

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**α -AMİLAZ ENZİMİNİN KİTOSAN İLE HAZIRLANAN KOMPOZİT TAŞIYICILAR ÜZERİNE
KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI ÖZLÜ

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Biyokimya

MANİSA 2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**α -AMİLAZ ENZİMİNİN KİTOSAN İLE HAZIRLANAN KOMPOZİT TAŞIYICILAR ÜZERİNE
KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI ÖZLÜ

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Biyokimya

MANİSA 2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**α -AMİLAZ ENZİMİNİN KİTOSAN İLE HAZIRLANAN KOMPOZİT TAŞIYICILAR ÜZERİNE
KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI ÖZLÜ

Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümünde Kabul Edilen

Yüksek Lisans Tezidir.

Tezin Teslim Tarihi: 02.08.2013

Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 09.09.2013

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ayşe DİNÇER

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Ayşe DİNÇER

MANİSA 2013

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
TEŞEKKÜR.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1 α -AMİLAZ.....	1
1.1.1 α -Amilazın Özellikleri	1
1.1.2 α -Amilazın Sanayide Kullanım Alanları	4
1.2 Enzimler.....	4
1.2.1 Enzim İmmobilizasyonu	4
1.2.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	5
1.2.2.1 Tutuklama Yöntemleri	6
1.2.2.1.b Mikrokapsüllerde Enzim İmmobilizasyonu	7
1.2.2.2 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri	7
1.2.2.2.a Kovalent Bağlama:	7
1.2.2.2.b Adsorpsiyon:	7
1.2.2.2.c İyonik Bağlama:	8
1.2.2.3 Çapraz Bağlama İle İmmobilizasyon	8
1.2.3.Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar.....	10
1.2.3.1 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Doğal Taşıyıcılar	12
1.2.3.1.4 Nişasta:	13
1.2.3.1.5 Karragenan:.....	14
1.2.3.1.6 Alginat:	15
1.2.3.1.7 Agaroz:	17
1.2.3.1.8 Kitosan:	17
1.2.3.1.8.1 Kitin ve Kitosanın Kimyasal Yapısı	19
1.2.3.1.8.2 Kitosanın Belirleyici Özellikleri	21
1.2.3.1.8.2.a Deasetilleme Derecesi.....	21
1.2.3.1.8.2.b Molekül Ağırlığı	22
1.2.3.1.8.2.c Viskozite.....	22
1.2.3.1.8.2.d Çözünürlük	22

1.2.3.1.8.2.e Renk	23
1.2.3.1.8.3 Kitosanın Kullanım Alanları	23
2. MATERYAL VE METOD	25
2.1 Materyal	25
2.2 Yöntem	25
2.2.1 Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması	25
2.2.2 α -Amilaz Aktivite Tayini	26
2.2.3 Protein Tayini	27
2.2.4 İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliğinin Hesaplanması	28
2.2.5 Kompozit Boncuklarının Hazırlanması	28
2.2.5.1 Nanokilin Aktivasyonu	28
2.2.5.2 Kitosan-Nanokil Kompozit Boncuklarının Hazırlanması	28
2.2.5.3 Fe_3O_4 (Manyetit) Hazırlanması	29
2.2.5.4 Kitosan- Fe_3O_4 Kompozit Boncuklarının Hazırlanması	29
2.2.6 Kitosan-Nanokil ve Kitosan- Fe_3O_4 Kompozit Boncukların Glutaraldehit ile Çapraz Bağlanması	29
2.2.6.1 Glutaraldehit ile Çapraz Bağlama Süresinin Etkisi	29
2.2.6.2 Glutaraldehit Konsantrasyonunun Etkisi	30
2.2.7 İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	30
2.2.8 α -Amilaz Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	30
2.2.9 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon	31
2.2.9.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklığın Etkisi	31
2.2.9.2 Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi	31
2.2.10 Kararlılık Testleri	31
2.2.10.1 Termal Kararlılık	32
2.2.10.2 pH Kararlılığı	32
2.2.10.3 Depo Kararlılığı	32
2.2.11 Kinetik Parametreler	32
2.2.12 İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	33
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	34

3.1 Aktivite ve Protein Standart Grafikleri	34
3.1.1 Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması	35
3.1.2 Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması	35
3.2 İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi	36
3.2.1 Glutaraldehitin α -Amilaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	36
3.2.1.1 Glutaraldehit ile Çapraz Bağlama Süresinin İmmobilizasyon Üzerine Etkisi	36
3.2.1.2 Glutaraldehit Konsantrasyonunun İmmobilizasyon Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	37
3.2.2 İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	39
3.2.3 α -Amilaz Konsantrasyonunun Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	40
3.3 Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi	41
3.4 Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Optimum pH' larının Belirlenmesi	42
3.5 Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	43
3.6 Stabilite Testleri	44
3.6.1 Serbest ve İmmobilize α -Amilazın pH Stabilesi.....	44
3.6.2 Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Termal Stabilesi	45
3.6.3 Depolama Kararlılığı.....	46
3.7 Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	48
3.8 Tekrar Kullanılabilirliği	50
3.9 Fiziksel Karakterizasyon	52
3.9.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi	52
3.9.2 Termogravimetrik Analiz (TGA)	56
3.9.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	57
Kitosan-kil Kompozit Boncuk.....	62
Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk	62
Kompozit boncuk	62
3.10 Genel Değerlendirme	62
4. KAYNAKLAR	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: α - Amilaz molekülünün şematik diyagramı	2
Şekil 1.2: α - Amilazın aktif bölgesi.....	3
Şekil 1.3: İmmobilize enzimlerin sınıflandırılması	6
Şekil 1.4: a) Matrikste tutuklama b) Yarı geçirgen membranda tutuklama	7
Şekil 1.5 : Taşıyıcıya bağlama	8
Şekil 1.6: Çapraz bağlama.....	9
Şekil 1.7: Selülozun açık yapısı	12
Şekil 1.8: Dekstranın açık yapısı	13
Şekil 1.9: a) Amilozun açık formülü	13
Şekil 1.9: b) Amilopektinin açık yapısı	14
Şekil 1.10: Karregenanın açık yapıları	15
Şekil 1.11: Aljinatın tekrarlanan birimlerinin yapısı	16
Şekil 1.12: Yumurta- kutu modeli	17
Şekil 1.13: a) Kitinin açık yapısı	18
Şekil 1.13: b) Kitosanın açık yapısı	18
Şekil 3.1: Maltoz standart eğrisi	53
Şekil 3.2: Protein standart grafiği	54
Şekil 3.3: Glutaraldehit ile çapraz bağlama süresinin belirlenmesi	55
Şekil 3.4: Glutaraldehit konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	56
Şekil 3.5: Kitosan-kil kompozit boncukların GLA ile çapraz bağlanması sonucu boncuklarda gözlenen değişiklik.....	57
Şekil 3.6: Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncukların GLA ile çapraz bağlanması sonucu kompozit boncuklarda gözlenen değişiklik.....	58
Şekil 3.7 İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi:.....	58
Şekil 3.8: Enzim immobilizasyonu için optimum α -Amilaz konsantrasyonunun belirlenmesi	59
Şekil 3.9: Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Optimum pH' larının Belirlenmesi	59
Şekil 3.10: Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	60
Şekil 3.11: Serbest ve İmmobilize α -Amilazın pH Stabilitesi	60
Şekil 3.12: Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Sıcaklık Stabilitesi.....	60
Şekil 3.13: a) - 18° C, b) + 4° C c) 25° C' de serbest α -amilaz enzimi (▲), kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş α -amilaz (●) ve kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş α -amilaz (■) enziminin depolama stabiliteleri GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuklar	61
Şekil 3.14: Serbest α -amilazın ve kitosan-kil kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen α -amilazın Lineweaver-Burk grafiği Kitosan-kil kompozit boncuklar	61

Şekil 3.15 : Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen α-amilazın Lineweaver-Burk grafiği GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuklar	61
Şekil 3.16: Kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilen α-amilazın tekrar kullanılabilirliği	35
Şekil 3.17: Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk üzerine immobilize edilen α-amilazın tekrar kullanılabilirliği	35
Şekil 3.18: Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncukların FTIR analizi.....	37
Şekil 3.19: Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncukların FTIR analizi	38
Şekil 3.20: Kitosan-kil kompozit boncukların FTIR analizi.....	38
Şekil 3.21:GLA ile çapraz bağlanmış kitosan-kil kompozit boncukların FTIR analizi	39
Şekil 3.22: Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncukların TGA sonuçları	40
Şekil 3.23: Kitosan-kil kompozit boncukların TGA sonuçları	41
Şekil 3.24: a) Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 100x büyütme b) Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 2500x büyütme c) Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 25.000x büyütme.....	43
Şekil 3.25: GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 100x büyütme b) GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 2500x büyütme c) GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 25.000x büyütme	44
Şekil 3.26: a) α-amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 100x büyütme b)α-amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 5000x büyütme c)α-amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk 25.000x büyütme	45
Şekil 3.27: a) Kitosan-kil kompozit boncuk 100x büyütme b) Kitosan-kil kompozit boncuk 2500x büyütme c) Kitosan-kil kompozit boncuk 25.000x büyütme	46
Şekil 3.28: a) GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuk 100x büyütme b) GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuk 2500x büyütme c) GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuk 25.000x büyütme	48
Şekil 3.29: a) α-amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk 100x büyütme b)α-amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk 2500x büyütme c)α-amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk 25.000x büyütme	49
Şekil 3.30: Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuklar	50
Şekil 3.31:GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuklar.....	51
Şekil 3.32:Kitosan-kil kompozit boncuklar	51
Şekil 3.33: GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuklar.....	64

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1: İmmobilizasyon yönteminin karşılaştırması	10
Çizelge 1.2: İmmobilizasyon yöntemi, taşıyıcı ve reaktör seçimini etkileyen	11
Çizelge 1.3: Taşıyıcıların sınıflandırılması	11
Çizelge 1.4: Kitosanın teknik üretim koşulları	20
Çizelge 1.5: Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları	24
Çizelge 2.1: Maltöz standart eğrisinin oluşturulması	26
Çizelge 2.2: Aktivite tayini	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Çizelge 3.1: Kitosan-kil ve kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş α-amilazda % verim ve % yükleme etkinliği	41
Çizelge 3.2: Yaş boncukların boyutları	61

KISALTMALAR

Abs: Absorbans

BSA: Sığır serum albumin

CT: Kitosan

DNS:3,5-Dinitro salisilik asit

GLA: Glutaraldehit

K_M : Michealis-Menten sabiti

TPP: Tripolifosfat

V_{max} : Maksimum reaksiyon hızı

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım ve hocam Doç.Dr. Ayşe DİNÇER' e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın Prof.Dr. Tülin AYDEMİR' e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013-008).

Öğrenim hayatım boyunca bana maddi ve manevi her türlü desteği veren aileme, en içten ve sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

α -Amilaz (1,4- α -D-glukan-glukanhidrolaz, EC. 3.2.1.1) doğada yaygın olarak bulunan bir salgı enzimidir. α -Amilaz enzimi nişasta (amiloz ve amilopektin), glikojen ve buna bağlı oligo ve polisakkaridlerdeki α -D- (1,4)-glukozidik bağlarının hidrolizlerini maltodekstrin, malto-oligosakkaridler ve glukoz üretmek için katalizlerler. Endo-amilazlar ailesinden olan α -amilazın molekül ağırlığı 55200 Da dolayındadır ve sıcaklığa karşı önemli ölçüde direnç göstermektedir. α -Amilaz molekülü 478 amino asit artığı (9 adet triptofan) ve 294 su molekülü bulundurmaktadır. Ayrıca α -amilazın Ca^{2+} ve Cl^- iyonlarını bağlama özelliği vardır. α -Amilazların aktif formda olmaları için mutlaka kalsiyum iyonu gereklidir. α -Amilaz, en az bir Ca^{2+} içeren bir metaloenzimdir. α -Amilazların optimum pH değerleri genellikle 4.0–7.0 arasında bulunmaktadır. Optimum pH aralığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Safaştırılmış α -amilazlar 50 °C'nin üzerinde aktivitelerini hızla kaybetmektedirler. Bu inaktivasyon işlemi kalsiyum ve substrat etkisiyle azaltılabilir. α -Amilazın 5 alt ünitesi yani substrat bağlama bölgesi vardır. Etkili oldukları sıcaklık aralığı ise 20–40 °C'dir.

Bu çalışmada biyoteknolojide, tekstil, gıda ve kağıt endüstrilerindeki uygulamalarda büyük önem taşıyan α -amilaz enzimi bu çalışmada doğada bol miktarda bulunan, ekonomik ve ucuz biyopolimer olan kitosan ile hazırlanan kompozit taşıyıcılar üzerine kovalent olarak immobilize edildi. Bu amaçla kitosan, nanokil (hidrofilik bentonit) ve Fe_3O_4 ile ayrı ayrı karıştırılıp, hazırlanan süspansiyon tripolifosfat içerisine damlatılıp kompozit boncuklar oluşturuldu. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonunda ilk olarak kompozit taşıyıcıların aktivasyonunda kullanılan glutaraldehidin optimum çapraz bağlama süresi ve konsantrasyonu belirlendi. Glutaraldehit ile çapraz bağlama süresi kitosan-kil kompozit boncuklar için 1 saat, kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk için 1,5 saat ve glutaraldehidin optimum konsantrasyonu her iki kompozit boncuk için % 1 (v/v) olarak bulundu. α -Amilaz enziminin çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuklar üzerine optimum bağlanma süresi 1 saat kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk üzerine bağlanma süresi 4 saat ve optimum enzim konsantrasyonu kitosan-kil kompozit boncuklar için 3 mg/ml, kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk için 2mg/ml olarak belirlendi. Ayrıca hem serbest enzim hem de immobilize enzim aktiviteleri üzerine pH'ın ve sıcaklığın etkisi incelendi. Serbest ve kitosan-kil immobilize enzimin optimum pH'ı 7.0, kitosan- Fe_3O_4 immobilize enzimin pH 5.0 olarak bulundu. Kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 50 °C, kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk üzerine immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 60° C, serbest enzimin optimum sıcaklığı 37 °C bulundu. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin pH, termal ve depolama stabilite testleri yapıldı. Kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize edilen α -amilaz enziminin yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha stabil olduğu görüldü. İmmobilize enzim pH 3.8-10.0 arasında aktivitesini korurken serbest enzim pH 5.0-8.0 arasında aktivite göstermektedir. Serbest enzimin ve kitosan-kil üzerine immobilize edilen enzimin pH 7.0'de, kitosan- Fe_3O_4 üzerine immobilize edilen enzimin ise pH 5.0'de diğer pH değerlerine göre daha stabil olduğu görüldü. Ayrıca immobilize α -amilaz enziminin tekrar kullanılabilirlik testi yapıldı ve kitosan-kil kompozit boncukların 10 kullanım sonrasında % 20 oranında, kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncukların 70 kullanım sonrası % 13,65 oranında aktivitesini koruduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler : α -Amilaz, kitosan, kompozit taşıyıcı, biyopolimer, immobilizasyon.

ABSTRACT

The α -amylases (EC 3.2.1.1) 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase; glycogenase) is a secretory enzymes commonly found in nature. α -Amylases are member of endo-amylases family, have about 55 200 Da molecular weight and they are resistant to temperature significantly. α -Amylase has 478 amino acid residues (tryptophan 9) and holds 294 water molecules. In addition, α -amylase has the ability to bind Ca^{2+} and Cl^- ions. α -Amylases are calcium metalloenzymes, completely unable to function in the absence of calcium and they have optimum pH between pH 4.0 and 7.0. The optimum pH range of the enzyme varies according to the source. Purified α -amylases lose their activity over 50 ° C. Inactivation can be reduced by adding calcium, and substrate to the reaction medium. α -Amylase has 5 subunits or substrate binding site. They show catalytic activity in the 20-40 ° C temperature range.

Enzymatic hydrolysis is more efficient and has more specific applications than chemical hydrolysis. One of the application areas of α -amylase enzyme is starch industry. Starch can be converted to glucose syrup by enzymatic hydrolysis and this syrup can be used as a sweetener in the food industry. α -Amylases can also be used at some types of beer production such as light beer, lower carbohydrate high alcohol content and at paper, textile, detergent and juice industries. In the textile industry, during sizing process, fibers are treated with starch solution for being stable and smooth in weaving. After weaving, α -amylase are used for removal of starch from the medium (Nielsen et al., 2000, Brzozowski et al., 1997).

In industrial applications, recovery of the free enzyme from the medium is difficult and this causes extra pollution. Also control of the reaction is difficult, because free enzyme cannot be removed when it wanted. α -Amylase which has great importance in biotechnology, food, textile and paper industries was immobilized on composite carries which were prepared by economical and inexpensive biopolymer such as chitosan. For this purpose, chitosan was mixed with nanoclay (hydrophilic bentonite) and Fe_3O_4 than the suspension was dropped in tripolyphosphate solution. The prepared chitosan-composite beads were activated by glutaraldehyde. Then α -amylase was covalently attached on the beads. Optimum glutaraldehyde crosslinking time were found as 1 hour for chitosan-clay and for chitosan- Fe_3O_4 1,5 hours, cross-linker concentration were optimized as % 1 (v/v) chitosan-clay and for chitosan- Fe_3O_4 and optimum enzyme concentration was determined as 3 mg/ml for chitosan-clay and for chitosan- Fe_3O_4 2mg/ml. In addition, optimum pH was found as pH 7.0 and optimum pH was found pH 5.0 chitosan- Fe_3O_4 , optimum temperature of free and chitosan-nanoclay immobilized enzyme was found as 37 °C and 50 °C respectively. Optimum temperature chitosan- Fe_3O_4 immobilized enzyme was found 60° C. Also, thermal, pH and storage stability of free and immobilized enzyme was compared. The reusability of immobilized α -amylase was also examined. After ten times of repeated use, each over 5 min, chitosan-nanoclay immobilized enzyme maintained its 20% initial activity. Chitosan- Fe_3O_4 immobilized enzyme maintained its 13,65 % initial activity.

Keywords: α -amylase, chitosan, immobilization, biopolymer, composite carrier.

1. GİRİŞ

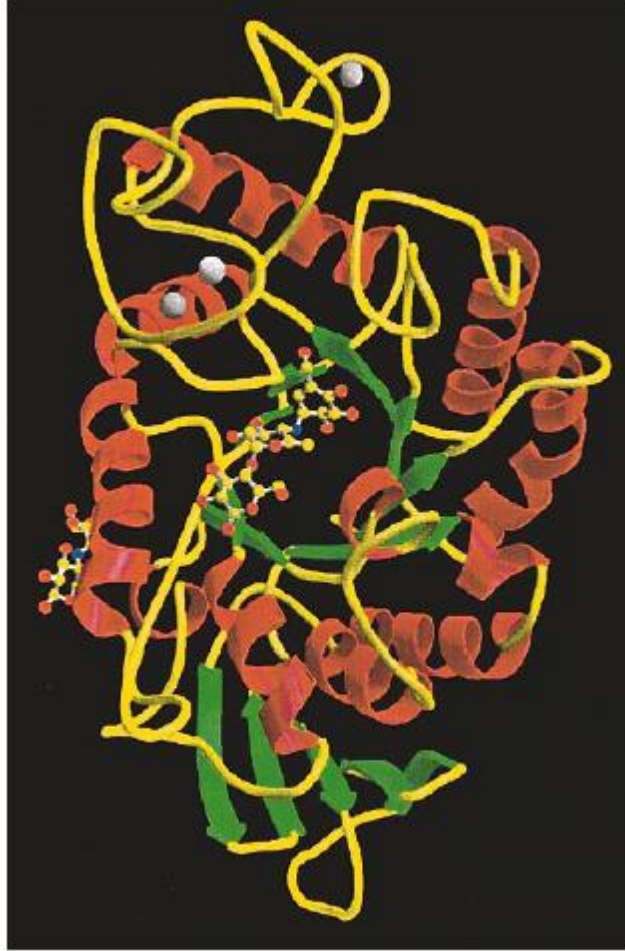
Amilazlar nişastada bulunan glikozid bağlarını hidroliz yoluyla parçalayan enzimlerdir. Bunlar nişastada α -1,4 glikozid bağlarını kıran alfa amilazlar ve indirgenmeyen uçlarındaki α -1,4 bağlarını kıran β -amilazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Alfa amilaz ve glucoamilazın nişastaya artarda etkisiyle veya bu enzimlerin karışımı kullanılarak glukoz şurubu elde edilmektedir. Çok kullanılan bu işlem, belirtilen enzimleri ticari anlamda önemli bir yere getirmektedir (1). Amilazlar günümüzde biyoteknolojide, gıda, tekstil ve kağıt endüstrilerindeki uygulamalarda büyük önem taşımaktadırlar. Amilazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilmekle birlikte endüstride genellikle mikrobiyal kaynaklı enzimler talep edilmektedir (2). Amilazlar, ilk defa Kirschhoff'un nişastayı parçalayan bu enzimleri keşfetmesi ile 1811'de kullanılmaya başlanılmışlardır. Bunu, nişasta parçalayıcı amilazlar ve malt amilazları takip etti. 1930'un sonlarına doğru, Ohlsson, nişasta parçalayıcı enzimleri, enzim reaksiyonları ile üretilen şekerlerin anomerik tiplerine göre, malttaki α - ve β -amilazlar olarak sınıflandırmayı önermiştir. α -Amilaz (1,4- α -D-glukan-glukanhidrolaz, EC. 3.2.1.1) doğada yaygın olarak bulunan bir salgı enzimidir (1,3).

1.1 α -AMİLAZ

1.1.1 α -Amilazın Özellikleri

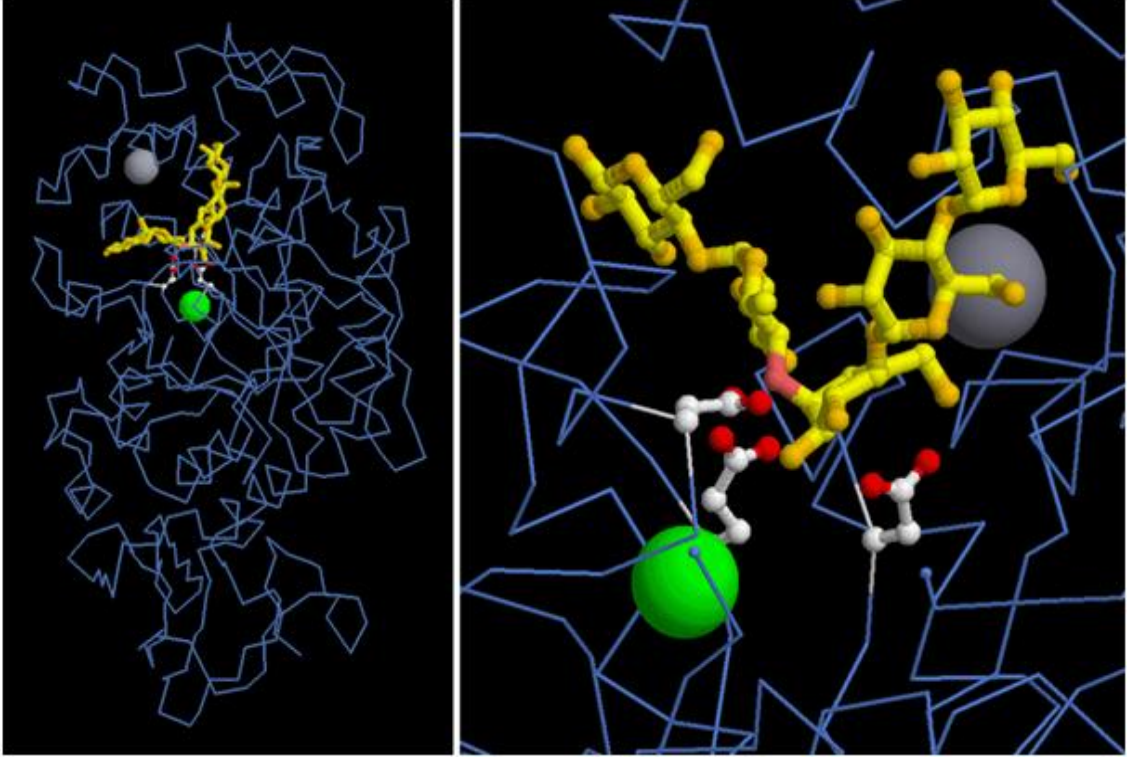
Endo-amilazlar ailesinden olan α -amilazlar (1,4- α -D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1) hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan monomerik enzimlerdir. Nişasta (amiloz ve amilopektin), glikojen ve buna bağlı oligo ve polisakkaridlerdeki α -D- (1,4)-glikozidik bağlarının hidrolizlerini maltodekstrin, malto-oligosakkaridler ve glukoz üretmek için katalizlerler (4,5,6). Birçok mantar türünden α -amilaz üretilmekle birlikte en çok incelenen ve genellikle ticari olarak kullanılan *Aspergillus oryzae* α -amilaz (TAKA)'dır. Bu enzim nişastanın α -(1,4) bağlarına saldırır fakat α -(1,6) bağlarına saldırmayan bir endohidrolazdır. Belirtilen enzim ile nişasta %60 oranında maltoza dönüştürülebilmektedir(7). α -Amilazın molekül ağırlığı 55200 Da dolayındadır ve sıcaklığa karşı önemli ölçüde direnç göstermektedir. Bu enzimin dikkate değer termostabilite özelliği, artan iyonik etkileşimler, azalan yüzey alanı ve iç kısımdaki artan paketlenme sağlayıcı etkileşimlerden ileri gelebilir. α -Amilaz molekülü 478 amino asit artığı (9 adet triptofan) ve 294 su molekülü bulundurmaktadır (8). Ayrıca α -amilazın Ca^{2+} ve Cl^- iyonlarını bağlama özelliği vardır. α -Amilazların aktif formda olmaları için mutlaka kalsiyum iyonu gereklidir. α -Amilaz, en az bir Ca^{2+} içeren bir metaloenzimidir. Ca^{2+} iyonunun afinitesi, diğer

iyonlardan daha kuvvetlidir. Kalsiyum bağlarının sayısı 1–10 arasında değişir. Ca^{2+} iyonu amilazlardan diyaliz yöntemi ile uzaklaştırılabilir. Kalsiyumun uzaklaştırıldığı enzimler Ca^{2+} iyonunun ilavesi ile tekrar aktif hale getirilebilir. Ca^{2+} nın varlığında, α -amilazlar Ca^{2+} nın bulunmadığı α -amilazlara göre daha termostabildir (1,9,10). α -Amilazlar, bir enzim molekülü başına en az bir atom kalsiyuma sahip metaloenzimlerdir. Ca^{2+} iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş ve Ca^{2+} iyonunun mikromolar seviyelerinin, α -amilazın yapısını stabilize etmeye yaradığı görülmüştür (11).



Şekil 1.1: α - Amilaz molekülünün şematik diyagramı (12)

Amilazdaki glutamat 233, aspartat 197 ve aspartat 300 birlikte çalışarak iki şeker molekülü arasındaki glikozid bağı kırılmaktadır. Kalsiyum iyonu enzimde protein yapının yakınında saptanmıştır ve enzimin yapısını stabilize etmektedir. Klor iyonu ise, çoğu amilazda aktif bölgenin altından bağlanmıştır ve bu iyon reaksiyonun oluşmasına yardımcı olmaktadır.



Şekil 1.2: α - Amilazın aktif bölgesi (12)

(Üçlü asidik grup (kırmızı), beş şeker biriminden oluşan zincir (sarı ve turuncu), kalsiyum iyonu (gri küre), klor iyonu (yeşil küre)).

α -Amilazların optimum pH değerleri genellikle 4–7 arasında bulunmaktadır. Optimum pH aralığı enzimin kaynağına göre değişmektedir. Safaştırılmış α -amilazlar 50°C 'nin üzerinde aktivitelerini hızla kaybetmektedirler. Bu inaktivasyon işlemi kalsiyum ve substrat etkisiyle azaltılabilir. Etkili oldukları sıcaklık aralığı ise $20\text{--}40^{\circ}\text{C}$ 'dir.

α -Amilazın 5 alt ünitesi yani substrat bağlama bölgesi vardır. α -Amilazın bu bölgelerine substratın yerleşmesi işleminde maksimum katalitik aktivitenin, nötralden daha çok asidik pH'da olduğu görülmüştür (13).

1.1.2 α -Amilazın Sanayide Kullanım Alanları

Enzimatik hidroliz, kimyasal hidrolizden daha etkili ve daha spesifik olduğu için uygulamalarda tercih edilmektedir. α -Amilazın kapsamlı kullanım alanlarından biri, nişasta endüstrisidir. Nişastayı hidroliz yoluyla parçalayan amilazlar, eczacılıkta siklo dekstrinlerinden çeşitli uygulamalarda yer alan glukoz şuruplarına kadar birçok üretim dalında yer almaktadır (14). Nişasta enzimatik hidroliz ile glukoz şuruplarına dönüştürülebilir ve bu şuruplar gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılırlar. Bazı bira türlerinin üretiminde, (light bira gi bi) daha düşük karbonhidrat ve daha yüksek alkol içeriğine sahip bir ürün elde etmek için enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. α -Amilazlar kağıt, tekstil, deterjan sanayilerinde ve meyve suyu üretiminde kapsamlı boyutta kullanılmaktadırlar (4).

1.2 Enzimler

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (15).

Enzimlerin kullanımı, genel uygulamalarda elde edilemeyen bir çok olumlu sonuç vermektedir. Enzimler, yüksek ürün kalitesi, üretimde düşük maliyet, az atık, fazla enerji tüketiminin engellenmesi, sadece istenilen reaksiyonun gerçekleşmesi, kolay kontrol ve reaksiyonun ılımlı koşullarda gerçekleşmesi ve reaksiyon hızının 10^{16} kata kadar artması gibi pek çok avantajlara sahiptir.(16)

Enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha kullanışlı ve ekonomik hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir.

1.2.1 Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu çalışmalarının çeyrek asırlık bir geçmişi vardır. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür.

Reaksiyonu istenilen anda durdurulması için reaksiyon ortamına inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır.

Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir.

Enzim saflaştırma işlemlerinin zahmetli ve pahalı olmasının yanı sıra endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan birtakım zorlukların üstesinden gelmek için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (17).

Enzimler;

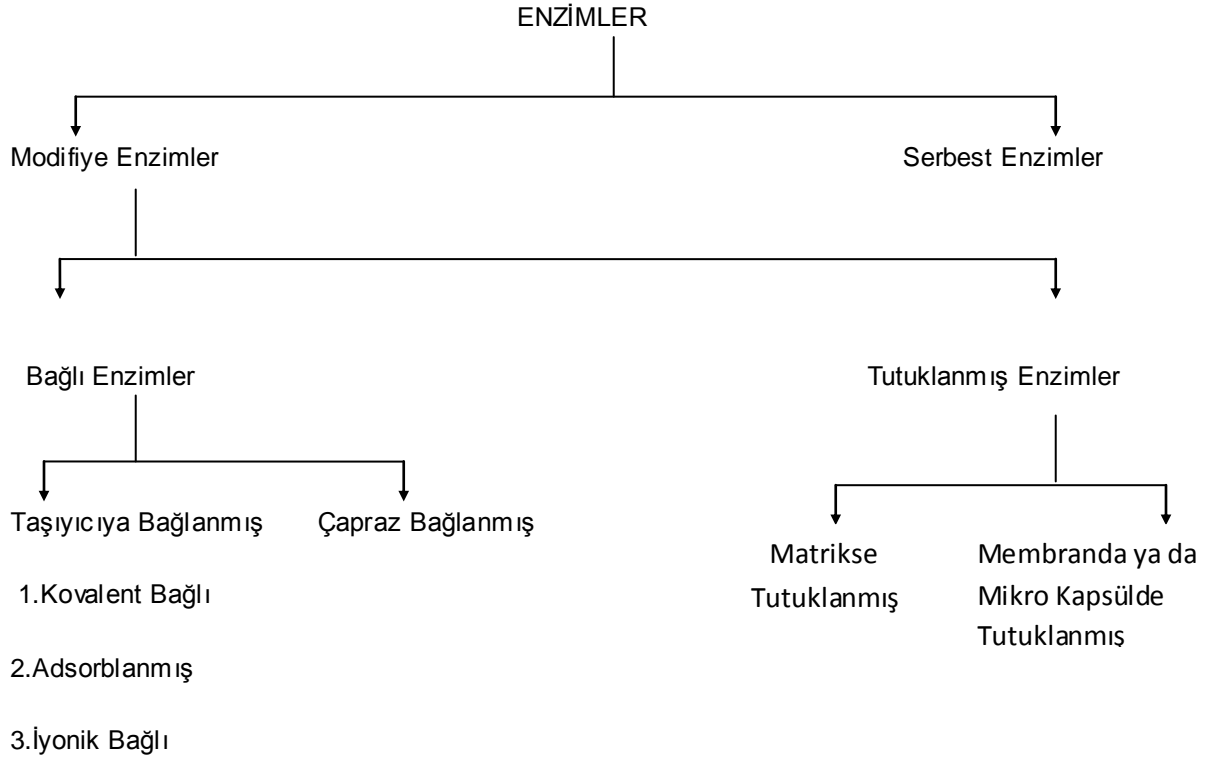
- Suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kimyasal olarak bağlanmasıyla,
- Suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla,
- Suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla immobilize edilirler.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri şöyledir;

- Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir (süzme ve santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur
- Bazı durumlarda serbest enzime göre daha yüksek bir aktivite gösterebilir
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır (16)

1.2.2 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Uygun immobilizasyon yönteminin dört ana kriter göz önüne alınmalıdır; güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık. Bir enzim immobilizasyonunda ayrıca enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir (17).



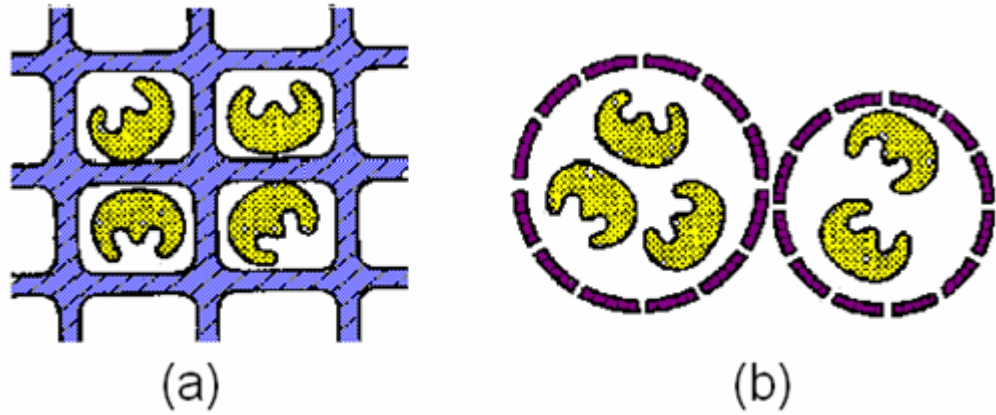
Şekil 1.3: İmmobilize enzimlerin sınıflandırılması (15,18)

1.2.2.1 Tutuklama Yöntemleri

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkmaz. Bu işlemler polimer matris içindeki kafelerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmış olmasıdır (18).

1.2.2.1.a Kafeste Tutuklama: Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda tutulmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N-N- metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir (19).

1.2.2.1.b Mikrokapsüllerde Enzim İmmobilizasyonu: Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından oluşmaktadır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 5–100 μ arasında değişmektedir. Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedirler. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir (18).



Şekil 1.4: a) Matrikste tutuklama b) Yarı geçirgen membranda tutuklama

1.2.2.2 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

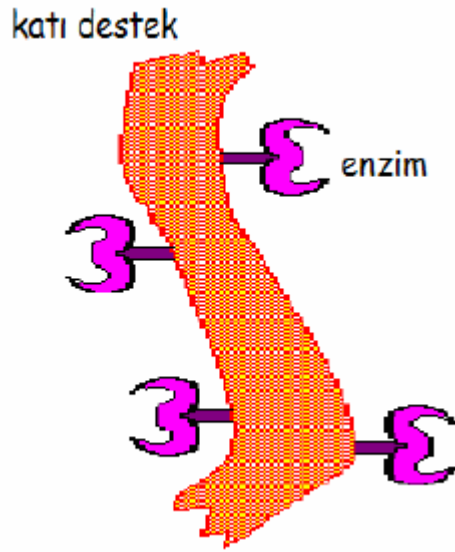
En eski enzim yöntemlerinden biridir. Taşıyıcıya bağlanma ya kimyasal kovalent veya iyonik veya adsorptif biçiminde gerçekleşir. Enzime göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Partikül büyüklüğü, toplam yüzey hidrofilik gruplarının hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi. Bu yöntem üç alt gruba ayrılır (19).

1.2.2.2.a Kovalent Bağlama: Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genelde protein kimyasında bilinen yöntemlerle sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupları rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlama enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı reaktif grupların üzerinden gerçekleşir (19).

1.2.2.2.b Adsorpsiyon: Yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van Der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işlemden

geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır (18).

1.2.2.2.c İyonik Bağlama: Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda bunun yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır (20). İyonik bağlanma çok yumuşak koşullarda gerçekteştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur (19).

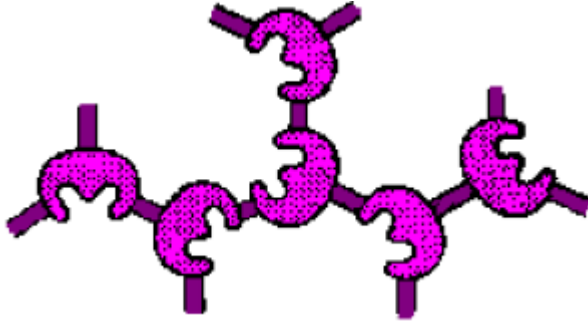


şekil 1.5 : Taşıyıcıya bağlama

1.2.2.3 Çapraz Bağlama İle İmmobilizasyon

Küçük moleküllü bir veya çok fonksiyonlu reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak, sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. Molekül içi bağlanmalar da söz konusu olabilir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu Zaborsky' a göre dört farklı şekilde gerçekteştirilebilir . Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile tepkimesi;

- a) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile tepkimesi
- b) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile tepkimesi
- c) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile tepkimesi.
- En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid (Sciff bazı), izosiyonat türevleri (peptid bağı), bisdiazobenzidin (diazot bağlaması) N-N – polimetilen bisiyodoasetamid (alkilleme), 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen ve N,N-dimetilbismaleimidir.



Şekil 1.6: Çapraz bağlama

Çizelge 1.1: İmmobilizasyon yönteminin karşılaştırması (18)

Karakteristik	Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi				
	Kovalent bağlama	Adsorpsiyon	İyonik bağlama	Çapraz bağlama yöntemi	Tutuklama yöntemi
Hazırlama	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Enzim aktivitesi	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Substrat spesifikliği	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Genel uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon maliyeti	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük
Bağ gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli

1.2.3.Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar

Bir immobilize enzim sisteminin en önemli üç bileşeni enzim, taşıyıcı ve immobilizasyonda kullanılan yöntemdir. Taşıyıcı materyal bir membran, suda çözünür bir katı ya da polimer bir matriks olabilir.

Enzimlerin immobilizasyonunda genel olarak doğal veya sentetik bir çok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Genel olarak bir taşıyıcının sahip olması gereken özellikler şunlardır:

(22)

- ❖ Hidrofilik karakter
- ❖ Kimyasal ve termal kararlılık
- ❖ Suda çözünmemesi
- ❖ Gözenekli (poröz yapı)
- ❖ Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- ❖ Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların ılımlı koşullarda reaksiyon veren fonksiyonel gruplar içermesi
- ❖ Mikroorganizmalara karşı dirençlilik

- ❖ Ucuz olması
- ❖ Rejenere olabilmesi

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıların seçiminde bazı kriterlere dikkat edilmelidir. Bunlar; immobilizasyon yöntemi, substratın yapısı, reaktör tipi ve mekanik özellikleridir. Immobilizasyon iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilecekse taşıyıcının fonksiyonel gruplar içermesi gerekir. Substrat büyük molekül ise özellikle tutuklama yöntemleri ve poröz taşıyıcılar difüzyon ve sterik engellemeden dolayı pek uygun değildirler (23).

Çizelge 1.2: Immobilizasyon yöntemi, taşıyıcı ve reaktör seçimini etkileyen faktörler (18)

İmmobilizasyon yöntemi	Taşıyıcı	Reaktör
Güvenilirlik	İmmobilizasyon yöntemi	Operasyonel gereksinimler
Maliyet	Sustratın doğası	Reaktör maliyeti
Aktivitenin korunması	Reaktör tipi	Katalizör rejenerasyonu
Kararlılık	Mekanik özellikler	Tepkime kinetiği

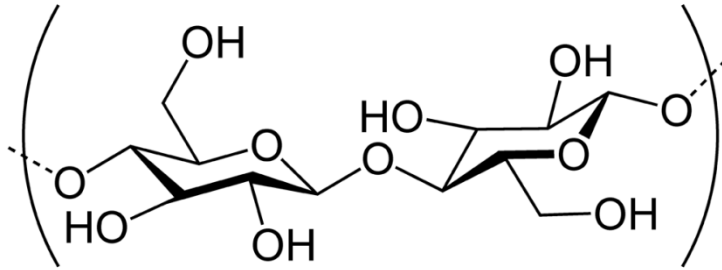
Çizelge 1.3: Taşıyıcıların sınıflandırılması

Doğal Taşıyıcılar		Sentetik Taşıyıcılar (Sentetik polimerler)
Anorganik	Polimer	Polistiren türevleri
Cam (gözenekli cam)	Selüloz	Naylon
Silikajel	Nişasta	Polivinil alkol
Alüminyum oksit	Dekstran	Oxiraanlar
Bentonit	Agaroz	Metakrilat
Hidroksi apatit	Karragenan	İyon değiştirici reçineler
Titan dioksit	Alginat	
Zirkonyum oksit	Kitin	
Nikel oksit	Kitosan	

1.2.3.1 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Doğal Taşıyıcılar

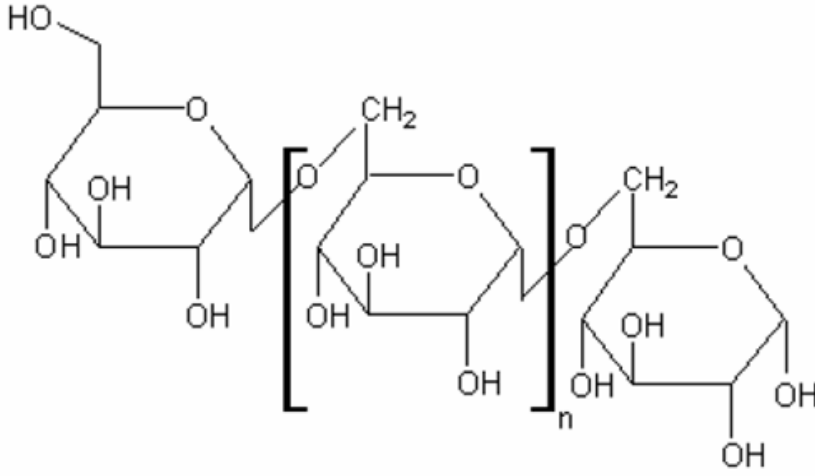
1.2.3.1.1 Kitin: Yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında bulunan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan beyaz, sert, elastik olmayan azotlu bir biyopolimerdir (poli-(1-4)-N-asetil-D-glukozamin). Ticari açıdan ilgi görmesinin başlıca sebebi yüksek azot oranıdır (6,98). Kitin çözünürlüğü oldukça düşük bir maddedir. Çözünürlük ve kimyasal reaktivite açısından da selüloza benzemektedir. Kitin polimeri yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve bazik ortamda deasetillenerek kitosana dönüşür (24).

1.2.3.1.2 Selüloz: Selüloz bitki biyokütlesinin ana bileşenidir ve bitkilerden, bakterilerden sentezlenen dünyada en yüksek oranda bulunan organik polimerdir. Selülozun ana bileşeni D-glukozdur. Fotosentez sırasında karbondioksit ve su D-glukoza dönüşür. Selüloz β -1,4 glikozidik bağı ile bağlı glukoz birimlerinden oluşan lineer homo-polisakkarittir. Glukoz halkası sandalye konformasyonundadır. Selülozun tekrarlayan en küçük alt birimi bir disakkarid olan selobiozdur. Selüloz suda çözünür özellikte değildir. Molekül ağırlığı genellikle (250.000-1.000.000) aralığında değişmektedir. Selüloz I, selüloz çeşitlerinin doğal ve en baskın olan kristal yapısı olup polimer bilimlerinde en çok çalışılan formudur. Çoğunlukla bitkilerde bulunur. Çok sayıda rapor ve yayına rağmen selülozun yapısı hala tam olarak çözülememiştir (25).



Şekil 1.7: Selülozun açık yapısı

1.2.3.1.3 Dekstran: Dekstran mikrobiyal sentez ile elde edilen polisakkaridlerin genel adıdır. Doğada bol miktarda bulunan biyobozunur, inert ve toksik olmayan bir polimerdir. Dekstran molekülü anhidro-D-glukopiranoz birimlerinin başlıca α -1,6-glikozid bağı ile bağlanması sonucu meydana gelmiştir. Her glukoz halkasında üç adet hidroksil grubu bulunmaktadır. Dekstran tıbbi uygulamalarda uzun zamandan beri yer almaktadır (26,27).

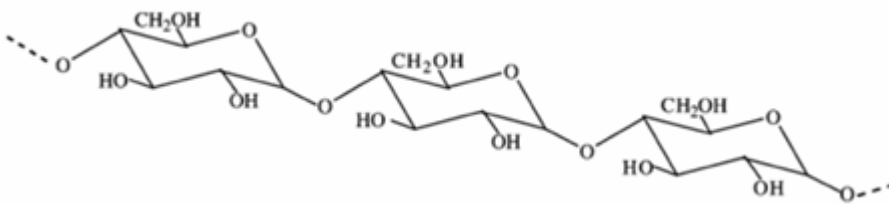


Şekil 1.8: Dekstranın açık yapısı

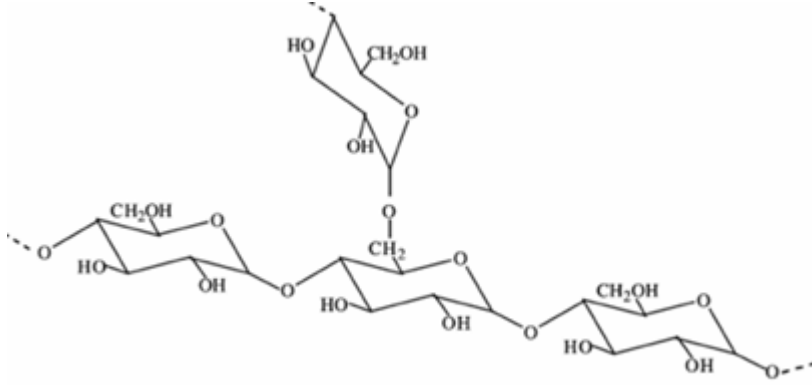
1.2.3.1.4 Nişasta: Nişasta daha çok patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasulye, buğday, pirinç gibi tahıllarda bulunmakla birlikte, bütün bitki hücreleri nişasta yapma yeteneğine sahiptirler.

Nişasta α -1,4 bağları içeren lineer glukoz polimeri olan amiloz, ve α -1,6 bağları ile α -1,4 glukoz kalıntılarının birbirine bağlandığı dallanmış yapıda polimer amilopektinden oluşmaktadır (28).

Amiloz, nişastanın lineer fraksiyonu olup α -(1,4) glikozid bağları ile bağlanmış durumda 1100 ile 4400 glukoz ünitesi içermektedir. Nişastanın dallanmış fraksiyonu olan amilopektin ise; α -(1,4) bağları yanında dallanma yerlerinde α (1,6) bağları da bulundurmaktadır. (29).

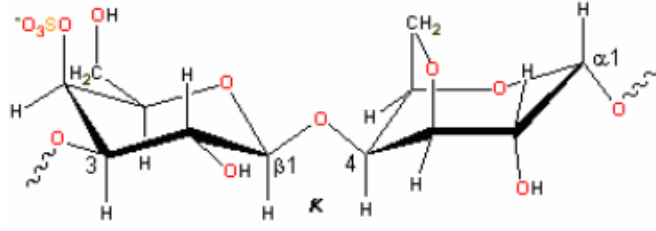


Şekil1.9: a) Amilozun açık formülü

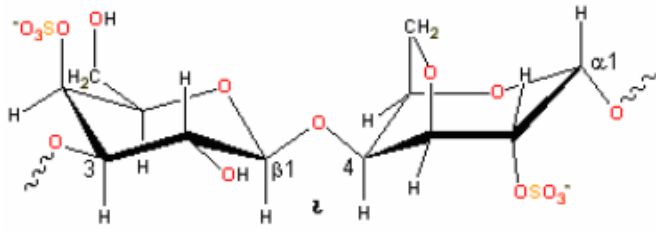


Şekil 1.9: b) Amilopektinin açık yapısı

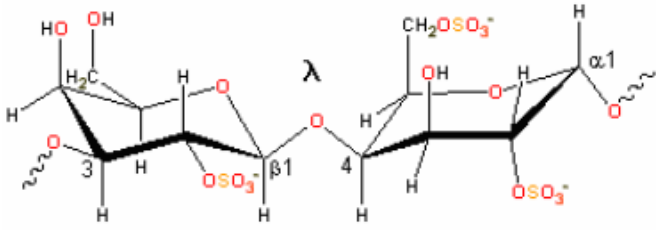
1.2.3.1.5 Karragenan: Deniz Kadayıfı, İrlanda Yosunu (Irish Moss) olarak adlandırılır. En yaygın *Chondrus crispus* ve *Gigartina mamillosa* adlı kırmızı alglerden elde edilen bir lineer polisakkarittir. Bu algler Kuzey İrlanda ve Amerika'nın Kuzey Doğu sahillerinde yetişir. Algler yaz veya sonbaharda su seviyesinin hemen altındaki kayalar üzerinden toplanır. Sahilde birkaç defa suyla yıkayıp, tekrar güneşte kurularak elde edilir. Beyazımsı, kırmızımsı veya sarımsı renkte, 5-15 cm uzunlukta parçalar halinde bulunur. Hafif kokulu ve tuzlu lezzettedir. Soğuk suda şişer. Soğuk suda % 47' si, sıcak suda % 75' i çözünür. % 5' lik çözeltisi suyu pelteleştirir. Karragenan 3 değişik formda bulunur. Bunlar *kappa* (k), *iota* (i) ve *lambda* (λ) karragenandır. k Karragenan en fazla bulunan ve kullanılan türüdür. En sık rastlanan k -karragenan (1,3)- β -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- α -D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşur. i -karragenan (1,3)- β -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- α -D-galaktopiranoz 2-sülfat birimlerinin ve λ -karragenan ise (1,3)- β -D-galaktopiranoz-2-sülfat-(1,4)- α -D-galaktopiranoz-2,6-disülfat birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmuştur (30).



κ-karragenan yapısı



ι-karragenan yapısı

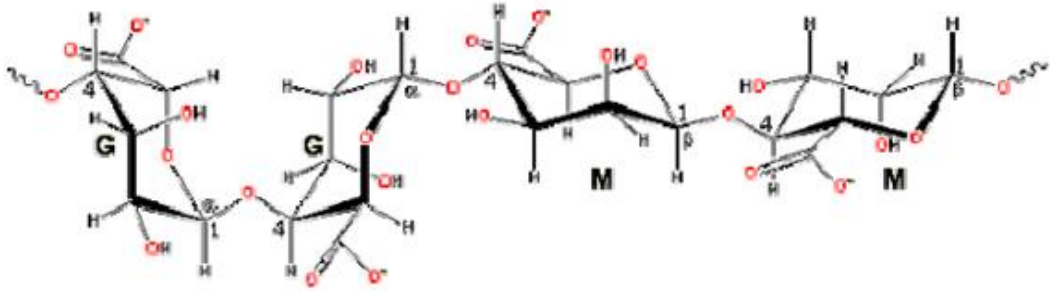


λ-karragenan yapısı

Şekil 1.10: Karregenanın açık yapıları

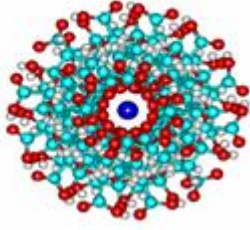
1.2.3.1.6 Alginat: Alginat özellikle Kuzey Atlantik kayalık kıyılarında çok yaygın bulunan kahverengi deniz alglerinin önemli bir polisakkarididir. 1,4 bağlı β-D- mannopiranozil üronat ve α-L-glunopranozil üronat ihtiva eder (31). Farklı seviyelerde de olsa, bütün Alginat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunur (32). Aljinatın yapısı ve molekül ağırlığı kullanılan algin cinsine, yaşına, bölümlerine ve aljinatın ekstraksiyon işlemlerine göre değişir (33). Açık denizlerde yaşayan *L. Hyperbore* alginin gövdesinde dokulara yüksek mekaniklik veren guluronik asit yüksek miktarda bulunurken aynı algin su yüzeyinde duran ince uzun yaprakları daha esnek bir yapı sağlayan düşük guluronik asit içeriği ile karakterize edilen aljinata sahiptir. Aljinat alglerde kalsiyum tuzu şeklinde bulunur. Ticari olarak piyasaya daha çok

sodyum aljinat formunda sunulmaktadır. Sodyum aljinat gıda endüstrisinde jel yapıcı, stabilizatör ve koyulaştırıcı madde olarak çok kullanılır. Ayrıca aljinat jeller protein, ilaç, hücrelerin salımı ve tutuklanması, doku ve organların onarımı için matris olarak da kullanılırlar. Aljinik asit, β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asidin 1,4 glikozit bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir kopolimerdir. Mannuronik asit-guluronik asit oranı türe, mevsime ve algin yetiştiği yere göre değişir. Aljinatlar β -1,4-D-mannuronik asit (M bloğu) ve α -1,4-L-guluronik asit (G bloğu) ve karışık bloklardan (MG) oluşur (34).



Şekil 1.11: Aljinatın tekrarlanan birimlerinin yapısı

Genelde G bloğu oranı yüksekse aljinatlar basınca daha dayanıklı fakat kırılğan jeller oluştururlar. G bloğu oranı düşükse aljinatlar basınca az dayanıklı ama esnek karakterde jeller oluştururlar. Aljinik asitin sodyum, potasyum, amonyum tuzları ve propilen glikol ester türevlerinin suda kolaylıkla çözünebilmesine karşı, aljinik asit ve kalsiyum tuzunun sudaki çözünürlüğü son derece sınırlıdır. Sodyum aljinat kokusuz, tatsız bir toz olup suda çözüldüğünde viskoz kolloidal bir çözelti oluşturur. Biyouyumluluğu, düşük toksisitesi, düşük maliyeti ve Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} gibi divalent katyonlar varlığında jelleşmesi bu polimerin uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Aljinat jel bilyeleri hazırlamada en çok kullanılan iki değerlikli metal kalsiyumdur. Aljinatın ucuz ve toksik etki göstermemesi, boncukların kolay bir şekilde hazırlanabilmeleri gibi avantajları vardır. Aljinat çözeltisinin ve CaCl_2 çözeltisinin konsantrasyonlarını artırmak daha sıkı çapraz bağlı jellerin oluşmasına neden olur. Fakat dikkat edilmesi gereken nokta yüksek konsantrasyonlu aljinat çözeltisiyle çalışmanın zorluğudur. Ca-aljinat jelleri oluşumunda α -L-guluronik asit (G) yapılarına bağlı kalsiyum iyonlarının bağlanmasıyla oluşur. Oluşum Yumurta- Kutu modeliyle şekil 1.12 de gösterilmektedir. Ca^{2+} iyonları ile aljinat zinciri iyonik çapraz bağ oluştururlar.



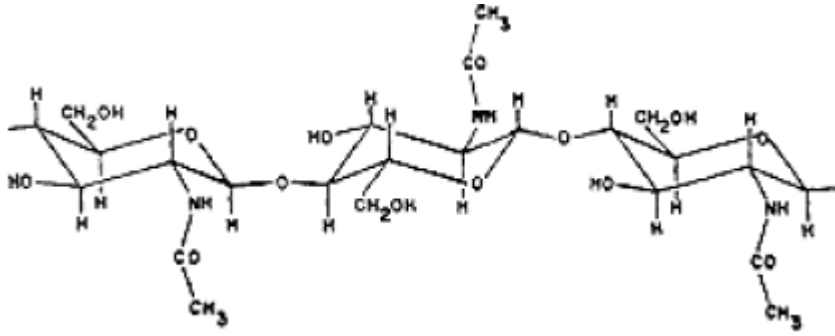
Şekil 1.12: Yumurta- kutu modeli

1.2.3.1.7 Agaroza: Agarın bileşimindeki 2 polisakkaritten birisi olup agarın jelleştirme özelliğini sağlar. Agaroza (1-4) bağlı 3,6-anhidro-a-L-galaktoz' a birer atlayarak bağlanan (1-3)-b-D-galaktoz' dan oluşur. Agaroza suda çözünür. Kendine has çok az kokusu vardır. Rengi beyaz, sarımsı tonlardadır. Agar büyük oranda Gelidium ve Gracilaria botanik türlerinden ekstrakte edilir. Agar; nötral "Agaroz" polisakkaridi ile, elektriksel yüklü polimer "Agaropektin" nin karışımıdır. Agar kaynayan suda çözünür ve soğutulduğunda 38-43° C arası jel oluşturur. 37° C de eriyen jelatin jellerinin aksine, 85° C veya üzerine kadar erimez. Gıda ürünlerindeki uygulamalarında, sıcak iklim koşullarında, düşük sıcaklıklarda muhafazası gibi bir sorun yaratmaz. Jel oluşturma sıcaklığı ile erime sıcaklığı arasındaki bu muazzam fark, agar' ı çoğu uygulama için benzersiz kılar. Birçok uygulamaları, bu tekil özellikten kaynaklanarak büyük avantaj sağlar (35).

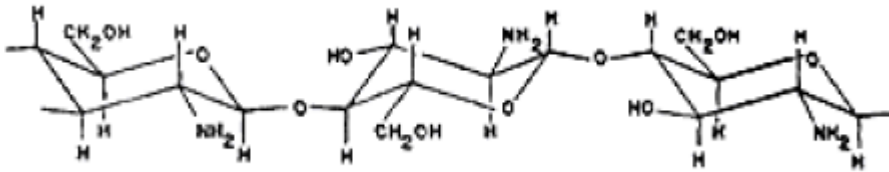
1.2.3.1.8 Kitosan: Doğal ve toksik olmayan bir biyopolimer olan kitin ve kitosan, başlıca yengeç ve karides kabuklarından elde edilmektedir. Bunun yanı sıra, böcek kabukları da kitin kaynağı açısından oldukça zengindir. Böcek kabuklarında yaklaşık % 23,5 oranında kitin bulunurken bu oran yengeç ve karideste sırasıyla % 17 ile % 32 arasındadır. Karides kitinlerinde % 6.29, yengeç kitinlerinde ise % 6.24 oranında azot bulunmaktadır. Kitosan, kitinin deasetillenmesi sonucu elde edilen bir polisakkariddir. Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunmaktadır. Dünyada yıllık kitin üretiminin yaklaşık 150x103 ton civarında olduğu belirtilmektedir. Bunun 56x103 tonu karidesten, 39x103 tonu çeşitli deniz kabuklularından, 32x103 tonu mantarlardan ve 22x103 tonu istiridyelerden elde edilmektedir (36). Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber en önemlisi kitosandır. Kitosan, ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından bulunmuştur. Bracannot, mantarlarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180° C'de işleme sokmuş (deasetilleme) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan "Kitosan"ı elde etmiştir. 1934 yılında kitosandan film üretimi

ve lif eldesi konusunda olmak üzere iki patent alınmıştır. Aynı yıl, Clark ve Smith tarafından çok iyi oryante olmuş kitosan lifi üretimi de başarı ile gerçekleştirilmiştir. Kitin ve kitosan hakkındaki ilk kapsamlı yayın, 1977 yılında Muzarelli tarafından yapılmıştır. Daha sonra bu konuda çeşitli uluslararası sempozyumlar ve araştırmalar ile devam eden incelemeler günümüze kadar gelmiştir. Bu çok yönlü materyallerin yeni uygulama alanlarını bulmaya ve uygulamaya yönelik akademik ve endüstriyel araştırmalar halen kapsamlı ve yoğun bir şekilde devam etmektedir (http://www.vanderbilt.edu/AnS/psychology/health_psychology/chitosan1.htm1; Guang Wu Yi, 2002; Dutta et al, 2002).

Kabuklu su ürünleri artıklarının başta kitin olmak üzere çeşitli ürünlerin eldesi şeklinde değerlendirilmesiyle hem ekonomik açıdan kazanç hem de çevre açısından oldukça büyük yarar sağlanmış olacaktır.



Şekil 1.13: a) Kitinin açık yapısı



Şekil 1.13: b) Kitosanın açık yapısı

Japonya ve ABD'de ticari olarak üretilmektedir. Flonac ticari adıyla yengeç kabuklarından üretilen kitosan polimerinin 2000 yılı üretimi 1250 ton/yıl dır. Kitosan birçok organik reaksiyon ile kolayca modifiye olabilir. Yapısındaki serbest amin grupları ve hidroksil gruplarından dolayı

fonksiyonel gruplu polimerlerin geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir. Yapısındaki amin gruplarından dolayı sulu asidik ortamda çözünür özelliğe sahiptir (37). Kitosanın uygulama alanları oldukça fazladır. Bunlar ilaç ve biyomedikal mühendisliği (yanık tedavisi, yumuşak ve sert kontak lensler), kağıt üretimi, kozmetik, gıda ve tekstil endüstrisi, atık su işlemleri gibi uygulama alanlarını kapsar.

1.2.3.1.8.1 Kitin ve Kitosanın Kimyasal Yapısı

Bir biyopolimer olan kitin esas olarak poli- $[\beta-(1,4)\text{-2-asetamid-2-deoksi-}\beta\text{-Dglukopiranoz}]$ yapısında olup çok düşük oranda 2-amino-2-deoksi- β -glukopiranoz monomerleri de bulunmaktadır. Kitosanın kimyasal yapısı, poli- $[\beta-(1,4)\text{-2-amino-2-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$ şeklindedir. Kitin ve kitosan birer polisakkarid olup kimyasal yapıları bakımından selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozdaki ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır. X-ray çalışmaları, kitinin son derece düzenli ve sıkı yapıda kristalin bölgeye sahip olduğunu göstermektedir. Alfa (α), beta (β) ve gama (γ) olmak üzere üç ayrı yapıda olan kitin, kristalin bölgelerinin diziliş şekline göre farklılık göstermektedir. α -kitinde zincirler zıt yönde, β -kitinde aynı yönde, γ -kitinde ikisi yukarı ve birisi aşağı şekilde dizilmişlerdir. Bunlardan en stabil yapıda olanı α -kitin olup, β ve γ kitin belirli işlem koşulları altında α -formuna dönüştürülebilmektedir. Bunlar arasında kitosanın konformasyonu, α -kitine benzemektedir. Genel olarak bakıldığında, yengeç, istakoz ve karides gibi deniz hayvanlarının kabuk kısmı % 30-40 protein, % 30-50 kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat ile % 20-30 kitinden oluşmaktadır. Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki protein bazı insanlarda alerjiye sebep olabilmektedir. Dolayısıyla, proteinin tamamen uzaklaştırılması özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanımı açısından son derece önemlidir. Bu amaçla, kitinin protein kompleksindeki kovalent bağlar koparılmakta ve yapılan işleme deproteinizasyon denilmektedir. Ancak kullanılan kimyasal maddelerin biyopolimeri de depolimerize etme tehlikesi nedeniyle işlem esnasında dikkatli olmak gerekmektedir.

Çizelge 1.4: Kitosanın teknik üretim koşulları (38)

Adım	Kimyasal madde	Sıcaklık	Süre
Deproteinizasyon	% 0.5-15 NaOH	25-100°C	0.5-72 saat
Deminerlizasyon	% 2-8 HCl	15-30°C	0.5-48 saat
Dekolorizasyon	Çeşitli organik çözgenler (NaOCl, H ₂ O ₂)	20-30°C	Yıkama, 60 dk
Deasetilleme	% 39-60 NaOH	60-150°C	0.5-144 saat

Deproteinizasyon için NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄ ve Na₂S gibi çeşitli kimyasal maddeler denenmiştir. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda en uygun olan maddenin NaOH olduğu görülmüştür. Bu amaçla deasetilasyon işleminde 1M NaOH çözeltisi kullanılmaktadır. NaOH, kitinin kısmen deasetillenmesine ve biyopolimerin hidrolize olması sonucu molekül ağırlığının azalmasına neden olmaktadır. İşlem herhangi bir sorun olmaksızın yerine getirildiği takdirde kitinin protein içeriği % 1 civarında kalmaktadır. Ayrıca, pepsin, papain, tripsin, ve proteaz gibi proteolitik enzimler de protein uzaklaştırma amacıyla kullanılmaktadır. Deproteinizasyon, aynı zamanda kitine belli bir kalite de kazandırmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken husus, kitinin kalitesinin elde edildiği hammaddeye bağlı olmasıdır. Tüm kabukların farklı yaştaki deniz hayvanlarından elde edilmesi durumunda bile farklı özelliklerde kitin elde edilmektedir. Yüksek saflıkta kitin eldesi, 12 N HCl asit içerisine konulan ve buz yardımıyla soğutulan kitin çözeltisinin kuvvetli bir şekilde karıştırılmasıyla elde edilebilmektedir. Ancak bu işlemin birkaç kez tekrarlanması gerekmektedir. Deproteinizasyon sonrası yapılan deasetilleme işlemi genellikle % 40-50'lik NaOH çözeltisi ile 100-160°C arasında birkaç saat işlem ve ardından soğutularak nötr pH'a kadar su ile durulanması şeklinde gerçekleşmektedir. Yapılan denemeler sonucunda, % 45 NaOH ile min. 30 dakika işlem sonrası yeterli deasetilleme derecesinin sağlandığı, daha kısa işlem sürelerinde ise yeterince deasetilleme elde edilemediği görülmüştür. Son olarak kitosan % 2'lik asetik asit çözeltisi ile ekstrakte edilip ardından filtre edilmekte, destile suda çöktürülüp kurutulmakta ve depolanmaktadır (Lim, S. Kitosan, yukarıda da bahsedildiği gibi 2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoz ve 2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukopiranoz monomerlerinden oluşan bir kopolimerdir. Yapısında yer alan glukozamin oranı asetilglukozamin oranından daha yüksek olduğunda suda çözünme oranı da artmaktadır. H. 2002; Fouda, 2005). Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona

uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir. Kitinin azot içeriği, deasetilleme derecesine göre % 5-8 (genellikle % 6.9) arasında değişmektedir. Azot içeriği selüloza göre yüksek olan kitin ve kitosan (selülozda azot miktarı % 1.25 civarında) özellikle atık sularda metal bağlayıcı (kelatlama maddesi) olarak büyük avantaj sağlamaktadır. Kitosan türevleri, ılıman koşullarda kolaylıkla elde edilebilmekte ve "süstitüe glukanlar" olarak adlandırılmaktadır. Kitosanda bulunan azot çoğunlukla primer alifatik amino grupları şeklindedir. Amin grubu içermesi nedeniyle N-alkilasyon, N-açılasyon ve Schiff baz gibi tipik amin reaksiyonlara maruz kalabilmektedir. Bu reaksiyonların en önemlileri N-açılleme ve Schiff baz reaksiyonlarıdır. Açılleme reaksiyonda, bir bileşiğe açıl (RCO-) grubu ilave edilmektedir. Schiff bazlar ise aril grubuna veya alkil grubuna bağlı azot ile karbon-azot çift bağı içeren kimyasal bileşik veya fonksiyonel gruplardır ($R_1R_2C=N-R_3$). Schiff bazlara, "substitüe iminler" adı da verilmektedir.

1.2.3.1.8.2 Kitosanın Belirleyici Özellikleri

Kitosanın özelliklerine etki eden parametreler; deasetilleme derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük ve rengi şeklinde sıralanabilmektedir.

1.2.3.1.8.2.a Deasetilleme Derecesi

Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. "Deasetilleme Derecesi (DD)" kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesidir. Böylece geride sadece amin grubu kalmaktadır. Kitosanın deasetilleme derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Kitinin belli derecede deasetillenmesi (% 60 ve üzeri) sonucunda "kitosan" elde edilmektedir (39). Deasetilleme derecesi, deniz kabuklularının cinsine ve üretim yöntemine göre % 56-99 arasında değişmektedir. Kitosanın kitine göre iki büyük avantajı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kitini çözmek için son derece toksik özellikteki lityum klorür ve dimetilasetamid gibi çözümler kullanılmasına karşın kitosanın seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesidir. İkinci avantajı ise birçok kimyasal reaksiyon için aktif kısım olan serbest amin gruplarına sahip olmasıdır. Deasetilleme derecesinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar ninhidrin testi, lineer potansiyometrik titrasyon, yakın-infrared spektroskopisi vb. şeklinde sıralanabilmektedir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılanı IR spektroskopisi olmasına karşın, IR spektroskopisi sonunda farklı baselinelerin ortaya çıkması nedeniyle yöntemler hakkında halen çeşitli tartışmalar söz konusudur.

1.2.3.1.8.2.b Molekül Ağırlığı

Kitosanın doğal ve sentetik polimerlere uygulamasında önemli olan diğer bir parametre de molekül ağırlığıdır. Kitin ve kitosanın molekül ağırlığı, elde edildiği kaynağa ve özellikle deasetilleme koşullarına (sıcaklık, zaman ve NaOH konsantrasyonu) bağlı olarak değişmektedir. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen, kitosanın parçalanmasına neden olmakta ve molekül ağırlığını düşürmektedir. Diğer yandan, çok yüksek sıcaklıklar da kitosanın molekül ağırlığına olumsuz etki etmektedir. Örneğin 280°C ve üzerindeki sıcaklıklarda kitosan parçalanmaya başlamakta, polimer zinciri kopmakta ve böylece molekül ağırlığı düşmektedir. Molekül ağırlığının belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar, jel permetasyon kromatografisi, ışık saçılma spektroskopisi ve viskozimetrik yöntemler şeklinde sıralanabilmektedir (40).

1.2.3.1.8.2.c Viskozite

Sıcaklık, viskozite, deasetilleme ve pH derecesi, gibi parametreler kitosanın özelliklerine etki etmektedir. Viskozite, demineralizasyon süresinin artması ile düşmektedir. Yaklaşık 4°C'de depolanan kitosan çözeltisinin viskozite açısından en iyi stabilite gösterdiği görülmüştür.

1.2.3.1.8.2.d Çözünürlük

Kitin birçok organik çözüngende çözünmezken, kitosan pH < 6 olan çözeltilerde kolayca çözünebilmektedir. Diğer yandan, inorganik asitler içerisinde de kitosanın çözünürlüğü oldukça düşüktür. Kitosanın çözünmesi amacıyla genellikle asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan çözüngen asetik asittir. Kitosanın çözünürlüğünü etkileyen birçok parametre bulunmaktadır. Bunlar sıcaklık, alkali konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü şeklinde sınıflandırılabilir. Yapılan araştırmalar iyi bir çözünürlük için en az % 75-80 deasetilleme derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir. Asidik ortamda NH₂ grubu -NH₃⁺ şeklinde bulunmakta ve ortamdaki anyonik gruplarla elektrostatik olarak etkileşime girmektedir. Protonlaşmış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstermekte, viskoz çözeltiler oluşturmakta ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. Kitosanın çözünürlüğü, kimyasal modifikasyonları, film veya lif oluşumu gibi kullanımları açısından da oldukça önemli bir parametredir. Kitin, çok miktardaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile yarı kristalin yapıda bir polimerdir. Bu nedenle seyreltik asitlerde ve birçok organik çözüngende çözünmemektedir. Katyonik yapısı kitosanın birçok uygulamasının da temelini oluşturmaktadır.

1.2.3.1.8.2.e Renk

Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki pigment, kitin ile kompleks oluşturmaktadır (4-keto ve 3,4,4'-diketo- β -keroten türevleri). Toz halindeki kitosan oldukça yumuşak olup rengi açık sarıdan beyaza kadar çeşitli tonlarda değişebilmektedir. Kitinden kitosan eldesi esnasında renk giderilmesi aseton ile ekstraksiyon ve ardından % 0.3 NaOCl ile oda sıcaklığında yapılan 5 dakika işlem sonunda gerçekleşmektedir. Çeşitli literatürlerde, renk giderme işlemi için alternatif olarak; $KMnO_4$, $NaHSO_3$, $Na_2S_2O_4$ veya H_2O_2 gibi kimyasalların da kullanılabilceği ifade edilmektedir.

1.2.3.1.8.3 Kitosanın Kullanım Alanları

Kitosan günümüzde tıptan gıdaya, ziraatten kozmetiğe, eczacılıktan atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilir. Kitosan çeşitli ülkelerde büyük ölçüde kullanılmasına karşın ülkemizde bu oran daha düşüktür. Tekstil sanayinde de birçok amaç için kullanılmaktadır. Bunlar arasında;

- Antimikrobiyal özellik kazandırması,
- Yünlü kumaşlarda çekmezlik sağlanması,
- Reaktif boyamada tuz miktarını azaltması,
- Pamuğun asit boyarmaddelerle boyanabilirlik kazanması,
- Antistatik özellik kazandırması,
- Deodorant maddesi olarak kullanılması,

sayılabilmektedir. Ayrıca, kitosan ile diğer liflerin karışımından üretilen çeşitli antimikrobiyal lifler de bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak, Crabyon (kitosan ve viskon karışımı, TEC SERVICE), chitopoly (kitosan ve polinozik lif karışımı (Fuji) verilebilmektedir.

Çizelge 1.5: Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları (41)

Uygulama Alanı	Spesifik Kullanımları
Su arıtımı	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon Atık sudaki metal iyonlarının uzaklaştırılması ve geri Kazanımı
Ziraat	Bitki katkı maddesi, Antimikrobiyal madde Bitki tohumu kaplanması, Gübre yapımı Insektisid ve nematositlerde
Biyoteknoloji	Kromatografik yöntemlerde Enzim immobilizasyonunda
Gıda	Doğal kıvamlaştırıcı Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi, Yiyecek işlemede (örneğin şeker işleme) Filtreleme ve temizleme, Hipokolestrolemik madde, Atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi
Kozmetik	Saç şekillendirici yapımı, Cilt nemlendirmede (nemlendirici kremlerde), Antikolestrol ve yağ bağlayıcı olarak zayıflama maddesi, Aftershave, deodorantlarda koku giderici madde
Medikal Alan	Hayvan ve insanlar için yara bandı yapımında Sargı bezi yapımında ve yara tedavisinde (yara tedavisini% 30 oranında hızlandırmaktadır.), Yanık tedavisinde acıyı dindirme ve iyileştirme etkisi, Kanı pıhtılaştırıcı madde Hidrojel yapımı, Antikoagülant ve antitrombojenik materyaller, (sülfatlanmış-kitin türevleri olarak Hemostatik madde, Kontakt lens yapımı, İlaç salımı

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasallar α -amilaz (α - amylase from *Aspergillus oryzae* 1,4- α -D-Glucan-glucanohydrolase, powder, ~30 U/mg), nişasta, maltoz, hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit (H₂SO₄), 3,5-dinitro salisilik asit (DNS), sığır serum albumin (BSA), glisin (C₂H₅NO₂), glutaraldehit (GLA), o-fosforik asit (o-H₃PO₄), FeCl₂.H₂O, FeCl₃. H₂O, kitosan (CT), coomassie brilliant blue G-250, nanokil (hidrofilik bentonit), etanol (% 99), sodyum fosfat pentabazik (TPP), Tris (hidroksimetil) aminometan (Sigma-Aldrich, ABD); sodyum asetat (CH₃COONa), asetik asit (CH₃COOH), dihidrojenfosfat (KH₂PO₄), dipotasyum hidrojenfosfat (K₂HPO₄), borat, PEG, sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya).

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer spectrum BX), UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer), pH metre (Inolab WTW series), inkübatör (GFL), Magnetic Susceptibility Balance (Sherwood Scientific) kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) analizleri hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik safliktadır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması

Maltoz standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,1-0,4 mM aralığında bir seri maltoz standart çözeltisi distile su içerisinde hazırlanmış olan 1 mM stok maltoz çözeltisinden yola çıkılarak hazırlandı. Denemelerde kullanılacak olan DNS Reaktifi, 1 g 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), 20 ml 2 N NaOH içerisinde çözülür. Üzerine 50 ml distile suda çözülmüş olan 30 g Na.K tartarat eklenip son hacim 100 ml' ye ile tamamlanır.

Çizelge 2.1: Maltoz standart eğrisinin oluşturulması

V (ml)	Kör	I	II	III	IV
Dist. Su	1,00	0,90	0,80	0,70	0,60
Maltoz Std.(1mM)	-	0,10	0,20	0,30	0,40
DNS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Karıştırılır, kaynar su banyosunda 10 dk. tutulur,soğutulur.					
Dist. Su	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Karıştırılır, köre karşı 540 nm de abs. okunur.					

540 nm'de alınan absorbans değerleri ile maltoz konsantrasyonları arasında standart grafiği çizilir. α -Amilaz aktivitesinin tayininde enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan maltoz miktarı, çizilen standart grafiği kullanılarak bulunur.

2.2.2 α -Amilaz Aktivite Tayini

Bu çalışmada serbest ve immobilize enzim aktivite tayini nişastanın hidrolizi ile açığa çıkan indirgen grupların 3,5-Dinitrosalisilik asit ile belirlenmesi yöntemine dayanan Bernfeld metodu (42) ile yapıldı. α - Amilaz aktivitesi enzimin substratı olan nişasta kullanılarak tayin edildi. Reaksiyon sonrasında enzimatik hidroliz sonrasında açığa çıkan maltozun 540 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Bir ünite, 25 °C'de dakikada 1.0 μ mol indirgen şeker üretmek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 2.2: Aktivite tayini

	Kör	Örnek
Saf Su	500 µl	480 µl
Substrat (Nişasta %1 (w/v))	500 µl	500 µl
Serbest enzim / İmmobilize α-amilaz		20 µl / 50 mg boncuk
İnkübasyon (37° C de 5 dak)		
DNS	1000 µl	1000 µl
10 dak. kaynar su banyosunda bekleldikten sonra soğutulur		
Saf Su	10 ml	10 ml
540 nm' de ölçüm alınır		

540 nm' de ölçüm alındıktan sonra, standart grafiğinden absorbans değerlerine karşı gelen konsantrasyon değeri bulunur ve aktivite hesaplamaları yapılır.

2.2.3 Protein Tayini

Protein miktarlarının tayini Bradford (43) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bradford tarafından geliştirilen bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır.

Bradford reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml %95' lik etanolde çözüldü. Çözeltiye 55 ml % 88' lik fosforik asit eklendi ve hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

Standart protein eğrisi; sığır serum albüminin (BSA) distile su ile 1 mg/ml' lik çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden 0,02-0,15 mg/ml konsantrasyonları hazırlanır. Hazırlanan protein standart çözeltilerinden 0,1 ml alınır ve üzerlerine 2 ml Bradford reaktifi eklenir. Oda sıcaklığında 10 dakika beklenir. 595 nm' de spektrofotometrik ölçümü alınır. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyona karşılık grafiğe geçirilir böylece standart protein eğrisi elde edilmiş olur.

2.2.4 İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliğinin Hesaplanması

İmmobilizasyon verim aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\% \text{ IY} = \frac{U_{akt}}{U_{total} - U_{kalan}} \times 100 \quad (1)$$

U_{akt} : İmmobilize enzimin spesifik aktivitesi

U_{total} : Serbest enzimin spesifik aktivitesi

U_{kalan} : Filtratta bulunan enzim spesifik aktivitesi

Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarı, total protein miktarından bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak % yükleme etkinliği hesaplandı.

$$\% \text{ Yükleme etkinliği} = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100 \quad (2)$$

C_i : Serbest enzimin protein miktarı

V_i : Ortama konan enzim çözeltisinin hacmi

C_f : Filtratta bulunan protein miktarı

V_f : Filtrat hacmi

2.2.5 Kompozit Boncuklarının Hazırlanması

2.2.5.1 Nanokilin Aktivasyonu

Nanokilin aktivasyonu için 50 g nanokil, 1 M H_2SO_4 ile 80° C' de 2 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Ardından ortam pH' ı nötral olana kadar bol su ile yıkandı ve etüvde kurutuldu (57).

2.2.5.2 Kitosan-Nanokil Kompozit Boncuklarının Hazırlanması

2,5 g kitosan, % 2' lik 100 ml asetik asit çözeltisi içinde çözülerek % 2,5 (w/v)'luk kitosan çözeltisi elde edildi. Hazırlanan kitosan çözeltisi içerisine 2,5 g aktive edilmiş kil eklendi ve hazırlanan süspansiyon, soğuk TPP (pH 8.2) çözeltisi içine ucu kesilmiş bir iğne yardımıyla

damlatıldı, sertleşmesi için soğukta 4 saat karıştırılarak bekletildi (47). Sertleşen boncuklar süzülerek bol saf su ile yıkandı ve daha sonra kullanılmak üzere + 4° C' de depolandı.

2.2.5.3 Fe₃O₄ (Manyetit) Hazırlanması

Fe₃O₄ nanopartikülleri Z. Yuanbi ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (45) göre sentezlendi. FeCl₂.4H₂O:FeCl₃6H₂O 2:3 (mol:mol) oranında tartıldı ve ayrıca 1 g PEG 4000 eklenerek 100 ml deiyonize suda karıştırıldı. Daha sonra ortamın pH'ı 11 olacak şekilde sulu amonyak (0,3 mol/L) ile ayarlandı. Fe₃O₄ oluşumundan dolayı çözeltinin renginin siyah olduğu gözlemlendi. Ortamın pH'ı nötr olana kadar saf su ile yıkama yapıldı. Fe₃O₄ nanopartikülleri süzgeç kağıdıyla süzülerek kurutuldu. Elde edilen Fe₃O₄ partiküllerinin manyetik duyarlılığı Magnetic Susceptibility (Sherwood Scientific) cihazıyla ölçüldü. Fe₃O₄ için manyetik alan hesaplamaları sonucu manyetik duyarlılık ölçümü (μ) 5,5 B.M bulundu.

2.2.5.4 Kitosan- Fe₃O₄ Kompozit Boncuklarının Hazırlanması

2,5 g kitosan %2' lik 100 ml asetik asit çözeltisi içinde çözüldü. Üzerine 1 g Fe₃O₄ nanopartikülleri eklendi. Hazırlanan Fe₃O₄ kitosan süspansiyonu soğuk TPP (pH 8.2) çözeltisi içine ucu kesilmiş iğne yardımı ile damlatıldı, sertleşmesi için soğukta 4 saat karıştırılarak bekletildi. Sertleşen boncuklar süzülerek bol su ile yıkandı ve daha sonra kullanılmak üzere + 4° C' de depolandı.

2.2.6 Kitosan-Nanokil ve Kitosan- Fe₃O₄ Kompozit Boncukların Glutaraldehit ile Çapraz Bağlanması

Yapılan aktivite ve protein tayinleri sonrasında optimum glutaraldehit ile optimum çapraz bağlama süresi belirlendi

2.2.6.1 Glutaraldehit ile Çapraz Bağlama Süresinin Etkisi

Optimum GLA inkübasyon süresini belirlemek için boncuklar (0,05 g) 30-60-90-120-240 dakika ve 24 saat süreyle % 1 (v/v)' lik glutaraldehit çözeltisiyle çapraz bağlandı. 1 mg/ml konsantrasyonunda 2 ml α -amilaz enzim çözeltisi eklenerek, belirlenen sürelerde inkübe edildi.

540 nm' deki aktivite ölçümleri sonucunda süreye karşılık % aktivite grafiği çizilerek optimum inkübasyon süresi belirlendi.

2.2.6.2 Glutaraldehit Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum glutaraldehit konsantrasyonunu belirlemek için, glutaraldehitin % 0,5- 5 arasında değişen konsantrasyonlarında çapraz bağlama yapıldı. 1 mg/ml konsantrasyonunda 2 ml enzim çözeltisi ilave edilerek 1 saat inkübe edildi. 540 nm' deki aktivite ölçümlerin sonucunda immobilize enzim aktiviteleri ölçülerek konsantrasyona karşılık % aktivite grafiği çizildi. Çizilen grafikten optimum immobilizasyon süresi belirlendi.

2.2.7 İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çapraz bağlı boncuklar üzerine enzimin optimum bağlanma süresinin belirlenmesi amacıyla, 30-360 dakika arasında değişen sürelerde 1 mg/ml konsantrasyonunda 2 ml enzim çözeltisi boncuklarla inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda immobilize enzim aktiviteleri ölçülerek süreye karşılık % aktivite grafiği çizildi. Çizilen grafikten optimum immobilizasyon süresi belirlendi.

2.2.8 α -Amilaz Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum enzim konsantrasyonunu belirlemek için α -amilazın 0,5- 5 mg/ ml arasında değişen konsantrasyonlarda 2 ml α -amilaz enzim çözeltisi kullanıldı. Optimize edilen immobilizasyon sürelerinin sonunda 540 nm' de aktivite ölçümleri ve protein tayinleri yapıldı ve konsantrasyona karşılık % aktivite grafiği çizilerek optimum konsantrasyon belirlendi.

2.2.9 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

Kimyasal Karakterizasyon

2.2.9.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık, enzimlerin katalitik aktivitesi için önemli parametrelerden biridir. Belirli sıcaklık limitlerinin üzerindeki değerlerde enzim proteinin denaturasyonundan dolayı aktivitede azalma gözlenir. Bu nedenle immobilizasyonun sebep olduğuna sıcaklığa bağımlılık çalışmaları enzimler ve kimyasal katalizörlerin kıyaslanmasında faydalı bilgiler verebilir (23).

Serbest ve immobilize α -amilazın aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacı ile aktivite ölçümleri 4-80 ° C sıcaklık aralığında 540 nm' de ölçümler alındı. Sıcaklığa karşılık % aktivite grafiği çizilerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

2.2.9.2 Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Enzimler proteinlerden oluştuğu için katalitik aktivite dikkate değer bir şekilde ortam koşullarından, özellikle de sulu ortamın pH'sından etkilenir. İnkübasyon ortamının pH'sı protein molekülünün tamamının yük ve dissosiasyon durumu yanında aktif merkezini de etkilemektedir (46).

Optimum pH tespiti için pH 3.8 – 5.0 aralığında 0,05 M asetik asit-sodyum asetat, 6.0 – 7.0 aralığında 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, 8.0' da 0,05 M Tris-HCl, 9.0 – 10.0 aralığında ise 0,05 M glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Optimum koşullarda 540 nm' deki aktivite ölçümleri sonucu pH değerlerine karşılık % aktivite grafiği çizilerek optimum pH değerleri bulundu.

2.2.10 Kararlılık Testleri

Enzim immobilizasyonunun en büyük amaçlarından biri enzimin kararlılığının gerek medikal gerekse endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirlik etkinliğinin artırılmasıdır (46). İmmobilize enzimin stabilitesinden anlaşılan, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Bu sıradaki enzim aktivite kaybı değişik nedenlere dayanır (pH veya kimyasal inaktivasyon vb.) Bunun dışında taşıyıcının parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzim kaçıışı da aktivite kaybına neden olur (22).

2.2.10.1 Termal Kararlılık

Enzimler protein yapısında oldukları ve ısıya karşı kararlı olmadıklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybı hızlanır (46). İmmobilize boncukların ve serbest enzimin termal kararlılığı, immobilize ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda (4–25-37-50-60-70-80° C 1 saat inkübe edildikten sonra optimum koşullarda kalan aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlendi.

2.2.10.2 pH Kararlılığı

İmmobilize boncukların serbest enzimin pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla immobilize boncuklar ve serbest enzim pH aralığı 3.8-10.0 arasında değişen tamponlarda 1 saat bekletildikten sonra optimum koşullarda kalan aktivite ölçümleri yapıldı.

2.2.10.3 Depo Kararlılığı

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna bağlı olarak da aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Bu değişimin sebebi ortamın sıcaklığı, iyon şiddeti ve pH gibi faktörlerdir. İmmobilizasyon işlemiyle enzimlerin depolama kararlılıkları artar (47).

Depo kararlılığını belirlemek için serbest enzim ve immobilize enzim –18,+4 ve 25° C’de depolandı ve 16 hafta boyunca belirli zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapıldı.

2.2.11 Kinetik Parametreler

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik etkiler, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri, immobilize enzimlerin serbest enzimden farklı kinetik davranışlar göstermesine neden olurlar. O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerinin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir (46).

Serbest enzim ve kitosan-kil, kitosan-Fe₃O₄ immobilize enzimin Michealis- Menten (K_m) sabitini ve maksimum reaksiyon hızını (V_{max}) hesaplamak için nişastanın farklı konsantrasyonlarında aktive ölçümü yapıldı. Lineweaver- Burk (1/V- 1/ S) grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

2.2.12 İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize α -amilaz'ın tekrar kullanılabilirlik denemeleri 37° C'de optimum koşullarda gerçekteştirildi. Karşım 5 dakika inkübatörde bekletildikten sonra immobilize enzim ortamdan ayrıldı ve indirgen şeker tayini yapıldı. İmmobilize enzim içeren boncuklar 0,05 M pH 7.0 fosfat tamponuyla yıkandı ve aktivite ölçüm prosedürü tekrarlandı.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

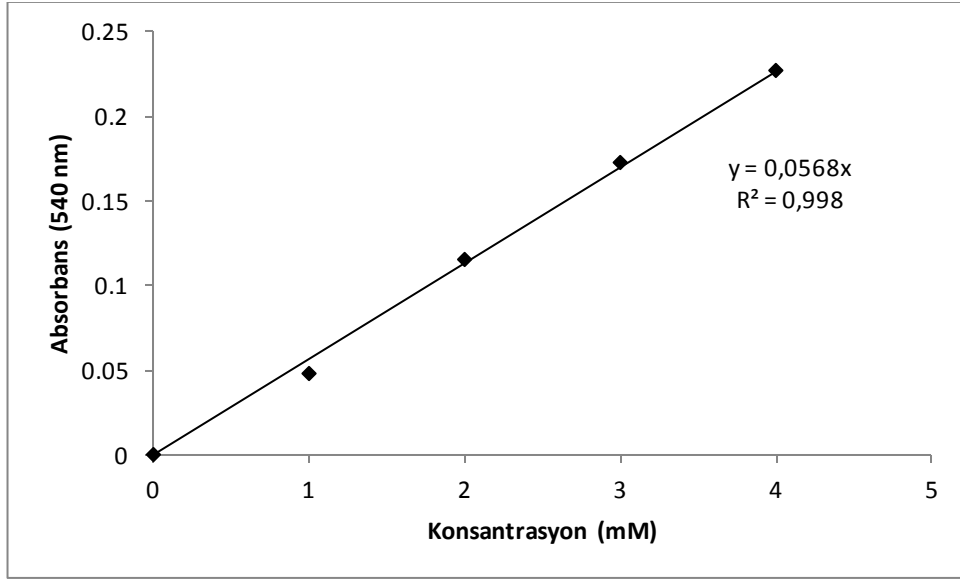
Bir canlı hücreden enzim izolasyonu ve saflaştırılması oldukça pahalı süreçlerle yapılmaktadır. Bu nedenle enzimler genellikle pahalıdır ve endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılmaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler ise serbest enzim tarafından kirlenen reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru olarak eklenir. Reaksiyon ortamındaki bu kirlilik unsurlarının uzaklaştırılmaya çalışılması maliyeti artırmaktadır. Bunun yanı sıra serbest enzimler sürekli üretim işlemlerinde de tercih edilmezler. Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması nedeniyle, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (48).

3.1 Aktivite ve Protein Standart Grafikleri

Maltoz standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,1-0,4 mM aralığında bir seri maltoz standart çözeltisi distile su içerisinde hazırlanmış olan 1 mM stok maltoz çözeltisinden yola çıkılarak hazırlandı.

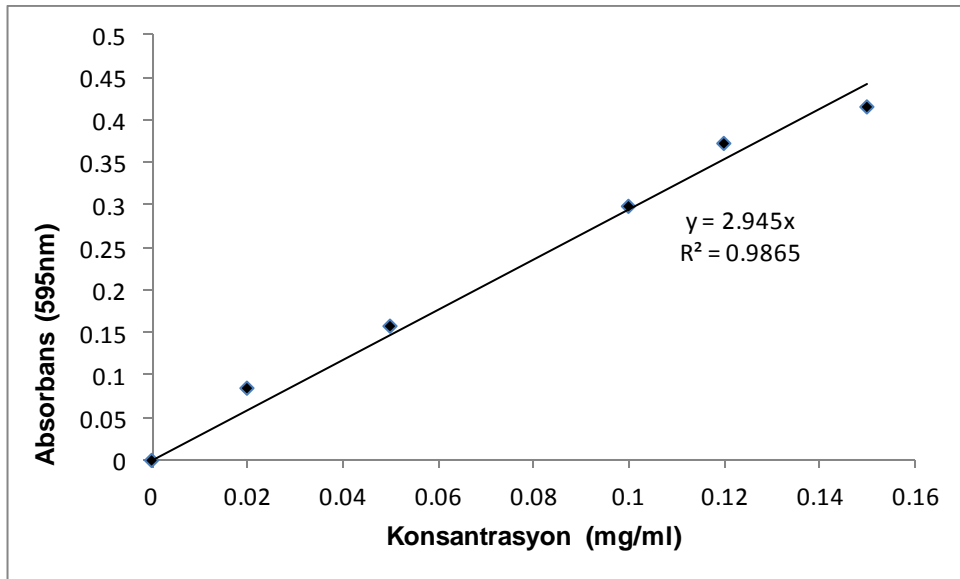
Bu çalışmada serbest ve immobilize enzim aktivite tayini nişastanın hidrolizi ile açığa çıkan indirgen grupların 3,5-Dinitrosalisilik asit ile belirlenmesi yöntemine dayanan Bernfeld metodu (42) ile yapıldı. α - Amilaz aktivitesi enzimin substratı olan nişasta kullanılarak tayin edildi. Reaksiyon sonrasında enzimatik hidroliz sonrasında açığa çıkan maltozun 540 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

3.1.1 Maltoz Standart Eğrisinin Oluşturulması



Şekil 3.1: Maltoz standart eğrisi

3.1.2 Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması



Şekil 3.2: Protein standart grafiği

3.2 İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

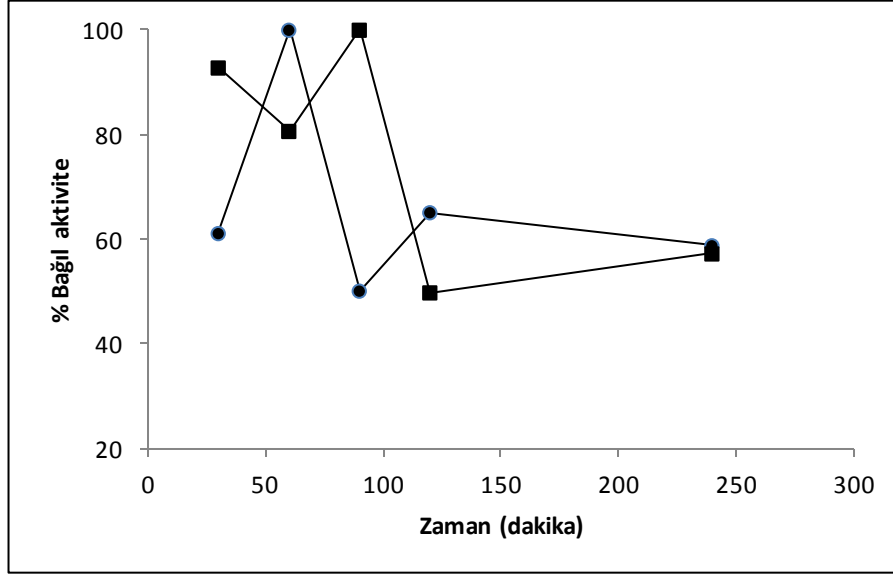
Glutaraldehit ile çapraz bağlama süresi, glutaraldehit konsantrasyonu, α -amilaz enziminin immobilizasyon süresi, enzim konsantrasyonu ve sıcaklık ile pH'ın etkisi immobilizasyon koşullarının optimizasyonunda incelendi.

3.2.1 Glutaraldehitin α -Amilaz Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

Biyolojik olarak aktif moleküllerin taşıyıcıya bağlanmasında ilk adım kimyasal olarak inert taşıyıcının aktivasyonudur. İkinci adım ise aktive edilen taşıyıcıya ligandın bağlanmasıdır. α -amilaz enziminin immobilize edilmesi için ilk önce taşıyıcıların amino gruplarının glutaraldehit ile aktive edilmesi gerekmektedir (17). Glutaraldehit çok reaktif bir maddedir ve artan konsantrasyonlardaki kullanımı matrislerin iç yapılarında farklılıklara neden olabilir (50).

3.2.1.1 Glutaraldehit ile Çapraz Bağlama Süresinin İmmobilizasyon Üzerine Etkisi

Glutaraldehit ile çapraz bağlama süresinin immobilizasyon üzerine etkisi incelenmesi amacıyla, her iki taşıyıcının sabit miktarları üzerine % 1 (v/v) konsantrasyonunda glutaraldehit çözeltisi eklendi. Farklı sürelerde (30-60-90-120-180-240 dak, 24 saat) glutaraldehit ile çapraz bağlanmış boncuklar üzerine 1 mg/ml olacak şekilde α -amilaz enzimi immobilize edildi. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda glutaraldehit ile optimum çapraz bağlama süresi, kitosan-kil kompozit boncukları için 60 dakika, kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukları için bu süre 90 dakika olarak belirlendi (şekil 3.3).

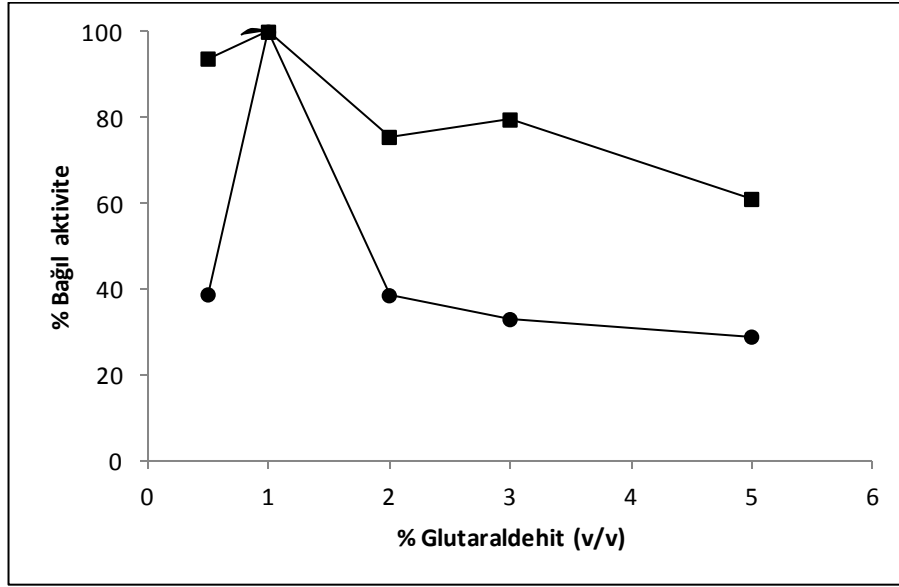


Şekil 3.3: Glutaraldehit ile çapraz bağlama süresinin belirlenmesi

kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz(●),kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (■) ,50 mg immobilize enzim.

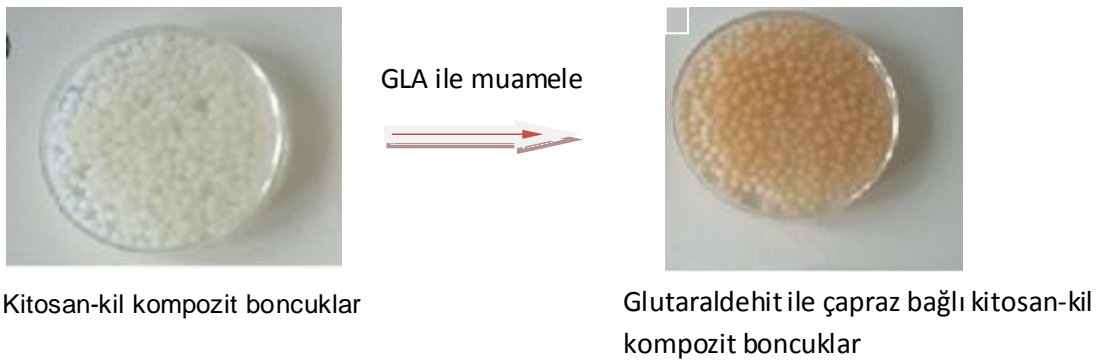
3.2.1.2 Glutaraldehit Konsantrasyonunun İmmobilizasyon Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Glutaraldehidin farklı konsantrasyonlarıyla çapraz bağlanmış kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş enzim aktivitelerindeki değişim şekil 3.20' de görülmektedir. Kitosan- kil ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar % 0.5-% 5 arasında değişen oranlarda glutaraldehit ile çapraz bağlandı. Enzim immobilizasyonu gerçekleştikten sonra hesaplanan % bağıl aktivitelere göre optimum glutaraldehit konsantrasyonları belirlendi. Buna göre her iki kompozit taşıyıcı için %1 glutaraldehit konsantrasyonu en iyi sonucu verdi (Şekil 3.4).

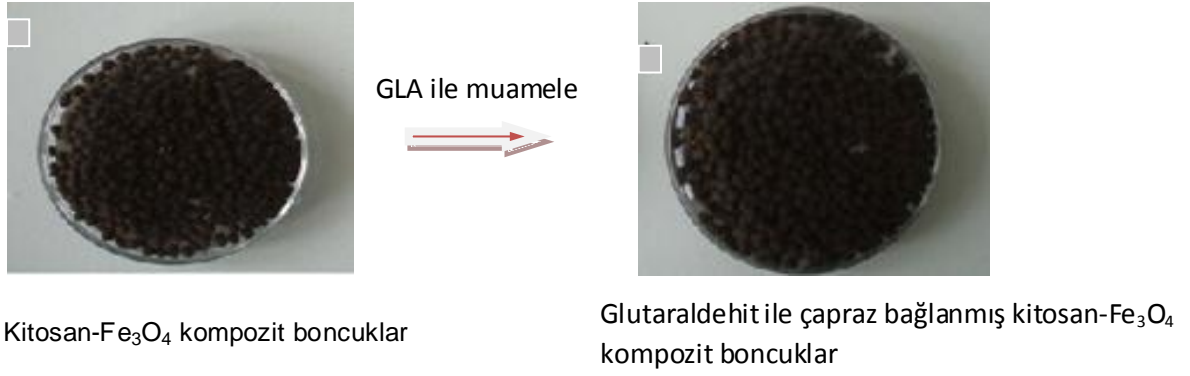


Şekil 3.4: Glutaraldehit konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (●), kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (■), 50 mg immobilize enzim.



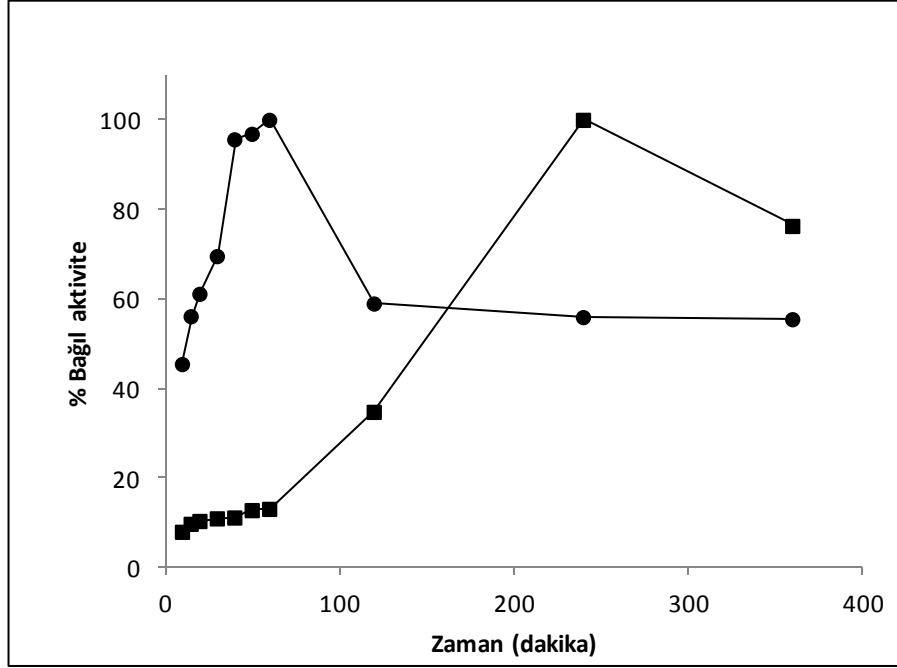
Şekil 3.5: Kitosan-kil kompozit boncukların GLA ile çapraz bağlanması sonucu boncuklarda gözlenen değişiklik
Kitosan-kil kompozit boncuklar GLA ile bağlanınca renginde sararma ve boyutunda küçülme gözlemlendi.



Şekil 3.6: Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların GLA ile çapraz bağlanması sonucu kompozit boncuklarda gözlenen değişiklik
Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar GLA ile muamele edilince boyutları küçüldü; kitosan Fe₃O₄ in engellemesinden dolayı sarı rengin gözlenmesi baskılanmıştır.

3.2.2 İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

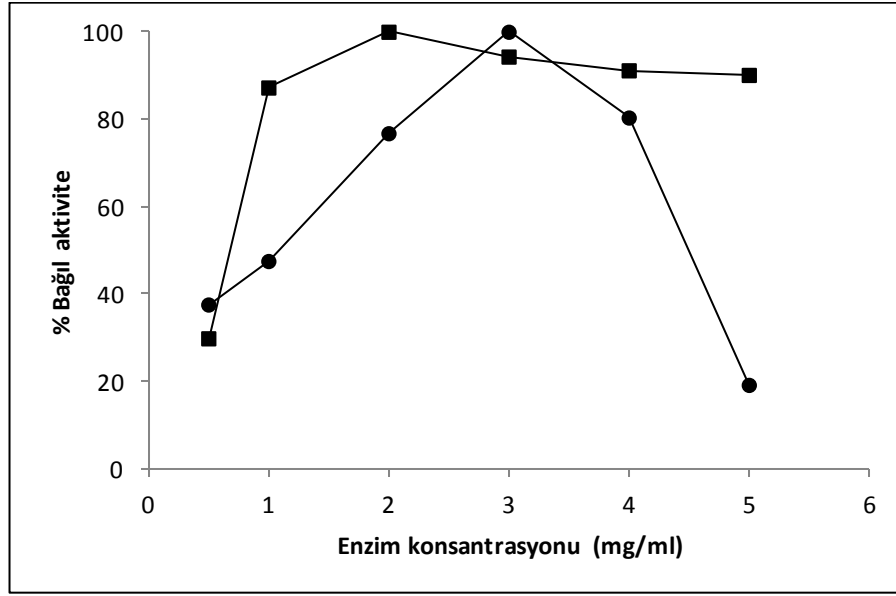
İmmobilizasyon süresinin etkisini belirlemek için 1 mg/ml α -amilaz enzim çözeltisi 30-360 dakika arasında değişen sürelerde % 1 glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan-kil ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklarıyla muamele edildi. % Bağlı aktiviteleri hesaplandıktan sonra çizilen grafikte görüldüğü üzere optimum immobilizasyon süresi kitosan- kil kompozit boncuklar için 1 saat, kitosan- Fe₃O₄ için 4 saat olarak belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi
 Kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (●), kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (■), 50 mg immobilize enzim.

3.2.3 α -Amilaz Konsantrasyonunun Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

Kitosan- kil ve kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncukları (50 mg) farklı konsantrasyonlarda (0.5- 3 mg/ml) α -amilaz ile immobilize edildi. % Bağlı aktivite hesaplarından sonra kitosan-kil için 3 mg/ml, kitosan- Fe_3O_4 için 2 mg/ml konsantrasyonlarında optimum sonucu verdi (şekil 3.8).



Şekil 3.8: Enzim immobilizasyonu için optimum α -Amilaz konsantrasyonunun belirlenmesi

- kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz, ■ kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz, 50 mg immobilize enzim.

3.3 Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi

İmmobilizasyon çalışmaları sırasında kitosan- kil ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine bağlanan protein miktarını saptamak için serbest enzim, filtrat ve yıkama sularında protein tayini yapıldı. Şekil 3.18' daki Bradford standart grafiği kullanılarak her iki taşıyıcı içinde yükleme etkinliği hesaplandı.

Çizelge 3.1: Kitosan-kil ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş α-amilazda % verim ve % yükleme etkinliği

	Verim (%)	Yükleme Etkinliği (%)
Kitosan-kil kompozit boncuk	55,59 (334,2 U/g)	21
Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk	31,58 (657,5U/g)	56,72

Kitosan-kil kompozit boncuk için protein miktarı 0,117 mg , serbest enzim aktivitesi 1024 U/g (6 mg enzim) ,kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk için 0,044 mg, serbest enzim aktivitesi 964 U/g (4 mg enzim) bulundu.

3.4 Serbest ve İmmobilize α-Amilazın Optimum pH' larının Belirlenmesi

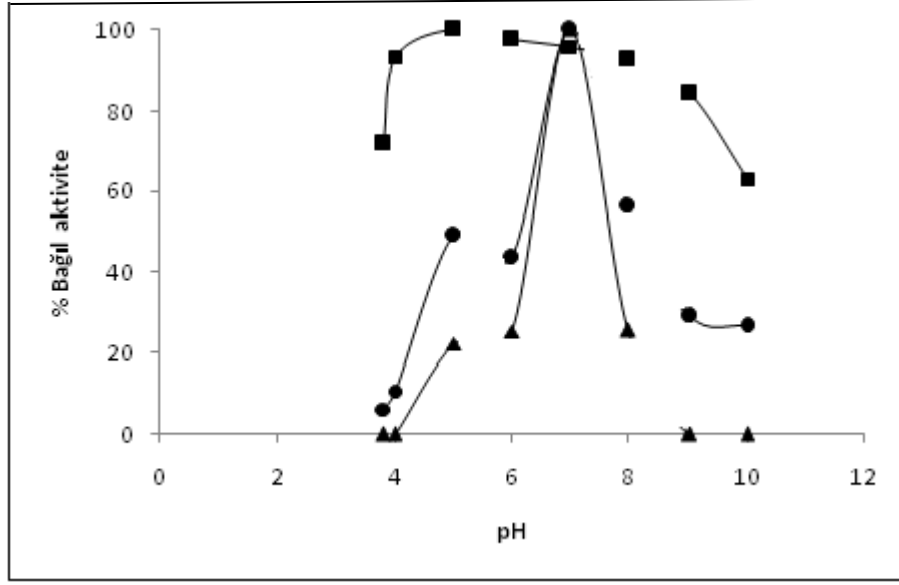
Serbest ve immobilize α-amilaz enziminin optimum pH' nı belirlemek için farklı pH aralıklarında hazırlanan tamponlar kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Bu sonuçlara göre serbest enzim ve kitosan-kil için en iyi pH 7.0 olarak, kitosan- Fe₃O₄ içinse pH 5.0' de en yüksek aktivitelerini gösterdiği belirlendi.

Şener çalışmalarında optimum pH' ı serbest α-amilaz ve immobilize α-amilaz enzimi için pH 7.0 bulmuştur.

Uygun çalışmalarında pH çalışmalarını 3.0 ile 9.0 arasında yapmıştır. Optimum pH serbest α-amilaz enzim için 6.0 , immobilize α-amilaz enzimi için 7.0 için bulmuştur.

Kitosan-kil kompozit boncuklar için optimum pH tek bir nokta olarak görülmektedir. Oysa kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklarda ise en yüksek aktivite pH 5.0' da görülmesiyle birlikte pH 4.0 ile 9.0 arandaki değerlerde de yüksek aktivite göstermektedir.

Bilindiği gibi poliyonik matriksler optimum pH değerlerinde bir kaymaya yol açan enzim mikroçevresi ile yığın fazı arasında proton dağılımına neden olur (51). α-amilazın immobilizasyonu sonucu asidik bölgeye doğru 2.0 birimlik bir kayma meydana gelmiştir. Bu kayma matriksin yüküne bağlıdır ve bu çalışmadaki asidik bölgeye kayma Fe₃O₄ matriksinin polikatyonik karakterinden kaynaklanmaktadır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Serbest ve İmmobilize α-Amilazın Optimum pH' larının Belirlenmesi

Kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α-amilaz (●), kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α-amilaz (■), 50 mg immobilize enzim.

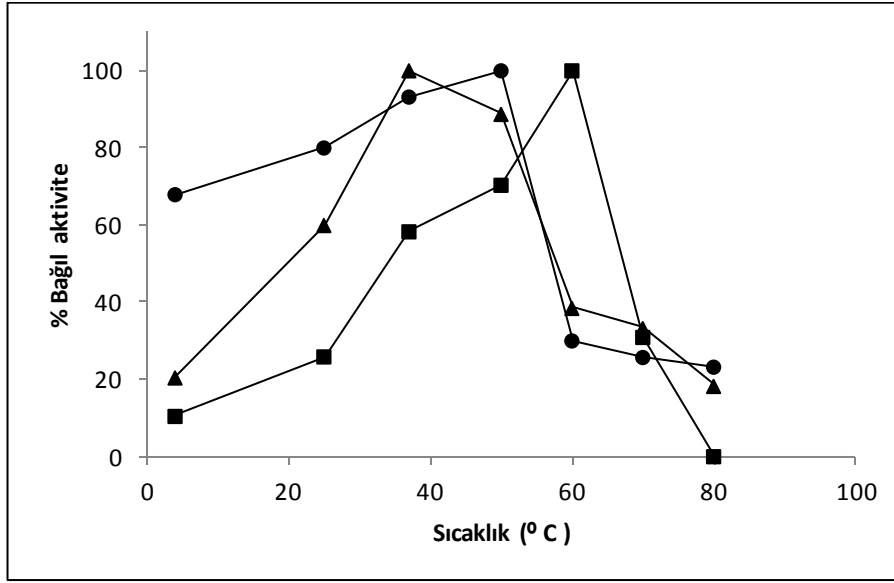
3.5 Serbest ve İmmobilize α-Amilazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize α-amilazın optimum sıcaklığını belirlemede farklı sıcaklık değerlerinde (4-80° C) aktivite ölçümleri yapılmıştır. Hesaplanan aktivite ölçümlerine göre optimum sıcaklık değerleri serbest enzim için 37° C, kitosan-kil kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen α-amilaz için 50° C ve kitosan- Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen α-amilaz için 60° C olarak belirlendi. α-amilazın optimum sıcaklığı immobilizasyon ile değiştiği görüldü (Şekil 3.10).

Şener optimum sıcaklık çalışmasında serbest α-amilaz için 60° , immobilize α-amilaz için 80° C bulmuştur.

Uygun çalışmalarında serbest ve immobilize enzim için 4-75 °C arasında çalışmıştır. Hem serbest hemde immobilize α-amilaz enzimi için optimum sıcaklığı 60° C bulmuştur.

Bu sonuçlar immobilizasyonun enzim kararlılığını sıcaklık değişimlerine karşı arttırdığını göstermektedir (49).



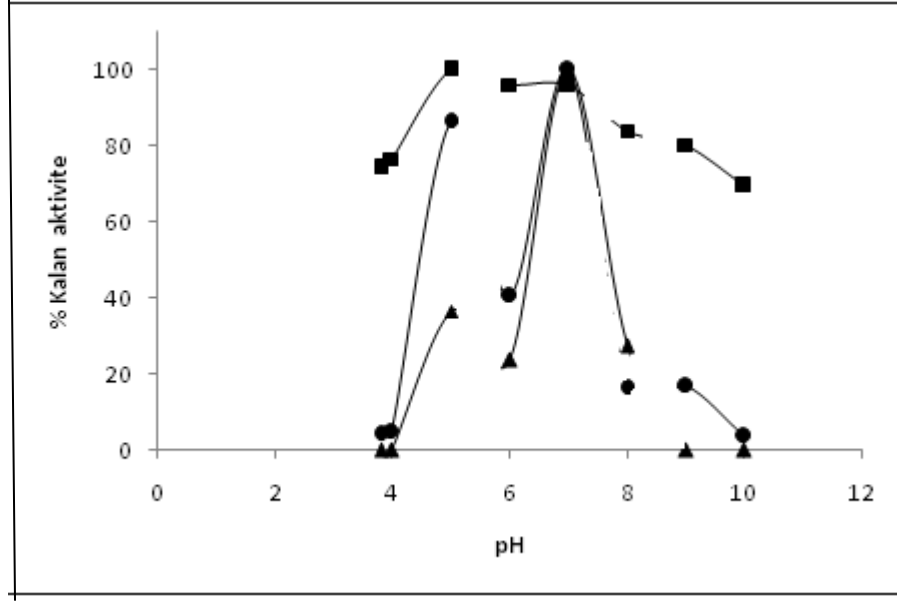
Şekil 3.10: Serbest ve İmmobilize α-Amilazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

serbest α-amilaz enzimi (▲), kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α-amilaz (●), kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α-amilaz (■), 50 mg immobilize enzim.

3.6 Stabilite Testleri

3.6.1 Serbest ve İmmobilize α-Amilazın pH Stabilitesi

Serbest ve immobilize α-amilazın pH stabilitesini belirleyebilmek için pH 3.8-10 arasındaki değişen pH' larda 1 saat bekletildi ve sonrasında optimum koşullarda aktivite ölçümleri yapıldı. Bu sonuçlara göre serbest enzim pH 5.0-8.0 arasında aktivite gösterirken kitosan- kil boncuklar üzerine immobilize edilen α-amilaz enzimi pH 3.8-10.0 arasında aktivite göstermektedir. Kitosan-kil kompozit boncuklar tek nokta olan pH 7.0' da stabilitesini korurken; kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar ise pH 4.0 ile 9.0 arasında stabilitesini koruyabilmektedirler. Serbest α-amilaz enzimi pH değerlerinden kolay etkilenmektedir, pH 3.8, 4.0, 9.0 ve 10.0'da aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Kitosan-kil kompozit boncuklar pH 4.0 ve 9.0' da aktivitesini neredeyse tamamını kaybederken kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar pH 7.0' da %76,63 ve pH 9.0' da % 80,28 aktivitesini korumaktadır (Şekil 3.11).

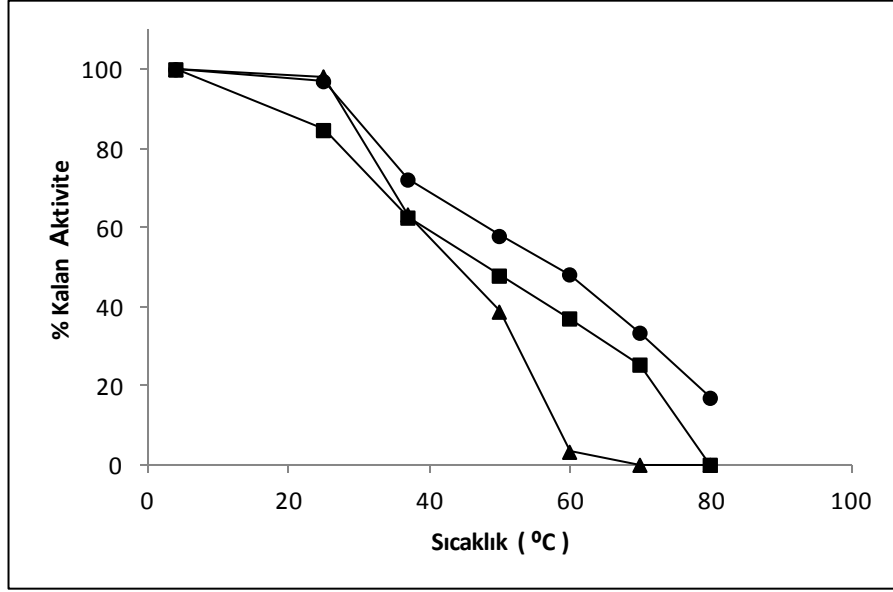


Şekil 3.11: Serbest ve immobilize α-Amilazın pH Stabilitesi

serbest α-amilaz enzimi (▲), kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α-amilaz (●), kitosan-Fe₃O₄ kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α-amilaz (■), 50 mg immobilize enzim, farklı pH'lerde 1 saat inkübasyon)

3.6.2 Serbest ve immobilize α-Amilazın Termal Stabilitesi

Serbest ve immobilize α-amilazın ısı kararlılığını belirlemek için 4-80° C arasında değişen sıcaklıklarda serbest ve immobilize α-amilaz 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda optimum koşullarda aktivite ölçümü yapıldı. Hesaplanan aktivite ölçümlerine göre immobilize enzimin yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha stabil olduğu görüldü. İmmobilizasyon işlemi yüksek sıcaklıkta stabiliteyi arttırmaktadır. Sıcaklık arttığı zaman serbest enzimin aktivitesi düşmektedir. 60° C' de 1 saat sonunda tüm aktivitesini yitirmektedir; kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş α-amilaz ise %50 aktivitesini korurken, kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş α-amilaz % 20 aktivitesini korumaktadır. 80° C' de 1 saat sonunda kitosan-Fe₃O₄ tüm aktivitesini kaybederken, kitosan-kil kompozit boncuklar % 20 aktivitesini korumaktadır (şekil 3.12).

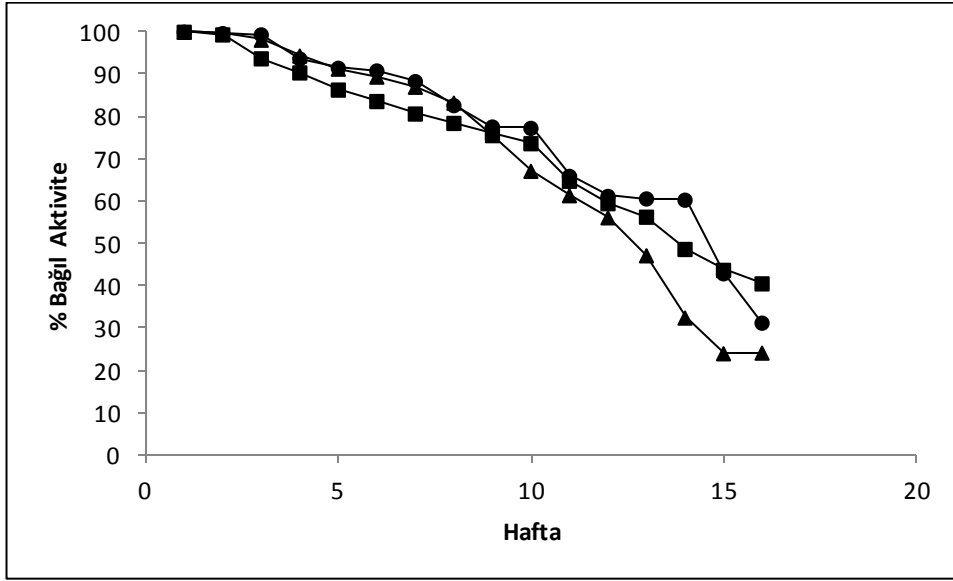


Şekil 3.12: Serbest ve İmmobilize α -Amilazın Sıcaklık Stabilitesi

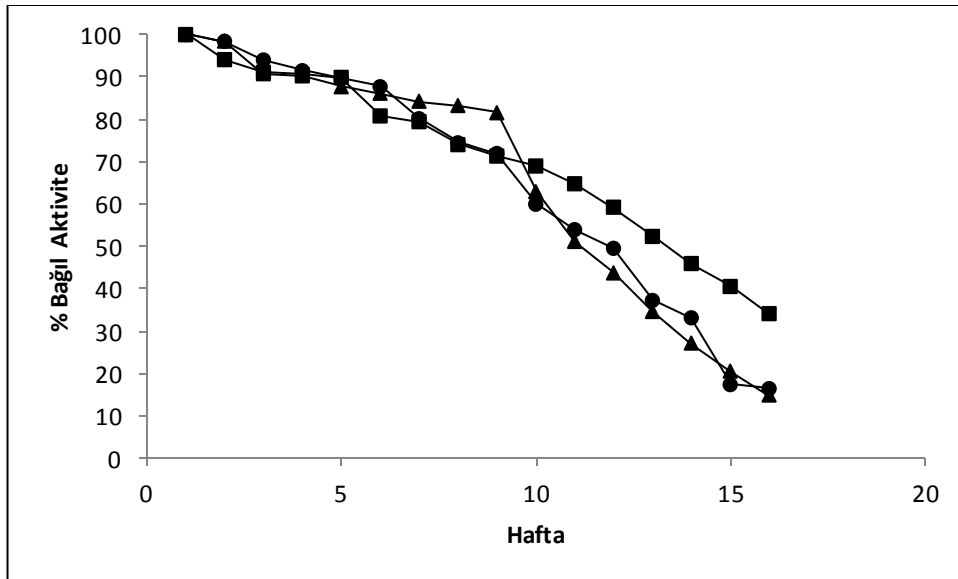
serbest α -amilaz enzimi (▲), kitosan-kil kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (●), kitosan-Fe₃O₄ taşıyıcı üzerine immobilize edilen α -amilaz (■), 50 mg immobilize enzim, farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon.

3.6.3 Depolama Kararlılığı

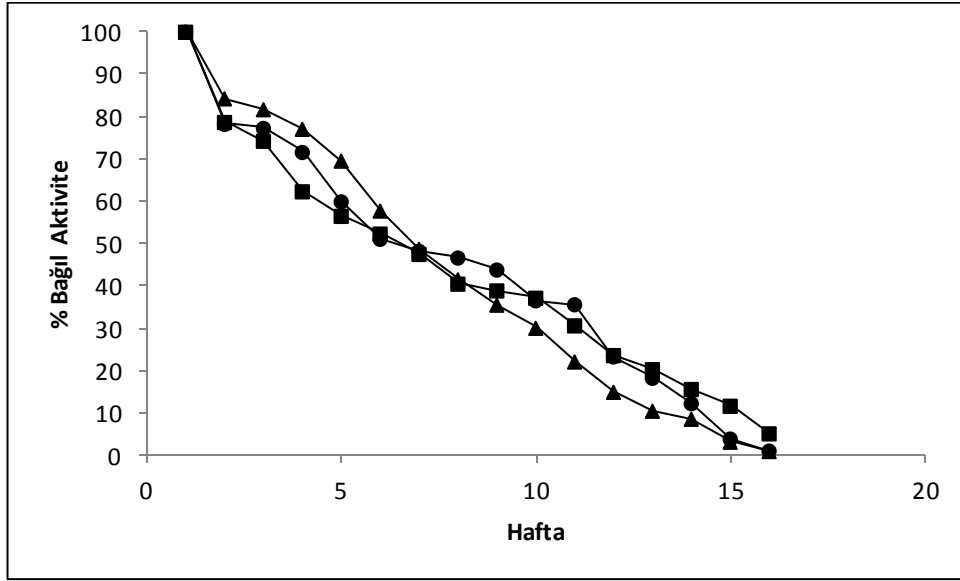
Serbest ve immobilize α -amilaz, - 18 ° C , 4 ° C ve 25 ° C' de 16 hafta boyunca uygun koşullarda depolandı ve belirli aralıklarla aktiviteleri ölçüldü. İmmobilize enzimlerin serbest enzime göre daha dayanıklı olduğu görüldü. Ayrıca kitosan-Fe₃O₄ immobilize enzimin kitosan-kil immobilize enzimden daha dayanıklıdır. Sıcaklıklara göre değerlendirme yapılacak olursa – 18° C de kil-kitosan % 31,23 , kitosan- Fe₃O₄ % 40,52, serbest enzim % 24,16 aktivitesini korumuştur. + 4 ° C de kitosan-kil % 16,4, kitosan-Fe₃O₄ % 34,11, serbest enzim % 14,89 aktivitesini korumuştur. 25° C de ise kitosan-kil % 1,1 , kitosan-Fe₃O₄ % 5,17 , serbest enzim ise % 1,01 aktivitesini korumuştur (şekil 3.13).



a)



b)



c)

Şekil 3.13: a) - 18° C, b) + 4° C c) 25° C' de serbest α-amilaz enzimi (▲), kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş α-amilaz (●) ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş α-amilaz (■) enziminin depolama stabiliteleri, 50 mg immobilize enzim.

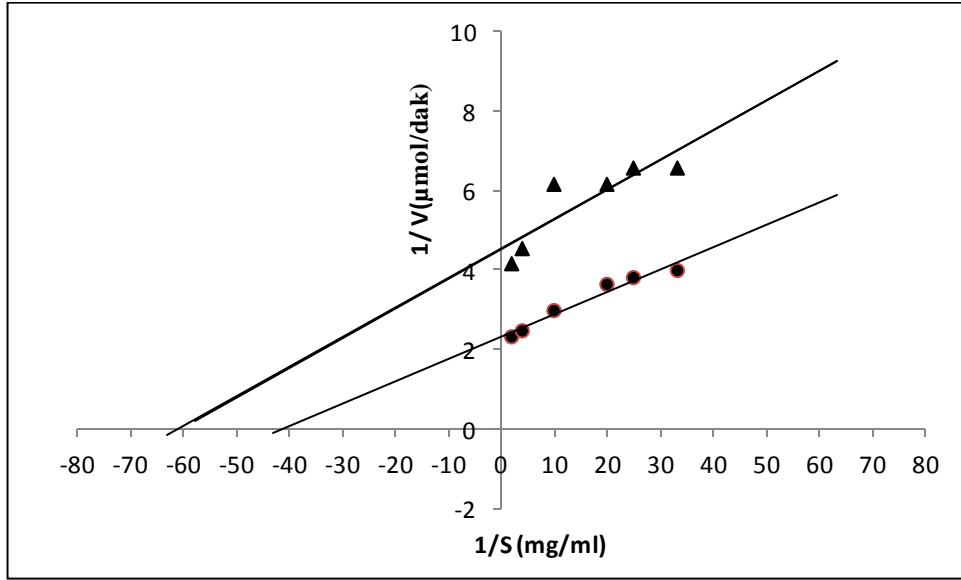
3.7 Serbest ve İmmobilize α-Amilazın Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Doğrunluk substrat (nişasta) konsantrasyonunu ve K_m ile V_{max} değerlerini belirleyebilmek için 0,01- 0,1 mM konsantrasyon aralığı kullanılarak serbest ve immobilize α-amilaz enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür. Hesaplamalara göre serbest enzim için V_{max} 4,5 $\mu\text{mol/dak}$, K_m 0,016 mg/ml; kitosan- kil için V_{max} 2,4 $\mu\text{mol/dak}$, K_m 0,025 mg/ml kitosan- Fe₃O₄ için V_{max} 4,0 $\mu\text{mol/dak}$, K_m $4,88 \times 10^{-3}$ mg/ml dir (Şekil 3.14 ve şekil 3.15).

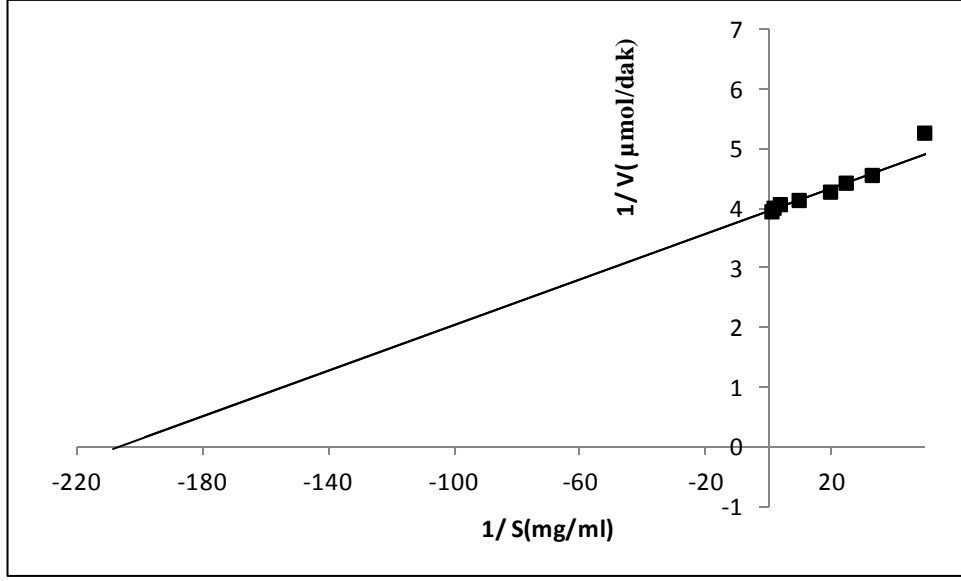
Şener kinetik çalışmalarında serbest α-amilaz enzimi için V_{max} 15×10^{-3} g/Lmin, K_m 1,19 g/L; immobilize α-amilaz için V_{max} $3,58 \times 10^{-3}$ g/L min, K_m 9,57 g/L bulunmuştur.

Enzimler bir desteğe immobilize edildiklerinde desteğin doğası, sistemin heterojenliği ve substratın enzime ulaşılabilirliği gibi faktörler nedeniyle kinetiği farklılaşır. Yapılan bu çalışmada, serbest ve immobilize α-amilazın Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve serbest ve immobilize α-amilazın V_{max} değerleri bulunmuştur. Serbest enzimin katalizlediği reaksiyonun maksimum hızının, immobilize enzimin katalizlediği reaksiyonun maksimum hızından büyük olması genellikle beklenen ve gözlenen bir durumdur (45). V_{max} , enzimin tümü substratına doymun olduğundaki olası en yüksek hızdır ve bu parametre immobilize enzimin gerçek özelliklerini yansıtır fakat difüzyonel sınırlamalardan etkilenir (55).

K_m değeri bir enzimin substratına olan ilgisi olarak bilinir (56) ve immobilizasyondan sonra genellikle K_m 'de bir artış beklenir. Ancak kitosan- Fe_3O_4 çalışmasında tersi bir durum yani K_m değerinde bir azalma görülmektedir. K_m değerindeki bu azalma substrat ve polimer materyali arasındaki elektrostatik etkileşimlerden ve difüzyonel etkilerden kaynaklanmış olabilir. Bununla beraber immobilizasyon sonunda enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelebilecek değişimler de enzim aktivitesi üzerine olumlu yönde etki gösterip K_m değerini azaltabilir (58) Kitosan-kil kompozit boncuklarının K_m değerinin kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuklarından daha fazla olması onun substratına ilgisinin daha fazla olduğunu gösterir.



Şekil 3.14: Serbest α -amilazın ve kitosan-kil kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen α -amilazın Lineweaver-Burk grafiği serbest α -amilaz (▲), kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş α -amilaz (●), 50 mg immobilize enzim



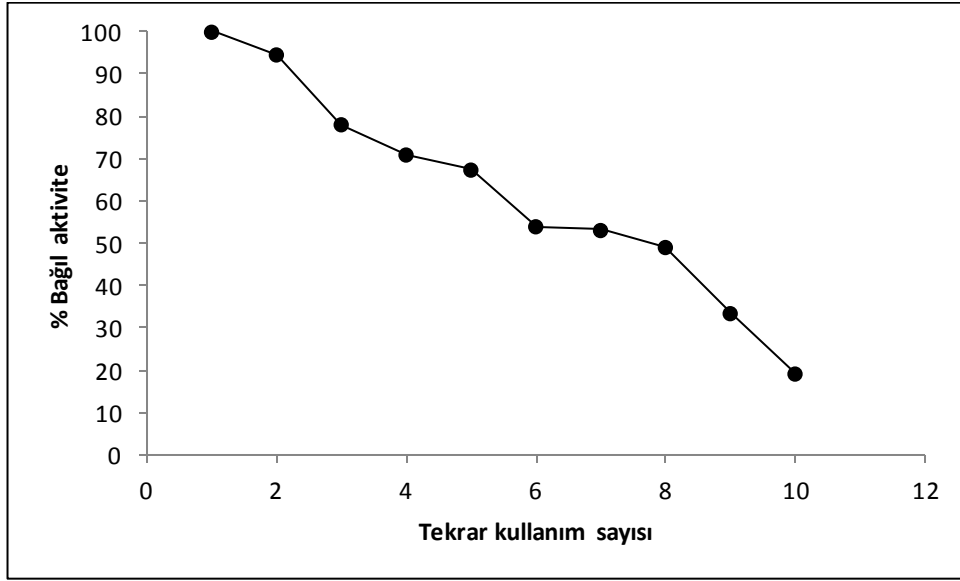
Şekil 3.15: Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen α-amilazın Lineweaver-Burk grafiği
Kitosan- Fe₃O₄ kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş α-amilaz (■), 50 mg immobilize enzim

3.8 Tekrar Kullanılabilirliği

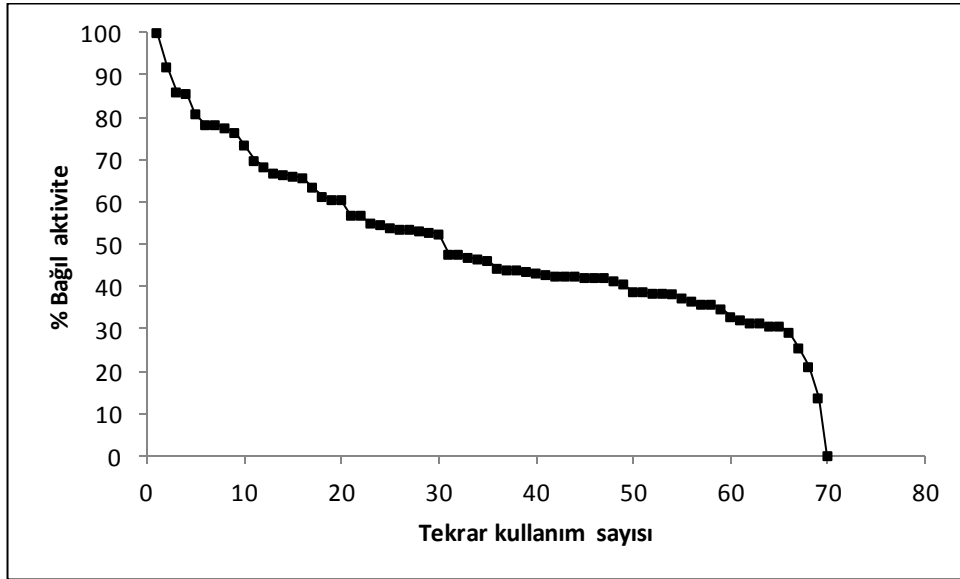
İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, seçilen taşıyıcının ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Ayrıca, tekrar kullanılabilirlik ekonomik açıdan ve kararlılığın korunması bakımından immobilize enzimleri serbest enzimlerden daha avantajlı kılar (59).

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği çalışması 37 ° C' de gerçekleştirilmiştir. Kitosan- kil kompozit boncuk için 10 kez tekrar kullanımının aktivite ölçümü sonucunda boncuk üzerine immobilize edilen α-amilazın % 20 aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Kitosan- Fe₃O₄ kompozit boncuk için 70 kez tekrar kullanımının aktivite ölçümü sonucunda boncuk üzerine immobilize edilen α-amilazın % 13,65 aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 3.16 ve şekil 3.17).

Uygun çalışmalarında α-amilazın 10 döngü sonucunda % 24 aktivitesini kaybettiğini görmüştür.



Şekil 3.16: Kitosan-kil kompozit boncuk üzerine immobilize edilen α -amilazın tekrar kullanılabilirliği



Şekil 3.17: Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk üzerine immobilize edilen α -amilazın tekrar kullanılabilirliği

3.9 Fiziksel Karakterizasyon

Bu çalışmada hazırlanan kitosan-kil, kitosan- Fe_3O_4 kompozit taşıyıcılarının karakterizasyon çalışmaları FTIR, TGA ve SEM analizleri ile yapıldı.

3.9.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

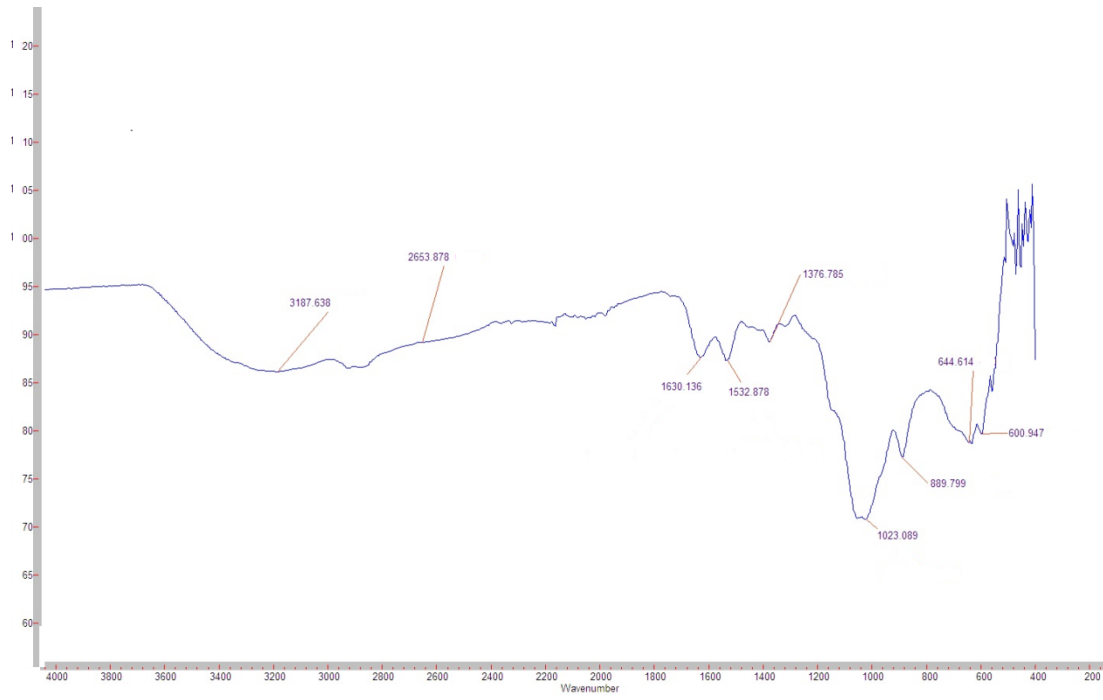
Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışın şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gereksiz hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir. Ayrıca biyokimyasal olarak; karbonhidrat fosfolipit amino asit ve proteinlerin yapı analizlerinde belirleyicidir (49).

FT-IR ölçümleri sonucunda kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuklarda pik 3187 cm^{-1} NH titreşimi, 1630 cm^{-1} C = C titreşimi, 1532 cm^{-1} C – C titreşimi, 1023 cm^{-1} C – O titreşimi, 600 cm^{-1} Fe_3O_4 den kaynaklanan pik gözlemlendi.

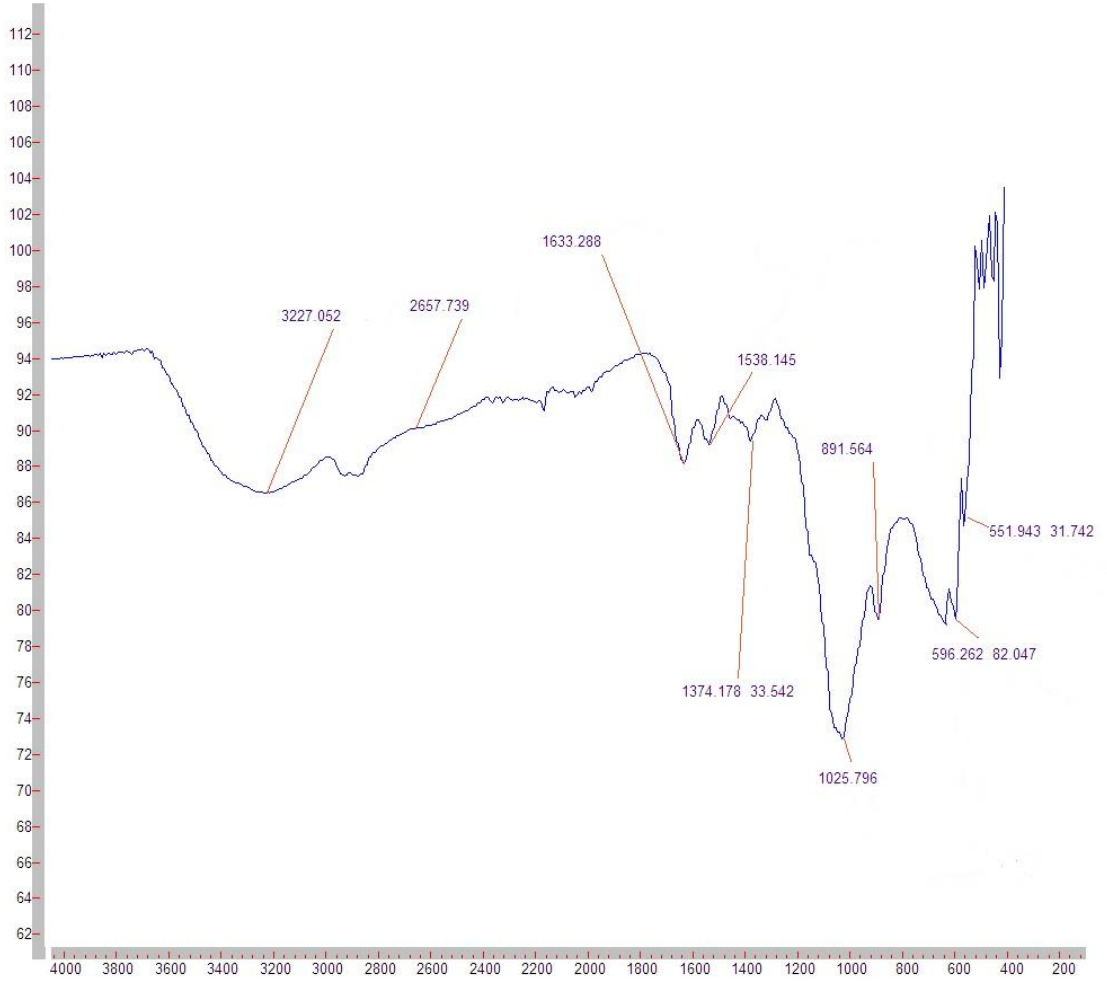
Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuklarda pik 3227 cm^{-1} NH titreşimi, 1633 cm^{-1} C = C titreşimi, 1538 cm^{-1} C – C titreşimi, 1025 cm^{-1} C – O titreşimi, Fe_3O_4 den kaynaklanan pik 551 cm^{-1} 'de gözlemlendi.

Kitosan-kil kompozit boncuklar için sonuçlar; 3479 cm^{-1} NH titreşimi, 1660 cm^{-1} C = C titreşimi görüldü.

Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan-kil kompozit boncuklarda; 3419 cm^{-1} NH titreşimi, 2924 cm^{-1} C – H titreşimi, 1673 cm^{-1} C = C titreşimi görüldü.



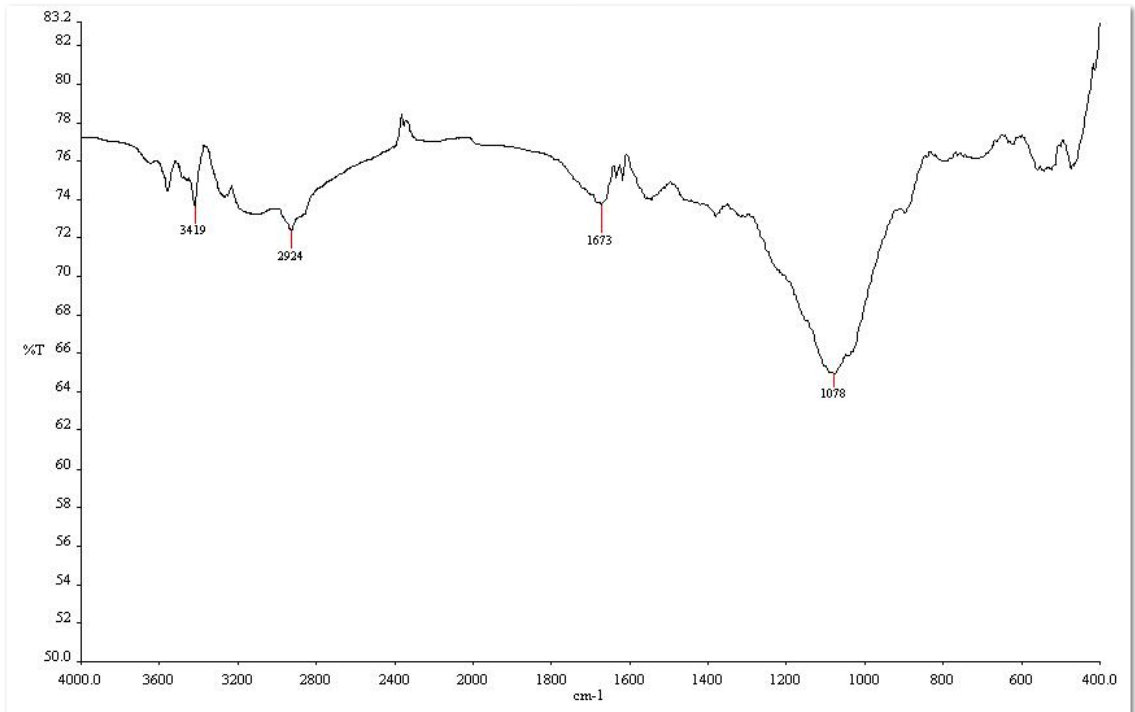
Şekil 3.18: Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların FTIR analizi



Şekil 3.19: Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların FTIR analizi



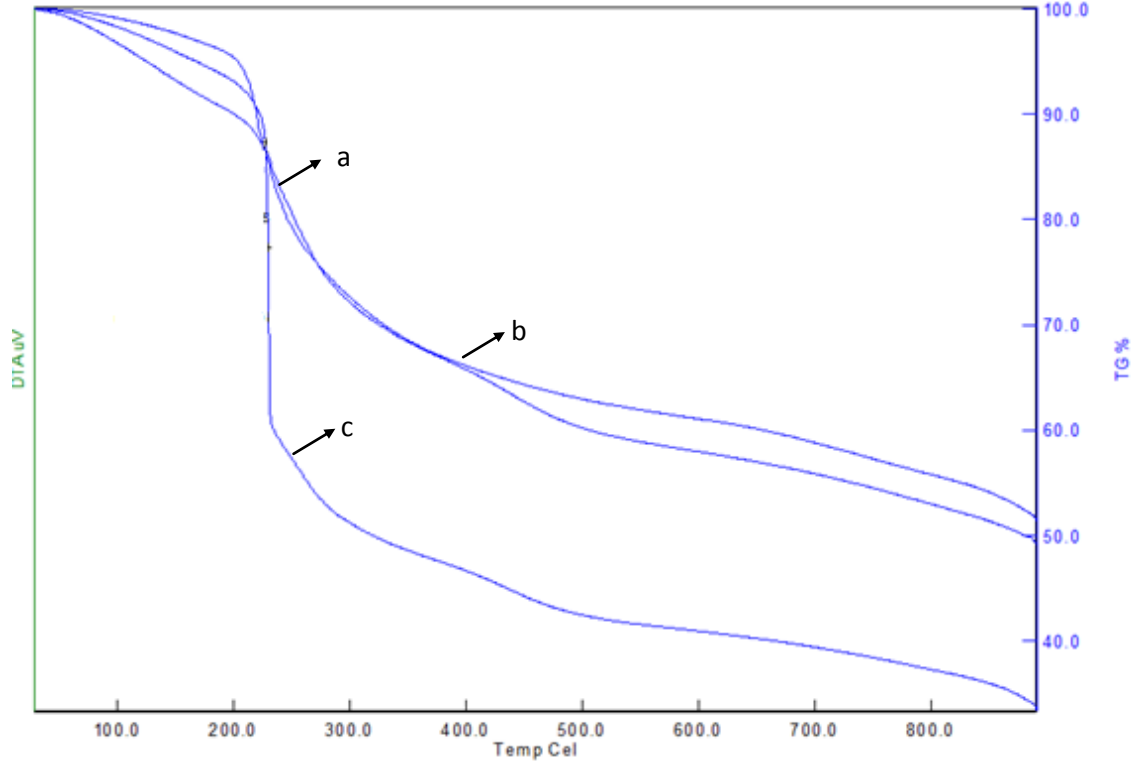
Şekil 3.20: Kitosan-kil kompozit boncukların FTIR analizi



Şekil 3.21: Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan-kil boncukların FTIR analizi

3.9.2 Termogravimetrik Analiz (TGA)

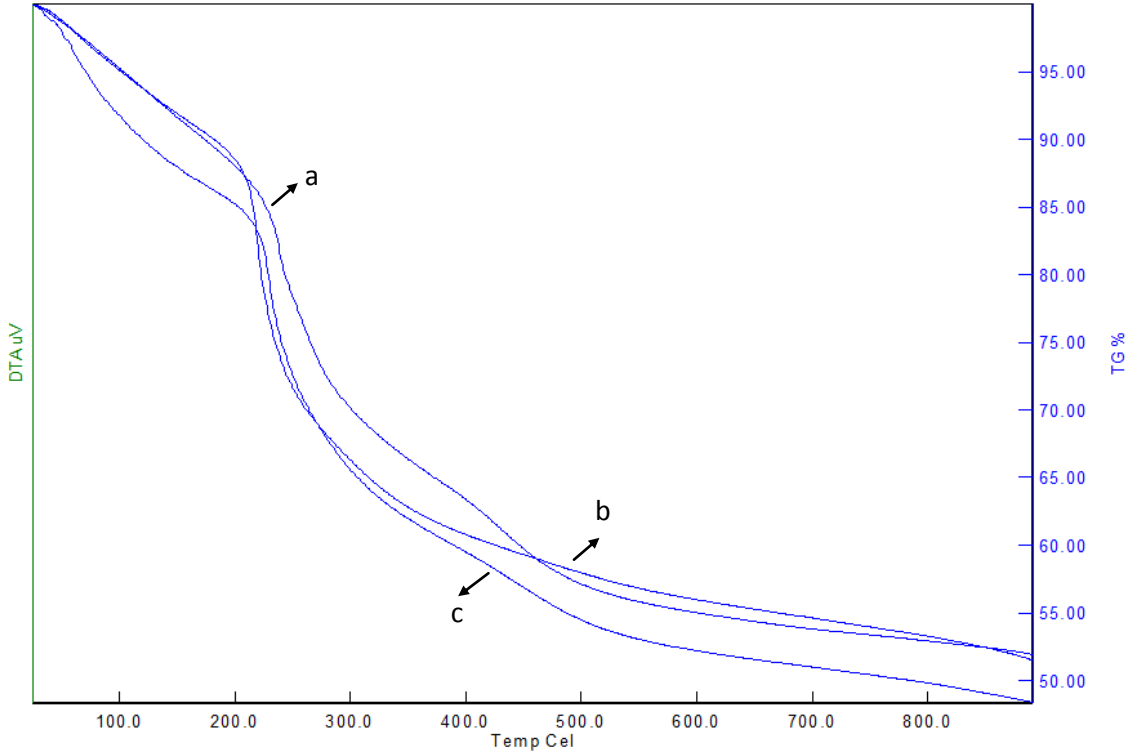
Termogravimetrik analizde boncukların ısıya karşı dayanıklılıkları ölçülmektedir. Analiz örnekte sıcaklığın etkisiyle uğradığı ağırlık kayıplarını ölçen hassas bir terazi kullanılır.



Şekil 3.22: Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların TGA sonuçları

(a: kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk, b: α-amilaz ile immobilize kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk, c: GLA ile çapraz bağlanmış kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk)

Manyetit nanopartikülleri makul stabiliteye sahip olduğu için, GLA ile çapraz bağlı ve α-amilaz ile immobilize edilmiş kompozit boncuklar ile karşılaştırıldığında daha stabil olması beklenmektedir (Namdeo et al., 2009). Bunu incelemek için kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk ve çapraz bağlı kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk ile α-amilaz ile immobilize kompozit boncukların termogravimetrik analizi yapıldı. 30-227 °C arasında ağırlık kaybı kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk için % 50, GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe₃O₄ için % 35, α-amilaz ile immobilize kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar için % 45' tir.



Şekil 3.23: Kitosan-kil kompozit boncukların TGA sonuçları

(a: Kitosan-kil kompozit boncuk, b: GLA ile çapraz bağlanmış kitosan-kil kompozit boncuk, c: α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk)

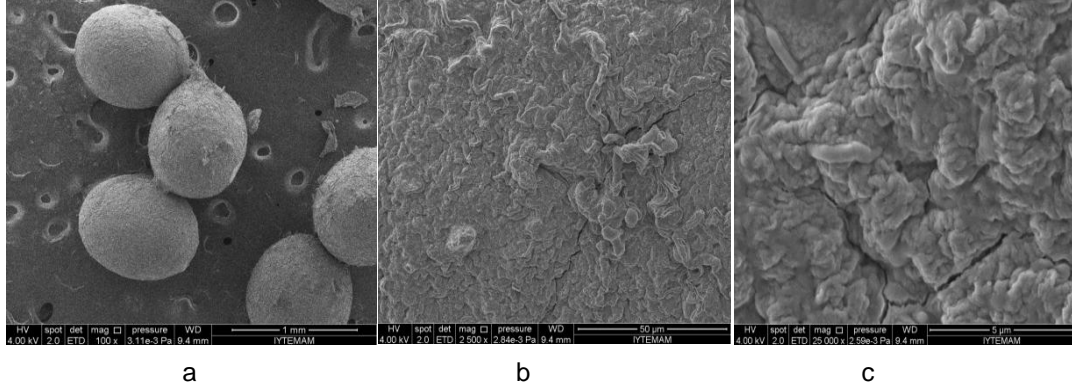
Kitosan-kil kompozit boncukların TGA incelemesi yapılırken iki basamakta gerçekleştiği görülmektedir. Birinci basamak 30-230 ° C arasında olmaktadır. Burada kitosan-kil kompozit boncuklar % 20, GLA ile çapraz bağlanmış kitosan-kil kompozit boncuklar % 17, α -amilaz ile immobilize kitosan-kil kompozit boncuklar % 20 kütle kaybına uğramıştır. İkinci basamakta 400-500° C kitosan-kil kompozit boncuklar % 40, GLA ile çapraz bağlanmış kitosan-kil kompozit boncuklar % 55, α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuklar % 40 kütle kaybına uğramıştır

3.9.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

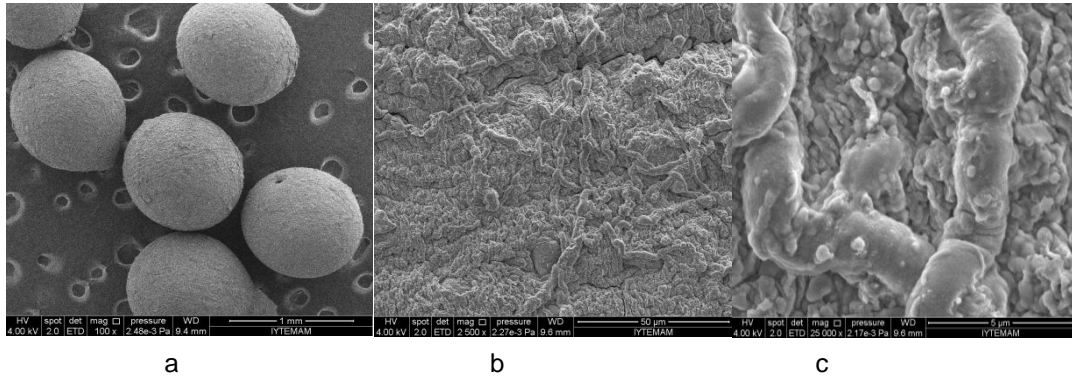
SEM analizinde bulanık bir örneğin yüzeyi ince bir elektron demeti ile taranır; örnek önceden bir ışık iletici film ile kaplanmıştır (buharlaştırma ile). Demet örneğe çarptığı zaman çıkan ikincil elektronlar (geri saçılan elektronlar) veya X-ışını fotonlarının (elektron mikroskopta) toplanmasıyla oluşan bir sinyal, bir televizyon tüpünde elektron demetinin şiddetini düzeltmede kullanılır ve mikroskop demetiyle senkronize bir tarama yapar. Bu sinyal örneğe göre geniş

mesafelerde küçük olduğundan, görüntülerin derinliği büyüktür ve üç boyutlu bir görüntü verirler. Resolusyon sınırı 100 \AA dolayındadır (54).

SEM çalışmaları kitosan-kil ve kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncukların genel morfolojisi ile ilgili bilgi vermektedir.

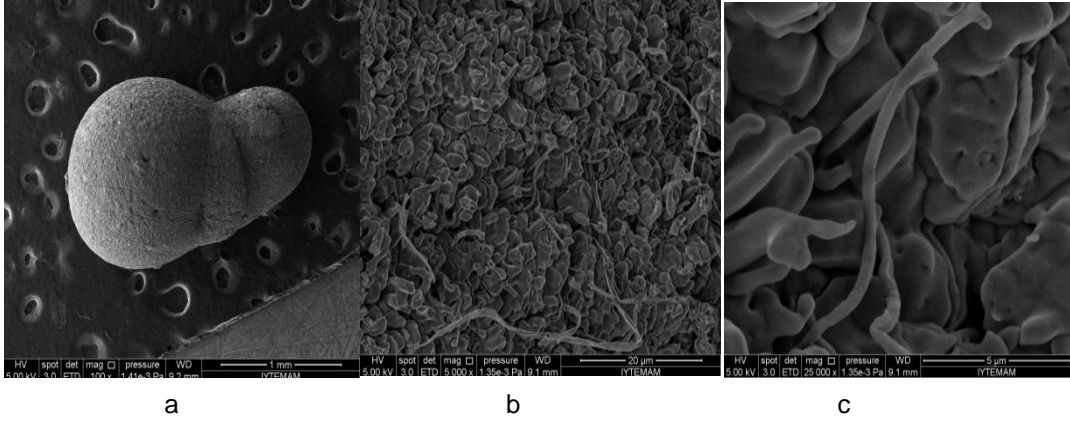


Şekil 3.24: a) Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 100x büyütme b) Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 2500x büyütme c) Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 25.000x büyütme

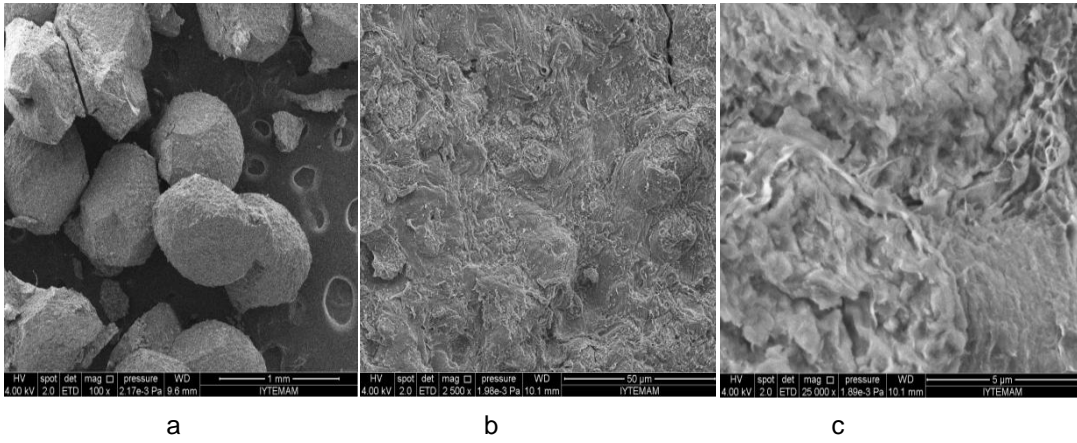


Şekil3.25: a) GLA ile çapraz bağlı kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 100x büyütme b)GLA ile çapraz bağlı kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 2500x büyütme c)GLA ile çapraz bağlı kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 25.000x büyütme

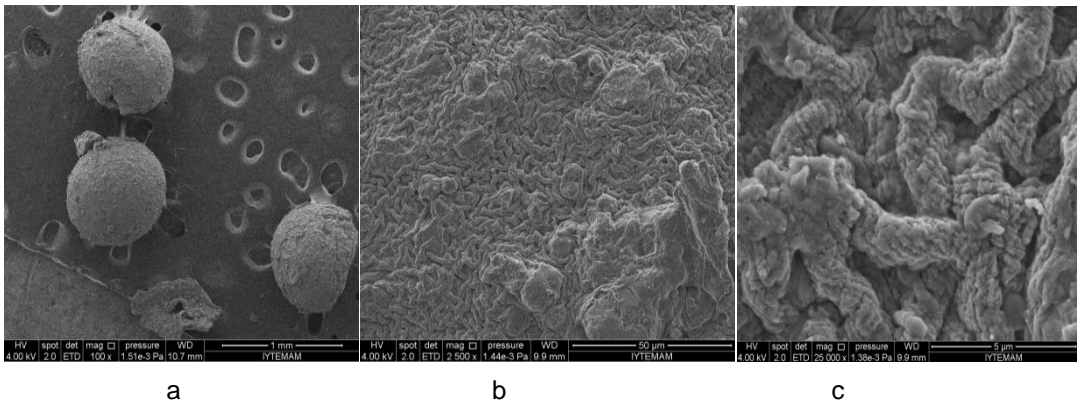
Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuklar GLA ile bağlanınca boncukların boyutları küçülmüş, sıkışmışlardır.



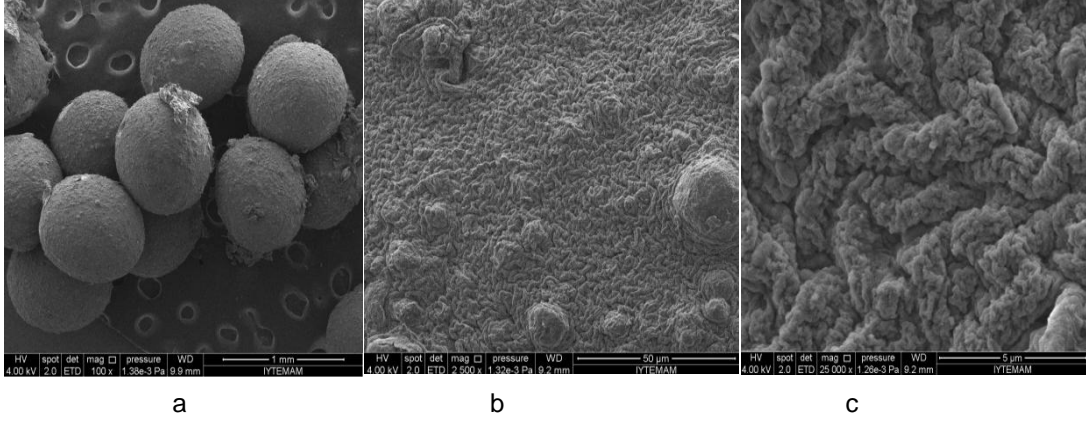
Şekil 3.26: a) α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 100x büyütme b) α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 5000x büyütme c) α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuk 25.000x büyütme



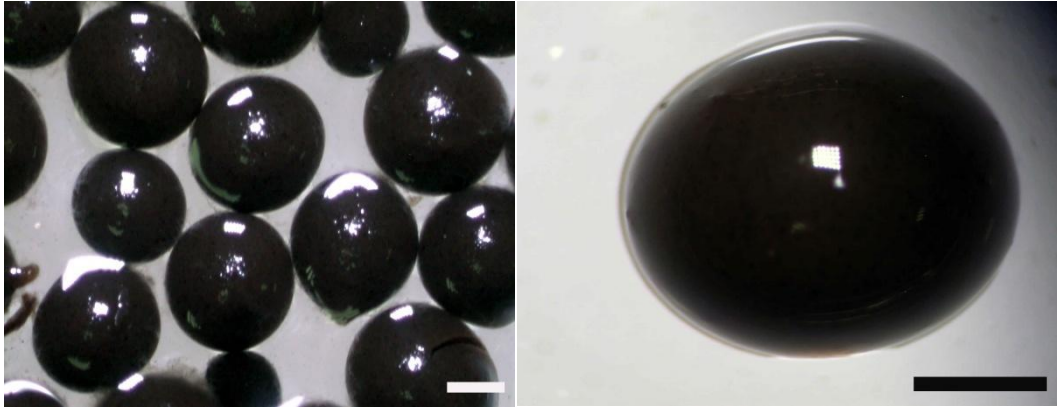
Şekil 3.27: a) Kitosan-kil kompozit boncuk 100x büyütme b) Kitosan-kil kompozit boncuk 2500x büyütme c) Kitosan-kil kompozit boncuk 25.000x büyütme



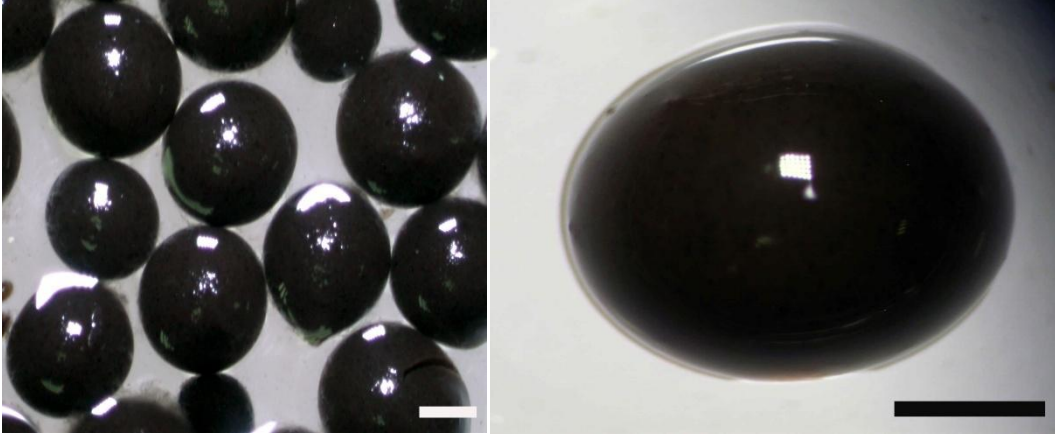
Şekil 3.28: a) GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuk 100x büyütme b) GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuk 2500x büyütme c) GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuk 25.000x büyütme



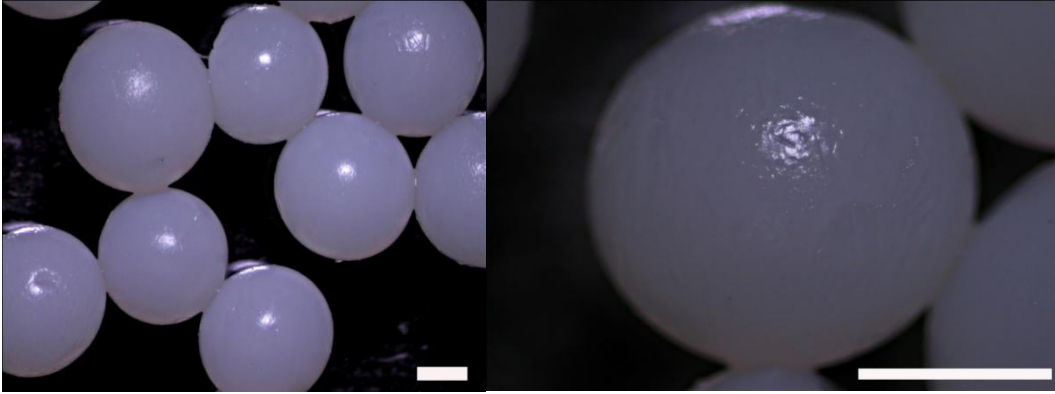
Şekil 3.29: a) α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk 100x büyütme b) α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk 2500x büyütme c) α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncuk 25.000x büyütme



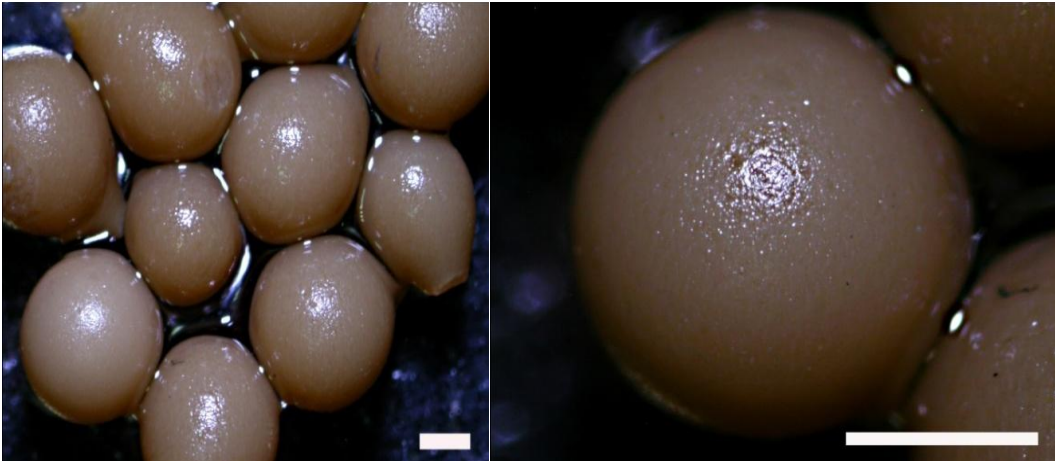
Şekil 3.30: Kitosan- Fe_3O_4 kompozit boncuklar



Şekil 3.31: GLA ile çapraz bağlı kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar



Şekil 3.32: Kitosan-kil kompozit boncuklar



Şekil 3.33 : GLA ile çapraz bağlı kitosan-kil kompozit boncuklar

Çizelge 3.2: Yaş boncukların boyutları

Kompozit boncuk	Kitosan-kil Boncuk	Kompozit	Kitosan-Fe ₃ O ₄ kompozit boncuk
	2,0 mm		1,86 mm

3.10 Genel Değerlendirme

Bu çalışmada kitosan- kil ve Fe₃O₄ olmak üzere iki farklı taşıyıcı kullanıldı. Çalışmadan çıkarılan sonuçlara göre kitosan-kil üzerine immobilize edilmiş α -amilazın GLA bağlama süresi 1 saat, kitosan-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilmiş α -amilaz için 1,5 saat bulundu. Her iki kompozit boncuk için GLA konsantrasyonu %1 (v/v) bulundu. Kompozit boncukları immobilize etmek için kullanılan α -amilaz konsantrasyonu kitosan-kil kompozit boncuk için 3 mg/ml, kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk için 2 mg/ml bulundu. α -Amilaz ile kompozit boncukları immobilize etme süresi kitosan-kil kompozit boncuklar için 1 saat, kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar için 4 saat bulundu. İmmobilizasyondan sonra immobilize α -amilazın optimum pH'ı asidik bölgeye doğru 2.0 pH birimi kaymıştır. Optimum sıcaklık değeri 37° C' den kitosan-kil kompozit boncuk için 50° C, kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk için 60° C' ye çıkmıştır. Serbest α -amilaz enziminin K_m değeri kitosan-kil immobilize α -amilazın Km değerinden düşük fakat immobilize kitosan-Fe₃O₄ α -amilazın Km değerinden yüksektir. Serbest α -amilaz için V_{max} 4,5 μ mol/dak dır ve bu değer immobilizasyondan sonra kitosan-kil kompozit boncuk için 2,4 μ mol/dak ve kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuk için 4,0 μ mol/dak' ya düşmüştür. Kitosan-kil kompozit boncuklarda tutulan α -amilaz tekrar kullanılabilir ve 10 döngü sonunda başlangıç aktivitesinin % 20' sini korumaktadır. Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncuklar 70 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 13,65' ni koruduğu gözlemlendi. Kitosan-kil kompozit boncukların boyutu 2,0 mm ve α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-kil kompozit boncukların boyutu ise 3,25 mm bulundu. Kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların boyutu 1,86 mm ve α -amilaz ile immobilize edilmiş kitosan-Fe₃O₄ kompozit boncukların boyutu 2,99 mm bulundu. Fe₃O₄ için manyetik alan hesaplamaları sonucu manyetik duyarlılık ölçümü (μ) 5,5 B.M bulundu.

4. KAYNAKLAR

- [1] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B "Microbial α - amylases: a biotechnological perspective", *Process Biochemistry*, 38, 1599-/1616, 2003.
- [2] Bailey, J. E., Ollis, D. F., *Biochemical Engineering Fundamental*, Mc Graw-Hill Book Company, (1986).
- [3] Kadziola, A., Sùgaard, M., Svensson, B., Haser, R., "Molecular Structure of a Barley α -Amylase-Inhibitor Complex: Implications for Starch Binding and Catalysis", *J. Mol. Biol.*, 278, 205-217, 1998.
- [4] Brzozowski, A. M., Davies, G. J., "Structure of the *Aspergillus Oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose, at 2 resolution", *Biochemistry*, 36,10837-10845, (1997).
- [5] Machius, M., Vertesy, L., Huber, R., Wiegand, G., "Carbohydrate and Protein-based Inhibitors of Porcine Pancreatic α -Amylase: Structure Analysis and Comparison of Their Binding Characteristics", *J. Mol. Biol.*, 260, 409-421, 1996.
- [6] Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K.; Hazzard, J.T.; Tollin, G.; Rensing, C.; Montfort, W.R.;'Crystal Structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*', *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99, 2766-2771, 2002.
- [7] Gary, D.B., Yaogand, L., Stephen, G.W., *Protein Science*, 4: 1730-1742, USA, 1995.
- [8] Swift, H. J., Brady, L., Defwenda, Z. S., Dodson, J., Turkenburg, J. P., *Acta Crystallogr., Ssct. B V.* 47, 535, 1991.
- [9] Quian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., Payan, F., "The Active Center of a Mammalian α -Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic α -Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2-Å", *Biochemistry*, 6284-6294,1994.
- [10] Decklerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C., "Probing Structural Determinants Specifying High Thermostability in *Bacillus licheniformis* α - Amylase", *J. Mol. Biol.*, 301, 1041-1057, 2000.
- [11] Bush, D. S., Sticher, L., Huystee, R., Wanger, D., Jones, R. L., 264(32), 19392-19398, 1989.
- [12] Öztolan, Ö. Ö., *Alfa amilaz dekstran konjugatlarının sentezi ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2007.
- [13] Ishikawa, K., Matsui, I., Kobayashi, S., ve Nakatani, H., *Biochemistry*, 29, 7119- 7123, 1990.
- [14] Nielsen J. E., Borchert T. V., "Protein engineering of bacterial α -amylases", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 253-274, 2000.

- [15] Wiseman, A., Handbook of Enzyme Biotechnology, Halsted Press, New York, 1975.
- [16] Bilen, Ç., Paraoksonaz enziminin glutaraldehit ile immobilizasyonu ve bazı ağır -metallere karşı afinitesinin araştırılması, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [17] Demir, T., α -galaktosidaz Enziminin İmmobilizasyonu İçin Biyoafinite Temelli İmmobilizasyon Prosedürlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 2012.
- [18] Telefoncu, A., Enzimolojinin prensipleri, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Yaz okulu), editör A. Telefoncu, 18s., 1986.
- [19] Öztürk, N., Hidrofobik nano yapılar da Candida Rugosa lipaz immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, 2006.
- [20] Soloman, B., Andlevin, Y., Studies on adsorption of amyloglucosidase on ion-exchange resins, Biotechnol. Bioeng., 16, 1161, 1974.
- [22] Telefoncu, A., İmmobilize enzimler, Enzimoloji (Yaz okulu), editor A. Telefoncu, 193s., 1997.
- [23] Önal, Tatar, S., Karpuz (Citrullus vulgaris) α -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 190s., 2000.
- [24] Fernandes, S. C., Rosane, I., Oliveria, W. Z., Vieira, I. C., A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic in white wine, Enzyme and Microbial Technology, 40, 661-668, 2007.
- [25] Moccellini, S.K., Franzoi, A.C., Vieira, I.C., Dupont, J., Scheeren, C.W., A novel support for laccase immobilization: Cellulose cetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection, Biosensors and Bioelectronics 26, 3549-3554, 2011.
- [26] Taylor, R. F., Protein Immobilization Fundamentals and Applications, Markel Dekker Inc, New York, 1991.
- [27] Zhang, J., Xu, Z., Chen, H., Zong, Y., Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from Coriolus versicolor, Biochemical Engineering Journal 45, 54-59, 2009.
- [28] Muralikrishna, G., Nirmala, M., "Cereal α -amylases—an overview", Carbohydrate Polymers, 60, 163–173, 2005.
- [29] Beazell, J. M., "A reexamination of the role of the stomach in the digestion of carbohydrates and protein", American Journal of Physiology, 132:42-50, (1941).
- [30] Meunier, V., Nicola, T., Durand, D., "Structure and kinetics of aggregating κ -caragenan studied by light scattering", Macromolecules, 33:2497-2504, 2000.
- [31] Salamone, J.C., "Polymeric Materials Encyclopedia", CRC Pres, New York, 149-154, 1996.
- [32] Kierstan, M.P.J., Bucke, C., "The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate", Biotechnolgy and Bioengineering, 19:387-397, 1997.
- [33] Tanaka, H., Matsumura, M., Veliku, I.A., "Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads", Biotechnolgy and Bioengineering, 26:53-58, 1984.

- [34] Rousseau, I., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J.F., Muller, G., "Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SDS) from calcium alginate gel beads", *European Polymer Journal*, 40:2709-2715, 2004.
- [35] Chiou, S., Wu, W., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, 25, 197-204, 2004.
- [36] Guang, W.Y, The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk, Ph.D. Thesis, Hong Kong Polytechnic University, 2002.
- [37] Wan, Y., Creber, K.A.M., Peppley, B., Bui, V.T., "Ionic conductivity of chitosan membranes", *Polymer*, 44:1057-1065, 2003.
- [38] Lim, S.H., Synthesis Of A Fiber-Reactive Chitosan Derivative And its Application to Cotton Fabric as an Antimicrobial Finish and a Dyeing-Improving Agent, 2002.
- [39] Vilchez, S., Jovancic, P., Manich, A.M., Julia M. R., Erra P., Chitosan Application on Wool Before Enzymatic Treatment, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 98, p. 1938 -1946, 2005.
- [40] Agboh, O.C., Qin, Y., Chitin and Chitosan Fibers, *Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 8, p. 355-365, 1997.
- [41] Demir, A., Tekstil terbiyesinde kitin ve kitosanın kullanım olanaklarının araştırılması, Doktora tezi, Ege Üniversitesi, 2007.
- [42] Bemfeld, P., Amylases α and β Meth., *Enzymology*, 1:149-58, 1955.
- [43] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- [44] Jiang, D., Long, S., Huang, J., Xiao, H., Zhou, J., Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres, *Biochemical Engineering Journal* 25, 15-23, 2005.
- [45] Zhao, Y.; Qiu, Z.; Huang, J. Preparation and Analysis of Fe_3O_4 Magnetic Nanoparticles Used as Targeted-drug Carriers. *Chinese J. Chem. Eng.*, 16(3), 451-455, 2008.
- [46] Coşkun, G., Glutatiyon -S-transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2007.
- [47] Kara, F., Üreazın Aljinat/ Kitosan Polielektrolit ve Poli(Akrilamid-ko-akrilik asit)/ κ Carragenan İnterpolimer Komplekslerine İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
- [48] Uygun, M., Uygun, D. A., Karagözler, A. A., PVA-Aljinat Küreler Üzerine α -Amilaz Enziminin İmmobilizasyonu, *Tralleis Elektronik Dergisi*, 1, 45-50, 2013.
- [49] Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., Logue, M. W., *Organik Kimya*, Uyar, T.(editör), 2001.
- [50] Adriano, W.S., Filho, E.H.C., Silva, J.A., Giordano, R.L.C., Gonc, L.R.B., Alves, Braz. J.

- [51] Kobayashi, T., Miyama, H., Kawata, S., Nosaka, Y., Fujii, N., Immobilization of enzymes on electrostatic medium of positively charged dimethylamino nylon gel. *Journal of Applied Polymer Science*, 46: 2183-2188, 1992.
- [53] Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26: 69-78, 2003.
- [54] Beşergil, B., *Polimer Kimyası*, 2003.
- [55] Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S., Immobilization of α - amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalysis Communication*, 8: 393-399, 2007.
- [56] Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I.S., Kim, W.S. Immobilization of starch-converting enzymes on surfacemodified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40: 53-61, 2005.
- [57] Chang, M.Y., Juang, R.S., *Process Biochem*, 39, 1087–1091, 2004.
Chem. Eng. 22 , 4, 2005, 529–538.
- [58] Demirel, G., Ozcetin, G., Sahin, F., Tunturk, H., Aksoy, S., Hasirci, N. Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase. *Reactive and Functional Polymers*, 66: 389-394, 2006.