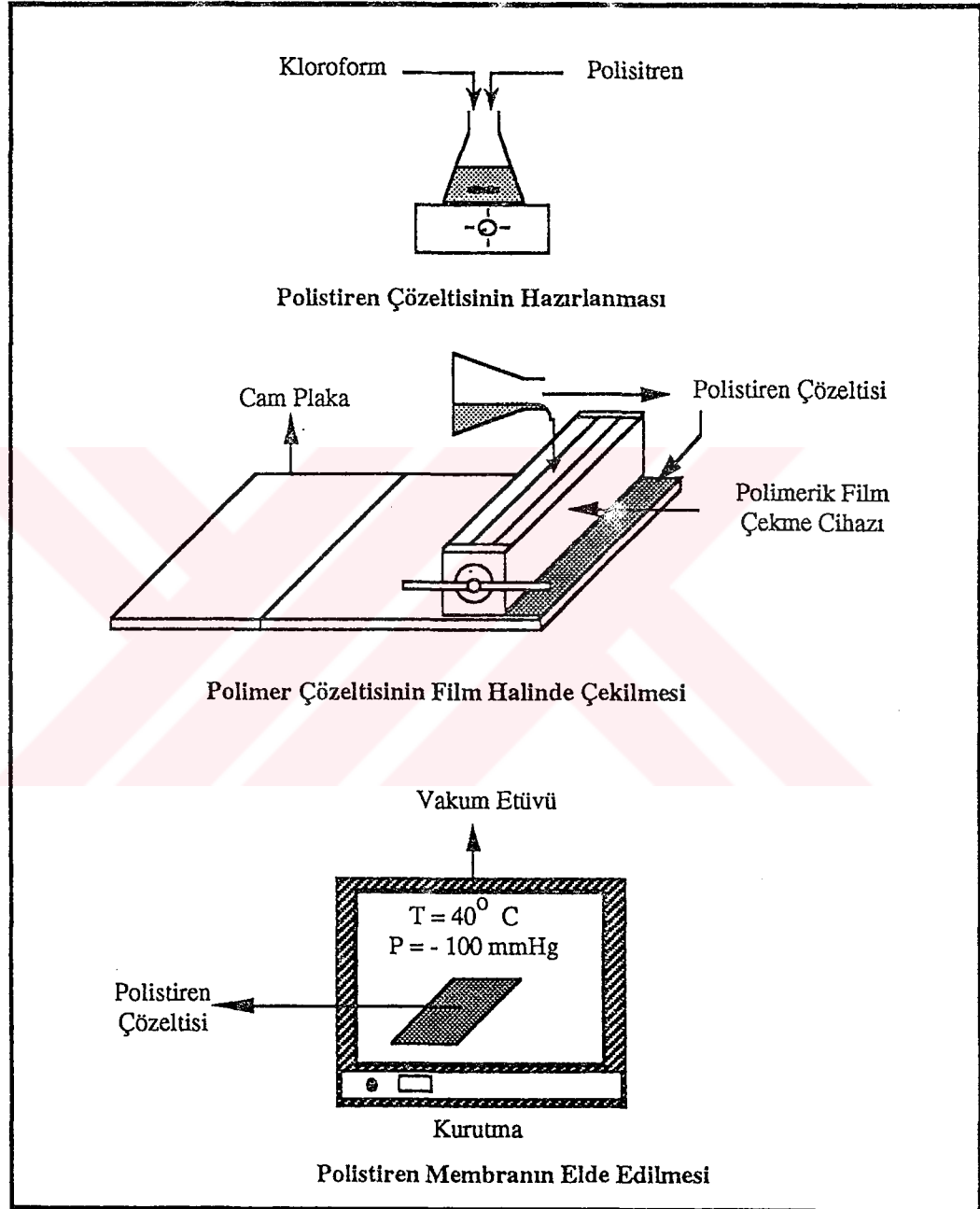
Sakkarozun invertaz ile hidroliz kinetiğinin incelenmesinde kullanılan 0.02 M asetat tamponu, 1 lt hacimde 1.6 gr NaOH ve 6.4 ml CH_3COOH olacak şekilde hazırlanmış ve pH 4.5' a ayarlanmıştır.

3.2. Polistiren Yüzeylerin Karakterizasyonu

Polistiren yüzeylerin kimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla FTIR-ATR spektrofotometresi (Shimatzu, FTIR8000, Japonya) ile çalışılmıştır. Ancak, kullanılan FTIR-ATR cihazının yaklaşık 10 μm ' den büyük taneciklerin yüzey karakterizasyonunu belirleyebilecek ek aksesuarının olmamasından dolayı, polistiren membranlar hazırlanmıştır. Polistiren kürelerle aynı yüzey özelliklerine sahip polistiren membranların hazırlanması için "çözücü döküm yöntemi" kullanılmıştır (Mutlu, 1983).

Polistiren membran üretimi için izlenen yöntem Şekil 3.1' de şematik olarak gösterilmiş olup, önemli basamaklar aşağıda özetlenmiştir:

Çözelti hazırlanması: Polistiren çözeltisi, çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilen polistiren tanecikler için hazırlanan çözeltiliye benzer şekilde, 100 ml kloroform içinde



Şekil 3.1. Polistiren membran üretimi

20 gr polistirenin (Petkim, Türkiye) 30 dakika sürekli karıştırılması ile hazırlanmıştır. Polistiren bu süre sonunda tamamen çözülmüş ve hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılması için karıştırmaya bir süre daha düşük devirde devam edilmiştir.

Membran çekme: Hazırlanan polistiren çözeltisi, kalınlığı yaklaşık 30 µm olacak şekilde ayarlanmış ince tabaka kromatografisinin haznesine hava kabarcığı olmayacak şekilde doldurulmuştur. Yüzeyi pürüzsüz cam, kloroform ile temizlenmiş ve kromatograf bu yüzey üzerinde sabit hızda kaydırılarak polimer çözeltisi bir film halinde yayılmıştır.

Membrandan çözücünün uzaklaştırılması: Cam yüzey üzerindeki membran ile birlikte sıcaklığı 40 °C ve basıncı -100 mmHg olan vakumlu etüve yerleştirilmiş, bu ortamda 1 saat kalan membran, bünyesindeki kloroformu tamamen kaybetmiş ve cam yüzeyden kolaylıkla ayrılabilmiştir.

Çözücü döküm yöntemi ile hazırlanan polistiren membran 1x2.5 cm boyutlarında kesilerek ATR ünitesindeki KRS-5 kristalinin her iki yüzüne yerleştirilmiş ve ATR ünitesinin ölçüm açısı 45° ye ayarlanarak ölçüm yapılmıştır.

3.3. Polistiren Yüzeylerin Poli(phe-lys) ile Modifikasyonu

Enzimlerin taşıyıcı yüzeye kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda en yaygın kullanılan fonksiyonel gruplardan biri amino grubudur. Polistiren küreciklerin yüzeyini amino grupları ile zenginleştirmek amacıyla kullanılan poli(phe-lys), fenilalanin ve lizinin bir kopolimeri olup fenilalanin/lizin oranı yaklaşık 1' dir. Polistiren yüzeylerin poli(phe-lys) ile modifikasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan 150-250 µm büyüklüğündeki polistiren küreciklerden 1 gr alınarak ultrasonik banyoda 1 saat (Bransonic, ABD) yıkama işlemi yapılmıştır.
- Poli(phe-lys)' in farklı derişimlerdeki sulu çözeltileri, stok çözelti kullanılarak % 0.010, % 0.025 ve % 0.050 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış, 100 ml poli(phe-lys) çözeltisine ilave edilen 1 g ağırlığındaki polistiren küreler, 25°C' de, sürekli karıştırma ortamında 24 saat süre ile etkileşime bırakılmıştır.
- Adsorptif kaplama işlemi tamamlandıktan sonra çözeltiden süzülen küreler 0.15 M NaCl çözeltisi ile yıkanıp distile su ile durulanmış ve kürecikler glutaraldehyt ile etkileşime hazır hale getirilmiştir.
- Poli(phe-lys)' in yüzeydeki varlığının etkisini kontrol etmek amacıyla poli(phe-lys) içermeyen kürelerde aynı işlemlerden geçirilmiştir.

3.3.1. Poli(Phe-Lys) ile Kaplanmış Polistiren Yüzeylerin Karakterizasyonu

Poli(phe-lys) ile kaplanan polistiren yüzeylerin kimyasal yapısı, FTIR-ATR spektroskopik tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, yüzeyi poli(phe-lys) ile kaplanmış polistiren küreciklerin ATR spektrumları, FTIR-ATR spektrofotometresi (Shimadzu, FTIR8000, Japonya) kullanılarak alınmıştır. Ancak Bölüm 3.2' de verilen problem burada da geçerli olduğundan, aynı bölümde hazırlama yöntemi anlatılan polistiren membranlar üzerine, Bölüm 3.3' de verilen yöntem uygulanarak poli(phe-lys) ile kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüzeyi poli(phe-lys) ile kaplı polistiren membran 1x2.5 cm boyutlarında kesilerek ATR ünitesindeki KRS-5 kristalinin her iki yüzüne yerleştirilmiş ve ölçüm için ATR ünitesinin ölçüm açısı 45° ye ayarlanmıştır.

Ayrıca, poli(phe-lys)' in toz halindeki yapısının FTIR spektrofotometrisi ile analizi, toz poli(phe-lys)' in KBr ile karıştırılıp tablet haline getirilmesi ve cihazın FTIR konumunda çalıştırılması ile gerçekleştirilmiştir.

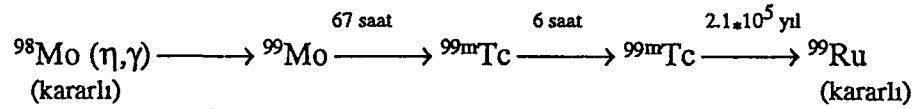
3.4. Modifiye Polistiren Yüzeylerin Glutaraldehit ile Aktivasyonu

Taşıyıcı yüzey ile enzim arasında çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren kürecikler, glutaraldehitin % 1.0, % 2.0 ve % 5.0 (v/v)' lik çözeltileri ile 25°C' de, 24 saat süre ile etkileşmeye bırakılmışlardır. Etkileşim süresi sonucunda çözeltilen alınan polistiren kürecikler 0.15 M NaCl çözeltisi ile yıkayıp distile suyla durulandıktan sonra enzim bağlama işlemi için hazır hale getirilmişlerdir.

3.5. İnvertzazın Radyoaktif İşaretlenmesi

Poli(phe-lys) ile modifiye edilen polistiren küreciklerin yüzeyine immobilize edilen enzim miktarını nicel olarak tespit etmek amacıyla, invertaz ^{99m}Tc-perteknetat (Amersham, İngiltere) ile işaretlenmiştir. Yapılan tüm radyoaktif işaretlemelerden sonra, işaretlemenin kalite kontrolü yapılmış ve işaretli enzimlerin aktivitesinin ortamdaki toplam aktiviteye oranı saptanmıştır (Ercan, 1976). Bu bölümde, ^{99m}Tc-perteknetat kullanılarak gerçekleştirilen invertazın işaretleme tekniği ve kalite kontrol yöntemi anlatılmıştır.

^{99m}Tc-perteknetat eldesi: ^{99m}Tc-perteknetat jeneratör adı verilen alüminyum oksit kolona absorplanan ⁹⁹Molibden'in üzerinden % 0.9' luk NaCl çözeltisinin geçirilmesi ile elde edilmektedir. Bu yıkama işlemi sonucunda ^{99m}Tc-perteknetat' ın oluşmuş aktivitesinin % 90-95 'i NaCl çözeltisine geçmektedir. Aşağıdaki mekanizma, jeneratörün hazırlanma, sağma ve çürüme basamaklarını içermektedir.



Mekanizmanın birinci basamağında, kararlı ${}^{98}\text{Mo}$ Molibden, ${}^{238}\text{U}$ Uranyum reaktöründe nötron bombardımanı ile ${}^{99}\text{Mo}$ Molibdene dönüştürülmektedir. Daha sonra alüminyum oksit kolona adsorplanan ${}^{99}\text{Mo}$ Molibden'in, çürümesi sırasında suda çözünebilir ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ Teknisyum meydana gelmektedir. Nükleer tıp ve çeşitli deneysel çalışmalarda kullanılan ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat bu aşamada jeneratörden sağılmakta ve çeşitli amaçlar için tüketilmektedir (Saha, 1984).

${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -İnvertaz hazırlama yöntemi: İnvvertaz immobilizasyonunda, modifiye polistiren yüzeylerde immobilizasyon veriminin belirlenebilmesi için invertaz, ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat kullanılarak, aşağıda verilen yöntemle işaretlenmiştir (Richards and Atkins, 1967):

- 20 mg invertaz, 2 ml distile suda çözülür.
- Kullanmadan hemen önce, ayrı bir şişede 10 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 ml distile suda çözülür.
- $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 0.5 ml alınarak, invertaz çözeltisine ilave edilir.
- pH, 0.5 N NaOH ile 7' ye ayarlanır.
- İçine yaklaşık 20 mCi ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat ilave edilir ve 20 dakika bekletilir.
- Tepkime tamamlandıktan sonra radyoaktif işaretlemenin kalite kontrolü yapılır.

3.5.1. Radyoaktif İşaretlenmiş Enzimlerde Kalite Kontrolü

Radyoaktif olarak işaretlenmiş maddelerin işaretlenme derecelerinin saptanması amacıyla her işaretleme işleminden sonra yapılan kalite kontrol yöntemi aşağıda özetlenmiştir (Ercan, 1976):

- İnce tabaka kromatografi havuzu uygun bir çözücü ile doldurulur. Bu çözücü genellikle yüksek buhar basınçlı bir sıvıdır. Çalışmada aseton kullanılmıştır.
- Gelman ITLC-SG şeridinin alt bölümüne (alttan 2-3 cm) 1 damla işaretlenmiş invertaz çözeltisinden damlatılır.
- Şeridin alt kısmı havuza yerleştirilir, çözücü şerit boyunca yükselmeye bırakılır.
- Şeridin tamamı çözücü ile ıslanınca banyodan çıkartılır ve kurumaya bırakılır.
- ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -invertaz şeridin alt kısımlarında kalırken, serbest ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat şerit boyunca yükselir. Şerit ortadan ikiye bölünür ve ayrı ayrı gama sintilasyon cihazında sayılır.
- Üst kısım ve alt kısım sayımları toplanır, alt kısım sayımı toplam sayıma oranlanır. Çıkan sonuç % olarak işaretlemenin derecesini verir.

3.6. Modifiye Polistiren Yüzeylerde İnvvertaz İmmobilizasyonu

Enzimlerin kovalent bağlanmasında taşıyıcı yüzey ile enzim arasındaki tepkimeye etki eden parametrelerin başında pH ve sıcaklık gelmektedir (Pitcher, 1980). İnvvertazın kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda polistiren yüzey ile invvertaz arasındaki tepkimeye pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiş, saptanan optimum pH ve sıcaklıkta farklı başlangıç invvertaz derişimlerinin etkisi araştırılmıştır.

pH' nun etkisi: İmmobilizasyon işlemine pH' nun etkisini araştırmak amacıyla pH 3, 4.5, 6, 7 ve 8' de deneyler yapılmıştır. Deneylerde sıcaklık 25°C' de ve invvertaz derişimi 1 mg/ml' de sabit tutulmuştur. Kullanılan polistiren kürecikler % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) ve % 2 (v/v) glutaraldehit ile modifiye edilmişlerdir.

Sıcaklığın etkisi: Bağlanmaya sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla 4, 25 ve 35°C' de immobilizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde pH 4.5' ta, invvertaz derişimi 1 mg/ml' de sabit tutulmuştur. Kullanılan polistiren kürecikler % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) ve % 2 (v/v) glutaraldehit ile modifiye edilmişlerdir.

Başlangıç enzim derişiminin etkisi: Enzimin polistiren yüzeye immobilizasyon miktarının saptanmasını amaçlayan bu aşamada farklı başlangıç derişimindeki (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/ml) invvertaz, pH 4.5' luk asetat tamponunda, oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Yıkama işleminden geçirilen kürecikler 100 ml hacmindeki işaretli invvertaz çözeltisi içerisinde 24 saat bekletilmiştir. 24 saat olarak düşünülen denge etkileşim süresi sonunda kürecik yüzeyindeki aktivite gama sintilasyon cihazında sayılarak immobilize edilen invvertaz miktarı saptanmıştır. Kürecik yüzeyindeki aktivite, başlangıç aktivitesine oranlanarak immobilizasyon verimi bulunmuş ve farklı başlangıç invvertaz derişimlerinde yüzeye ne kadar invvertaz bağlandığı hesaplanmıştır. Bu grup deneyler önceki aşamada optimum olarak tespit edilen 25°C' de ve pH 4.5' da gerçekleştirilmiştir.

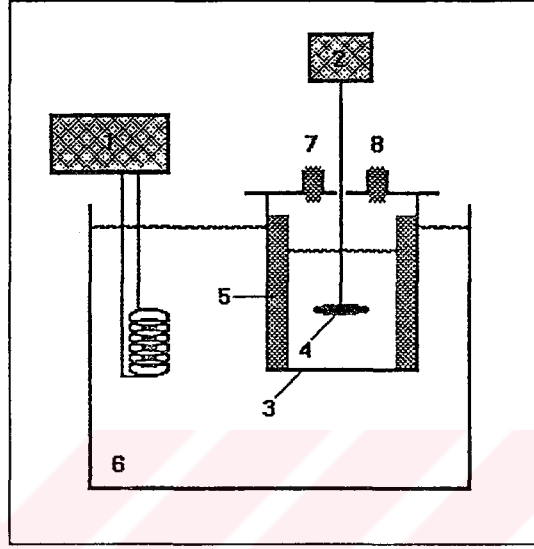
3.7. Sakkarozun İnvvertaz ile Hidroliz Kinetiğinin İncelenmesi

Serbest invvertazın ve immobilize invvertazın sakkarozu hidroliz kinetiği kesikli bir düzende optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 55°C' de incelenmiştir (Başçı, 1985). Karıştırma hızı, serbest invvertaz sistemi için 550 dev/dk ve immobilize invvertaz sistemi için 1200 dev/dk' da sabitlenmiştir.

3.7.1. Deney Düzeneği

Sakkarozun immobilize ve serbest invvertaz ile hidrolizi tepkimesinde, kullanılan düzenek Şekil 3.2' de verilmiştir. Düzenek, karıştırma hızı, pH ve sıcaklığı kontrol

edilebilen standart tepkime kabından oluşmuştur. Tepkime kabı, ağzı rodajlı 150 ml. kapasiteli, Pyrex® cam beherdir. Çalışılan sıcaklıkta, 55 °C, buharlaşma ile sıvı kaybını engellemek amacıyla sızdırmaz kapak kullanılmış, sistem örnek alımı dışında çevreye kapatılmıştır. Sakkaroz çözeltisini karıştırmak amacıyla kullanılan düzeneği oluşturan, mil, pervane ve dört adet tampon levha paslanmaz çelikten yapılmıştır.



Şekil 3.2. Deney düzeneğinin şematik görünümü (1. Denetimli (on-off) ısıtıcı, 2. Karıştırıcı motor, 3. Tepkime kabı, 4. Karıştırıcı pervane, 5. Tampon levha, 6. Su banyosu, 7. Örnek alma yeri, 8. Termometre yeri)

3.7.2. DeneYlerin Yapılışı

İmmobilize ve serbest invertazın sakkarozu hidroliz tepkimesi, kesikli bir düzenekte optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 55°C' de sakkaroz başlangıç derişimi 0.05-0.4 M aralığında, substrat derişiminin başlangıç tepkime hızına etkisi incelenmiştir. Tepkime hızlarının saptanması amacıyla, herbir farklı substrat derişiminde yapılan serbest ve immobilize invertaza ait deneyler aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tepkime hızlarının saptanması: Seçilen sakkaroz derişimi, pH 4.5' luk 0.02 M asetat tamponunda hazırlanmış ve tepkime kabı 100 ml sakkaroz çözeltisi ile doldurulmuştur. Karıştırıcı motorun hızı, serbest invertaz denemelerinde 550 dev/dk, immobilize invertaz denemelerinde ise yüzeydeki kütle aktarım kısıtlamasına engel olmak amacıyla 1200 dev/dk hızda sabitlenmiştir. Sakkaroz çözeltisi 55°C' ye gelince, serbest veya immobilize invertaz ortama eklenip tepkime başlatılmıştır. Tepkime sırasında belirli zaman aralıklarında alınan örnekler mutorotasyon olayının tamamlanması için bir gece buzdolabında bekletilmiştir. Glikozun mutorotasyonu ile ilgili ayrıntılı bilgi Ek 1' de verilmiştir. Mutorotasyon tamamlandıktan sonra örneklerin

D-glikoz derişimi (mg/dl), Glikoz Analizöründe (YSI Model 27, ABD) saptanmış ve elde edilen D-glikoz derişim değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek başlangıç tepkime hızı ($\mu\text{mol glikoz/dk/mg invertaz}$) hesaplanmıştır.

Çalışılan 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 M sakkaroz derişimleri için başlangıç tepkime hız değerleri hesaplandıktan sonra Lineweaver-Burk doğrusu çizilmiş ve bu doğrunun eğimi ve apsis kesim noktası kullanılarak Michaelis-Menten sabiti ve maksimum tepkime hızı hesaplanmıştır (Bölüm 2.1.4).

İnvertazın deaktivasyonu: Enzimler tepkime sırasında çeşitli nedenlerden dolayı zamanla aktivitelerini kaybederler. Sabit sıcaklık ve pH da yürütölen bir tepkimedede, çoğunlukla enzim deaktivasyon hızı, aktif enzim derişimine bağlı olarak üstel deaktivasyon modeli ile açıklanır (Bölüm 2.1.5).

Bu amaçla kısıtlayıcı olmayan 0.4 M substrat derişiminde, serbest ve immobilize invertaz için tepkime uzun zaman aralığında (120 dk) geręekleřtirilmiřtir. Herhangi bir andaki tepkime hızının başlangıç tepkime hızına oranı olarak tanımlanan enzim aktivite değerleri, a , hesaplanmış ve enzim aktivitesinin logaritmasına karşı zaman doğrusu çizilmiştir. Doğrunun eğiminden deaktivasyon sabiti, k_d , üstel deaktivasyon modelinden yararlanarak da (Eş. 2.15) serbest ve immobilize invertaz için aktivite yarı ömrü hesaplanmıştır.

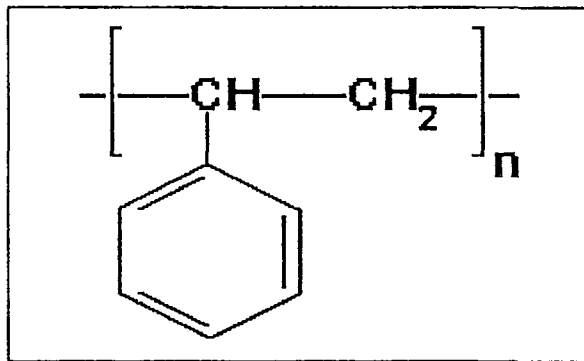
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, taşıyıcı matriks olarak kullanılan polistiren küreciklerin yüzeyleri amino gruplarınca zenginleştirilmek üzere poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş ve model enzim olarak seçilen invertaz, polistiren yüzeylere glutaraldehit yardımıyla kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Daha sonra serbest invertazın aktivitesi ile immobilize invertazın aktivitesi karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Bu bölümde, önce polistiren taşıyıcı matriks tanıtılmış ve yüzey özelliklerinin belirlenmesiyle ilgili çalışmaların sonuçları sunulmuştur. Daha sonra modifiye yüzeylerin enzim immobilizasyon performanslarının belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları tartışılmıştır. Son bölümde de serbest ve immobilize enzimin kinetik özelliklerini belirleyen çalışmaların sonuçları yer almıştır.

4.1 Polistiren Yüzeylerin FTIR-ATR Tekniği ile Tanımlanması

Çalışmanın bu bölümünde, yüzey kimyasal yapısının analizi amacı ile hazırlanan polistiren membranların ATR-FTIR spektrumları çekilmiştir. Bilindiği gibi infrared (IR) spektroskopisi ile yapıdaki farklı kimyasal bağların dönme, titreşim ve eğilme hareketleri ile ortaya çıkan farklı enerji seviyeleri belirlenmekte, böylece kimyasal yapı tanımlanabilmektedir. Bazı polimerik yapıların kimyasal bağlarına ait enerji seviyeleri Ek 2' de verilmiştir. ATR ataçmanı kullanıldığı durumda ise 5 µm derinliğe kadar yüzey analizi yapmak mümkün olmaktadır (Ewing, 1975).

Bu çalışmada kullanılan polistirenin kimyasal yapısı Şekil 4.1' de görülmektedir. Stiren, benzen ve etilenin birleşmesiyle elde edilen ve bir çok monomerle kopolimer oluşturma yeteneğine sahip bir maddedir (Boyer, 1970). Stiren polimer grubu üyelerinden olan polistiren, çeşitli polimerizasyon teknikleriyle üretilebilir (Alger, 1989).



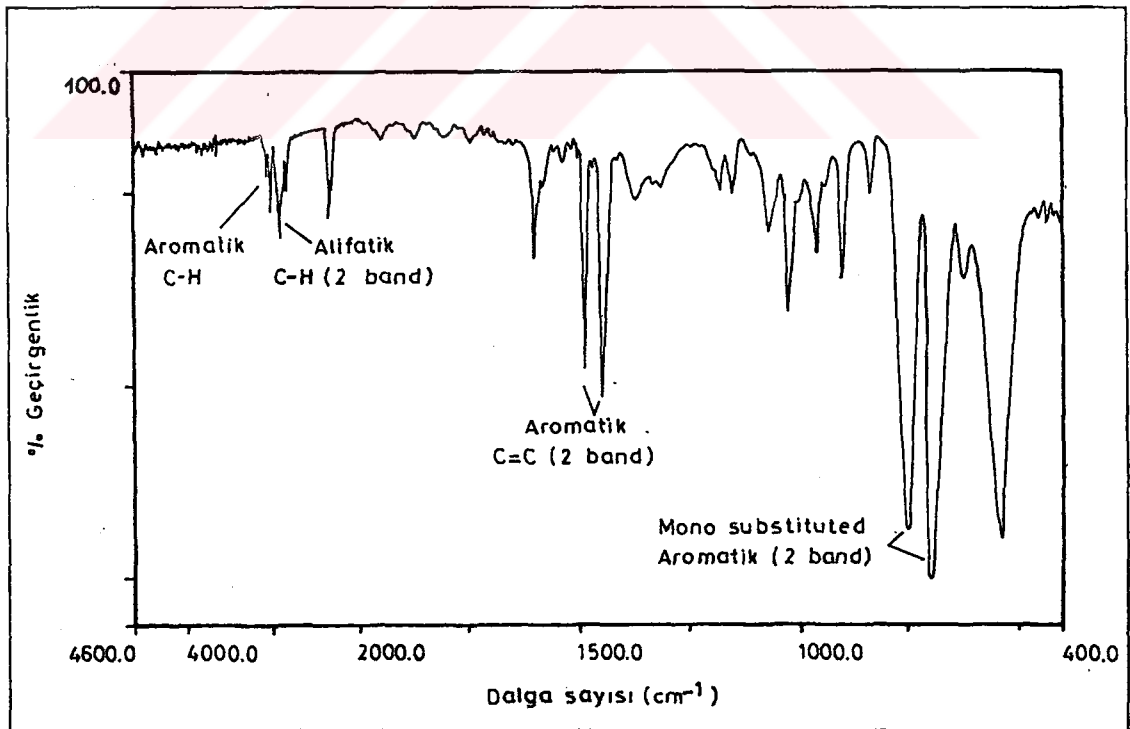
Şekil 4.1. Polistirenin yapısı

Şekil 4.1' deki bileşim göz önüne alınarak literatürden polistiren yapısını karakterize eden ve ATR-FTIR değerlendirmesi açısından önemli bazı gruplar ile ilgili spektral bölgeler seçilmiş ve bunlar Çizelge 4.1' de verilmiştir (Krause et al., 1983). Hazırlanan polistiren membran örneğinin Şekil 4.2' de görülen ATR-FTIR spektrumu bu çizelgeye dayanarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Polistiren yapısında bulunan temel gruplar ve ilgili spektral bölgeler

Fonksiyonel grup titreşim türü	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)
Mono substituted aromatik (2 band)	700-750
Aromatik C=C (2 band)	1500-1600
Alifatik C-H (2 band)	2800-3000
Aromatik C-H	3000-3100

Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi, polistiren için belirleyici pikler; sırasıyla ana zincire bağlı aromatik grup, aromatik yapıdaki C=C ve C-H titreşimleri ve alifatik yapıdaki C-H titreşimidir. Şekil 4.2' de, hazırlanan polistiren membrana ait ATR-FTIR spektrumu görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, polistiren için belirleyici pikler olan, ana zincire bağlı aromatik yapı ile aromatik yapıdaki C=C ve C-H titreşimlerine ait pikler



Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan polistirenin (Petkim, Türkiye) ATR-FTIR spektrumu

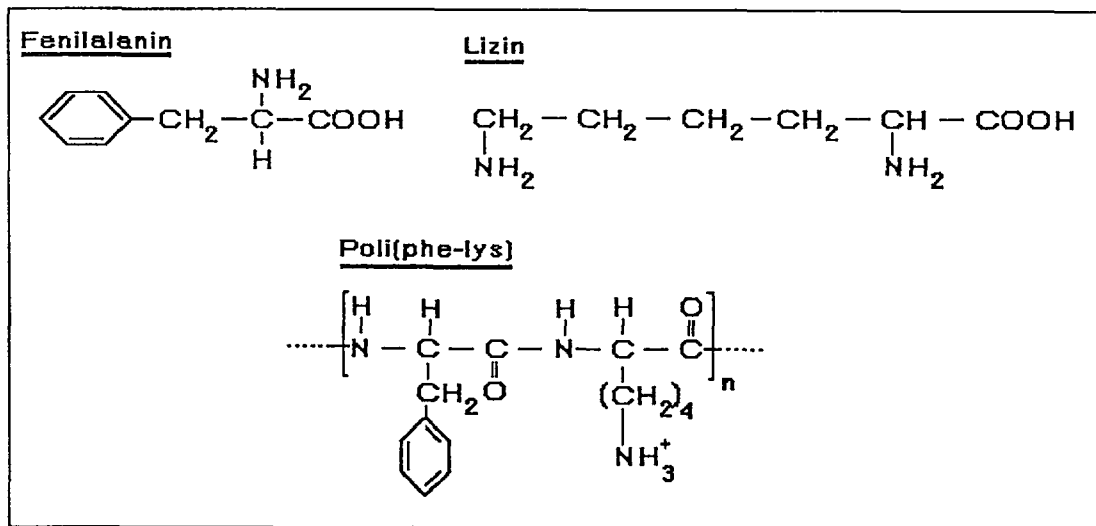


Şekil 4.3. Ticari bir polistirenin ATR-FTIR spektrumu (Krause, 1983)

ve polistiren zinciri ana yapısındaki alifatik C-H titreşimine ait pik, sırasıyla 700-750, 1450-1500, 3000-3100 ve 2800-3000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında belirlenmiştir. Şekil 4.3' de literatürden alınan, ticari bir polistirene ait spektrum görülmektedir. Petkim' den temin edilerek bu çalışmada kullanılan ve Şekil 4.2' de verilen polistiren spektrumu ile Şekil 4.3 karşılaştırıldığında, her iki spektruma ait piklerin büyük bir benzerlik gösterdiği, laboratuvarında hazırlanan polistirenin yapısında herhangi bir değişikliğin veya fonksiyonel gruplarda yönelmelerin olmadığı gözlenmiştir.

4.2. Polistiren Yüzeylerin Poli(phe-lys) ile Modifikasyonu

Enzim immobilizasyonu amacı ile çözücü buharlaştırma yöntemiyle laboratuvarında hazırlanan polistiren küreciklerin (çap: 100-300 μm) ve ön denemelerde kullanılan polistiren küreciklerin (çap: 6.5 mm) yüzeyleri, amino grupları ile zenginleştirilmek amacıyla, poli(phe-lys) ile işlenmiştir. Poli(phe-lys), fenilalanin (Phe) ve lizin (Lys) amino asitlerinin bir kopolimeridir. Fenilalanin (α -amino- β -fenilpropiyonik asit) ve lizinin (α - ϵ -diaminoheksanoik asit) kimyasal yapısı Şekil 4.4' de verilmiştir.



Şekil 4.4. Fenilalanin, lizin ve poli(phe-lys)' in kimyasal yapısı

Şekilden de görüldüğü gibi, fenilalanin ve lizin, diğer amino asitler gibi yapılarında aynı karbona bağlı bir karboksil (-COOH), bir de amino (-NH₂) grubuna sahiptirler. Aromatik amino asitlerden olan fenilalaninin yapısında, metil grubuna bağlanmış bir fenil halkası bulunur. Bazik amino asitlerden olan lizin ise, alifatik zincirinde ε-NH₂ grubu ile pozitif yüke sahiptir. Bu iki amino asit birbirine peptit bağı oluşturarak bağlanır ve (n) kadar amino asitten oluşan polipeptit zincirinde (n-1) kadar da peptit bağı bulunur. Peptit bağı yapımına, bir amino asidin karboksil grubu ile diğer amino asidin amino grubu katılmaktadır. Poli(phe-lys), kondenzasyon polimerizasyonu oluşum mekanizmasına uygun olarak oluşur (Pişkin, 1987). Buna göre karboksil grubundan bir (-OH) ile amino grubundan bir (-H) birleşmekte ve bir mol su çıkması sonucu peptit bağı oluşmaktadır. Poly(phe-lys) yapısını oluşturan fenilalanin ve lizinin peptit bağı ile bağlanarak oluşturduğu polipeptitin kimyasal yapısı Şekil 4.1' de verilmiştir.

Poli(phe-lys)' in polistiren yüzeylere bağlanma mekanizmasını şu şekilde açıklamak mümkündür: Aminoasitler ve üst grubu olan proteinler, ortam şartlarına bağlı olarak yüzeylere yüksek oranda adsorplanma eğilimi gösterirler (Brash ve Horbett, 1981). Bu çalışmada yüzey modifikasyonu amacıyla kullanılan ve temelde protein yapısında bulunan poli(phe-lys)' in de polistiren yüzeylere adsorptif kuvvetlerle bağlandığı söylenebilir. Bölüm 2.3.1' de adsorpsiyon olayının mekanizmasından ve adsorpsiyon çeşitlerinden bahsedilmiştir.

İmmobilize enzim proseslerinin, genelde sürekli üretime dönük ve kullanılan reaktörlerin akış dinamikleri dolayısı ile yaratılan türbulansdan doğrudan etkilenen yapısı göz önünde bulundurulursa, adsorptif kuvvetlerle bağlı bir yüzey modifikasyonunun bu amaca uygun olmadığı düşünülebilir. Fakat, polistiren kürelerin poli(phe-lys) ile etkileşimi işlemi tamamlandıktan sonra taneciklerin yüksek devirli mekanik karıştırma ortamında (1100 rpm) 16 saat bekletilmesinden sonra çözüldükten alınan örneklerde, poli(phe-lys)' in yüzeyden uzaklaşmadığı, 280 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle gösterilmiştir. Bu durum, poli(phe-lys) adsorpsiyonunun kemisorpsiyon (Bölüm 2.3.1) şeklinde gerçekleştiğini göstermekte, yapının 16 saatlik mekanik etkilere dayanması ile de kararlı bir yüzey modifikasyonu sağlandığı anlaşılmaktadır.

Poli(phe-lys)' in yapısını oluşturan lizin ve fenilalaninden özellikle lizin kovalent bağ tepkimelerinde daha fazla kullanılır. Proteinlerin yapısında bulunan amino asitlerden bazılarının kovalent bağlanma tepkimelerinde kullanılabilirliği Çizelge 4.2' de verilmiştir (Chaplin and Bucke, 1990).

Çizelge 4.2. Kovalent bağlanma için amino asitlerin bağıl kullanılabilirliği

Amino asit	Bağ oluşturma yeteneği	Bağ stabilitesi	Kullanım
Arjinin	+	±	-
Histidin	±	+	+
Lizin	++	++	++
Methionin	-	-	-
Serin	++	+	±
Sistein	-	-	-
Threonin	++	±	±
Triptofan	-	+	±
Tirozin	+	+	+

++, +, ±, - işaretleri yüksekten düşüğe doğru verilmiştir.

Çizelgeden de anlaşılacağı gibi lizin diğer amino asitlere göre kovalent bağ oluşturmaya daha eğilimli bir amino asittir. Polistiren yüzeyler, poli(phe-lys) ile kaplandıktan sonra enzimi yüzeye immobilize etmek için kullanılan glutaraldehitin yüzeye bağlanmasının, lizinin varlığında daha da kolaylaştığını söyleyebiliriz.

4.3. Poli(Phe-Lys) ile Kaplanmış Polistiren Yüzeylerin FTIR-ATR Tekniği ile Tanımlanması

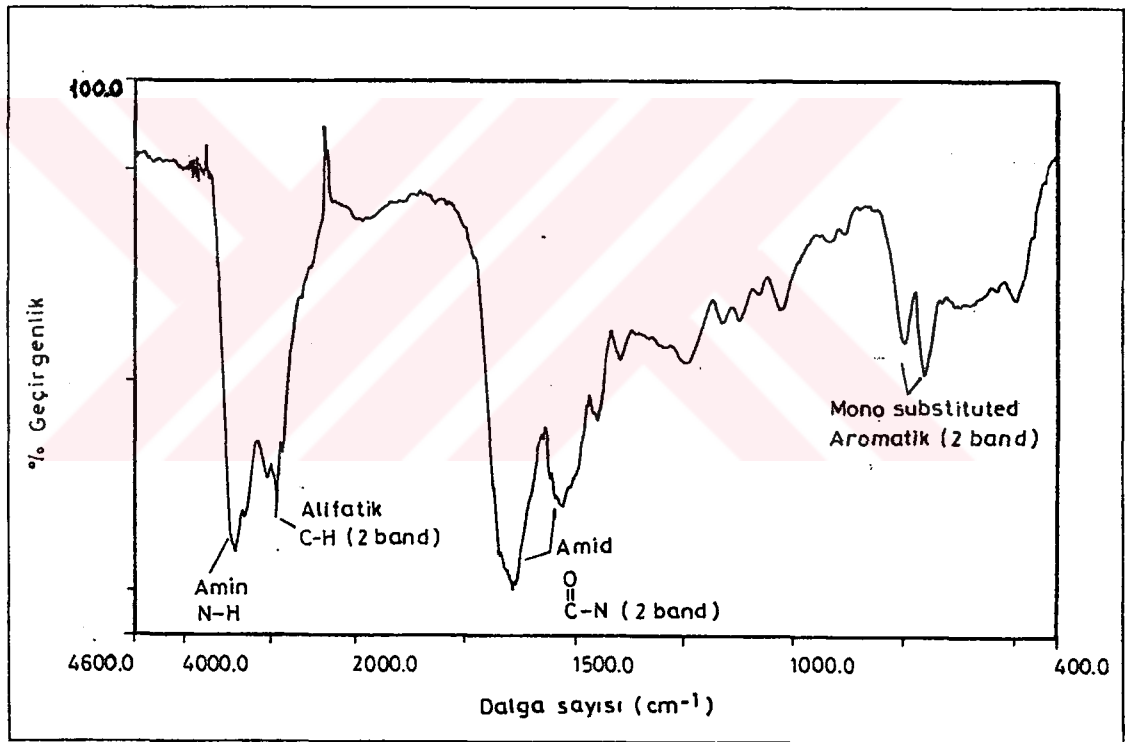
Çalışmanın bu bölümünde, yüzey kimyasal yapısının analizi amacıyla poli(phe-lys) ile kaplanan polistiren membranların ATR-FTIR spektrumları çekilmiştir. Bu çalışmada kullanılan poli(phe-lys)' in yapısı Şekil 4.2' de görülmektedir. Bu polimerik yapıya göre poli(phe-lys)' in yapısında bulunan titreşim türleri FTIR değerlendirmesi yapılarak belirlenmiştir. Poli(phe-lys)' in Şekil 4.2' deki bileşimi göz önüne alınarak literatürden poli(phe-lys) yapısında bulunan FTIR yönünden önemli bazı gruplar ile ilgili spektral bölgeler seçilmiş ve bunlar Çizelge 4.3' de verilmiştir (Krause et al.,1983). Hazırlanan poli(phe-lys) örneğinin Şekil 4.5' de görülen FTIR spektrumu bu çizelgeye dayanarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.3' de görüldüğü gibi, poli(phe-lys) için belirleyici pikler; sırasıyla ana zincire bağlı bir aromatik grup, amid yapıdaki O=C-H, alifatik yapıdaki C-H ve amin yapıdaki N-H titreşimlerine ait piklerdir. Şekil 4.5' de, poli(phe-lys)' e ait FTIR spektrumu görülmektedir. Poli(phe-lys) için belirleyici pikler olan, ana zincire bağlı bir aromatik

grup, amid yapıdaki O=C-N, alifatik yapıdaki C-H ve amin yapıdaki N-H titreşimlerine ait pikler, sırasıyla 700-750, 1500-1650, 2900-3100 ve 3400-3500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, Şekil 4.5' de de belirlendiği gibi görülmektedir.

Çizelge 4.3. Poli(phe-lys) yapısında bulunan temel gruplar ve ilgili spektral bölgeler

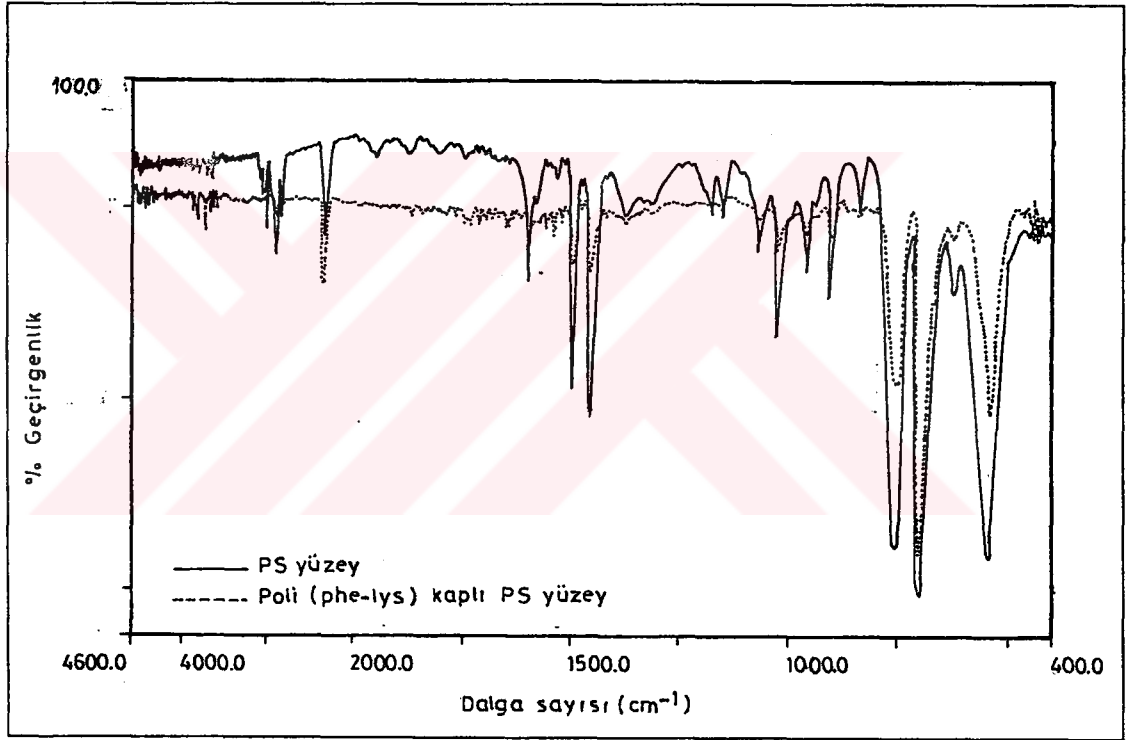
Fonksiyonel grup titreşim türü	Dalga Sayısı (cm^{-1})
Mono substituted aromatik (2 band)	700-750
Amid O=C-N (2 band)	1550-1650
Alifatik C-H (2 band)	2800-3000
Amin N-H	3250-3550



Şekil 4.5. Poli(phe-lys)' in FTIR spektrumu

Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren kürelerin, yüzeylerinde oluşan değişimi göstermek amacı ile, polistiren ve poli(phe-lys) kaplı polistiren yüzeylerden alınan ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.6' de verilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı gibi, polistiren ve poli(phe-lys) ile kaplanan polistiren yüzeylere ait ATR-FTIR spektrumları karşılaştırıldığında belirgin değişiklikler gözlenmektedir. Bu değişiklikler sıralanacak olursa; (i) 3000-3100 dalga sayısı aralığındaki aromatik C-H titreşimine ve 2800-3000

dalga sayısı aralığındaki alifatik C-H titreşimine ait pikin azaldığı gözlenmektedir. (ii) 1450-1500 dalga sayısındaki aromatik C=C titreşimine ait pik yüksekliğinde belirgin şekilde azalma görülmektedir. (iii) Polistireni karakterize eden ana zincire bağlı aromatik gruba ait 700-750 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki pikin yüksekliği azalmış olmakla birlikte poli(phe-lys) kaplı yüzeyde de görülmektedir. (iv) Ayrıca polistiren yüzeyinde yapıyı karakterize eden pikler dışında görülen pik yüksekliklerinin de belirgin şekilde azaldığı görülmektedir. Yüzeyi poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistirene ait ATR-FTIR spektrumunda poli(phe-lys) yapısını karakterize eden N-H bandları belirgin şekilde görülmemektedir. Bunun nedeni yüzey kaplanmasında kullanılan poli(phe-lys) derişiminin, yüzeyin ATR spektrumunun alınabilmesi için yeterli derişim değerinde olmaması şeklinde açıklanabilir.



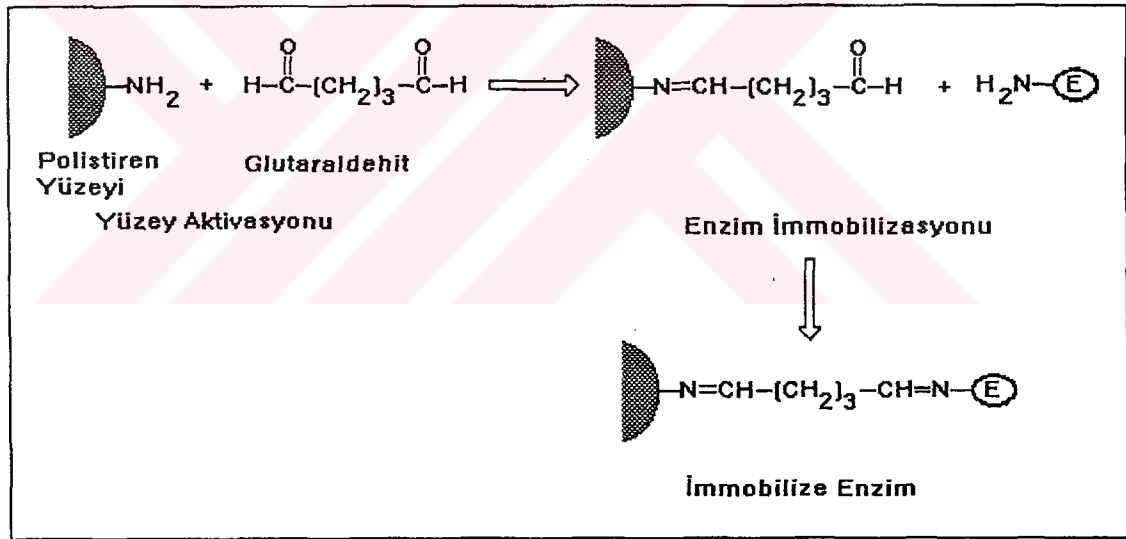
Şekil 4.6. Polistiren ve poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylerin karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumları

4.4. Modifiye Yüzeylerin Glutaraldehit ile Aktivasyonu

Glutaraldehit, enzim immobilizasyon tekniklerinde yaygın olarak kullanılan, her iki ucunda aktif aldehit grupları bulunan, bu uçları ile amino gruplarına karşı yüksek afinite gösteren bir çapraz bağlayıcıdır (Pitcher, 1980). Bu çift fonksiyonlu aldehit, serbest amino grubu taşıyan polimerler ile tepkime verir ve aldehit fonksiyonu içeren bir matriks meydana getirir. Ancak glutaraldehit ile proteinler veya sentetik polimerler

arasındaki tepkimenin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber tepkimeyi karakterize etmek için bazı yaklaşımlarda bulunulmuştur. Tepkime sulu ortamda ve pH 5-9 aralığında gerçekleşmekte ve tepkime hızı pH arttıkça artmaktadır. Genellikle pH 7' nin üzerinde gerçekleşen modifikasyonlar geriye dönüşümsüz olmaktadır. Tepkime temel olarak protein üzerindeki amino grupları ile gerçekleşmektedir (Goldstein and Manecke, 1976). Taşıyıcının ön aktivasyonu oda sıcaklığında, % 10 (v/v) ve üzerindeki glutaraldehit derişimlerinde gerçekleştirilirken enzim varlığında glutaraldehit derişimi % 0.01-1.0 (v/v) aralığında tutulmakta ve etkileşme süresi 1-60 dk. arasında değişmektedir. Fakat yine de her taşıyıcı-enzim çifti için optimal koşullar farklılık göstermektedir (Demain and Solomon, 1986).

Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş, diğer bir deyişle, yüzeyleri amino gruplarınca zenginleştirilmiş polistiren tanecikler, glutaraldehit ile aktif hale getirilmişlerdir. Enzim ile polistiren kürecikler arasında bağlantı ajanı olarak kullanılan glutaraldehitin yapısında bulunan iki aldehit grubundan biri polistiren yüzeyindeki amino grubu ile tepkimeye girerken, diğer aldehit grubu ise enzim ile birleşir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylere glutaraldehit aracılığı ile enzim immobilizasyonu (Hartmeier, 1988)

Polistiren yüzeylerin aktivasyonunda kullanılan poli(phe-lys)' in yapısını oluşturan aminoasitlerden biri olan lizinin ϵ -NH₂ grubu, aldehit ve ketonlarla kolayca tepkimeye girme özelliğine sahiptir (Gözükara, 1989). Fakat glutaraldehit-amino grubu etkileşiminde dikkat edilmesi gereken önemli bir husus, glutaraldehitin düşük miktarlarındaki kullanımında yüzeylerde bulunan amino gruplarının glutaraldehitin her iki ucu ile bağlanması, dolayısı ile enzim bağlamak için kullanıma açık serbest aldehit

grubu kalma olasılığının azalmasıdır. Bu durum, hem yüzeyleri amino gruplarınca zenginleştirilmiş polistiren taneciklerin ve kullanılan kimyasalların ziyan olmasına, hem de yüzey aktivasyonunun gerçekleştirilememesine neden olmaktadır. Bu duruma engel olmak için, yüzey amino grubu yoğunluğunun saptanması ve stokiometrik ihtiyaçtan bir kaç misli fazla glutaraldehit ile yüzeylerin etkileştirilmesi (Mutlu et al., 1991) veya doğrudan aşırı miktarda glutaraldehit ile yüzeylerin işlenmesi gerekmektedir. Bunlar dışında, glutaraldehit kullanımındaki bu problemi çözmek için yeni yöntemler geliştirilmektedir (Chang-Zhi and Yao-Ting, 1989). Bu çalışma da yüzeylerin glutaraldehit ile aktivasyonunda ikinci yol kullanılmış yani yüzeyler doğrudan aşırı miktarda glutaraldehit ile işlenmiştir. Bununla ilgili deneysel sonuçlar Bölüm 4.6.2' de verilmiştir.

4.5. İnvertzazın Radyoaktif İzleyici ile İşaretlenmesi

Modifiye polistiren yüzeyine invertaz immobilizasyonunu nicel olarak izleyebilmek için ^{99m}Tc -pereteknetat kullanarak invertaz radyoaktif olarak işaretlenmiştir. Radyoaktif işaretlemelerde invertaza ait işaretleme verimleri, her işaretlemeden sonra yapılan kalite kontrol işlemi sonucunda %99 civarında bulunmuştur. Radyoaktif işaretlemenin % 99 gibi yüksek oranlarda çıkmasından dolayı, işaretleme ortamında kalan % 1 civarındaki serbest ^{99m}Tc -pereteknetatı ayırmak için herhangi bir saflaştırma işlemine gidilmemiştir.

4.6. Polistiren Yüzeylerde İnvertzaz İmmobilizasyonu

Polistiren küreciklerin modifikasyonundan sonra invertaz, yüzeye kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Yüzey immobilizasyonunun avantajı, enzim-substrat etkileşimine difüzyon kısıtlamasının, taşıyıcı materyal çevresinde yüksek türbülans yaratılması ile kolaylıkla minimize edilebilmesidir. Bu durum, matriks içi tutuklama yöntemine göre avantaj sağlamaktadır. Matriks içi immobilizasyon yönteminde görülen difüzyon kısıtlaması, taşıyıcı materyalin iç yapısı tarafından kontrol edilmektedir. Kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonunun olası dezavantajı, enzimin konformasyonel yapısının değişmesi ve sterik engellemeler dolayısı ile görülebilecek aktivite kaybıdır. Sterik engellemeler matriks yüzeyi-enzim arasındaki bağı "spacer" ile uzatılmasıyla belli ölçüde giderilebilmektedir (Hartmeier, 1988).

Bu bölümde, poli(phe-lys) modifikasyonu ve glutaraldehit aktivasyonu sonucu enzim immobilizasyonu için hazırlanan polistiren yüzeylerde, invertaz immobilizasyonuna etki eden parametreler tartışılmıştır. Bu parametreler, sırasıyla, başlangıç poli(phe-lys)

derişiminin etkisi, başlangıç glutaraldehit derişiminin etkisi, sıcaklık ve pH gibi fizikokimyasal parametreler ve başlangıç invertaz derişiminin etkisi olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Her bir parametre için yapılan bir dizi ön deneme sonucunda elde edilen sonuçlar arasında maksimum invertaz immobilizasyon verimini veren değerler aşağıdaki bölümlerde incelenmiştir.

4.6.1. Poli(phe-lys) Derişiminin Etkisi

Enzimlerin taşıyıcı yüzeye kovalent bağlanma tepkimelerinde en yaygın kullanılan fonksiyonel gruplardan biri de amino gruplarıdır. Polistiren yüzeylerin amino grupları ile zenginleştirilmesi amacıyla yüzeyler poli(phe-lys) ile aktive edilmiştir. Bu amaçla poli(phe-lys)' in % 0.000, % 0.010, % 0.025 ve % 0.050' lik (w/v) derişimleri ile etkileştirilen yüzeylerdeki enzim immobilizasyon verimleri Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Yüzey modifikasyonunda kullanılan poli(phe-lys) derişiminin invertaz immobilizasyon verimine etkisi (T: 25°C, pH: 4.5, Glutaraldehit Derişimi: % 2.0 (v/v), Başlangıç İvertaz Derişimi: 1.0 mg/ml)

Poli(phe-lys) Miktarı % (w/v)	İmmobilizasyon Verimi %
0.000	0.2
0.010	23.7
0.025	19.3
0.050	15.3

Çizelge 4.4' den de anlaşılacağı gibi, poli(phe-lys) ile işlem görmemiş polistiren yüzeylere invertaz immobilizasyonu hemen hemen mümkün olamamaktadır. Yüzeyler diğer aktivasyon işlemlerinden geçmesine ve immobilizasyon optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilmesine rağmen polistiren yüzeylerde immobilizasyon verimi ancak % 0.2 civarında olmuştur.

Poli(phe-lys)' in artan başlangıç modifikasyon derişimlerinde, enzim immobilizasyon verimi hızlı bir şekilde artış göstermiş, fakat belli bir derişim değerinden sonra düşmeye başlamıştır. Bu durum, yüzeyin taşıyabileceği enzim miktarının bir üst sınırı olduğunun göstergesidir. Yüzeye bağlanan enzim miktarının bir plato değerine ulaşmayıp belirli bir değerden sonra azalması, yüksek poli(phe-lys) başlangıç derişimlerinde görülen sterik engellemelerdir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Başlangıç poli(phe-lys) derişimi arttıkça, poli(phe-lys) moleküllerinin biraraya gelerek kolloidal yapı oluşturması sonucu polistiren yüzeyine bağlanan poli(phe-lys)

moleküllerinin sayısı azalır, bu da poli(phe-lys) molekülüne bağlanan glutaraldehit miktarının ve dolayısı ile bağlanan enzim miktarının azalmasına sebep olur.

Bu bulgular doğrultusunda, polistiren yüzeyine invertaz immobilizasyonu için optimum poli(phe-lys) başlangıç derişimi % 0.01 (w/v) olarak bulunmuştur.

4.6.2. Glutaraldehit Derişiminin Etkisi

Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş, diğer bir deyişle, yüzeyleri amino gruplarınca zenginleştirilmiş polistiren tanecikler, glutaraldehitin % 1, % 2 ve % 5' lik (v/v) çözeltileri ile aktif hale getirilmişlerdir. Glutaraldehitin % 1, % 2 ve % 5' lik (v/v) derişimleri kullanılarak aktive edilen yüzeylerdeki enzim immobilizasyon verimleri Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Yüzey modifikasyonunda kullanılan glutaraldehit derişiminin enzim immobilizasyon verimine etkisi (T: 25°C, pH: 4.5, Poli(phe-lys) Derişimi: % 0.01 (w/v), Başlangıç İvertaz Derişimi: 1.0 mg/ml)

Glutaraldehit Miktarı		İmmobilizasyon Verimi
% (v/v)	mM	%
1	2.5	7.1
2	5.0	23.7
5	12.5	12.5

Çizelge 4.5 'de görüldüğü gibi, %1 (v/v) glutaraldehit başlangıç derişimi ile aktive edilen yüzeylerdeki invertaz immobilizasyon verimi % 7.1 iken, glutaraldehit derişiminin % 2 (v/v) seviyesine artırılması ile verim % 23.7' ye yükselmektedir. Bu durumu şu şekilde açıklamak mümkündür. Glutaraldehitin düşük derişimlerinde yüzeylerde bulunan amino gruplarının glutaraldehitin her iki ucu ile bağlanması, dolayısı ile enzim bağlamak için kullanıma açık serbest aldehit grubu kalma olasılığının azalması durumundan Bölüm 4.4' de bahsedilmişti. Düşük derişimlerde görülen bu durum, hem modifiye polistiren yüzeylerdeki amino gruplarının fonksiyonlarını engellemekte, hem de enzim ile bağ yapacak ortamın yaratılmasını kısıtlamaktadır. Fakat ortamdaki glutaraldehit derişimi arttıkça, modifiye polistiren yüzeyle glutaraldehit etkileşimi daha yoğun olmakta, bu yoğunluk dolayısı ile aldehit gruplarından biri yüzeydeki amino grubu ile birleşirken diğer aldehit grubu geriye dönerek yüzeydeki bir diğer amino grubu ile birleşmeye fırsat bulamamaktadır. Bu nedendir ki genellikle amino grupları üzerinden glutaraldehit ile gerçekleştirilen

aktivasyon işlemlerinde, glutaraldehit derişimi amino gruplarına göre stokiyometrik ihtiyacın bir kaç misli üzerinde kullanıldığı literatürde bildirilmiştir (Hartmeier, 1988).

Glutaraldehit başlangıç derişimi ile artan invertaz immobilizasyon veriminin, yüzeydeki tüm amino grupların, glutaraldehitin yapısındaki aldehitlerden biri ile bağlanıp diğeri ile enzim bağlanmasına hazır hale gelmesi sonucu, bir plato değerine ulaşılması beklenen bir gelişmedir. Ancak artan başlangıç glutaraldehit derişimi ile artış gösteren verim, glutaraldehitin % 5' lik başlangıç derişiminden sonra düşme eğilimi göstermiştir. Bu durum ise beklenen genel eğiliminin tersine bir sonuçtur. Bu ters durum, yüzey modifikasyonunun özelliği ile açıklanabilir. Poli(phe-lys), fenilalanin ve lizin bir kopolimeri olup büyük moleküler yapıya sahip bir proteindir. Bölüm 4.2' de açıklandığı gibi poli(phe-lys), yüksek adsorplanma özelliğine sahiptir ve polistiren yüzeye kemisorpsiyon ile bağlanmıştır. Bu büyük moleküle glutaraldehitin de, amino grupları üzerinden kovalent bağlanmasının dışında belli oranda adsorplanması söz konusu olabilir. Bu adsorplanma eğilimi, diğeri bir deyişle seçici olmayan bağlanma (non-specific binding) artan glutaraldehit başlangıç derişimi ile artar. Deneysel çalışmalar bölümünde anlatıldığı gibi, glutaraldehit ile aktivasyon işlemi sonucu polistiren küreler iyice yıkanmasına rağmen yüksek glutaraldehit derişimlerinde yüzeydeki seçici olmayan bağlanma tamamen giderilemeyebilir. Bu durumda, yüzeye adsorplanan glutaraldehit molekülündeki aldehit gruplarının ortamdaki serbest invertazın amino gruplarına afinitesi dolayısıyla yüzeyden ayrılıp serbest invertaza çapraz bağlarla bağlanabilirler. Bu durum ise yüzeye bağlanma olasılığı olan enzimlerin yüzey dışında da glutaraldehit ile bağlandığını ve poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylerdeki invertaz immobilizasyon verimini düşürme nedenini açıklamaktadır.

Bu bulgular doğrultusunda, poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylere invertaz immobilizasyonu için optimum glutaraldehit başlangıç derişimi % 2 (v/v) olarak saptanmıştır.

4.6.3. Fizikokimyasal Parametrelerin Etkisi

Sıcaklığın etkisi: İvertaz immobilizasyonuna sıcaklığın etkisini araştırmak amacı ile deneyler 4, 25 ve 35°C' de gerçekleştirilmiş ve bu deneylere ait sonuçlar Çizelge 4.6' da verilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi, belli bir sıcaklık değerine kadar artan enzim immobilizasyon verimi, 25°C' den sonra düşmeye başlamıştır. Bu sıcaklık, çalışmanın diğeri bölümlerinde gerçekleştirilen enzim immobilizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. Enzim immobilizasyonuna sıcaklığın etkisi (pH: 4.5, Poli(phe-lys) Derişimi: % 0.01 (w/v), Glutaraldehit Derişimi: % 2 (v/v), Başlangıç İvertaz Derişimi: 1.0 mg/ml)

Sıcaklık, °C	İmmobilizasyon Verimi, %
4	7.4
25	23.7
35	5.6

Çizelge 4.6 'da görüldüğü gibi, 4°C' de immobilizasyon verimi % 7.40 seviyesinde iken, bu değer sıcaklığın 25°C' ye çıkmasıyla % 23.67' ye yükselmiş, ancak sıcaklığın 35°C' ye yükselmesi ile verim % 5.57' ye düşmüştür. İmmobilizasyon veriminin, oda sıcaklığına kadar (25°C) sıcaklıkla artması beklenen bir durumken, 35°C gibi enzimatik aktivite için yüksek olmayan bir sıcaklıkta beklenmeyen düşüşünü poly(phe-lys)' in denatürasyonu ile açıklamak mümkündür: Kovalent bağlama işleminden sonra, proteinin aktif konformasyonunu muhafaza etmesi önemlidir. Doğal konformasyonun belirlenmesinde, primer amino asit yapı önemlidir. Sekonder, tersiyer, kuaterner yapıdaki bağlar, disülfid bağları dışında, kovalent olmayan bağlardır. Tuzların kovalent olmayan etkileşimleri, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimlerin hepsi tek tek ele alındığında kararsızdır. Fakat çok sayıda zayıf bağın toplamı, protein molekülüne stabilize kazandırır. Proteinin aktif konformasyonunu koruyabilmesi için çözelti koşulları, zayıf bağlara göre sınırlandırılır. Bundan dolayı genellikle, 35°C' nin üzerindeki sıcaklıklar, pH' sı 3-4' den düşük asidik veya pH' sı 9-10' dan büyük alkali çözeltiler kullanılmamalıdır (Mosbach, 1976). Bundan dolayı literatürde poli(phe-lys)' in artan sıcaklıklara karşı hassas bir yapıda olduğu vurgulanmış ve poli(phe-lys)' in biyoafinite kromatografisinde ligand bağlamak üzere kullanıldığı durumlar için ortam çalışma sıcaklığının 4°C olduğu belirtilmiştir (Wood and Gadow, 1983).

pH'nin etkisi: İvertaz immobilizasyonuna pH' nın etkisini araştırmak amacı ile gerçekleştirilen deneylere ait sonuçlar Çizelge 4.7' de verilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi, belli bir pH değerine kadar artan enzim immobilizasyon verimi, pH 4.5' dan sonra düşmeye başlamıştır. Bu pH değeri, çalışmanın diğer bölümlerinde gerçekleştirilen enzim immobilizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.7' de görüldüğü gibi, düşük pH değerlerinde daha yüksek olarak gözlenen immobilizasyon verimi, pH 4.5' da % 23.67 ile maksimuma ulaşmıştır. Bu maksimum değerden sonra, artan pH değerleri ile hızla bir azalma eğilimine giren immobilizasyon verimi, pH 8' de % 2.54' e kadar düşmüştür. İvertaz immobilizasyonuna sıcaklık

etkisinin incelendiği kısımda bahsedildiği gibi enzimin aktif konformasyonunu koruyabilmesi için çözelti koşulları, zayıf bağlara göre sınırlandırılır. Bundan dolayı genellikle, pH' sı 3-4' den düşük asidik veya pH' sı 9-10' dan yüksek alkali çözeltiler kullanılmaz (Mosbach, 1976). Bu açıklamalar doğrultusunda, yüksek alkali çözeltilerinde hazırlanan invertazın kovalent bağlanmasında aktif konformasyonunu koruyamadığını göstermektedir.

Çizelge 4.7. Enzim immobilizasyonuna pH' nın etkisi (T: 25°C, Poli(phe-lys) Derişimi: % 0.01 (w/v), Glutaraldehit Derişimi: % 2 (v/v), Başlangıç İvertaz Derişimi: 1.0 mg/ml)

pH	İmmobilizasyon Verimi, %
3.0	13.4
4.5	23.7
6.0	4.2
7.0	3.3
8.0	2.5

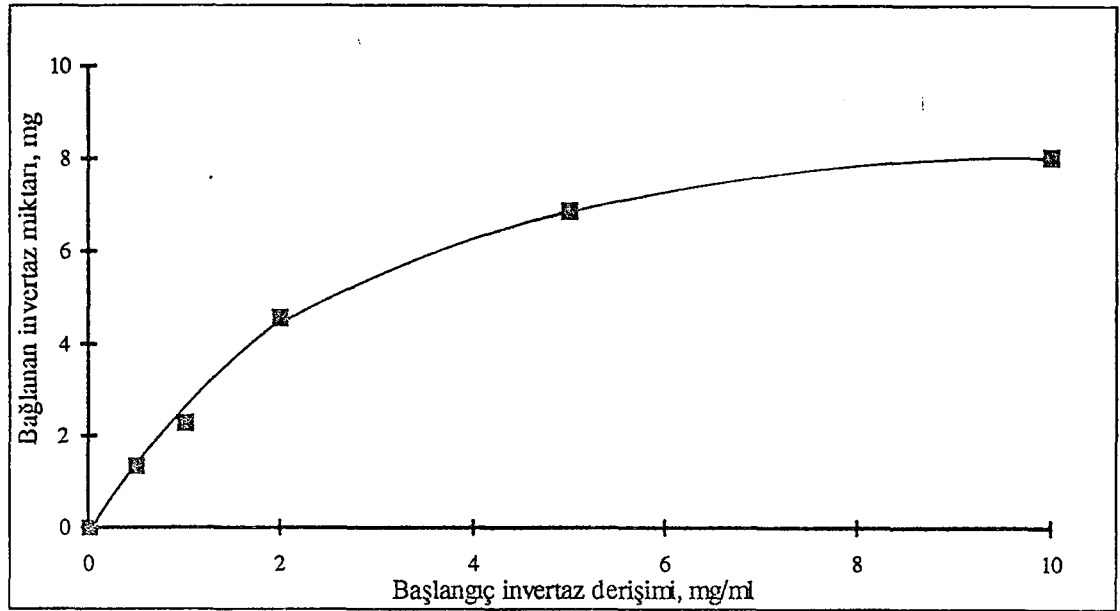
4.6.4. Başlangıç İvertaz Derişiminin Etkisi

Polistiren yüzeye invertaz immobilizasyonuna invertaz başlangıç derişiminin etkisini saptamayı amaçlayan bu aşamada, 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ve 10.0 mg/ml derişimlerinde invertazın immobilizasyonu optimum sıcaklık ve pH' da gerçekleştirilmiş ve ilgili sonuçlar Şekil 4.8' de verilmiştir.

Şekil 4.8' den de anlaşılacağı gibi, artan enzim derişimi ile, yüzeye immobilize olan enzim miktarı artmış, belli bir başlangıç enzim derişiminden sonra bağlanma miktarı bir plato değerine ulaşmıştır. Bu durum, yüzeyin taşıyabileceği maksimum enzim miktarını verilen şartlarda (T: 25°C, pH: 4.5, poli(phe-lys) derişimi: % 0.01 (w/v), glutaraldehit derişimi: % 2 (v/v)) yaklaşık 8 mg/ml olarak belirlemektedir.

4.7. Sakkarozun İvertaz ile Hidroliz Kinetiğinin İncelenmesi

İmmobilize ve serbest invertazın sakkarozu hidroliz kinetiği kesikli bir düzenekte optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 55°C' de incelenmiştir. Bu inceleme için gerçekleştirilen deneylerde ortam karıştırma hızı, serbest enzim deneyleri için 550 dev/dk ve immobilize enzim deneyleri için 1200 dev/dk olarak saptanmıştır. İvertazın sakkarozu hidroliz kinetiğinin incelenmesinde her iki durum için seçilen optimum çalışma şartlarının belirlenmesindeki kriterler ve sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.



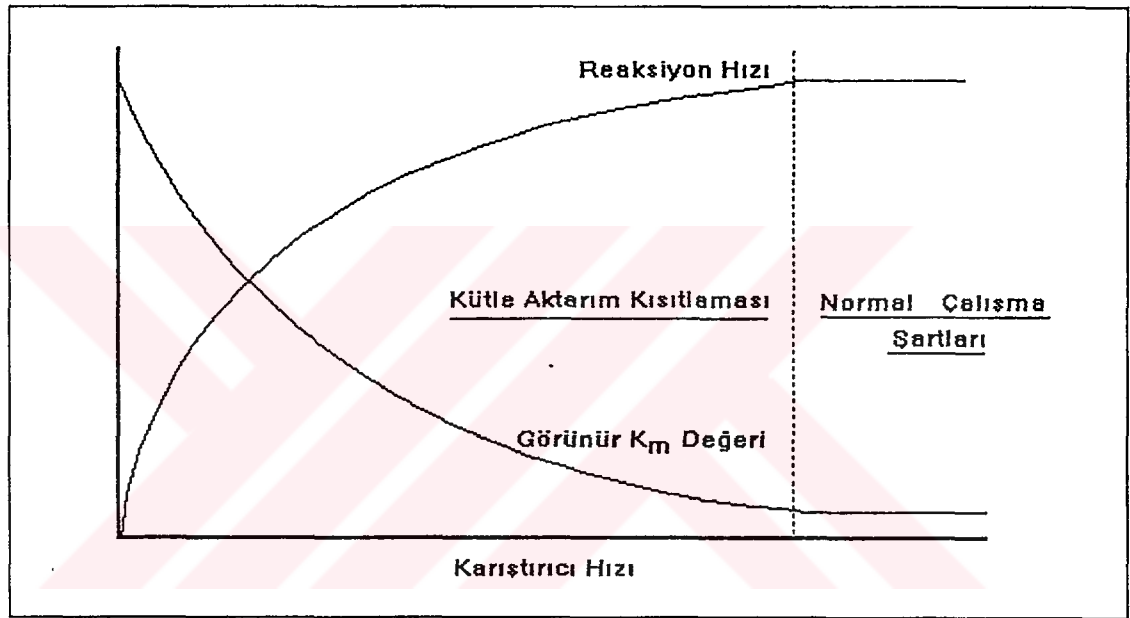
Şekil 4.8. Farklı başlangıç invertaz derişiminin invertaz immobilizasyon verimine etkisi (T: 25°C, pH: 4.5, Poli(phe-lys) Derişimi: % 0.01 (w/v), Glutaraldehit Derişimi: % 2 (v/v))

Optimum pH değerinin saptanması: Enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etki eden parametrelerin başında pH ve sıcaklık gelir. Maya invertazı, zayıf asidik bölgede en aktif ve pH 4-5 aralığında en kararlı durumdadır. Bununla birlikte değişik invertaz kaynaklarından elde edilen invertazın pH değişimine karşı davranışı farklılık göstermektedir. Değişik kökenli invertazlar için 4.2' den 7' e kadar uzanan oldukça geniş bir optimum pH aralığı saptanmıştır (Boyer, 1971). Bu çalışmada invertazın etiket aktivitesinde belirtilen optimum pH 4.5 değeri ile çalışılmıştır. Bu değer, değişik çalışmaların sonuçlarıyla da uyum içindedir (Synowiecki et al., 1981; Monsan et al., 1984).

Optimum sıcaklık değerinin saptanması: Daha önce belirtildiği gibi, enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etki eden en önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Enzim katalizli tepkimelerde, genellikle enzimatik tepkime hızı artan sıcaklıkla önce artar, daha sonra bir maksimum vererek azalır. Genellikle bu azalmanın nedeni, enzimin denatüre olarak aktivitesini kaybetmesi şeklinde açıklanmaktadır. Bu çalışmada etiket aktivitesinde verilen optimum sıcaklıkta, 55°C, çalışılmıştır. Bu değer, değişik çalışmaların sonuçlarıyla da uyum sağlamaktadır (Monsan et al., 1984; Başçı and Çelebi, 1985).

Optimum karıştırma hızının saptanması: Serbest ve immobilize invertazın sakkarozu hidroliz kinetiğinin incelendiği deneylerde, enzimin her iki durumu için ayrı karıştırma hızlarında çalışılmıştır.

Serbest invertaz için yapılan ön denemelerde artan karıştırma hızı ile reaktörde daha homojen bir ortamın oluştuğu ve bunun enzim substrat etkileşimini olumlu yönde etkilediği gözlenmiş ve deneyler 550 dev/dk karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Karıştırıcının yüksek hızı dolayısıyla enzimin mekanik olarak parçalanabileceği düşünülerek daha yüksek karıştırma hızına çıkılmamıştır. Bu bulgular aynı enzim ile benzer sistemde gerçekleştirilen diğer çalışmalarla da uyum içindedir (Başçı, 1985).



Şekil 4.9. Karıştırma hızının maksimum enzimatik tepkime hızı ve Michaelis-Menten sabitine etkisi.

İmmobilize enzimlerin kinetiğinin incelendiği kesikli sistem çalışmalarında, ortamdaki karıştırma hızının artması, yüzey film dirençlerini kırmakta, diğer bir deyişle kütle aktarım katsayısını arttırmaktadır. Böylece tepkime hızı artmakta ve görünür Michaelis-Menten sabitinin, K_m , değeri azalmaktadır. Bu durum şematik olarak Şekil 4.9' da enzim aktivitesinin difüzyon kısıtlamasından etkilendiği bir immobilize enzim sistemi için verilmiştir (Hartmeier, 1988). Karıştırma hızının artması ile ortamdaki türbulansın artması, immobilize enzimin tutuklandığı materyal ile ortam arasındaki yüzey difüzyon dirençlerini azaltmakta, bu durum tepkime hızını arttırmaktadır. Fakat şekilden de anlaşılacağı gibi karıştırma hızının belli bir değerinden sonra, hız değişmemekte ve bir plato değerinde, V_{max} , sabit kalmaktadır. Benzer şekilde, immobilize enzimin K_m değeri de, V_{max} ' e paralel olarak ama ters yönde, belli bir

karıştırma hızı değerinden sonra en düşük seviyesine ulaşmakta ve daha sonra sabit kalmaktadır. İmmobilize enzimin kinetik olarak maksimum hıza ulaştığı karıştırma hızı, optimum karıştırma hızı olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada, immobilize invertaz için karıştırma hızı 1200 dev/dk' da sabitlenmiştir. Bu karıştırma hızının optimum koşulları yarattığı ilerde açıklanacak olan kinetik çalışmaların sonuçları ile doğrulanmaktadır. Ayrıca, polistiren yoğunluğunun, 0.98 g/ml (Boyer, 1978), çalışmaların gerçekleştirildiği sıvı ortamından, 1.07 g/ml (Geankoplis, 1983), daha düşük olması nedeniyle, düşük devirdeki karıştırma hızlarında polistiren taneciklerin ortamda yüzmesi ve çözelti içine karışmaması söz konusudur. 1200 dev/dk karıştırma hızı, polistiren küreciklerin çözelti ortamına homojen olarak karışmasını sağlamıştır.

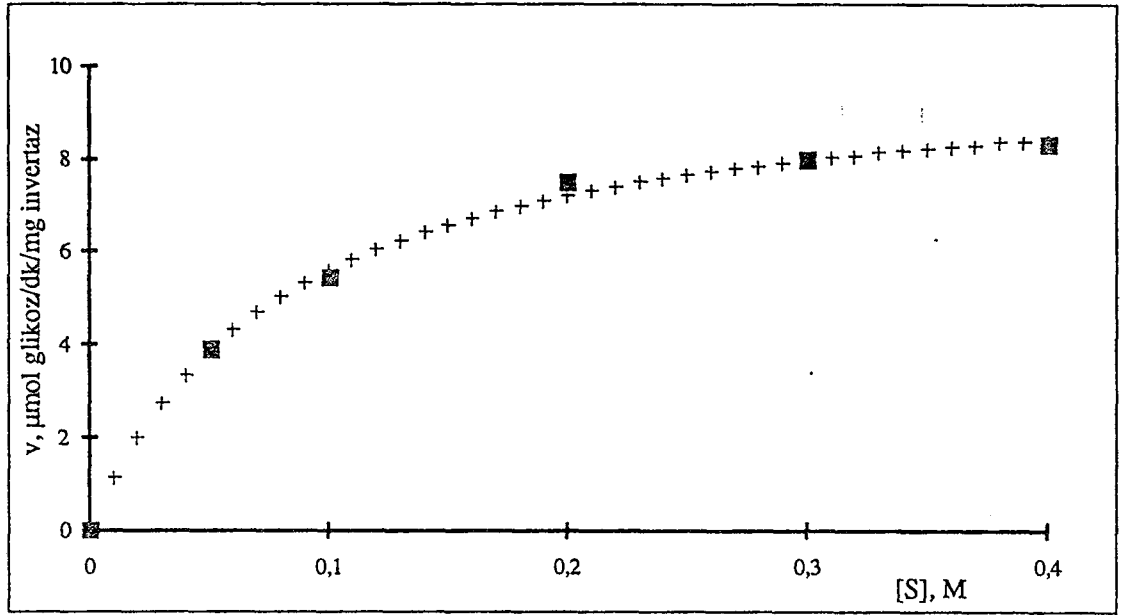
Serbest ve immobilize invertaza ait kinetik sabitleri saptamak için, optimum pH 4.5 ve optimum sıcaklık 55°C' de sakkaroz derişiminin tepkime hızına etkisi araştırılmış, çalışılan 0.05-0.4 M sakkaroz derişim aralığında elde edilen başlangıç tepkime hızları Çizelge 4.8' de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişim değerleri (pH: 4.5, T: 55°C)

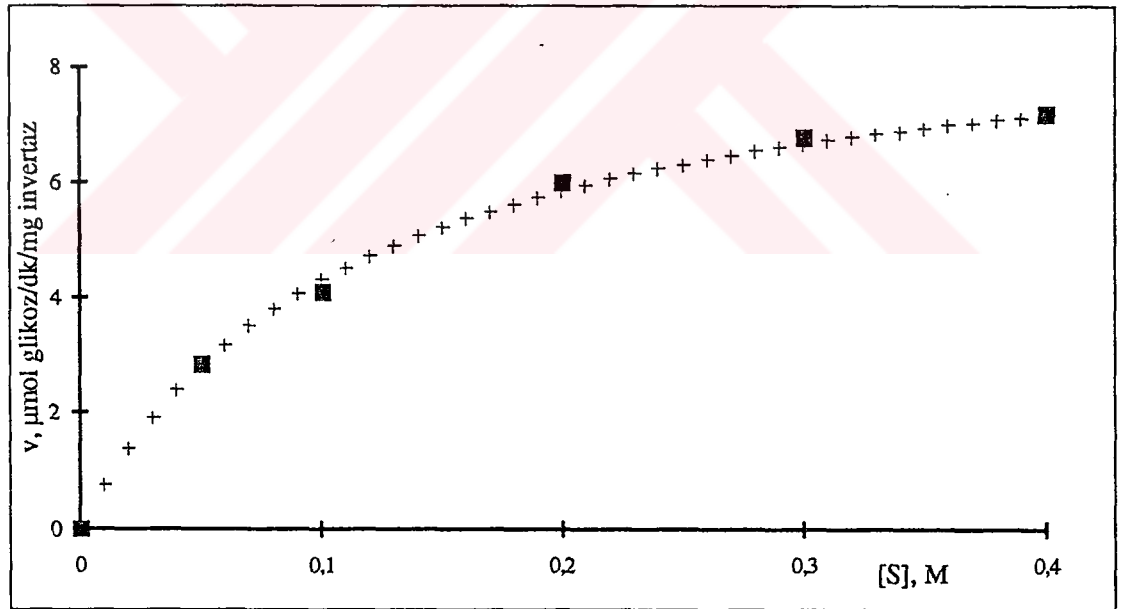
Sakkaroz Derişimi (M)	Başlangıç Tepkime Hızı ($\mu\text{mol glikoz/dk/mg invertaz}$)	
	Serbest invertaz	İmmobilize invertaz
0.05	3.89	2.84
0.10	5.46	4.09
0.20	7.49	6.02
0.30	7.99	6.80
0.40	8.33	7.20

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11, sırasıyla serbest ve immobilize invertaz için başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimiyle değişimini göstermektedir. Bu şekillerden anlaşılacağı gibi her iki durumda da artan sakkaroz derişimiyle hidroliz hızı artmakta, fakat belli bir sakkaroz derişiminden sonra tepkime hızı bir plato değerine ulaşmaktadır. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de görüldüğü gibi serbest ve immobilize invertaz için başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimiyle değişimi Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır.

Her iki enzime ait kinetik sabitleri saptamak amacıyla Çizelge 4.8' de verilen, serbest ve immobilize invertaza ait başlangıç tepkime hızı değerleri ile başlangıç sakkaroz derişimi değerleri, Lineweaver-Burk grafiği oluşturacak şekilde $1/v$ ye karşı $1/[S]$ şeklinde yeniden değerlendirilmiş ve Şekil 4.12 ve Şekil 4.13 elde edilmiştir.



Şekil 4.10. Serbest invertaz için başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi (■) Deneysel değerler, (+) Teorik değerler (pH: 4.5, T: 55°C, Karıştırma hızı: 550 dev/dk)



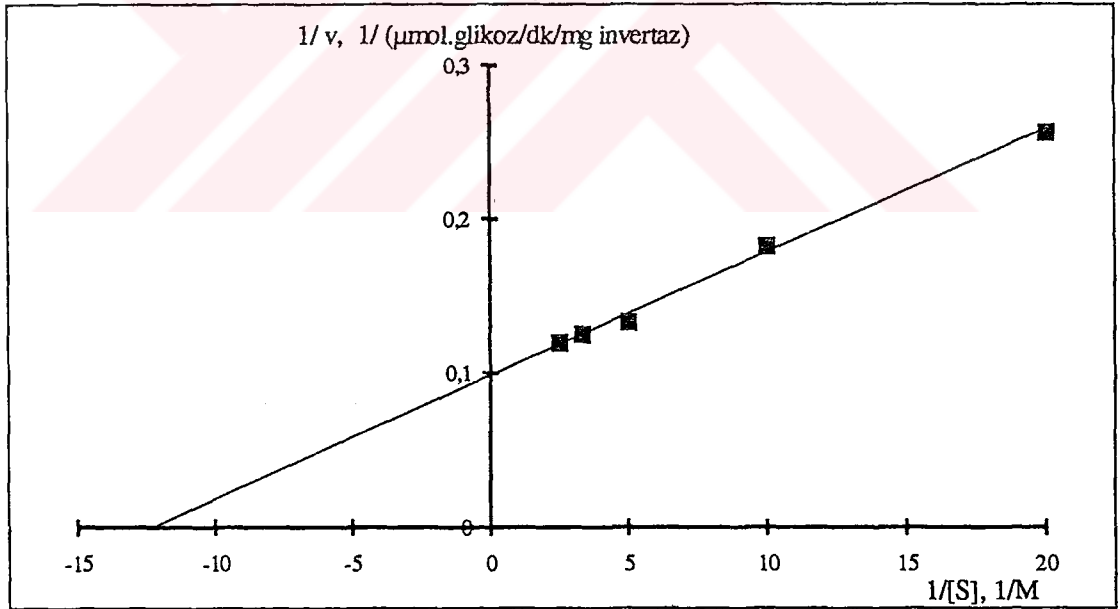
Şekil 4.11. İmmobilize invertaz için başlangıç tepkime hızının sakkaroz derişimi ile değişimi (■) Deneysel değerler, (+) Teorik değerler (pH: 4.5, T: 55°C, Karıştırma hızı: 1200 dev/dk)

Serbest invertaz için, optimum pH 4.5 ve optimum sıcaklık 55°C' de ve 550 dev/dk karıştırma hızında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği, Şekil 2.2.A' da verilen grafikte (Bölüm 2.2.1) tam bir uyum içerisinde olup bu grafiğin y eksenini kesim noktasının

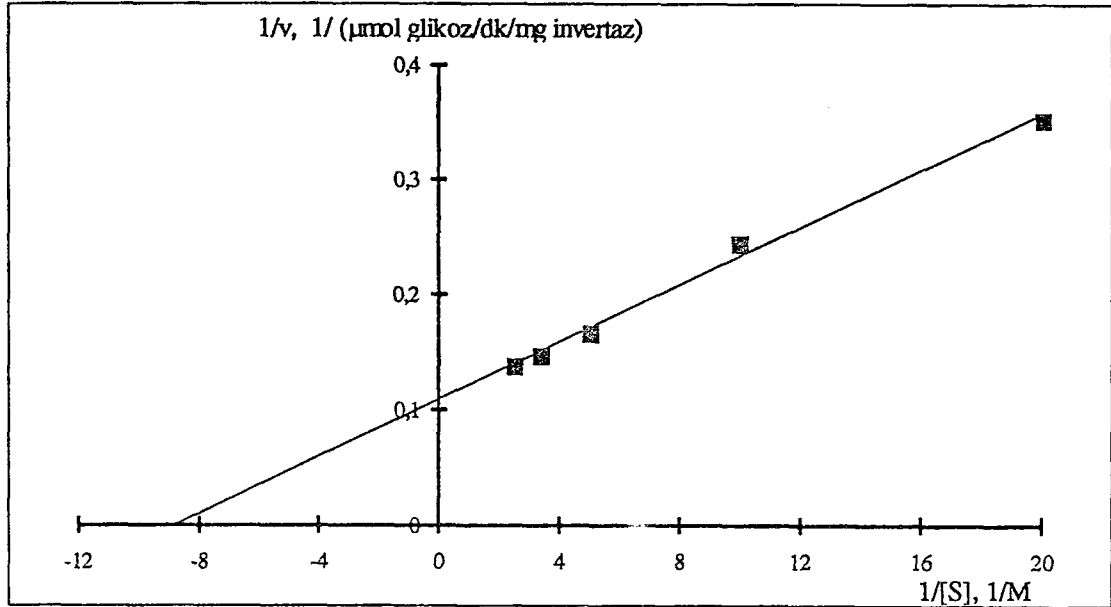
değerlendirilmesinden, serbest enzim için V_{max} değeri $10.13 \mu\text{mol glikoz/dk/mg}$ invertaz ve eğiminin değerlendirilmesinden K_m , 81 mM olarak bulunmuştur.

İmmobilize invertaz için, optimum pH 4.5 ve optimum sıcaklık 55°C ' de ve 1200 dev/dk karıştırma hızında elde edilen Lineweaver-Burk grafiği de, serbest enzime benzer şekilde, Şekil 2.2.A' da verilen grafikte uyum içerisinde olup bu grafiğin y eksenini kesim noktasının değerlendirilmesinden, immobilize enzim için V_{max} değeri $9.20 \mu\text{mol glikoz/dk/mg}$ invertaz ve eğiminin değerlendirilmesinden K_m değeri 114 mM olarak bulunmuştur. İmmobilize enzime ait Lineweaver-Burk grafiğinin Şekil 2.2.A' dakine uyumlu çıkması, 1200 dev/dak karıştırma hızında çalışmanın, ortamdaki difüzyon dirençlerini tamamen ortadan kaldırdığının ve bu karıştırma hızının kullanılan immobilize enzim prosesi için uygun olduğunun bir göstergesidir.

Bu çalışmada serbest invertazın K_m değeri ile immobilize invertazın K_m değeri arasındaki oran 0.71 dir. Bu oran Mansfeld ve Schellenberger (1987) tarafından çeşitli polistiren yüzeylere immobilize edilen invertaz için $0.18-0.71$ arasında bulunmuştur. Bu da çalışmada elde edilen oranın literatürdeki oran ile uyumlu olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Serbest invertaz için Lineweaver Burk grafiği [pH: 4.5 , T: 55°C , Karıştırma hızı: 550 dev/dk , Doğrusal bölge için korelasyon katsayısı, $r=0.998$]



Şekil 4.13. İmmobilize invertaz için Lineweaver Burk grafiği [pH: 4.5, T: 55°C, Karıştırma hızı: 1200 dev/dk, Doğrusal bölge için korelasyon katsayısı, $r=0.997$]

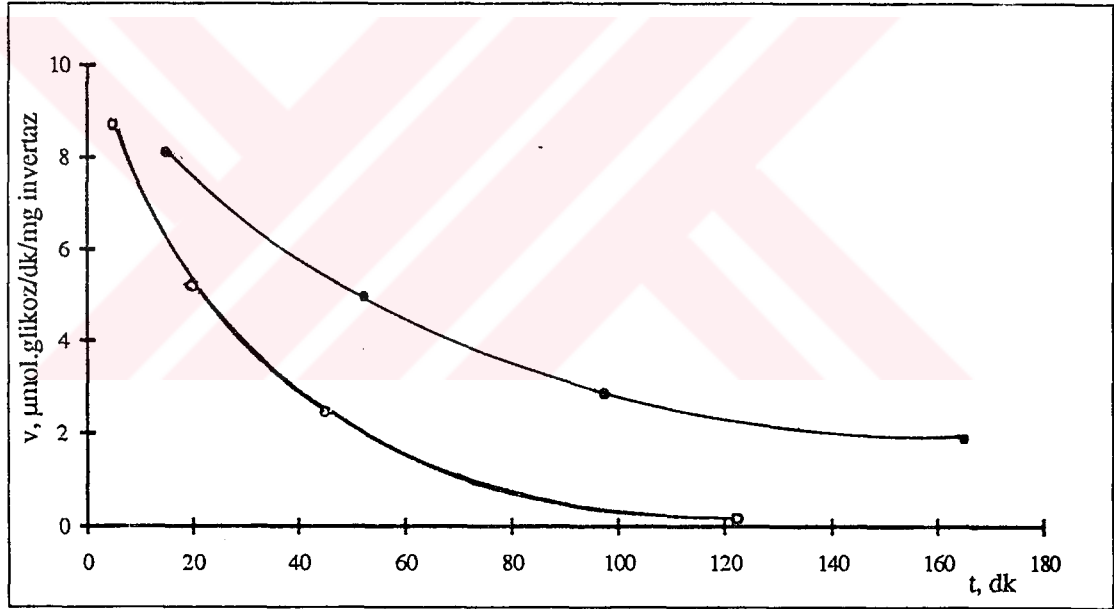
İmmobilize ortamın K_m değerinin, serbest ortamın K_m değerinden büyük çıkması, immobilize invertazın sakkarozafinitesinin azaldığını göstermektedir. Bunun sebepleri olarak, immobilizasyon işlemi sırasında invertazın yapısındaki değişiklikler ve difüzyon kısıtlaması gösterilebilir. Bu etkilerin tek başına veya aynı anda olması K_m değerinin yükselmesine sebep olabilir (Vieth and Venkatasubramanian, 1974). İmmobilize invertaz ile gerçekleştirilen deney sonuçlarının Lineweaver Burk grafiği ile değerlendirilmesi sonucunda, immobilize sistemde difüzyon kısıtlamasının olmadığı gösterilmiştir. İmmobilize enzimin K_m değerindeki artışın, immobilizasyon işleminde invertazın yapısındaki değişiklikten kaynaklandığı söylenebilir.

Serbest ve immobilize invertaz için V_{max} değerleri sırasıyla 10.13 $\mu\text{mol/dk/mg}$ invertaz ve 9.20 $\mu\text{mol/dk/mg}$ invertaz olarak hesaplanmıştır. Her iki değer birbirlerine pratikte yaklaşık eşit kabul edilebilirse de, çalışmada immobilizasyonun kimyasal yöntem ile yapılmış olması, enzim aktivitesinin düşebileceğini akla getirmektedir. İmmobilize ortamda enzim aktivitesini azaltacak faktörün yalnızca difüzyon kısıtlaması olduğu durumda serbest ve immobilize ortamdaki V_{max} değerlerinin aynı olması ve immobilize ortamda V_{max} 'i veren minimum sakkaroz derişiminin serbest ortamından yüksek olması beklenirdi. Bu çalışmada ise serbest invertazın V_{max} değeri, immobilize invertazından daha büyüktür. Bu davranış çalışma sırasında difüzyon kısıtlamasının, Bölüm 2.2.1' de anlatıldığı gibi, yüksek karıştırma hızından

(1200 dev/dk) dolayı etkisiz kalması nedeniyle, sadece immobilize invertazın yapısal değişikliklere ve sterik engellenmelere uğraması şeklinde açıklanabilir. Ayrıca her iki ortamda da aynı sakkaroz derişiminde (0.4 M) inhibisyonun başlaması sistemde gerçekten difüzyon kısıtlamasının etkili olmadığı sonucunu desteklemektedir.

4.7.1. İvertazın Deaktivasyonu

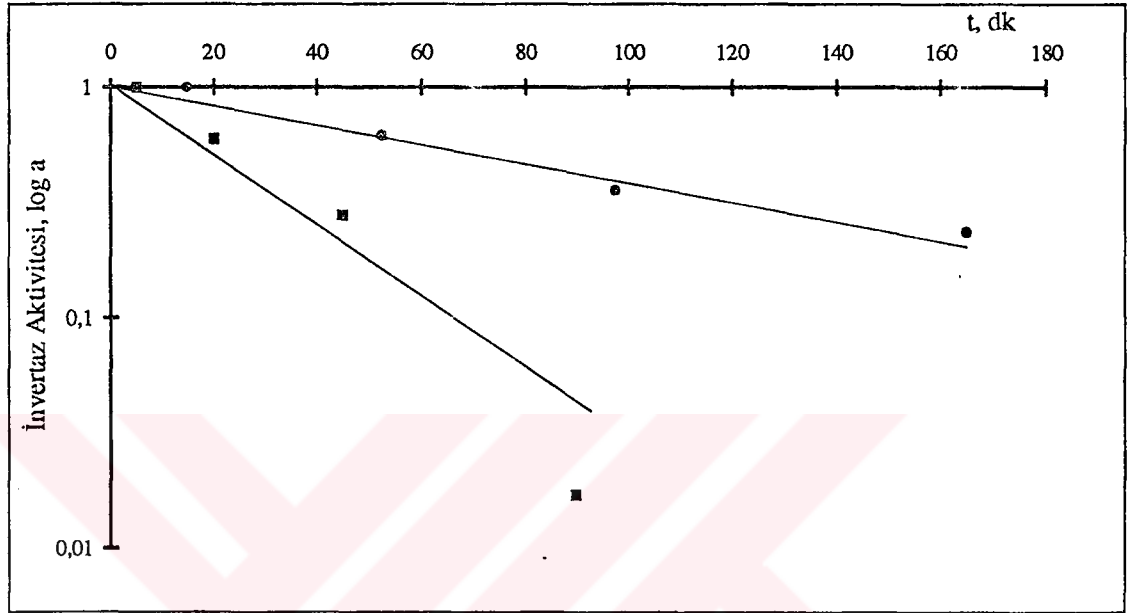
Enzimlerin deaktivasyonu çoğunlukla üstel deaktivasyon modeli ile açıklanmaktadır (Bölüm 2.2.2). Bu modelde enzim deaktivasyonu enzim aktivitesine birinci dereceden bir kinetik ile bağlanmaktadır. Bu yaklaşım kesikli sistemlerde, substrat ve ürün derişiminin fazla değişmediği durumlarda uygulanabilir. Bu çalışmada enzim deaktivasyonunun aktif enzim derişimine birinci dereceden bağlı olduğu kabul edilmiş, serbest ve immobilize invertaz için maksimum tepkime hızının elde edildiği 0.4 M sakkaroz derişiminde zamana karşı tepkime hızları belirlenmiş (Şekil 4.14), enzim aktiviteleri grafiğe geçirilerek (Şekil 4.15) deaktivasyon katsayıları, k_d , saptanmıştır.



Şekil 4.14. Tepkime hızının zamanla değişimi (•)İmmobilize invertaz (o) Serbest invertaz (pH: 4.5, T: 55°C, karıştırma hızı (serbest invertaz): 550 dev/dk, karıştırma hızı (immobilize invertaz): 1200 dev/dk)

Serbest ve immobilize invertaz için k_d değerleri sırasıyla 0.0347 dk^{-1} ve 0.0098 dk^{-1} olarak saptanmıştır. Bu değerler kullanılarak invertaz aktivitesinin yarı ömrü, $t_{1/2}$, serbest ve immobilize invertaz için sırasıyla 20 dk ve 71 dk olarak bulunmuştur (Eş. 2.18). Görüldüğü üzere serbest invertazın k_d değeri, immobilize invertazınkinden daha büyük ve bunun doğal bir sonucu olarak serbest invertazın $t_{1/2}$ değeri immobilize

invertazinkinden daha düşük çıkmıştır. Bu durum immobilize invertazın, serbest invertaza göre işletme şartlarında yüksek karıştırma hızına rağmen daha kararlı olduğunu ve aktivitesini daha yavaş kaybettiğini göstermektedir. (Şekil 4.14). İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre daha kararlı olmaları literatürde de genel olarak karşılaşılan bir durumdur (Vieth and Venkatasubramanian, 1973).



Şekil 4.15. İvertaz aktivitesinin zaman ile değişimi (■) Serbest invertaza ait deneysel değerler, doğrusal bölge için korelasyon katsayısı, $r=0.99$; (●) İmmobilize invertaza ait deneysel değerler, doğrusal bölge için korelasyon katsayısı, $r=0.98$ (pH: 4.5, T: 55°C, karıştırma hızı (serbest invertaz): 550 dev/dk, karıştırma hızı (immobilize invertaz): 1200 dev/dk)

5. SONUÇLAR

Çalışma kapsamında, yüzeyde enzim immobilizasyonu için taşıyıcı matriks olarak polistiren küreler kullanılmıştır. Kürelerin yüzeyleri amino gruplarınca zenginleştirilmek üzere poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş ve modifiye yüzeyler çift fonksiyonlu bir çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehit ile aktive edilerek invertaz immobilizasyonu için hazır hale getirilmişlerdir. Polistiren yüzeylere immobilize edilen invertaz miktarını nicel olarak tespit etmek amacıyla, ^{99m}Tc-perteknetat izleyici olarak kullanılmıştır.

Taşıyıcı matriks olarak kullanılan polistiren ve poli(phe-lys) ile kaplanan polistiren yüzeylerin kimyasal yapısı FTIR-ATR spektroskopik tekniği kullanılarak incelenmiştir. Poli(phe-lys) modifikasyonu ve glutaraldehit aktivasyonu sonucu enzim immobilizasyonu için hazırlanan polistiren yüzeylerde, invertaz immobilizasyonuna etki eden parametreler, sırasıyla, başlangıç poli(phe-lys) derişiminin etkisi, başlangıç glutaraldehit derişiminin etkisi, sıcaklık ve pH gibi fizikokimyasal parametreler ve başlangıç invertaz derişiminin etkisi olmak üzere dört grupta ele alınmıştır.

Son bölümde serbest invertazın ve immobilize invertazın sakkarozu hidroliz kinetiği kesikli bir düzenekte optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 55°C' de incelenmiştir. Bu inceleme için gerçekleştirilen deneylerde ortam karıştırma hızı, serbest enzim deneyleri için 550 dev/dk ve immobilize enzim deneyleri için 1200 dev/dk' da sabitlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Çalışmada kullanılan polistirene (Petkim, Türkiye) ait spektrum ile literatürden alınan ticari bir polistiren (Krause, 1983) spektrumu karşılaştırıldığında (Şekil 4.2 ve 4.3), her iki spektruma ait piklerin büyük bir benzerlik gösterdiği, laboratuvarında hazırlanan polistiren taneciklerin yapısında herhangi bir değişikliğin veya fonksiyonel gruplarda yönlennmelerin olmadığı gözlenmiştir.

2. Polistiren yüzeyleri amino gruplarınca zenginleştirmek amacıyla kullanılan ve temelde protein yapısında bulunan poli(phe-lys)' in yüzeylere adsorptif kuvvetlerle bağlandığı ve poli(phe-lys) adsorpsiyonunun kemisorpsiyon şeklinde gerçekleştiği, yapının 16 saatlik mekanik etkilere dayanması ile de kararlı bir yüzey modifikasyonu sağlandığı anlaşılmaktadır.

3. Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylerine ait ATR-FTIR spektrumunda (Şekil 4.6) poli(phe-lys) yapısını karakterize eden N-H bandları belirgin şekilde görülmemektedir. Bunun nedeni yüzey kaplamasında kullanılan poli(phe-lys)

derişiminin, yüzeyin ATR spektrumunun alınabilmesi için yeterli derişim değerinde olmaması şeklinde açıklanmıştır.

4. Yüzey modifikasyonunda kullanılan poli(phe-lys) derişiminin invertaz immobilizasyon verimine etkisi incelenmiş ve pH 4.5 ve 25°C' de, glutaraldehit derişimi % 2.0 (v/v), başlangıç invertaz derişimi 1.0 mg/ml değerlerinde çalışıldığında maksimum immobilizasyon verimine, % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) başlangıç derişiminde ulaşılmıştır. Ayrıca poli(phe-lys) ile işlem görmemiş polistiren yüzeylere invertaz immobilizasyonu hemen hemen mümkün olamamıştır.

5. Poli(phe-lys) ile modifiye edilmiş polistiren yüzeylerde glutaraldehit derişiminin etkisi incelenmiş, maksimum invertaz immobilizasyonunu veren glutaraldehit derişimi pH 4.5 ve 25°C' de, % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) derişiminde ve 1.0 mg/ml başlangıç invertaz derişiminde şartlar sabit tutulduğunda, % 2 (v/v) olarak bulunmuştur.

6. İvertaz immobilizasyonuna pH' nın etkisini araştırmak amacı ile gerçekleştirilen deneylerde, 25°C' de, % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) derişiminde, % 2 (v/v) glutaraldehit derişiminde ve 1.0 mg/ml başlangıç invertaz derişiminde şartlar sabit tutulduğunda maksimum invertaz immobilizasyonuna pH 4.5' da ulaşılmıştır.

7. İvertaz immobilizasyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için gerçekleştirilen deneylerde, deney şartları pH 4.5' da, % 0.01 (w/v) poli(phe-lys) derişiminde, % 2 (v/v) glutaraldehit derişiminde ve 1.0 mg/ml başlangıç invertaz derişiminde tutulduğunda maksimum invertaz immobilizasyonuna 25°C' de ulaşılmıştır.

8. Serbest ve immobilize invertazın sakkarozu hidrolizi 0.05-0.4 M sakkaroz derişim aralığında, optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 55°C' de, serbest invertaz için karıştırma hızı 550 dev/dk, immobilize invertaz için 1200 dev/dk' da incelenmiş, Lineweaver-Burk yönteminden yararlanılarak, serbest ve immobilize invertaz için Michaelis-Menten sabitleri, K_m , sırasıyla 81 mM, 114 mM olarak, maksimum enzimatik tepkime hızları, V_{max} , sırasıyla 10.13 $\mu\text{mol glikoz/dk/mg invertaz}$, 9.20 $\mu\text{mol glikoz/dk/mg invertaz}$ olarak bulunmuştur.

9. İvertazın işletme koşullarındaki deaktivasyonu üstel deaktivasyon modeli yardımıyla açıklanmış ve enzim deaktivasyonunun aktif enzim derişimine birinci dereceden bağlı olduğu kabul edilerek, serbest ve immobilize invertaz için deaktivasyon katsayıları, k_d , sırasıyla 0.0347 dk^{-1} ve 0.0098 dk^{-1} olarak saptanmıştır. Bu değerler kullanılarak invertaz aktivitesinin yarı ömrü, $t_{1/2}$, serbest ve immobilize invertaz için sırasıyla 20 dk ve 71 dk olarak bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Alger, S.M., 1989, Polymer Science Dictionary, Elsevier Science Publishers LTD., London, 377 p.
- Altman, P. L. and Dittmer, D.S., 1972, Biology Data Book, Eds. P.L. Altman and D.S. Dittmer, Vol 1, Federation of American Society for Experimental Biology, Maryland.
- Bailey, J.E. and Ollis, F.D., 1977, Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, Inc., New York.
- Başçı, N., 1985, Sakkarozun İnvvertaz ile Hidroliz Kinetiğinin ve İnvvertaz Deaktivasyonunun İncelenmesi, H.Ü. Yüksek Mühendislik Tezi, Ankara.
- Başçı, N. and Çelebi, S.S., 1985, The Co-Effects of Substrate Inhibition and Water Concentration on the Kinetics of Sucrose Hydrolysis by Invertase, Abstracts of Communications, 13th International Congress of Biochemistry, August 25-30, Amsterdam, The Netherlands, 793 p.
- Brash, J.L. and Horbett, T.A., 1987, Proteins at Interfaces: Current Issues and Future Prospects. In: Proteins at Interfaces, Eds. J.L. Brash and T.A. Horbett, ACS publications, Amsterdam, The Netherlands, 1-33.
- Boyer, R.F., 1970, Styrene Polymers, In: Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Volume 13, John Wiley and Sons, Inc., New York, 128-440.
- Boyer, P. D., 1971, The Enzymes, Vol. 5, 3rd ed., Academic Press, New York.
- Cardoso, J.P. and Emery, A.N., 1978, A New Model to Describe Enzyme Inactivation, Biotechnol. Bioeng., 20, 1471-1477.
- Chang-Zhi, C. and Yao-Ting, Y., 1989, Immobilized Enzyme Activity Improvement in Glutaraldehyde Method, Biomat., Art. Cells, Art. Org., 17, 3, 329-334.
- Chaplin, M.F. and Bucke, C., 1990, Enzyme Technology, Cambridge University Press, UK.
- Çelebi, S.S. ve Çağlar, A., 1986, İmmobilize Enzimlerin Uygulandığı Kimyasal Prosesler: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ed. A. Telefoncu, E.Ü. Yayınları, İzmir.
- Demain, A.L. and Solomon, A., 1986, Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology, Washington.

- Ercan, M., 1976, Chromatographic Quality Control of ^{99m}Tc -Labeled Radiopharmaceuticals, Hacettepe Bulletin of Medicine / Surgery, 9, 3-4, 85-90.
- Ewing, G.W., 1975, Instrumental Methods of Chemical Analysis, 4th ed., McGraw-Hill, Inc., Tokyo, 127-128.
- Filippusson, H. and Hornby, W.E., 1970, The preparation and properties of yeast β -fructofuranosidase chemically attached to polystyrene, Biochem. J., 120, 215-219.
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C., 1978, Food Microbiology, 3rd ed., McGraw-Hill, Inc., New York, 409-412.
- Geankoplis, C.J., 1983, Transport Processes and Unit Operations, 2nd. ed., Allyn and Bacon, Inc., Boston, 834 p.
- Gemeiner, P., 1992, Enzyme Engineering: Immobilized Biosystems, Ellis Horwood, London.
- Gerhartz, W., 1990, Enzymes in Industry, Production and Applications, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Goldstein, L. and Manecke, G., 1976, The chemistry of enzyme immobilization. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Eds. L.B. Wingard and L.Goldstein. vol.1, Academic Press, New York, 23-125.
- Gözükara, E.M., 1989, Biyokimya, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.
- Hartmeier, W., 1988, Immobilized Biocatalysts, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kara, A., 1994, Sukroz Biyosensörü, Bitirme Ödevi, H.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Krause, A., Lange, A, Ezrin, M., 1983, Plastics Analysis Guide, Hanser Publishers, Munich.
- Lee, F. A., 1983, Basic Food Chemistry, 2nd ed., The Avı Publishing Company, Inc., Connecticut, 39-41.
- Lehninger, A. L., 1975, Biochemistry. 2nd ed., Worth Publishers Inc., New York.

- Mansfeld, J. and Schellenberger, A., 1987, Invertase Immobilized on Macroporous Polystyrene: Properties and Kinetic Characterization, *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 72-78.
- Mason, R.D. and Weetall, H.H., 1972, Invertase covalently coupled to porous glass: Preparation and characterization, *Biotechnol. Bioeng.*, 14, 637-645.
- Monsan, P., Combes, D., and Alemzadeh, I., 1984, Invertase Covalent Grafting onto Corn Stover, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 658-664.
- Mosbach, K., 1976, *Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes*, Academic Press, New York, 44, 999 p.
- Mutlu, M., 1983, Selülozik Karakterli Hemodializ Membranların Üretim Yöntemleri ve İn-vitro Performanslarının Araştırılması, Yüksek Mühendislik Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens., Ankara.
- Mutlu, M., 1988, Poliüretan Biyomateryallerin Yüzey Özelliklerinin Plazma Polimerizasyonu ile Modifiye Edilmesi ve Kan-Biyomateryal Etkileşmesinin Uyarı-Cevap Tekniği ile İzlenmesi ve Moment Tekniği ile Analizi, Doktora Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens., Ankara.
- Mutlu, M., Mutlu, S., Rosenberg, F.M., Kane, J., Jones, N.M., Vadgama, P., 1991, Matrix Surfaces Modification by Plasma Polimerization for Enzyme Immobilisation, *J. Mater. Chem.*, 1, 3, 447-450.
- Onyezili, F.N., 1987, Glutaraldehyde activation step in enzyme immobilization on nylon, *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 339-402.
- Ooshima, H., Sakimoto, M. and Harano, Y., 1980, Characteristics of immobilized invertase, *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2155-2167.
- Pekin, B., 1979, *Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)*, Birinci Kitap: Kısım: 1, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.
- Pişkin, E., 1987, *Polimer Teknolojisine Giriş*, İnkılap Kitapevi, İstanbul, 93-98.
- Pitcher, W.H., 1980, *Immobilized Enzymes For Food Processing*, CRC Press, Inc., Florida.
- Richards, P. and Atkins, H.L., 1967, Technetium-^{99m} labeled Compounds. USAEC Rep. BNL-11831.

- Saha, G.B., 1984, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 56 p.
- Shuler, M.L. and Kargı F., 1992, Bioprocess Engineering, Prentice-Hall, Inc., USA.
- Stanley, W.L. and Olson, A.C., 1974, The chemistry of immobilizing enzymes, J. Food Sci., 39, 660-666.
- Synowiecki, J., Sikorski, Z.E. and Naczka, M., 1981, Immobilization of invertase on krill chitin, Biotechnol. Bioeng., 23, 231-233.
- Telefoncu, A., 1986, Enzimolojiye Genel Bakış: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ed. A. Telefoncu, E.Ü. Yayınları, İzmir.
- Uslan, A.H., 1986, Enzim Kinetiği: Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ed. A. Telefoncu, E.Ü. Yayınları, İzmir.
- Vieth, W. R. and Venkatasubramanian, K., 1973, Enzyme Engineering, Part I. The Utility of Supported Enzyme Systems, Chem. Technol., November, 677-684.
- Vieth, W.R. and Venkatasubramanian, K., 1974, Enzyme Engineering, Part III, Properties of Immobilized Enzyme Systems, Chem. Technol., May, 309-320.
- Wood, W.G. and Gadow, A., 1983, Immobilisation of Antibodies and Antigens on Macro Solid Phases: A Comparison Between Adsorptive and Covalent Binding, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 21, 789-797.
- Yenigün, S., 1991, Çözücü buharlaştırma yöntemi ile paramagnetik polistiren partiküllerin elde edilmesi ve partikül yüzeylerine "Zwitterionic" özellik kazandırılması. Yüksek Mühendislik Tezi, H.Ü., Fen Bilimleri Ens., Ankara.

EK 1

GLİKOZUN MUTOROTASYONU

Glikozun kristal halde iki şekli mevcuttur. Şayet glikoz suda eritilir ve buharlaştırmak suretiyle kurumaya terk edilirse kristal halde α -D-Glikoz elde edilir. Eğer glikoz, asetik asit veya piridin ile eritilerek kristalize edilirse β -D-Glikoz elde edilir. Kristal haldeki bu iki glikoz şekli mutorotasyon gösterir. Optik çevirmenin zamanla değişmesi olayına *mutorotasyon* denir. Tüm indirgen şekerler mutorotasyon olayı gösterirler. Suda çözülmüş α -D-Glikoz içeren çözelti başlangıçta polarize ışığı $+112.2^\circ$ sağa çevirirken, zamanla bu değer azalarak $+52.7^\circ$ de sabit kalır. Bu durum şekerlerinde diğer aldehitler gibi hemiasetal oluşturma yeteneği ile açıklanır. Glikozun hemiasetal oluşturma yeteneği sonucu şeker çözeltisi içinde başlangıçta mevcut olan α -D-Glikoz zamanla kısmen β -D-Glikoza dönüşmek suretiyle iki glikoz çeşidi arasında bir denge meydana gelir. β formunda spesifik rotasyon $+18.7^\circ$ iken sulu çözeltide mutorotasyon sonucunda $+52.7^\circ$ olur (Lehninger, 1975). Böylece denge durumuna ulaşılmış olur. Glikozun sulu çözeltisinde denge durumunda ağırlıkça % 64 β , % 36 α anomeri bulunur. Denge durumuna ulaşma genellikle kendiliğinden yavaş olur, fakat ısıtmak, asit veya baz katmakla, dengenin kurulması katalizlenebilir. Ayrıca *Penicillium notatum*' dan elde edilen mutorotase enzimi de mutorotasyonu hızlandırabilir (Lee, 1983).

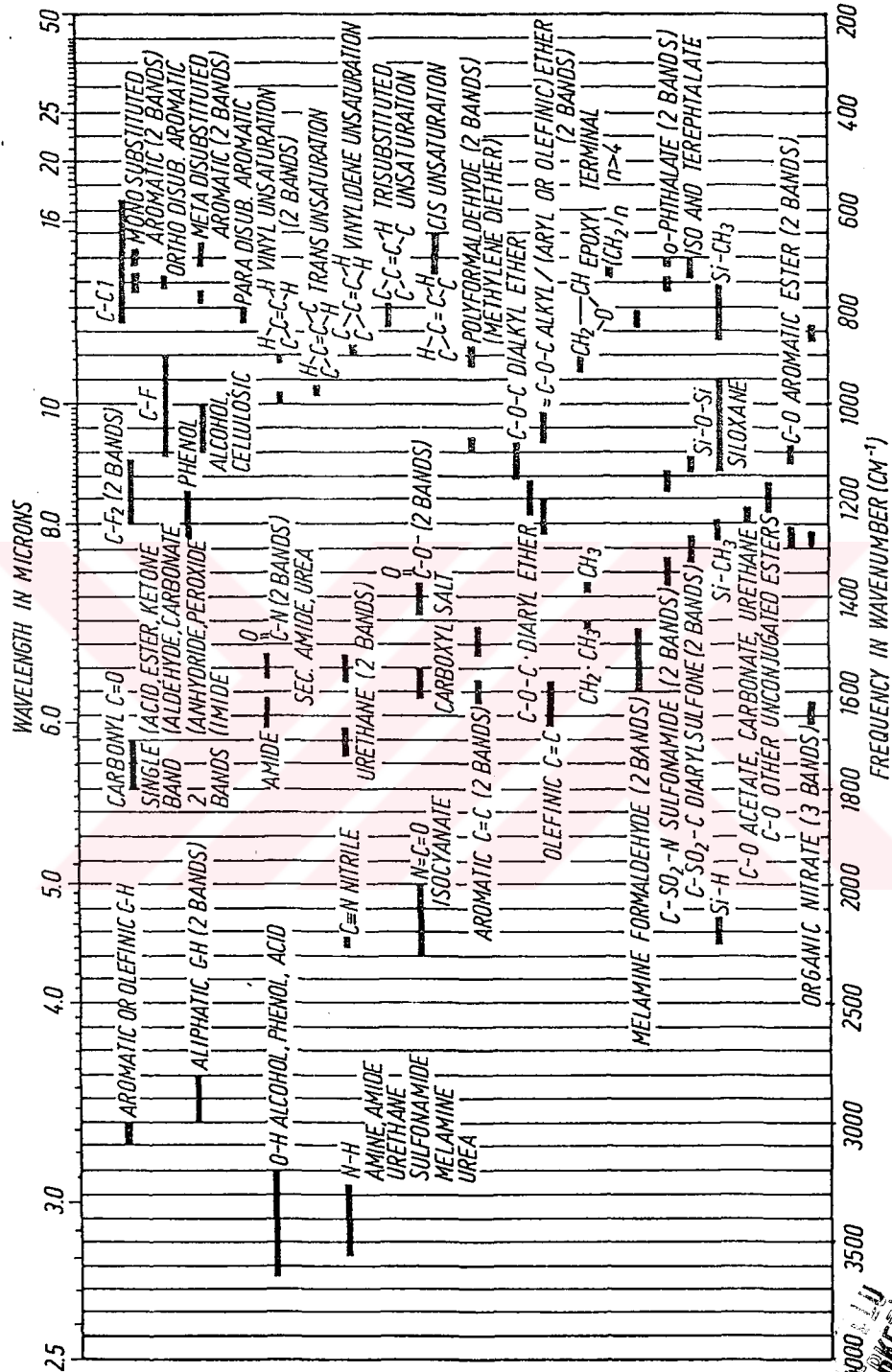
EK 2

BAZI POLİMERİK YAPILARIN
KİMYASAL BAĞLARINA AİT ENERJİ SEVİYELERİ

CARBONYL BAND NEAR 1725 cm ⁻¹		CARBONYL BAND NEAR 1725 cm ⁻¹	
Present		Absent	
Bands Near 1605, 1590 and 1490 cm ⁻¹	Absent (Aliphatic)	Bands Near 1605, 1590 and 1490 cm ⁻¹	Absent (Aliphatic)
Present (Aromatic)	Absent (Aliphatic)	Present (Aromatic)	Absent (Aliphatic)
3330, 1695, 1540, 1220 <i>Polyurethane</i>	1430, 1235, 1025 <i>Polyvinylacetate</i>	3330, 1430, 1100 (b) <i>Polyvinyl Alcohol</i>	1220-1150 (d) <i>Polytetrafluoroethylene</i>
3330, 1735, 1695, 1540, 1220 <i>Polyesterurethane</i>	1265, 1240, 1190-1150 <i>Polymethacrylates</i>	2920, 1470, 1380, 730-720 (d) <i>Polyethylene</i>	1250-1110, 1000-910 <i>Polychlorotrifluoroethylene</i>
3330, 1695, 1540, 1220, 1110 <i>Polyetherurethane</i>	1250, 1190-1150 <i>Polyacrylates</i>	2950, 2920, 1470, 1380, 1160, 970 <i>Polypropylene</i>	1265, 1110-1000, 800 <i>Methylsiloxane</i>
1300, 1230, 725 <i>Isophthalate Alkyls and Polyesters</i>	1230, 1110-1050 (b) <i>Cellulose Acetate</i>	2260 <i>Polyacrylonitrile</i>	1110 (b) <i>Polyvinylethers and acetals</i>
1230, 1120, 1075, 740, 705 <i>o-Phthalate Alkyls and Polyesters</i>	1170, 1110-1050 (b) <i>Other unconjugated cellulose esters</i>	3300, 1640, 1540 <i>Urea-Formaldehyde and Polyamides</i>	3450 (b), 1160-1050 (b) <i>Cellulose and Cellulose (acetone washed)</i>
1265, 1110, 867, 725 <i>Terephthalate Alkyls and Polyesters</i>		1640, 1280, 1160-1060-1000 (b), 834 <i>Cellulose Nitrate</i>	1110-1050 (b) <i>Cellulose ethers</i>
1775, 1235, 830 <i>Polycarbonate</i>		3420, 1540, 813 <i>Melamine-Formaldehyde</i>	1240, 1110, 935, 910 (b) <i>Polyformaldehyde</i>
1780, 1718 <i>Polymide</i>		1430, 690 <i>Polyvinyl chloride</i>	2880, 1470, 1110 (b) <i>Polyethylene Oxide</i>
1860, 1790, 1225, 1080, 760, 700 <i>Styrene-Maleic Anhydride</i>		1400, 1050 (d) <i>Polyvinylidene chloride</i>	2980, 2880, 1470, 1370, 1110 (b) <i>Polypropylene Oxide</i>
		1095, 1075, 1010, 820, 700, 560 <i>Polyphenylene Sulfide</i>	3010, 2940, 1450, 740 <i>1,4 Cis-Polybutadiene</i>
		1190, 855 <i>Polyphenylene Oxide (2,6 dimethyl-1,4 phenyleneoxide)</i>	2940, 1450, 970 <i>1,4 Trans-Polybutadiene</i>
			3070, 2920, 1640, 990, 910 <i>1,2 Polybutadiene</i>

Flow chart for identification of polymers from principal infrared bands

b = broad
d = doublet



Infrared spectra frequency-structure correlation chart

I.G. POLICE
DOMINANTASION MERKEZI
 4000 1100