



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOAMİLAZ ENZİMİNİN METAL-ŞELAT AFİNİTE
YÖNTEMİ İLE POLİ(ETİLEN GLİKOL DİMETAKRİLAT
1-VİNİL-1,2,4-TRİAZOL) MİKROKÜRELER ÜZERİNE
İMMOBİLİZASYONU

Senay KÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA 2009



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOAMİLAZ ENZİMİNİN METAL-ŞELAT AFİNİTE
YÖNTEMİ İLE POLİ(ETİLEN GLİKOL DİMETAKRİLAT
1-VİNİL-1,2,4-TRİAZOL) MİKROKÜRELER ÜZERİNE
İMMOBİLİZASYONU

Senay KÖK

Prof.Dr.Necati BEŞİRLİ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2009

ÖZET

Poli(etilen glikol dimetilakrilat-1-vinil-1,2,4-triazol) [poli(EGDMA-VTAZ)] hidrojel (ortalama çap 150-200 µm) etilen glikol dimetilakrilat (EGDMA) ve 1-vinil-1,2,4-triazol (VTAZ)'ın kopolimerizasyonu ile hazırlandı. Cu^{2+} iyonları poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri üzerine şelatlaştırıldı ve daha sonra metal-şelatlanmış mikroküreler kesikli sistemde glukoamilaz enzimi adsorbsiyonunda kullanıldı. Poli(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} mikrokürelerinin maksimum glukoamilaz adsorbsiyon kapasitesi pH 6.5'te 104 mg/g olarak belirlendi. Serbest haldeki glukoamilaz enzimi pH 4.5 'da maksimum aktivite gösterirken bu değer immobilize enzim için pH 4 olarak belirlenmiştir. Serbest enzim için 60 °C olan optimum sıcaklık ise immobilize enzim için 65 °C 'ye kaymıştır. İmmobilizasyon glukoamilaz enzimin sıcaklığa karşı olan dayanıklılığını da arttırmıştır. 60–70 °C 'de 180 dakika inkübasyon sonucunda immobilize enzimin serbest enzime göre çok daha yüksek aktivite değerleri gösterdiği belirlenmiştir. Depolanma kararlılığı, immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlük gösterdiği özelliklerden biridir. Serbest glukoamilaz enzimi 20 gün içerisinde aktivitesinin tamamını kaybederken immobilize enzim aynı süre içerisinde aktivitesinin sadece % 5 'ini kaybetmiştir. Glukoamilaz enziminin Michaelis sabiti, K_m adsorbsiyona bağlı olarak artarken V_{max} değeri azalmıştır, bu da enzimin substratına karşı olan afinitesinin azaldığının bir göstergesidir. İmmobilize enzimlerin en önemli avantajlarından biri de tekrar kullanımdır. 10 kez tekrar kullanım sonucunda immobilize glukoamilaz enziminin aktivitesinin %76 'sını koruduğu belirlenmiştir ki, bu da biyokatalitik uygulamalarda enzim bağlanmış mikrokürelerin ne kadar kullanışlı olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER : Adsorbsiyon, metal-şelat , glukoamilaz, 1-vinil-1,2,4-triazol

ABSTRACT

Poly(ethylene glycol dimethacrylate-1-vinyl-1,2,4-triazole) [poly(EGDMA-VTAZ)] hydrogel (average diameter 150–200 μm) was prepared by copolymerizing ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) with 1-vinyl-1,2,4-triazole (VTAZ). Cu^{2+} ions were chelated on the poly(EGDMA-VTAZ) beads, then the metal-chelated beads were used in the adsorption of glucoamylase in a batch system. The maximum glucoamylase adsorption capacity of the poly(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} beads was observed as 104 mg/g at pH 6.5. The maximum relative activity of the free glucoamylase was observed at pH 4.5, whereas the optimal pH value to get which of that was at 4.0 for the immobilized glucoamylase. The optimal temperature of free glucoamylase was at 60 $^{\circ}\text{C}$ and the immobilized enzyme was shifted to 65 $^{\circ}\text{C}$. The immobilization remarkably enhanced heat and denaturation resistance of glucoamylase. After incubation at 60–70 $^{\circ}\text{C}$ for 180 min, the immobilized glucoamylase remained higher activity in comparison with the free one. Storage stability is one of the important advantages for immobilized enzymes over the free enzymes because free enzymes can lose their activities fairly quickly. The free glucoamylase lost its whole activity within 20 days. However, the immobilized glucoamylase on the poly-(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} beads lost only 5% of its activity during the same period. The value of the Michaelis constant K_m of glucoamylase was larger upon adsorption, indicating decreased affinity by the enzyme for its substrate, whereas V_{max} was smaller for the adsorbed glucoamylase. The most important advantage of immobilization is repeated use of enzymes. The glucoamylase adsorption capacity was not changed during the 10 successive adsorption-desorption cycles. Adsorbed glucoamylase retains an activity of 76 % after 10 batch successive reactions, demonstrating the usefulness of the enzyme-loaded beads in biocatalytic applications.

KEY WORDS : Adsorption, metal-chelate, glucoamylase, 1-vinyl-1,2,4-triazole

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1-GİRİŞ	1
2-KURAMSAL BİLGİLER	
2.1. Enzim İmmobilizasyonu	4
2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	7
2.2.1. Kimyasal Yöntemler	8
2.2.1.1. Kovalent Bağlanma	8
2.2.1.2. Çapraz Bağlanma	10
2.2.2. Fiziksel Yöntemler	12
2.2.2.1. Adsorpsiyon ile İmmobilizasyon	12
2.2.2.2. Hapsetme ile İmmobilizasyon	14
2.2.2.2.1. Kafes Tipi Hapsetme	15
2.2.2.2.2 Mikrokapsül İle Hapsetme	16
2.2.3. İmmobilize Metal Afinite Yöntemi	17
2.2.3.1. İMAK İçin Kromatografik Destekler (Matriksler)	20
2.2.3.2. İMAK'da Kullanılan Şelat Oluşturucu Ligandlar	21
2.2.3.3. Koordinasyon Kimyası	22
2.2.3.4. Serbest Çözeltide ve İmmobilize Formdaki Amino Asit Metal Etkileşimleri	24
2.2.3.5. İMAK 'da Peptit ve Proteinlerin Adsorpsiyon -Desorpsiyon Mekanizmaları	26
2.2.3.6. pH Etkisi	27
2.3. İmmobilizasyon Metodlarının Karşılaştırılması	27

2.4. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi	31
2.5. Lowry Metodunun Özellikleri	31
2.6. Çalışmada Kullanılan Enzimler	34
2.6.1. Glukoamilaz Enziminin Özellikleri	34
2.6.2. Glukoamilaz Enziminin İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar	39
2.7. Çalışmada Kullanılan Substrat ve Özellikleri	53
2.7.1. Nişasta	53
2.8. Enzim Katalizinin Mekanizması	56
2.9. Enzim Aktivitesi ve Miktarının Tayini	57
2.9.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler	58
2.9.1.1. pH Etkisi	58
2.9.1.2. Sıcaklığın Etkisi	59
2.10. Enzim Kinetiği	59
2.10.1. Km ve Vmax Değerlerinin Önemi	64
2.10.2. Vmax ve Km Değerlerinin Grafikle Tayini	65
2.11. Çalışmada Kullanılan Destek Materyali ve Özellikleri	68
3-MATERYAL ve YÖNTEM	
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	72
3.1.1. Kimyasallar	72
3.1.2. Çözeltiler	72
3.1.2.1. Tampon Çözelti Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler	72
3.1.2.2. İmmobilizasyonda Kullanılan Çözeltiler	73
3.1.2.3. Glukoamilaz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	73
3.1.2.4. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	74
3.2. Metodlar	75
3.2.1. Poli(EGDMA-VTAZ) Mikrokürelerin Sentezi	75
3.2.2. Cu ²⁺ İyonlarının Şelatlanması	75
3.2.3. Glukomilaz Adsorpsiyon Çalışmaları	76
3.2.4. Protein Tayini	76
3.2.5. Protein ve Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	77

3.2.6. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz İçin Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	77
3.2.7. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	78
3.2.8. Tekrar Kullanım	78
3.2.9. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enziminin Michaelis-Menten Sabitlerinin Belirlenmesi	78
3.2.10. Termal Kararlılık	79
3.2.11. Depolanma Kararlılığı	79
4-ARAŞTIRMA SONUÇLARI	
4.1. Protein Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	80
4.2. Glukoamilaz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	81
4.3. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu(II) Mikrokürelerin Glukoamilaz Adsorbsiyon Kapasitesine pH Etkisi	82
4.4. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu(II) Mikrokürelerin Glukoamilaz Adsorbsiyon Kapasitesine Konsantrasyon Etkisi	83
4.5. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklık Etkisi	85
4.6. Tekrar Kullanım	89
4.7. Termal Kararlılık	91
4.8. Depolanma Kararlılığı	92
4.9. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enziminin Michaelis-Menten Sabitlerinin Belirlenmesi	93
5-TARTIŞMA VE SONUÇ	
5.1. Kopolimer Mikrokürelerin Özellikleri	96
5.2. Glukoamilaz Adsorbsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi	96
5.3. Glukoamilaz Adsorbsiyonuna Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi	97
5.4. İmmobilize Enzim Aktivitesini Etkileyen Koşulların İncelenmesi	98
5.5. Kinetik Sabitler	102
6.SONUÇ	
KAYNAKLAR	106
EKLER	116

SİMGELER DİZİNİ

- α** - Alfa
 β - Beta
 γ - Gama
 κ - Kappa
 μm - Mikrometre
 μg - Mikrogram
 nm - Nanometre
 K_m - Michaelis sabiti
 V_{max} - Maksimum hız

KISALTMALAR

(AIBN)	Azobisisobutironitril
(AAA)	2-dimetil-aminoasetoaldehitdimetilasetal
(APA)	3-(N,N-dimetilamino-n-propandiamin) propiyonaldehitdimetilasetal
(ADH)	Adipik dihidrazid
(CLEAs)	Çapraz Bağlanmış Enzim Yığımları
(CLEs)	Çapraz Bağlanmış Çözünmüş Enzimler
(CLECs)	Çapraz Bağlanmış Enzim Kristalleri
(CLSDs)	Çapraz Bağlanmış Tek Yönlü-Kurutulmuş Enzimler
(CM)	Karboksi metillenmiş
(CZE)	Kapiler Alan Elektforezi
(DNS)	Dinitrosalisilik asit
(DVB)	Divinil benzen
(EDTA)	Etilendiamintetraasetik asit
(EGDMA)	Etilen glikol dimetakrilat
(ES)	Enzim-substrat kompleksi
(E_T)	Toplam enzim konsantrasyonu
(EU)	Enzim ünitesi
(FDA)	Enzimler Gıda ve İlaç Kurumu
(GA)	Glukoamilaz
(GMA)	Glisidil metakrilat
(GO_x)	Glukoz oksidaz
(HFCS)	Fruktoz şurubu
(İDA)	İminodiasetik asit
(İMAK)	İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi
(NTA)	Nitriлотriasetik asit
(MAA)	Metakrilik asit
(M-GAD)	Glutaraldehit
(PANIG)	Polianilin glutaraldehit
(PEI)	Polietilenimin
poli(EGDMA–VTAZ)	Poli(etilenglikol dimetakrilat-1-vinil-1,2,4-triazol)
poli(EGDMA–VIM)	Poli(etilenglikol dimetakrilat-n-vinil imidazol)

(PVA)	Poli (vinil alkol)
(PVAc)	Poli (vinil asetat)
PVA-DVB-g-GMA-IDA	Polivinil alkol-divinilbenzen-g-glisidl metakrilat- iminodiasetik asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
(TED)	N,N,N'-tris-karboksimetil etilen diamin
(TLC)	İnce Tabaka Kromatografisi
(VTAZ)	1-vinil-1,2,4-triazol
(VIM)	n-vinil imidazol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1 Enzim immobilizasyon metodlarının şematik gösterimi	11
Şekil 2.2.3.1. İDA metal-protein kompleksi: immobilize bir Cu^{2+} iyonuna bağlı bir proteinin histidin rezidüsünün şematik gösterimi.	18
Şekil 2.2.3.2. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi.	20
Şekil 2.2.3.2.1. İMAK'daki şelatlayıcı ligandlar.	23
Şekil 2.6.1.1. Hidrolitik enzimler ve etki ettikleri kimyasal bağlar	35
Şekil 2.6.1.2. Glukoamilaz enziminin muhtemel çalışma mekanizması	37
Şekil 2.7.1.1. Nişastanın molekül yapısı	54
Şekil 2.7.1.2. Nişastanın organizasyonu	55
Şekil 2.7.1.3. Nişastadan çeşitli ürünler elde etmede kullanılan enzimler	56
Şekil 2.10.1. Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi.	60
Şekil 2.10.2. Lineweaver-Burk grafiği	67
Şekil 2.10.3. Eadie-Hofstee grafiği	68
Şekil 2.11.1. Poli(EGDMA-VTAZ) polimerinin sentez reaksiyonu	70
Şekil 2.11.2. Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerinin SEM mikrografı (a) Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerin yüzey görüntüsü; (b) Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerin kesit görüntüsü.	71
Şekil 4.1.1. Protein kalibrasyon grafiği	81
Şekil 4.2.1. Glukoz kalibrasyon grafiği	82
Şekil 4.3.1. Poli(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} mikroküreler üzerine glukoamilaz immobilizasyonuna pH etkisi: glukoamilaz konsantrasyonu, 1.0 mg/ml; zaman, 4 saat; T, 25 °C.	83
Şekil 4.4.1. Poli(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} mikrokürelerinin adsorbsiyon verimi üzerine glukoamilaz enzimi konsantrasyonunun etkisi: pH 6.5; zaman, 4 saat; T, 25 °C.	84
Şekil 4.5.1 Serbest ve immobilize glukoamilaz enzim aktivitesine pH etkisi. (■) Serbest enzim; (■) immobilize enzim (Spesifik aktivite) .	86
Şekil 4.5.2 Serbest ve immobilize glukoamilaz enzim aktivitesine pH etkisi. (■) Serbest enzim; (■) immobilize enzim (Bağlı aktivite) .	87
Şekil 4.5.3. Serbest ve immobilize glukoamilaz enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi. (■) Serbest enzim; (■) immobilize enzim (Spesifik aktivite) .	88

- Şekil 4.5.4** Serbest ve immobilize glukoamilaz enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi. (■) Serbest enzim; (●) immobilize enzim (Bağlı aktivite) . 89
- Şekil 4.6.1.** Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin depolanma kararlılığı. (■) Serbest enzim; (●) immobilize enzim. 90
- Şekil 4.7.1.** Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin termal kararlılığı. (■) Serbest enzim, 60 °C; (●) serbest enzim, 65 °C; (■) serbest enzim, 70 °C; (●) immobilize enzim, 60 °C; (*) immobilize enzim, 65 °C; (●) immobilize enzim, 70 °C. 91
- Şekil 4.8.1** İmmobilize glukoamilaz enziminin tekrar kullanımı : glukoamilaz konsantrasyonu, 1.0 mg/mL; pH 6.5; zaman, 4 saat; T, 25 °C. 93
- Şekil 4.9.1.** Lineweaver-Burk Grafiği (■) Serbest enzim; (●) immobilize enzim. 95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2.3.2.1. İMAK'da immobilizasyon için şelat oluşturuıcı bazı bileşikler	22
Çizelge 2.3.1. Destek materyali ve immobilizasyon metodu seçmede izlenecek yol	29
Çizelge 2.3.2. İmmobilizasyon metodlarının karşılaştırılması	30
Çizelge 4.1.1. Protein kalibrasyonu absorbans değerleri	80
Çizelge 4.2.1. Glukoz kalibrasyonu absorbans değerleri	81
Çizelge 4.3.1. Glukoamilaz adsorbsiyon kapasitesine pH etkisi	82
Çizelge 4.4.1. Glukoamilaz adsorbsiyon kapasitesine konsantrasyon etkisi	84
Çizelge 4.5.1. Serbest enzim aktivitesinin pH ile değişimi	85
Çizelge 4.5.2. İmmobilize enzim aktivitesinin pH ile değişimi	86
Çizelge 4.5.3. Serbest enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	87
Çizelge 4.5.4. İmmobilize enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	88
Çizelge 4.6.1. İmmobilize glukoamilazın tekrar kullanılabilirliği	90
Çizelge 4.7.1. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı	91
Çizelge 4.8.1. Serbest ve immobilize enzimin depolanma kararlılığı	92
Çizelge 4.9.1. Serbest ve immobilize enzimin başlangıç aktivitelerin substrat konsantrasyonuna göre değişimi	94
Çizelge 4.9.2. Serbest ve Cu ²⁺ -şelatlanmış poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelere üzerine immobilize edilmiş glukoamilaz enziminin özellikleri	94

1.GİRİŞ

Enzimler tüm canlı hücrelerde bulunan ve organizmada gerçekleşen kimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki moleküllerdir. Son yıllarda enzimlerin ticari katalizörler olarak kullanımına yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Enzimlerin sentetik katalizörler yanında (1) yüksek katalitik etkinlik , (2) spesifite , (3) hassasiyet ,(4) düşük sıcaklık ve basınçlarda kullanılabilme gibi birçok üstünlüğü vardır (Royer 1980). Daha ılıman reaksiyon koşulları sağlaması nedeniyle enzimler endüstriyel ölçekte kullanılması açısından da dikkat çekmektedir.

Enzimler başlıca; nişasta, deri, tekstil, petrol, deterjan, çay, soya, et - balık ve ekmek sanayinde, süt ve mamülleri, alkol ve bira, aroma ve tat maddelerinin üretiminde, meyve ve sebze işlemede, ve son yıllarda atık maddelerin arıtılmasında kullanılırlar. En önemli kullanım alanlarından bir diğeri de tıp ve eczacılıktaki uygulamalardır.

Enzimlerin çözünür formda endüstriyel proseslerde kullanımı çok yaygın değildir. Çünkü serbest enzimler çözünür formda sadece bir kez kullanılabilirler ve tekrar kullanılabilir formda geri kazanılmaları çok zordur. Ayrıca çözültide pH ve sıcaklık değişimlerine karşı dayanıksızdırlar ve bozularak aktivitelerini yitirirler. Proses uygulamalarında tekrar kullanım ve kararlılık için enzimler fiziksel ya da kimyasal metodlar kullanılarak polimerik destek materyalleri üzerine immobilize edilmektedir. Enzimler katı bir destek materyaline immobilize edildiğinde daha doğal bir çevreye sahip olurlar ve çoğu zamanda daha etkin bir fonksiyon gösterirler.

Enzimler serbest halde bir reaksiyonun katalizlenmesinde kullanıldığında, reaksiyon sadece enzimi deaktif ederek ya da ortam koşullarını değiştirerek (örneğin pH, sıcaklık) durdurulabilir. Immobilize enzim kullanılması durumunda ise destek materyalinin ortamdaki ayrılmasıyla reaksiyon kolayca durdurulabilir. Immobilize enzimlerin en önemli yararlarından biri de ürün kirlenmesini minimuma indirmesidir. Bu özellikle yiyecek ve ilaç endüstrisinde önem taşımaktadır.

Amiloglukosidaz (EC 3.2.1.3) olarak da bilinen, glukoamilaz (GA) biyokatalizördür ve çözünebilir nişastada ve ilgili oligosakkaritlerde anomerik konfigürasyonu inversiyona uğratarak, β -glukoz oluşturmak üzere α -1,4 glikozidik bağlarını hidrolize eder. Enzim, α -1,4 bağlarına olan etkisinin yanısıra nişastanın α -1,6 glikozidik bağlarını da yavaşça hidrolize eder. Kristalize D-glukoz ve glukoz şurubu üretimi glukoamilazın temel endüstriyel uygulamalarıdır. Endüstriyel enzimatik reaksiyonlarda, substrat ve çözülmüş enzim karışımı inkübe edilir. Her kademe tamamlandıktan sonra enzim deaktive olur. Enzim tekrar kullanılabilirse kuşkusuz proses daha ekonomik olacaktır. Bu yüzden nişastadan glukoz üretmede immobilize enzim teknolojisini kullanmaya karşı oldukça büyük bir ilgi vardır. Glukoamilaz enziminin immobilize edilmesi için bugüne kadar birçok yöntem kullanılmıştır: anyon-değiştirici reçine üzerine immobilizasyon (Tomar ve Prabhu 1985), manyetik partiküller (Bahar ve Celebi 2000), jel ile hapsedme (Czichocki ve ark. 2001), poroz olmayan PS/PnaSS mikroküreler üzerine kovalent bağlama (Oh ve Kim 2000), vb. Bu teknikler arasında, katı bir destek materyaline adsorbsiyon gibi “kovalent olmayan bir immobilizasyon tekniği” iyi bir seçim olacaktır; çünkü adsorbsiyon ile immobilizasyon oldukça basit, kolay ve zaman alıcı olmayan bir işlemdir ve destek materyalleri deaktive enzimin desorbsiyonundan sonra tekrar kullanılabilir. Böylece maliyet düşer ve atık miktarı da az olur. Tersinir metal-şelat immobilizasyonu, metallerin d-kabuğu orbitallerinin kolay polarize olabilme özelliklerinden dolayı proteinleri immobilize etmede en kolay yol olarak bilinmektedir (Torres ve ark. 2002). Pearson’ın Lewis asit-Lewis bazı kuramına göre Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Ni^{2+} gibi 1. sıra geçiş metalleri yumuşak Lewis asidi özelliği gösterirler (Pearson 1968). Dolayısıyla bunlar aromatik veya alifatik amino grubu içeren ligandlardaki azot atomlarının bağ yapmayan eşleşmemiş elektronlarıyla etkileşim gösterirler.

Bu çalışmada, *Aspergillus niger* glukoamilaz enzimi metal afiniteye sahip destek materyali üzerine adsorbsiyon ile immobilize edildi. Bu nedenle etilen glikol dimetakrilat ile 1-vinil-1,2,4-triazolün (VTAZ) kopolimerizasyonu ile poli(etilen glikol dimetakrilat-1-vinil-1,2,4-triazol) [poli (EGDMA-VTAZ)] mikroküreleri hazırlandı. Poli (EGDMA-VTAZ) mikroküreleri Cu^{2+} iyonunun sulu çözeltisiyle muamele edilerek Cu^{2+} -poli (EGDMA-VTAZ) şelat matriksi hazırlandı. Cu^{2+} iyonları, 1-vinil-1,2,4-triazol

şelat ligandlarına koordine olarak ve enzim şelat metal iyonu üzerinden polimere bağlandı. Enzim matriksinin hazırlanmasında kullanılan bu yaklaşım diğer immobilizasyon metodlarına göre birçok avantaja sahiptir. İmmobilize metal-afinite materyalinin hazırlanmasında pahalı, zaman alıcı ve kritik basamak şelatlayıcı ligandın adsorbsiyon matriksine bağlanmasıdır. Bu prosedürde, komonomer VTAZ metal-şelatlayıcı ligand olarak davranır. Ayrıca metal iyonlarını, başka aktivasyon ve ligand immobilizasyon basamakları kullanmaksızın direkt mikrokürelere yüklemek mümkündür. Çalışmamızda, poli (EGDMA-VTAZ)Cu⁺² mikrokürelere protein adsorbsiyon kapasitesine konsantrasyon ve pH'ın etkisi, serbest ve immobilize glukoamilaz aktivitesi üzerine sıcaklık ve pH 'ın etkisi, immobilize enzimin termal kararlılığı, tekrar kullanım ve depolanma kararlılığı gibi özellikleri araştırıldı.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1.Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilize enzim hareketi küçük bir alan içerisinde tamamen veya kısmen sınırlandırılmış enzim olarak tanımlanır. 1971’de gerçekleştirilen ilk enzim mühendisliği konferansında immobilize enzim terimi “katalitik aktivitesi korunarak, tekrar ve sürekli kullanıma olanak sağlayan, hareketi belli bir alan içinde sınırlandırılmış enzim olarak ifade edilmiştir (Chibata 1978). Enzim immobilizasyonu, enzimin substratı ile temasına engel olmaksızın farklı bir fazda hapsedilmesi olarak da tanımlanabilir. Ancak hareketinin bir mikroçevre içerisinde kısmen veya tamamen engellenmesi, immobilize enzimin bu fazda hiç hareket edemeyeceği anlamına da gelmez.

Enzimler canlı hücrelerde bulunan protein katalizörleridir. Enzimlerin birçoğu globüler yapıda olup molekül ağırlıkları 10000 ile bir milyon Dalton aralığında değişmektedir. Makromolekülün yüzey alanının çok küçük bir bölümünü oluşturan aktif bölge, bağlanma bölgesi ve katalitik bölgeden oluşmaktadır. Katalitik bölge genellikle metal iyonları ya da protein yapısında olmayan koenzimler içerir. Kimyasal proses mühendisliği açısından bakıldığında enzimler mükemmel katalizörlerdir. Oldukça ılıman reaksiyon koşullarında kullanılabilirler ve katalizde yüksek katalitik etkinlik ve spesifite gösterirler. Yüksek spesifiteleri nedeniyle klasik kimyasal metodlar ile gerçekleştirilemeyecek birçok reaksiyonu olanaklı hale getirirler. (Falb 1972). Sahip oldukları bu potansiyele rağmen enzimlerin serbest halde ticari biyokatalizörler olarak kullanımı çok azdır. Enzimleri serbest halde kullanmanın bazı dezavantajları şöyle sıralanabilir: (1) tek seferlik kullanım nedeniyle ortaya çıkan yüksek maliyet, (2) enzimin üründen ayrılma zorluğu, (3) enzimi maksimum kapasitede kullanabilmek için gerekli uzun reaksiyon süreleri , (4) yüksek maliyete ve enerji kaybına neden olan büyük reaktörlere ihtiyaç duyulmasıdır.

Bu dezavantajların birçoğu enzimlerin sentetik materyallere immobilize edilmesiyle giderilebilir. İmmobilize enzimler kesikli ya da sürekli sistemde

kullanılabilir ve immobilize enzimin ortamdaki kolayca ayrılabilmesi nedeniyle reaksiyon kolayca durdurulabilir. Kontrollü ürün oluşumu ve farklı biyoreaktörlerin dizayn edilmesiyle katalizde çok yüksek etkinlik değerlerine ulaşılabilir. Küçük reaktörlerde daha kısa reaksiyon sürelerine olanak veren yüksek enzim aktiviteleri ile kısa reaksiyon periyotlarında yan ürün oluşumu engellenebilir. Enzimlerin çözünmeyen taşıyıcı materyaller üzerine immobilize edilmesi onları daha doğal bir ortama taşıyarak çoğu kez daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar. Aynı zamanda immobilize enzimler katalitik etkinliklerini daha uzun süre koruyarak kullanımlarını daha da ekonomik hale getirirler. Enzim immobilizasyonu serbest enzime karşın ilave bir masraf gerektirmesine rağmen bu daha sonra çalışma koşullarında sağladığı avantajlar sayesinde mali dengenin sağlanmasına neden olmaktadır. Ürün saflaştırma maliyetleri de düşer. Çünkü immobilize enzimin kullanılması, yan ürün oluşumunu engellemektedir.

Değişen pH optimumları, Michaelis-Menten sabitleri ve çoğu zamanda değişen substrat spesifiteleri nedeniyle immobilize enzimler spesifik katalitik proseslerde kullanım açısından çok önemli bir potansiyele sahiptir. Immobilize enzimler aynı zamanda birkaç enzimin aynı taşıyıcı üzerine tutturulduğu çoklu enzim sistemlerinde de kullanılabilir.

İmmobilizasyonun aktivite ve reaksiyon sistemi üzerindeki kompleks etkisini kesin olarak öngörmek veya niceliksel olarak tanımlayabilmek zordur. İmmobilizasyon prosesi veya destek materyalinin özellikleri açısından bakıldığında, immobilize enzimlerin aktivitesini ve kararlılığını veya reaksiyon prosedürünü doğrudan etkileyen birçok faktör vardır.

Hangi metot kullanılırsa kullanılsın, immobilizasyon prosesi süresince enzimler, bağlayıcılar ve destek materyalleri arasındaki etkileşimden dolayı yapısal değişim meydana gelebilir. Sonuç olarak aktif bölgeyi veya modülasyon bölgesini içeren yapısal değişimler aktiviteyi, kararlılığı ve enzimin substratına olan seçiciliğini etkiler. Örneğin, iyon-değişimi metodu ile immobilizasyondan sonra, enzimin aktif bölgesinin

yanında destek materyali üzerindeki bölgesel yüklü gruplar elektrostatik mikroçevrede değişime neden olarak enzimin pH optimumunu kaydırırlar.

Sterik sınırlamalar, çözeltideki serbest enzimlerle karşılaştırıldığında destek materyalinin varlığında enzimler ve substratlar veya kofaktörler arasındaki etkileşimlerin engellenmesi olarak tanımlanabilir. Bağlayıcı hidrokarbon zincirlerinin (spacer arm) veya selüloz gibi açık modellenmiş destek materyalinin kullanımı ile bu durum büyük ölçüde düzeltilebilir. Destek materyalinin hidrofobikliği ve hidrofilikliği veya ortamın dielektrik sabiti, enzimlerin katalitik kapasitesini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen bir başka etkidir.

Bölme etkisi ise; substratlar, ürünler ve diğer etkileyiciler nedeniyle mikroçevre ve makroçevre arasında oluşan dengesiz dağılımdan kaynaklanır. Reaksiyon hızının değişmesiyle sonuçlanır. Diğer bir söyleyişle, kısmi çevre olarak tanımlanan mikroçevre, kütle fazından önemli derecede farklı olup immobilize enzime daha yakındır. Bölme etkisi nicel olarak bölme katsayısı ile tanımlanır. Örneğin, destek materyalleri substratlarla aynı veya farklı yükler taşıdıklarında, diğer kinetik parametreler gibi enzimin K_m değeri de, immobilizasyon ile değişir. Daha da ötesi, immobilizasyonun ardından destek materyalleri pozitif yüklendiğinde enzimatik katalizin pH optimumu asidik pH değerlerine kayar. Negatif yüklenmiş destek materyalleri ise pH optimumunu ters tarafa kaydırır. Destek materyallerinin hidrofobikliği de, substratların farklı hidrofobikliklerine bağlı olarak reaksiyon sisteminde rol oynar.

Difüzyon sınırlaması esas olarak immobilize enzimin çevresindeki Nernst tabakasından dolayı oluşmaktadır. Bu tabaka hemen hemen hareketsiz sıvı bir tabakadır ve kütle fazı ile enzim molekülleri arasında dengeleyicilerin hızlı çift yönlü transferini bloke eder. Difüzyon sınırlamalarının reaksiyon hızı üzerine etkisi kendi derecesine ve özgün reaksiyon hızına bağlıdır. Eğer enzimatik reaksiyon çok hızlı ise difüzyon sınırlamaları reaksiyon sisteminin kısıtlayıcı faktörleri olur. Normalde difüzyon sınırlamaları elimine edilebilir veya iyice karıştırılarak azaltılabilir.

Birçok enzim immobilizasyondan sonra yüksek kararlılık, kullanım ve depolanma süresine sahip olur. Muhtemel nedenler şunlardır: (1) immobilizasyon sonrası artan konformasyon kararlılığı ; (2) kimyasallar ve proteazlar gibi dezavantaj faktörlere karşı dayanıklı hale gelme; ve (3) enzim molekülleri arasında sınırlandırılmış etkileşim.

Serbest enzimle karşılaştırıldığında, immobilize enzimler daha yüksek termal kararlılık gösterirler. Çünkü artan konformasyon kararlılığı, yapısal değişimden kaynaklanan aktivite kaybını kısmen önler ve immobilize enzimler ısı uygulanması sırasında çökmeden korunur. Ayrıca denatüre edici ajanlara, inhibitörlere ve proteazlara karşı immobilize enzimlerin direnci geliştirilmiştir. Bazı immobilize enzimler organik çözücülere karşı da direnç gösterirler ve bu sayede organik sentezler veya dönüşümler için bazı susuz reaksiyon sistemlerinde uygulanabilirler.

2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu, spesifik enzimatik kataliz devam ederken, destek materyali veya taşıyıcılar ile enzimleri belirli bir alanda sınırlandırarak, enzimlerin geri kazanımına ve tekrar kullanıma olanak sağlayan en önemli biyotekniklerden biridir (Chibata 1978). Günümüzde immobilize enzimler, biyokimyada, biyoteknolojide, biyomühendislikte, biyomedikal mühendislikte ve buna benzer alanlarda geniş olarak kullanılmaktadır (Bahar ve ark. 1999). Serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, immobilize enzimler yüksek depolanma ve kataliz kararlılığı, kolay ayrılma ve tekrar kullanım, sürekli ve kontrol edilebilir proses, düşük maliyet ve sınırlı kirlilik gibi birçok avantaja sahiptirler.

Enzim immobilizasyon teknolojisi ilk ortaya çıkışından bugüne kadar oldukça ilerlemiştir (Bickerstaff 1995). İlk araştırmalar, kofaktöre gerek duyulmaksızın tek enzim sistemi üzerine kurulmuştur. Koenzimleri veya multi-enzim sistemlere ihtiyaç duyan çok basamaklı reaksiyonlara talebin artması nedeniyle immobilize enzim içeren daha kompleks yapılar, hücre içi organeller ve hücreler geliştirilmiştir. Mevcut uygulamalar için spesifik gelişmeler sağlamak ve immobilize enzimlerin uygulama

alanlarını genişletmek amacıyla son yıllarda çok daha fazla sayıda immobilizasyon metodu ve destek materyalleri kullanılmıştır. Destek materyalinin ve immobilizasyon metodunun seçimi, çeşitli özelliklerin ve immobilize enzimlerin sınırlamalarına karşı enzimatik uygulamaların gerekli niteliklerinin dengelenmesine bağlıdır.

Enzim immobilizasyonu, destek materyali ile enzimin hareket özgürlüğünü sınırlama esasına dayanır. Sonuçta aktivite azalır ancak kararlılığı gelişir. Ana husus uygun destek materyalleri ve uygun immobilizasyon metotlarını kullanmaktır. Immobilizasyon metodları kimyasal ve fiziksel yöntemler olarak iki ana başlık altında toplanmaktadır. Şekil 2.2.1'de kullanılan immobilizasyon metodları şematik olarak gösterilmiştir.

2.2.1. Kimyasal Yöntemler

2.2.1.1. Kovalent Bağlanma

Bu immobilizasyon metodu enzim ile destek materyali arasında kovalent bağ kurulması esasına dayanır (Cabral ve ark. 1991 , Woodward 1985). Bağlar genellikle destek materyalinin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar ile enzim yüzeyindeki amino asit kalıntılarının fonksiyonel grupları arasında oluşur.

Lizin veya arjininin amino grubu (NH_2), aspartik asit veya glutamik asidin karboksil grubu (CO_2H), serin veya treoninin hidroksil grubu (OH) ve sisteinin tiyol grubu (SH) gibi bir takım amino asit fonksiyonel grupları kovalent bağ oluşumunda yer almak için çok uygundur (Sreere ve ark. 1976).

Ticari olarak kullanılan destek materyalleri, çeşitli özellikleri ile kovalent bağlamada kullanıma elverişlidirler (Taylor 1991). Enzim aktivitesinin destek ortamında korunması için destek materyalinin hidrofilikliğı kilit faktördür. Bunun da aralarında bulunduğu birçok faktör immobilizasyonun etkisine tesir edebilir (Gemeiner 1992). Destek materyalinin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, uygun pH, sıcaklık ve iyonik şiddet koşulları altında enzim moleküllerini eşlemek için aktive edilebilirler.

Bunun için enzimlerin aktif bölgelerindeki aminoasitler ile bağlanmayacak gruplar tercih edilir. İmmobilizasyon proseslerinde yer alan dört ana tipte kimyasal bağ vardır: (1) izoüre bağı; (2) diazo bağı; (3) peptid bağı ve (4) alkilleme reaksiyonu.

Kovalent bağlama, enzim immobilizasyonunda en çok uygulanan metotlardan biridir. Çünkü enzim ve destek materyali birbirine kovalent bağ ile sıkıca bağlanır böylece immobilize enzim, endüstriyel proseslerdeki birçok etkiye karşı kararlı hale gelir ve sürekli kullanıma uygundur. Diğer yandan eğer enzimin aktif bölgesindeki kalıntılar destek materyaline bağlanırsa veya enzimin ya da destek materyalinin aktif bölgesinde yapısal değişiklik meydana gelirse enzim aktivitesi ciddi şekilde zarar görebilir. Toplam yüzey alanı, partiküllerin boyutu ve gözenekliliği gibi destek materyalinin yapısal etkileri de adsorpsiyon metodunda olduğu gibi immobilize enzimin katalitik etkinliğini önemli derecede etkiler.

Selüloz, dekstran (Sephadex), nişasta ve agaroz (Sepharose) gibi polisakkarit polimerler yüksek hidrofilik özelliklerinden dolayı kovalent immobilizasyon için en çok kullanılan destek materyalleridir. Bu polimerlerdeki şeker kalıntıları hidroksil grupları içerirler ki bu fonksiyonel gruplar kovalent bağ oluşturmakta kimyasal aktivasyon için idealdirler. Ayrıca hidroksil grupları, destek materyalinde hidrofilik ortam yaratmak için su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturabilirler. Mikrobiyal ya da mantarsı safsızlıklara karşı duyarlılık ve zayıf mekanik şiddeti bu polisakkarit destek materyallerinin dezavantajlarıdır.

Diğer popüler kovalent destek materyalleri gözenekli silika ve gözenekli camdır. Gözenekli silikalar, mikro-oyuklar ve küçük kanallar oluşturmak üzere bir araya gelmiş küçük küresel silika parçacıklarıdır. Bu destek materyali normalde mikroküre formunda oldukça kuvvetli ve dayanıklıdır. Gözenekli cam da dayanıklıdır ve mikrobiyal bozunmaya veya çözücülere karşı dirençlidir. Ancak bu iki destek materyalinin hidrofilitesi polisakkarit maddelere göre daha düşüktür.

Kovalent immobilizasyon yöntemi iki basamaktan oluşur: (1) destek materyalinin fonksiyonel grupları bir aktiveleştirici ile aktif hale getirilir; (örneğin

siyonejen bromür) ve (2) kalan aktifleştirciler uzaklaştırıldıktan sonra bağlama reaksiyonu gerçekleştirilir. Aktive edilmiş destek materyali ile enzim çözeltisi bazen direkt olarak bazen de glutaraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı reaktif varlığında kovalent bağ oluşturmak üzere karıştırılır. Kovalent bağlama ile immobilizasyon prosesi adsorpsiyondan daha karmaşıktır ve kovalent bağlama sisteminin bazı bileşenleri insanlar ve çevre için zararlıdır.

2.2.1.2. Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlama metodunun prensibi enzim ile çapraz bağlayıcılar arasında kovalent bağlar oluşturarak üç-boyutlu bir yapı oluşturmaktır. Enzimlerin moleküller içi ve aynı zamanda diğer tamamlayıcı protein molekülleri veya çözünmeyen destek materyali üzerindeki fonksiyonel gruplara (birincil aminler, sülfhidriller, vb.) çapraz bağlanması ile enzimlerin immobilizasyonu sağlanır.

Destek materyali olmaksızın enzimlerin moleküller içi çapraz bağlanması 1960'lerden bu yana dört şekilde geliştirilmektedir: Çapraz Bağlanmış Enzim Kristalleri (CLECs) (St Clair ve ark. 1992), Çapraz Bağlanmış Çözünmüş Enzimler (CLEs) (Cao ve ark. 2003), Çapraz Bağlanmış Enzim Yığınları (CLEAs) (Cao ve ark. 2002) ve Çapraz Bağlanmış Tek Yönlü-Kurutulmuş Enzimler (CLSDs) (Lopez-Serrano ve ark. 2002). Çözünmeyen destek materyalleri ile immobilize edilmiş enzimlerle karşılaştırıldığında, destek materyali olmaksızın çapraz bağlanmış enzimler şu avantajlara sahiptirler: geniş yüzey alanı, yüksek katalitik aktivite, çoklu-enzimlerin kullanılabilmesi, sınırlı difüzyon problemi, düşük maliyet, vb. Ancak bunun yanında, zayıf mekanik şiddeti ve düşük enzimatik aktivite geri kazanımı karşılaşılan problemler arasındadır. Katı destek materyallerinin kullanılması mekanik şiddeti arttırabilir. Enzimlerin, bazı destek materyallerine daha sonraki bir moleküller içi çapraz bağlanma amacıyla veya doğrudan destek materyalinin fonksiyonel grubuna çapraz bağlanması için önceden adsorpsiyonları bu problemi düzeltebilir ancak bu aynı zamanda immobilize enzimdeki protein yoğunluğunu azaltır. Enzimler ve çapraz bağlayıcılar arasında oluşan rastgele kovalent bağlar, proteinin konformasyonel değişime uğratması

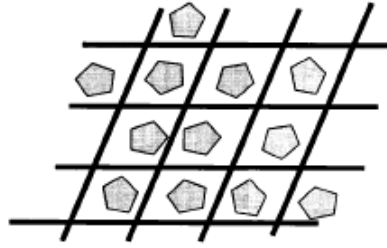
veya aktif bölgedeki aminoasit kalıntılarının anahtar kısımlarının etkinliğini yitirmesine neden olmasından dolayı daima enzim aktivitesini düşürür.



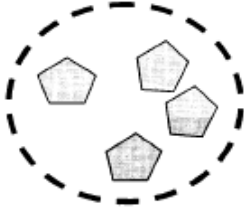
Adsorbsiyon



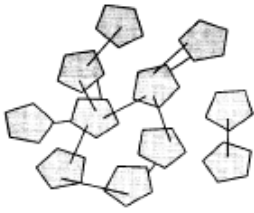
Kovalent Bağlama



Kafes Tipi Hapsetme



Mikrokapsül ile Hapsetme



Çapraz Bağlama

Şekil 2.2.1 Enzim İmmobilizasyon Metodlarının Şematik Gösterimi

Birçok uygulamada proteinin doğal yapısını korumak gerekir, dolayısıyla çapraz bağlama ılıman pH, sıcaklık ve tampon koşulları altında en çok kullanılan metottur. Ayrıca etkin immobilizasyon ve yüksek aktivite verimi için ideal çapraz bağlayıcı – protein molar oranları belirlenmelidir. Uygulamalara bağlı olarak konjügasyon derecesi de önemli bir faktördür. Çapraz bağlama sistemindeki bileşenlerin sayısı minimumda tutulmalıdır. Çünkü çok fazla bileşenden oluşan konjügasyonu analiz etmek zordur.

Çapraz bağlayıcılar homobifonksiyonel veya heterobifonksiyonel olabilirler. Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki özdeş reaktif gruba sahiptir. Proteinleri birbirlerine çapraz bağlamak için veya proteinin dördüncül yapısını stabilize etmek için tek basamaklı prosedürde kullanılırlar. İki değişik protein, tek basamaklı reaksiyonda karıştığında homobifonksiyonel reaktifler öz-konjugasyon, molekül içi çapraz bağlanma ve/veya polimerizasyon ile sonuçlanır. Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki farklı reaktif gruba sahiptir. Bunlar dizil (iki basamaklı) konjugasyonlara izin verirler ve istenmeyen polimerizasyonu veya özkonjugasyonu minimize ederler. Aminlerin modifikasyonu problemlidir olduğunda heterobifonksiyonel reaktifler kullanılırlar. Aminler bazen proteinlerin aktif bölgelerinde yer alırlar ve bu nedenle aminlerin modifikasyonu aktivite kaybına neden olabilir. Sülfhidriller, karboksiller, fenoller ve karbohidratlar gibi diğer gruplar daha uygun hedefler olabilirler. Örneğin, bir uçta amin reaktif diğer uçta da sülfhidril reaktif olan çapraz bağlayıcılar özellikle bu durumlarda kullanılırlar.

Glutaraldehit, benzersiz özelliklerinden dolayı en önemli çapraz bağlayıcıdır. Değişen pH, konsantrasyon, sıcaklık gibi çözümleri koşullarına bağlı olan 13 değişik formu bulunur (Bertrand ve ark. 2004). Glutaraldehitin protein immobilizasyonunda kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Ancak glutaraldehitin monomerik ve polimerik formları dengede olduğu için çapraz bağlanma prosesine katılan reaktif türler konusunda henüz bir yargıya varılamamıştır. Glutaraldehit proteinlere aldol kondenzasyonu ya da Michael katılması gibi reaksiyonlarla bağlanabilir.

2.2.2. Fiziksel Yöntemler

2.2.2.1. Adsorpsiyon İle İmmobilizasyon

Adsorpsiyon metotları, en basit immobilizasyon metotları olan fiziksel adsorpsiyon ve iyon-değişimini kapsar ve enzim ile taşıyıcı arasında tersinir yüzey etkileşimlerini içerir (Woodward 1985). Birbirini etkileyen kuvvetler van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve hidrofobik bağ etkileşimleri olduğu gibi en çok da iyonik elektrostatik etkileşimlerdir. Bu kuvvetler zayıftır, ancak bağlanma için yeterlidir. Bir

destek materyalinin adsorbsiyon kapasitesi, materyalin toplam yüzey alanına ve yüzeydeki aktif gruplarının sayısına bağlıdır.

Bu immobilizasyon metodunun avantajları: (1) kimyasal bir aktivasyon veya modifikasyon olmadığından enzimin doğal yapısı daha az zarar görür; (2) basit, ucuz ve hızlı bir immobilizasyon prosesidir; (3) enzim ve destek materyali kimyasal değişikliğe uğramaz, ve (4) etkileşim, destek materyalinin taze enzim ile rejenerasyonuna izin verecek şekilde tersinirdir. Diğer yandan iyon değiştirici bir destek materyali kullanmanın ana dezavantajı enzimin destek materyalinden sızmasıdır (Gooden 1997). Enzimin destek materyalinden desorpsiyonu, iyon konsantrasyonuna, pH değerine ve immobilize enzimin mikroçevresinin sıcaklığına bağlıdır. Bu yüzden bu parametrelerin üretim, depolanma ve katalizi içeren proses süresince olabildiğince sabit tutulması gerekir. Çözücüler, akış hızı, gaz kabarcıklarının oluşumu ve partikül-partikül sürtünmesi gibi fiziksel faktörler desorpsiyona neden olabilir.

Adsorbsiyon kapasitesinin yanı sıra katalitik etkinlik de destek materyalinin partikül yapısına bağlıdır. Gözeneksiz maddeler için, partikülün daha küçük bir yarıçapa sahip olması adsorbsiyon kapasitelerinin ve katalitik etkinliklerinin yüksek olmasını sağlar. Gözenekli maddeler için ise toplam yüzey alanı ve enzim molekülünün boyutu dikkate alınması gereken özelliklerdir. Aynı zamanda gözenekli partiküllerin sterik etkisi, substratın ve ürünün difüzyon sınırlamalarından dolayı katalitik etkinlik için anlamlıdır. Ayrıca, enzimin destek materyaline bağlanması immobilize enzimin mikroçevresinin pH değerini değiştirebilir, bu da enzimin pH optimumunun kaymasına yol açar. Non-spesifik bağlanma ise diğer bir dezavantajdır. Eğer substrat, ürün veya kalan atıklar yüklenirse ya da destek materyali ile etkileşime girerse bu adsorbsiyon kapasitesini ve reaksiyon kinetiklerini etkiler. Ayrıca, destek materyalini aşırı yüklemekten de kaçınmak gerekir. Çünkü bu düşük aktivite geri kazanım hızına neden olabilir (Fuente ve ark. 2004).

Kaolin, silikajel, diatomit, alumina, selüloz ve selloidin gibi bir takım organik veya inorganik maddeler van der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağı ile fiziksel

adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılır. Fiziksel adsorbsiyonun adsorbsiyon kapasitesi genellikle iyon değiştiricinininkinden azdır.

Çözeltideki bir iyon ile sabit katı matrikse bağlı aynı yüklü bir iyonun yer değiştirmesini içeren iyon değiştirme tersinir bir kimyasal reaksiyondur. Kullanılan katı matriksler nötral inorganik maddeler veya sentezlenmiş organik taşıyıcılardır. Sentetik organik taşıyıcılar günümüzde kullanılan ana türlerdir. Çünkü özellikleri spesifik uygulamalarla daha uyumludur. Bir iyon değiştirici taşıyıcı çözünmeyen bir polimerdir ya da enzimin yüzeyindeki aminoasit kalıntılarında da bulunan yüklü gruplar veya iyonlarla yer değiştirebilen destek materyalleridir. İmmobilizasyon prosedürü şu aşamalardan meydana gelir: (1) enzim çözeltisinin ve destek materyalinin uygun pH, iyonik şiddet, sıcaklık ve diğer koşullar altında hafif hızda karıştırılması, (2) immobilize edilmiş enzimin toplanması ve (3) bağlanmayan bileşenlerin uzaklaştırılması için yıkama.

Fonksiyonel grupları açısından farklılık gösteren başlıca dört çeşit destek materyali vardır: kuvvetli asidik (sülfonik asit grupları), kuvvetli bazik (trimetilamonyum grupları), zayıf asidik (karboksil grupları), zayıf bazik (amino grupları). Her bir taşıyıcı birim destek materyaline karşı maksimum değiştirici miktarını karşılayan belli sayıda hareketli iyon bölgesine sahiptir. Karboksimetilselüloz gibi kation değiştirici destek materyalleri ve dietilaminoetil selüloz (DEAE-selüloz) gibi anyon değiştirici destek materyalleri genellikle enzim immobilizasyonu için endüstriyel proseslerde kullanılan materyallerdir.

2.2.2.2.Hapsetme İle İmmobilizasyon

Hapsetme ile immobilizasyon metodu enzimlerin büyük polimer molekülleri arasına gömülmesi esasına dayanır ve iki ana formu vardır: (1)mikrokapsül ile hapsetme (2) kafes tipi hapsetme. Bu iki metodun ortak özelliği enzim moleküllerinin çözeltide serbest halde tutulmaları fakat kafes yapısındaki destek materyali (O'Driscoll 1976) veya seçici geçirgen membran (Groboillot ve ark. 1994) ile sınırlandırılmış hareketleridir. Benzer şekilde, immobilize enzimlerin hareket yeteneğini ve katalitik

etkinliğini önemli ölçüde etkileyen zayıf mekanik şiddet ve difüzyon ile substrat ve ürünlerin transferine karşı sterik engel bu iki metodun da dezavantajlarıdır.

2.2.2.2.1. Kafes Tipi Hapsetme

Kafes tipi hapsetme ile immobilizasyon prosesinde oluşan polimer matriks enzim sızıntısını engellerken substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe hareket etmelerine izin verir. Kafes tipi hapsetmede dört ana metot vardır: (1) makromoleküllerin çok değerlikli katyonlar ile ionotropik jelasyonu (e.g., aljinat); (2) sıcaklıkla başlatılmış jelasyon (e.g., agaroz, jelatin); (3) kimyasal veya fotokimyasal reaksiyon ile organik polimerizasyon (e.g., poliakrilamid); ve (4) karışmayan çözücünden çöktürme (e.g., polistiren).

Genelde proses enzimlerin monomer ve çapraz bağlayıcı reaktif ile çözeltide karıştırılmasıyla başlar daha sonra istenilen şekli elde etmek için bir kalıpta jel oluşum prosesini başlatmak üzere polimerizasyon aktifleştiriciler kullanılır. Elde edilen jel kalıp toplam yüzey alanını arttırmak için küçük küplere bölünebilir. Diğer yandan polimerleşmemiş çözelti küresel destek materyalleri elde edilmek üzere boyutları geri basınçla ayarlanabilecek ağızlıklara yönlendirilir. Daha sonra oluşan destek materyalleri yapısal katılıklarını arttırmak üzere sertleştirilir.

Birçok polimer arasından (poliakrilamid, kalsiyum aljinat ve jelatin), kalsiyum aljinat yiyecek ve ilaç endüstrisinde emülsiyonlama, sertleştirme, film oluşturma ve jelleşme ajanı olarak enzimin kafes tipi hapsedilmesinde en çok kullanılan maddedir (Haider ve ark. 2007). Aljinik asit 1-4 glikosidik bağlarla birleştirilmiş α -L-guluronik asit (G) ve onun C-5 epimeri β -D-mannuronik asidin (M) dallanmamış ikili kopolimeridir. Yapıyı oluşturan çeşitli (100-3000) blokların birbirine kuvvetli ve kısmen esnek zincirlerle bağlanmasıyla oluşur (Hartman ve ark. 2002). İki monomerin dağılımı kadar oranları da çeşitli fizikokimyasal özelliklere yol açar. Bu polisakkaritlerin çözünebilir tuzları genellikle aljinatlar olarak adlandırılır. Jeller, kalsiyum, stronsiyum ve baryum gibi katyonların varlığında, aljinat çözeltide çözüldükten sonra iyon-değiştirici reaksiyon ile oluşturulurlar. Vizkozite aljinat

moleküllerinin boyuna bağlıdır. Çözünmüş ve sulu aljinat molekülleri çoklu-kovalent katyonlarla çapraz bağlanırlar böylece aljinat mikroküreleri yüksek enzim aktivitesinin elde edilmesini sağlayan ılıman koşullarda oluşurlar. Diğer yandan bu özellik sodyum ve fosfat iyonları gibi iyonların multi-kovalent katyonlarla kolayca yer değiştirmesi nedeniyle dezavantaj oluşturur. Bu nedenle jelden kolayca ayrılabilen bu iyonların substrat çözeltisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaması gerekir.

Enzimlerin aljinat mikroküreler içerisine immobilizasyonu iki aşamadan oluşur. İlk aşamada aljinat ve enzimlerin multi-kovalent katyonlar içeren çözelti içerisine küçük damlalar halinde dağılması gerekir. İkinci aşamada damlalar damla yüzeyinde jelleşme ya da membran oluşumu ile katı hale dönüştürülür.

Sıcaklıkla gerçekleştirilen jelleşme oldukça basit bir metottur. Matriks materyalinin sıcaklık değişimiyle faz transferi gerçekleştirilir. Oluşan jeller yumuşak ve kararsızdır fakat κ -carrageenan polimerlerinin ilavesiyle stabilize edilebilir. Sözü edilen üç jel arasında poliakrilamid kovalent çapraz bağlı polimerik ağ ile enzimlerin hapsedilmesinde en sık kullanılan matrikstir. Jelin gözenek büyüklüğü ve mekanik yoğunluğu monomer ve çapraz bağlayıcı ajanın oranı değiştirilerek belirlenebilir. Poliakrilamid jel noniyonik olmasından dolayı avantajlıdır. Çünkü enzimler jel matriks içerisinde çok az bir değişime uğrarlar ve aynı zamanda yüklü moleküllerin difüzyonu engellenmez. Fakat bununla birlikte polimerizasyon başlatıcısı olan dimetilaminopropionitril oldukça toksiktir ve dikkatli kullanılmalıdır.

Karışmayan çözücülerden çöktürme ile ilgili son metodun kullanımı kararlılığı yüksek ya da daha önceden stabilize edilmiş enzimlerle sınırlıdır. Çünkü birçok enzim faz ayrımı ile enzim çökmesinin gerçekleştiği organik çözücülerde dayanıksızdır.

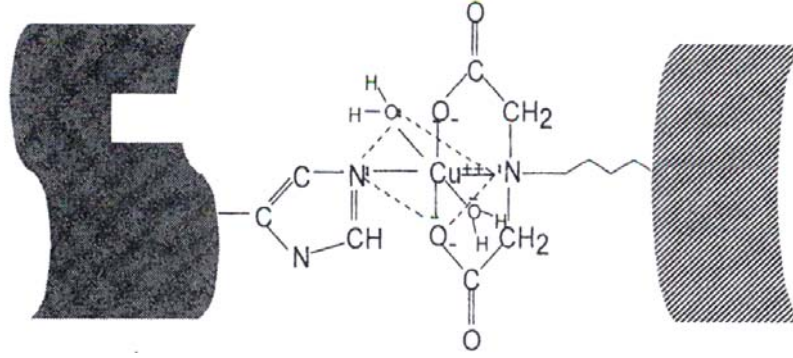
2.2.2.2.2 Mikrokapsül İle Hapsetme

Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi, yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesini içerir. Naylon ve selüloz nitrat gibi birçok madde, çapı 10 ~ 100 μm arasında değişen mikrokapsüllerin yapımında kullanılmıştır. Substrat ve

ürünün difüzyonuna ilişkin aynı problem daha akuttur ve ürünlerin ani birikmesi ile mikrokapsüllerde kırılmalarla neden olur. Aynı zamanda aynı yoğunluktaki mikrokapsüller ve dış çözelti, reaktör konfigürasyonunda ve akış dinamiğinde problemlere yol açabilir. Ancak çeşitli enzimlerin istenen bir şekilde bir araya geldiği ve çok basamaklı reaksiyonda uygulandığı koimmobilizasyon bu metodun önemli bir avantajıdır.

2.2.3. İmmobilize Metal Afinite Yöntemi

İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi (İMAK)' nın başlangıcı, Helfferich' in küçük moleküllerin "ligand değişim kromatografisi" ni öne sürdüğü 1961'e kadar uzanmaktadır. Biorad tarafından pazarlanan Chelex 100 gibi şelat yapıcı bir reçine, küçük metal iyonlarının bir katyon değiştirici olarak kullanıldığı iminodiasetat ligandlarını ihtiva eder. Makromoleküller için bir afinite ligand olan iminodiasetatın kullanımı, Porath ve arkadaşları tarafından 1975'e kadar geliştirilememesine karşın daha sonra Porath, ligand değişimini de içine alan metal şelat etkileşim kromatografisinin bütün şekillerini kapsayan "immobilize metal iyon afinitesi" terimini ortaya koymuştur. Porath, ilk olarak bir protein molekülünün, metal iyon afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak, saflaştırılabildiğini gözlemledi. Katı bir destek üzerine metal iyonunu immobilize etmek için şelatlayıcı bir ajanın kullanılması, protein-metal etkileşimlerinin serbestlik derecesini azaltmaktadır. Bu kısıtlama, proteinlerin zengin saflaştırılması ve ayrılmasına olanak sağladığı gibi, denaturasyonu azaltabilir ve aktivitesini devam ettirebilir. Çözeltideki metal kompleks çalışmaları üzerine kurulu şematik bir resim Şekil 2.2.3.1' de gösterilmiştir.



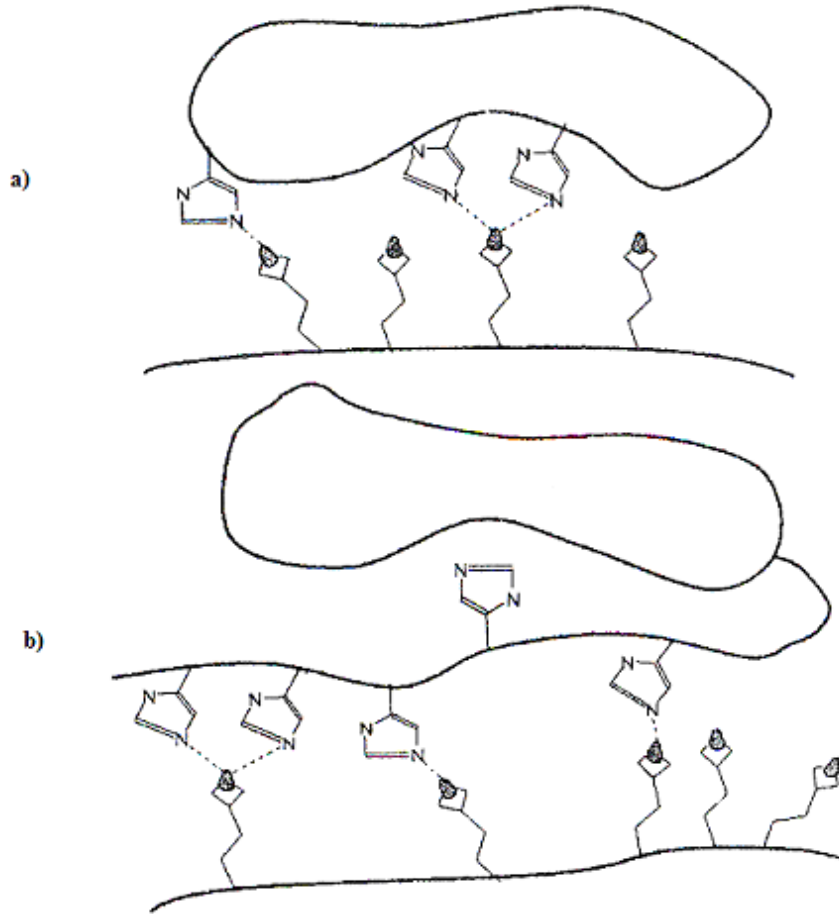
Şekil 2.2.3.1. İDA Metal-Protein Kompleksi: immobilize bir Cu^{+2} iyonuna bağlı bir proteinin histidin rezidüsünün şematik gösterimi. Metal, katı bir desteğe bağlı İDA ile şelat oluşturuyor.

Bir İMAK kolonu, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} gibi herhangi bir iyon çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle yüklenebilir. Çözeltiyi kolondan geçirme işlemine, çözeltideki metal iyonu ile sabit fazda şelat oluşturan metal iyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam edilir. İminodiasetikasit (İDA) gibi bir ligand, silika veya polimer bazlı olan katı destek materyale bağlanır. Kolon birkaç kez aşırı metal çözeltisiyle doldurulur ve uygun bir tampon ile dengeye getirilir. İlgilenilen biyolojik olarak aktif ürünleri ihtiva eden bir karışım, kolondan geçirilir. Karışımda bulunan bileşiklerden, liganda eşlenik olmayan moleküller kolondan geçer. İmmobilize metal-ligand kompleksi için afinite gösteren ürünler ise kolonda tutunur.

Metal afinite ile protein adsorpsiyonunda triptofanın indol, sistenin tiyol ve histidin imidazol grubu gibi ortaya çıkan elektron verici amino asit kalıntıları, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Biyopolimerlere ligandın bağlanması, metal şelasyonunun yanı sıra elektrostatik, hidrofobik ve Van der Waals etkileşimlerini de içermektedir. Proteinler, immobilize metal ile aralarındaki afinite sabitini azaltan bazı şartlarda, komplekslerinden ayrılabilirler. Tuz konsantrasyonunun değişimi, pH'nın değişimi veya bağlanmada görev alan amino asit rezidülerine benzerliği bulunan yarışmalı bir ajanın ortama eklenmesi, proteini bağlı bulunduğu kompleksten uzaklaştırabilir. İmidazol ve histidin, İMAK' da bağlı proteinleri uzaklaştırmak için yaygın olarak kullanılan iki yarışmalı ajandır. Bu desorpsiyon metotlarının birinde, tek basamak veya gradiyent elusyon şekli, proteinleri saflaştırmak veya uzaklaştırmak için seçici olarak kullanılabilir.

İMAK' da proteinlerin adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici gruplar ile immobilize bir metal iyonu arasındaki koordinasyon bağı oluşumuna dayanır (Şekil 2.2.3.2). Çoğunlukla kullanılan metaller, Lewis asitleri olarak düşünülebilen ve elektron çifti kabul eden Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , gibi geçiş metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlanan şelat oluşturucu bileşiklerde bulunan (N, S, O) gibi elektron verici gruplar, ortamda bulunan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak, iki dişli, üç dişli vb olabilen metal şelatları oluşturarak, metal iyonları ile koordinasyon bağı yapabilirler. Geride kalan metal koordinasyon bölgeleri normalde su molekülleri tarafından işgal edilir. Daha sonra proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilir. Bazı amino asitler, özellikle yan zincirlerindeki elektron verici atomlarından dolayı bağlanma için uygundur. Glutamat, histidin, arginin, lizin, asparagin, tirozin, sistein ve metiyonin gibi çoğu artıkların bağlanmaya katılabilmesine rağmen, İMAK' de proteinin gerçekte alıkonması histidil kalıntılarının varlığı temeline dayanır. Triptofan, fenilalanin, ve tirozin gibi aromatik yan zincire sahip amino asitlerde, eğer dışarı uzanabilen histidil kalıntılarına yakın iseler onlar da bağlanmaya katkıda bulunabilir.

Afinite kromatografisinde geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında, İMAK pek çok avantaja sahiptir. Farklı metal iyonları, şelat oluşturucu ligand üzerine immobilize edilebilir ve daha güçlü şelat yapan başka bir ajan ile ortamdan uzaklaştırılabilir. Çoğu durumda proteinler, İMAK kolonlarından elue edildikten sonra bile hala aktivite gösterirler. Bir çözelti aynı zamanda, içinde metal iyonları olmayan bir İMAK kolonundan geçirildiğinde çözelti, içindeki metal iyonlarının uzaklaştırılmasıyla sterilize edilebilir. Bu basamak, bakterilerce ihtiyaç duyulan metal besinlerinin uzaklaştırılmasıyla bakteriyel kontaminasyon riskini önler.



Şekil 2.2.3.2. Metal şelat afinite desteklerine protein bağlanmasının gösterimi. **a)** Protein yüzeyindeki histidin grupları ile metal-şelat etkileşimi **b)** Proteinin C veya N terminaline ilave edilen His-etiketi ile metal-şelat etkileşimi **Kaynak:** Protein kromatografisi yaz okulu kitapçığı sayfa:136

2.2.3.1. İMAK için Kromatografik Destekler (Matriksler)

Destek materyalinin seçimi afinite sistemlerde üzerinde durulması gereken öncelikli parametredir. Matriks İMAK'a uygun olabilmesi için aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

1. Kolay türevlendirilebilme
2. Yüksek hidrofilik karakter ve son derece düşük non-spesifik adsorpsiyon
3. Yüksek miktarda ligand immobilizasyonu için yüksek porozite
4. Geniş gözenek boyutu ve dar gözenek boy dağılımı
5. Hidroksil, karboksil ve amid gibi fonksiyonel yüzey gurupları
6. Farklı şartlardaki fiziksel, kimyasal, termal ve mekaniksel dayanık
7. Yüksek akış hızlarında kullanılabilme

8. Matriksde herhangi bir bozunma olmaksızın kolonun kolayca rejene edilebilmesi

9. Kromatografi işlemi süresince herhangi bir büzülme ve şişme olmaksızın kararlı bir yatak oluşturma özelliklerine sahip olmalı.

Afinite kromatografisi için kullanılan çeşitli destek materyalleri vardır. Matriks, bir protein ile immobilize metal arasında şekillenen kompleksin dayanıklılığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir. Küçük partiküllü destekler, akış hızına karşı büyük bir direnç gösterir ve kolon tıkanabilir. Geniş partiküller, akış rezistansını düşürürler fakat kolon etkinliğini (ayırma kapasitesini) azaltırlar. Farklı formdaki partiküller, düzensiz bir dolgu oluşturabilir ve bu da kanallaşmaya neden olabilir. Kolon dolgu maddelerinin bakterilere karşı göstereceği direnç de önemli bir özelliktir.

2.2.3.2. İMAK'da Kullanılan Şelat Oluşturucu Ligandlar

Sulu bir ortamda metal iyonları, su molekülleri tarafından çevrilerek çözünür. Metal iyonu bir Lewis asiti, su ise Lewis bazı gibi davranır. Su daha güçlü bir baz ile yer değiştirdiği zaman, bir koordinasyon kompleksi oluşur.

İMAK 'da metal iyonlarının immobilizasyonu için genellikle kullanılan şelatlayıcı ligand, İDA'dır. İMAK' da kullanılan bazı şelat oluşturucu ligandlardan bazıları Şekil 2.2.3.2.1 ' de gösterilmektedir. Ni^{2+} için en çok kullanılan şelat oluşturucu ajan nitrilotriasetiktir (NTA). Cu^{2+} iyonu üç dişli ligand İDA ile şelat oluşturduğu zaman, biyopolimer etkileşimleri için açıkta olan yalnızca bir koordinasyon bölgesine sahip iken, Ni^{2+} üç bölgeye sahiptir. Bunun yanında, Ni^{2+} , İDA ile sıkıca bağlanmaz ve matriksden sızar. TED, Ni^{2+} yi sıkıca bağlar, fakat; ligand değişimi için geride yalnızca bir koordinasyon bölgesine sahiptir. Matrikse bağlı nitrilotriasetik (NTA) içeren dört dişli bir şelatlayıcı adsorbent, Ni^{2+} metal koordinasyon küresinin dört pozisyonunu işgal edebilir. Sekiz koordinasyon küresinde geriye kalan iki ligand pozisyonu seçici protein etkileşimleri için kullanışlıdır. Çizelge 2.2.3.2.1. İMAK'da immobilizasyon için kullanılan şelat oluşturucu bazı bileşikler ve bağlanabildikleri metal iyonları özetlenmiştir.

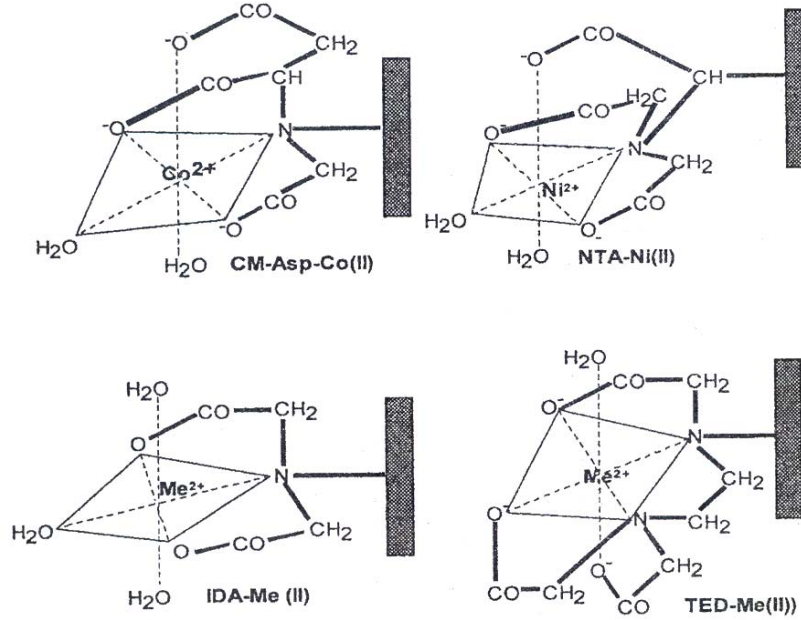
Çizelge 2.2.3.2.1. İMAK'da immobilizasyon için şelat oluşturuucu bazı bileşikler

Şelatlayıcı Bileşik	Koordinasyon	Metal İyonu
Salisilaldehit	İki Dişli	Cu (II)
8-hidroksikinolin (im-8-HQ)	İki Dişli	Al (III), Ca (II), Fe (III), Yb (III)
N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH)	İki Dişli	Fe (III)
Dipikolilamin (DPA)	Üç Dişli	Ni (II), Zn (II)
İminodiasetik asit (IDA)	Üç Dişli	Cu (II), Ni (II), Zn (II), Ga (III)
O-fosfoserin (im-OPS)	Üç Dişli	Al (III), Ca (II), Fe (III), Yb (III)
Tris(2-aminoetil)amin (TREN)	Üç Dişli	Cu (II)
1,4,7-triazosiklononan(tacn)	Üç Dişli	Cu (II), Cr (III), Mn (II), Co (II), Zn (II), Ni (II)
Nitriлотriasetik asit (NTA)	Dört Dişli	Cu (II), Ni (II), Zn (II)
Karboksimetillenmiş aspartik asit (CM-Asp)	Dört Dişli	Ca (II), Co (II)
N-metakriloil-(L)-sistein metil ester (MAC)	—	Fe (III)

2.2.3.3. Koordinasyon Kimyası

Ne tür bir ligandın seçileceği ve belirli bir metal iyonunun bir liganda bağlanmasıyla nasıl bir geometrik şeklin oluşacağı, koordinasyon kimyasının iki önemli sorunudur. Pearson tarafından geliştirilen sert ve yumuşak asit ve baz prensipleri, bu iki sorunu çözmek için kullanılabilir. Sert ve yumuşak asit baz yaklaşımında, birlikte bağlanan iki atomdan birinin Lewis asiti diğerinin ise Lewis bazı rolü oynadığı kabul edilmektedir. Bağ kuvvetleri, asit ve bazın kuvvetiyle ilişkilendirilmektedir. Bu görüşü kuvvetli asitlerin, kuvvetli bazları tercih ettiğini ayrıca tercih edilen bir bağlanmanın, tercih edilmeyen bir bağlanmadan daha sıkı olduğunu ileri sürmektedir.

Zayıflık parametreleri elektronik orbital şeklinin bozulabilmesinden veya bir türün polarize olabilmesinden ortaya çıkmaktadır. Eğer elektronlar oynak ise zayıf bir tür, elektronlar sıkı bir şekilde tutuluyor ise kuvvetli bir türdür. Elektronegativite (baz), elektropozitivite (asit), oksidasyon durumu, büyüklük, bağ tipleri (iyonik veya kovalent), elektron alma ve verme istekleri kuvvetli ve zayıf asitleri sınıflandırmada diğer karakteristik özelliklerdir. Zayıf bir baz değerlik elektronlarını gevşek bir şekilde tutar, yüksek polarizasyon kabiliyetine sahiptir ve kolaylıkla yükseltgenir. Kuvvetli bir asit ise küçük bir hacime ve yüksek oranda pozitif yük yoğunluğuna sahiptir, ayrıca değerlik kabuğunda ortaklaşmamış elektron içermezler.



Şekil 2.2.3.2.1. İMAK'daki şelatlayıcı ligandlar. CM-Asp: (Karboksi metilenmiş aspartik asit), NTA: (Nitrilotriasetik asit), IDA: (İminodiasetik asit), TED: (N,N,N'-tris-karboksimetil etilen diamin) **Kaynak:** Protein kromatografisi yaz okulu kitapçığı , s. 141

Kuvvetli bazlar ile zayıf asitler bu tanımın tersine sahiptirler. Yumuşak asitlere örnek olarak tek değerlikli Ag⁺, Au⁺, Hg⁺, Cu⁺ iyonlarını, sert asitlere örnek olarak da K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ iyonlarını örnek olarak verebiliriz. Ayrıca Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ ve Ni²⁺ iyonlarını da sınır metal ailesine örnek olarak verebiliriz. Amonyak, amin, sülfat, karbonat, fosfat ve perklorat sert bazlara örnek olarak verilebilirken, siyanür ve sülfür ihtiva eden grupları da yumuşak bazlara örnek verebiliriz. Farklı metaller şelatlandıkları

zaman, proteinlere karşı reaktiviteleri değişime uğrar. Amino asit ligandların farklı metallere karşı reaktiviteleri sert yumuşak asit baz prensibi ile tahmin edilebilir. Bu prensiplere göre ligand verici atomların üç temel modeli vardır. Bunlardan, karboksilattaki oksijen, asparajin ve glutamindeki alifatik azot ve fosforillenmiş amino asitteki fosfor kuvvetli baz olarak sınıflandırılır. Histidin ve triptofandaki aromatik azot sınır olarak sınıflandırılırken sisteindeki sülfür ise zayıf bir baz olarak sınıflandırılır. Çift değerlikli sınır metalleri olan Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} , tercihen sınır bazlarından olan azot atomları ile koordine olurlar.

Metal komplekslerinin geometrisi, metalin koordinasyon sayısı ile ilgilidir. Koordinasyon bileşiğinin yapısı, elektriksel nötralliği korumak amacıyla kompleks iyon ile gevşek olarak birleşmiş olan diğer iyonlara sıkıca tutunmuş bir ligand grubuna bağlanmış bir metal iyonundan yapılmış kompleks olarak adlandırılan bir çekirdekten ibarettir. Geçiş metal komplekslerinin, ligandları ile oluşturdukları bağlar, ligandların bağlayıcı orbitalleri ve metalin s, p ve d orbitallerini içermektedir. Moleküler orbital teorisi, metal ligand kompleksleri için enerji seviyeleri ve nitel bağ şekillenmesini tanımlamak için kullanılmaktadır.

2.2.3.4. Serbest Çözeltide ve İmmobilize Formdaki Amino Asit Metal Etkileşimleri

Amino asitler çözeltideki pek çok metal iyonu ile dayanıklı, sürekli şelat halkalarını oluştururlar. Amino asitlerin genel yapısı α amino ve karboksil grubundan ibaret olan $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COO}^-$ yapısında olup, her iki grup da şelat oluşumuna katılır. Bazı amino asitler yan R zincirinde bulunan ve kompleks oluşturmada α -amino ve karboksil gruplarıyla yarışan, etkili verici atomlara sahiptir. Amino asitlerin NH_2 ve COO^- olmak üzere iki verici atom grubu vardır. Amino asitler hem metal-karboksilat tuzu hem de amin-metal gruplarıyla kompleks oluştururlar veya her ikisiyle birlikte beş üyeli halka oluştururlar. Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi sınır metal iyonları şelat halkası oluşturmayı tercih ederken, Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi daha sert metal iyonları karboksilat anyonlarıyla tuz oluşturur. Eğer amino asitin R yan grubu arjinin ve glutamin gibi pozitif yüklü ise oluşacak kompleks, pozitif yüklü metal ile itici etkileşimden dolayı daha az dayanıklı

olur. Sert asit-Yumuşak baz etkileşimi yapıyı bozar. Eğer yan grup aspartat ve glutamat gibi negatif yüklü olursa, ekstra yük, metal ile güçlü dayanıklı bir kompleks vermek üzere dimerizasyon yapar.

Histidin ve sistein, reaktif yan gruplara sahiptir ve güçlü kompleks ajanları oluşturur. Histidin, 5, 6 ve 7 üyeli halkaları da kapsayan dört farklı yolla kompleks oluşturabilir. Histidin, karboksilat ve α -amino gruplarını içine alan 5 üyeli halka, α -amino ve imidazol gruplarını içine alan 6 üyeli halka veya karboksilat ve imidazol grupları 7 üyeli bir halka aracılığıyla bir metal iyonuyla birleşebilir ayrıca bir metal iyonu ile histidinin bütün verici gruplarının birleştiği bir yapıyı da oluşturabilir.

Serbest çözeltideki protein-metal iyonu etkileşimlerinde göz önünde bulundurulacak olan birkaç faktör vardır. Karboksil, imidazol ve sülfhidril gibi yan zincir grupları, terminal amino ve karboksil gruplarına metal iyonu bağlamada daha etkindir. Ligand grupları üzerindeki yükler, metal iyonu ile bağlanma afinitesine etki eder. Metal iyonları için bağlanma sabitleri pH'nın düşmesiyle azalır, çünkü: $-\text{NH}_2$, $-\text{S}^-$ ve $-\text{COO}^-$ gibi ligandlara bağlanmak için protonlar, metal iyonlarıyla yarışmaya başlarlar. Protonlanmış amino grupları üzerindeki pozitif yük, pozitif yüklü metal iyonlarını uzaklaştırır, ayrıca karboksilat ve sülfür gruplarının protonlanması, metal iyonlarına olan çekici gücü yok eder.

Çözeltideki doğal bir proteinin üçüncül yapısı, protein üzerindeki fonksiyonel ligandların bir metal iyonuna yaklaşmasını engeller. Proteinler pek çok ligand gruplarına sahip olmasına rağmen, ancak bir veya iki metal iyonu onlara bağlanabilir. Bazen bir metal iyonu sadece bir grup tarafından tutulabilir. Belirli proteinlerde aktif merkez olarak isimlendirilen bazı ligand grupları, bir metal iyonu ile yapılan şelat oluşturmada düzenleyici rol oynar. Diğer proteinlerde ligand vericiler, o kadar iyi düzenlenemeyebilir ve metal iyonu iki farklı grup arasında tutunabilir. Bir metal iyonuna elektronlarını verebilen herhangi bir grup, bunu bir proteine de yapabilir; bundan dolayı, metal iyonlarıyla proteinler arasındaki yarışma çok önemlidir. Sonuç olarak, immobilize bir metale protein bağlanması pH ve iyonik şiddete bağlıdır.

2.2.3.5. İMAK 'da Peptit ve Proteinlerin Adsorpsiyon-Desorpsiyon Mekanizmaları

İMAK' da proteinlerin metal iyonlarına bağlanmasının elektronca zengin ligandların, metal komplekslerindeki, su gibi zayıf bağlı ligandlarla yer değiştirmesiyle gerçekleştiğine inanılmaktadır. Porath ve arkadaşları, İMAK' da alıkonma davranışının açıkta olan histidin, triptofan ve sistein merkezlerinin yüzey yoğunluğuyla kontrol edildiğini öne sürmüşlerdir. Spesifik metal iyon-protein koordinasyon kompleksleri oluşumunda, elektrostatik, hidrofobik ve yük-transfer etkilerinin yanında, metal-iyon protein etkileşimleri de etkin olabilir. Proteinlerin bağlanması, bu elektronca zengin amino asitlerin, metal komplekslerindeki zayıf koordine olmuş su ile yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Metal, bu amino asitlere elektron verebilir veya bunlardan elektron alabilir. Bir protein, sabit bir matriks ile şelat oluşturmuş bir metalle etkileştirildiğinde, koordinasyon bağları ve çok noktali bağlanma yapabilir. Bu bağlanma, yüksek tuz derişimlerinde seçimlidir. Çünkü, yüksek iyonik güç, elektrostatik etkileşimlerin olasılığını azaltır.

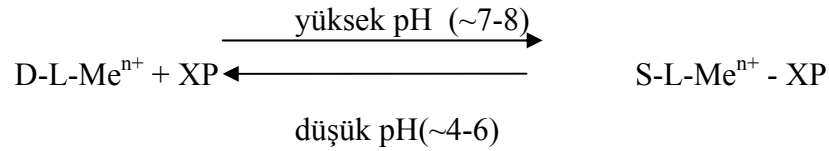
Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri, protonlama, iyonik şiddet değişimi, ligand değişimi veya şelat oluşumunu engelleyerek gerçekleştirilebilir. Protonlama, elusyon için yaygın bir prosedürdür. Protein yüzeyindeki elektron verici grubun protonlanması, koordinasyonu tersine çevirerek proteinin ayrılmasını sağlar.

Cu^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} veya Ni^{+2} gibi sınır Lewis asitleri kullanıldığında, adsorpsiyon, yüksek tuz derişiminde gerçekleşir. Adsorpsiyon kapasitesi ve seçimliliği, tampondaki tuz derişimi arttıkça artar. Tuz derişimini azaltmak, bazı proteinler için desorpsiyona neden olabilir. Elektrolitlerin tutunma üzerindeki etkisi, metal iyonlarının solvate olmuş su moleküllerine ilgisiyle bağlantılıdır. Metal iyonlarıyla su molekülleri arasındaki çekim gücünün, tuz tarafından zayıflatılması, adsorpsiyon prosesini kolaylaştırır. İyonik şiddet arttıkça adsorpsiyon seçiciliği arttığına göre, proteinlerin kısmi ve seçimli elusyonu, eluentteki tuz derişimini azaltarak gerçekleştirilebilmelidir.

Bununla birlikte çeşitli proteinlerin adsorpsiyonu ve elusyonu Fe^{3+} gibi kuvvetli bir Lewis asidinin, bir İDA kolonuna immobilizasyonu ve NaCl derişiminin 0' dan 1M'a kadar arttırılmasıyla gerçekleştirilir.

2.2.3.6. pH Etkisi

Adsorpsiyon/desorpsiyon basamağı bütün afinite kromatografisi proseslerinin kalbidir. Proteinlerin İMAK jeline adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupların, protonlarını kısmen kaybettikleri bir pH' da gerçekleşir. Protein adsorpsiyonu genellikle zayıf bazik bir pH' da yapılır. Spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltmak için, pH tamponuna bir tuz katılır. Fosfat ve asetat tamponları yaygın olarak kullanılır. Reaksiyon şöyle gösterilebilir:



Burada D desteği, L ligandı, Me^{n+} immobilize metal iyonu ve X, P proteininin aktif *yan* gurubunu sembolize eder (3).

pH, alıkonma ve elusyon proseslerinde karmaşık bir rol oynar. Çünkü: Tampon bileşenlerinin nükleofilik davranışını, çözücülerin elektron alıcı-verici özelliklerini ve metallerin kararlılığını etkiler. Histidin veya sistein seçiciliğinin pH 6-8 aralığında yüksek olmasından dolayı, bu grupları taşıyan proteinlerin adsorpsiyonu bu pH aralığında gerçekleşir. Bazik bir pH değerinde, amino gruplarıyla koordinasyon gerçekleşir; böylece adsorpsiyon daha etkin fakat daha az seçimli olur .

2.3. İmmobilizasyon Metodlarının Karşılaştırılması

Enzimlerin gözenekli destek materyalleri üzerine adsorpsiyonu basit ve ucuzdur. Fakat bununla birlikte adsorbe enzimlerin taşıyıcı materyaleden sızması söz konusudur. İmmobilize enzimin kullanımı esnasında pH, sıcaklık ve iyonik şiddetteki değişim enzimin desorpsiyonuna neden olabilmektedir.

Enzimlerin polimerik jeller içerisine hapsedilmesi ucuz bir tekniktir ve oldukça ılıman koşullarda gerçekleşebilir. Fakat bu metodun en önemli dezavantajları enzimin jelden sızması ve yüksek molekül ağırlıklı reaktanların kullanılması durumunda ortaya çıkan difüzyon sınırlamalarıdır. Aynı zamanda enzim aktivitesi polimerizasyon sırasında oluşan radikallerden etkilenebilmektedir. Enzimlerin mikrokapsülleme yöntemiyle hapsedilmesi ara yüzey polimerizasyonu ile gerçekleştirilir. Bu metodta polimerizasyonun kontrolü çok zordur.

Enzimlerin hollow-fiberler içerisine hapsedilmesi basitliği ve enzim aktivitesinin daha büyük ölçüde korunabilmesi nedeniyle daha çok tercih edilen bir methodtur. En önemli problem fiberin kırılması nedeniyle enzimin kaybolmasıdır. Aynı zamanda, yüksek molekül ağırlıklı substratların kullanımı difüzyon problemleri nedeniyle kısıtlıdır.

Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan tekniklerden biride kovalent bağlanmadır. Bu metod yüksek aktivite değerlerinin elde edilebilmesi ve sıcaklık dayanımı gibi avantajlara sahiptir. Kovalent bağlanma tekniği ile kararlı, kolayca hazırlanabilen ve kullanışlı enzim preperasyonları yapmak mümkündür. Ayrıca enzimin aktivitesini yitirmesinin ardından taşıyıcı materyali tekrar kullanmak mümkündür. Fakat bu teknikte immobilizasyon sırasında aktif bölgenin bloke edilmesi halinde enzimin tamamen aktivitesini yitirmesi olasıdır. Bazı durumlarda enzimin aktivitesinin amino asit yan zincirlerinin reaksiyona girmesi nedeniyle değişmesi mümkündür. Yüzeyi aktive etmekte kullanılan kimyasalların yüzeyden sızması ise enzime zarar verebilecek diğer bir durumdur.

Çapraz bağlama enzimin aktivitesinin korunması ve termal kararlılığını arttırması gibi avantajlara sahip olan diğer bir methodtur. Fakat difüzyonel sınırlamalar ve mekanik kararsızlık karşılaşılan en önemli sorunlardır.

Enzimlerin iyonik bağlanma ile immobilize edilmesi ılıman koşullar altında gerçekleştirilebilen ve yüksek aktivite değerlerinin sağlanabildiği bir tekniktir. Fakat,

enzim ve destek materyali arasındaki bağlanma kuvvetleri kovalent bağlanma ile kıyaslandığında oldukça zayıftır. Bu nedenle enzimin pH ya da iyonik şiddet değişmesi durumunda yüzeyden sızması söz konusudur. İmmobilize enzimin uzun süreli kullanımlarda aktivitesinin azalması durumunda kolayca değiştirilmesi mümkündür. Bazı durumlarda, enzim üzerindeki yükü arttırmak amacıyla modifiye edilir ve bu sayede enzim daha kararlı hale getirilebilir. İyonik bağlanma metodunu kullanmak özellikle pahalı enzim veya destek materyalleri ile çalışılması durumunda kovalent bağlanmaya göre daha avantajlıdır. Çizelge 2.3.1’de bir destek materyali ve immobilizasyon metodu seçmede izlenecek yolu Çizelge 2.3.2’de ise immobilizasyon metodlarının avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.3.1. Destek materyali ve immobilizasyon metodu seçmede izlenecek yol

Özellikler	Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar
Fiziksel	Şiddet, uygun yüzey alanı, gözenek boyutu, partikül yarıçapı, yoğunluk, akış hızı ve şekli (mikroküreler / plakalar / fiberler)
Kimyasal	Hidrofiliklik, uygun fonksiyonel gruplar ve rejenerasyon
Kararlılık	Depolanma, kalan enzim aktivitesi, mekanik, kimyasal ve termo kararlılık
Dayanıklılık	Bakteriyel veya mantarsı atak ve proteazların parçalanması
Güvenlilik	Biyoyumluluk, bileşenlerin toksiklikleri, proses ve son ürünlerde sağlık ve güvenlik
Ekonomik	Destek materyallerinin maliyeti ve kullanılabilirliği, enzim kapasitesi, kimyasallar, özel ekipman, çevresel etkiler, safsızlık kontrolü ve endüstriyel prosesler
Reaksiyon	Akış hızı, enzim yükleme ve katalitik verimlilik, reaksiyon kinetikleri, yan ürünler, çoklu enzim sistemi, substratların kütle transferi üzerine difüzyon sınırlamaları, ürünler ve kofaktörler, ve proses şekli (kesikli veya sürekli)

Çizelge 2.3.2. İmmobilizasyon metodlarının karşılaştırılması

ÖZELLİKLER	FİZİKSEL METODLAR			KİMYASAL METODLAR	
	ADSORBSİYON	HAPSETME VE MİKROKAPSÜLLEME	İYONİK BAĞLANMA	KOVALENT BAĞLANMA	ÇAPRAZ BAĞLANMA
<i>Hazırlama</i>	Kolay	Zor	Kolay	Zor	Zor
<i>Enzim aktivitesi</i>	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
<i>Substrat spesifitesi</i>	Değişmeyebilir	Değişmeyebilir	Değişmeyebilir	Değişmeyebilir	Değişmeyebilir
<i>Bağlanma kuvveti</i>	Zayıf	Güçlü	Orta	Güçlü	Güçlü
<i>Rejenerasyon</i>	Mümkün	Mümkün Değil	Mümkün	Mümkün Değil	Mümkün Değil
<i>Genel uygulanabilirlik</i>	Düşük	Yüksek	Orta	Orta	Düşük
<i>Hidrolik</i>	İyi	Orta	Orta	İyi	Kötü
<i>Kararlılık</i>	Değişebilir (pH ile)	Uzun Süreli (Hapsetme)	Değişebilir (pH)	Yüksek Termal Dayanıklılık	Yüksek Termal Dayanıklılık
<i>Maliyet</i>	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek	Orta

2.4. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (Mosbach 1976).

1 - Enzim, reaksiyonun yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.

2- Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimim aktif merkezi ile reaksiyona girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif merkezine nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.

3- Mümkünse enzimin aktif merkezi bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfhidril enzimleri, glutatyon veya sistein ile reaksiyona sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.

4- İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.

5- İmmobilize enzim, bazı kimyasal reaksiyonlarda devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon yöntemini seçmeden önce reaksiyonun doğası göz önünde bulundurulmalıdır.

6- Son olarak, destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

2.5. Lowry Metodunun Özellikleri

İlk olarak Lowry ve arkadaşları (Lowry ve ark. 1951) tarafından geliştirilen ve yöntemi bulan kişinin adıyla bilinen Lowry metodu protein konsantrasyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin uygulanabilmesi için yapısında fosfomolibdik ve fosfotungstik asid içeren Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, Cu^{+2} iyonları ve alkali bir ortam gerekmektedir. Lowry metodu ile protein tayini sırasında iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. İlk olarak " Biüret " reaksiyonunda olduğu gibi Cu^{+2} iyonları alkali ortamda peptid bağlarında yer alan azot atomları ile kompleks oluşturarak Cu^{+1} iyonuna indirgenir. Oluşan kompleks " Biüret " kromoforu olarak adlandırılır. Ardından gerçekleşen reaksiyon yine bir redoks reaksiyonudur ve bu reaksiyonda da Folin-

Ciocalteu reagentini oluşturan fosfomolibdik/fosfotungstik asid , aromatik amino asitlerin (tirosin, triptofan) bakır iyonu katalizli yükseltgenmesiyle ile birlikte heteropolimolibdenyuma indirgenmektedir. İndirgenmiş durumdaki Folin-Ciocalteu reaktifi mavi renklidir ve bu nedenle 500 - 750 nm (ölçüm yapılabilecek dalga boyları : 500, 540, 600, 660, yada 750 nm) dalga boyu aralığında spektrofotometre ile tayin edilebilir özelliktedir. Biüret reaksiyonunun hassasiyeti yüksek olmadığından indirgenmiş bakır iyonlarını tayin etmek için Folin-Ciocalteu reaktifinin kullanılması Lowry metodunu Biüret reaksiyonundan 100 kat daha duyarlı hale getirmektedir. Lowry metodu pH değişimlerine hassas olduğundan ortamın pH değeri 10 – 10.5 aralığında olmalıdır.

Lowry metodu çok hassas olduğundan bu yöntemle çok düşük konsantrasyonlardaki protein miktarlarını tayin etmek mümkündür. Dunn ve ark. (1992) ; 0,10-2 mg protein/mL , Price (1996) ise 0,005 – 0,1 mg protein / mL konsantrasyon aralığındaki protein tayinlerinin Lowry metoduyla hassas bir şekilde yapılabileceğini bildirmektedir. Bu metodun en önemli dezavantajı tam doğru sonuçlar alınabilmesi için çok dar bir pH aralığının sağlanmak zorunda olmasıdır. (pH 10 – 10.5) Fakat bu dezavantaj reaksiyon karışımının pH değerini çok az etkileyecek miktarlarda protein örneği kullanmak suretiyle ortadan kaldırılabilir.

Lowry metodu hassasiyetine karşın biraz zaman alıcıdır ve yöntemin uygulanması sırasında birçok maddenin interferans etki göstermesi söz konusudur. Deterjanlar, karbonhidratlar, gliserol, EDTA, tris, potasyum bileşikleri, sülfhidril bileşikleri (Dunn ve ark. 1992), disülfid bileşikleri, magnezyum ve kalsiyum gibi maddeler Lowry metodunda interferans oluşturabilecek maddelerdir. Sözü edilen bu maddelerin çoğu proteinlerin hazırlanması amacıyla kullanılan tampon çözeltilerin içeriğinde yer almaktadır (Price 1996). Bu durum metodu sınırlayan en önemli dezavantajlardan biridir. Ayrıca Lowry metodu tirosin ve triptofan amino asitlerinin miktarına duyarlı olduğundan bu amino asitlerin varlığındaki çeşitlilik metodun hassasiyetini etkileyecektir. Yöntemin uygulanması esnasında çizilecek kalibrasyon grafiği 1 -100 µg protein miktarı aralığında doğrusaldır. Absorbansın 500 - 750 nm arasındaki değerlerde ölçülebilir olması bir avantajdır. Çoğu

araştırmacı 660 nm değerinde çalışır. Fakat farklı bir dalga boyunda çalışmak bazı durumlarda interferans etkisini en aza indirebilir. Örneğin bitkilerde bulunan klorofil 660 nm de interferans yaparken 750 nm de bu etki ortadan kalkmaktadır.

Lowry metodunun avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Duyarlılık sınırları geniştir.
2. Protein konsantrasyonunun tayin edilmesinde en sık kullanılan methodur.
3. Yöntem oda sıcaklığında kolayca gerçekleştirilebilir.
4. UV dedeksiyonundan 10 - 20 kat daha hassastır.

Lowry metodunu kullanmanın bazı dezavantajları da vardır. Bu dezavantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Uygulama esnasında birçok maddenin interferans yapması söz konusudur.
2. Alkali bakır çözeltisi uzun süreli depolamada optik aktiviteyi etkileyecek şekilde karbonatlar oluşturacağından her denemeden önce taze hazırlanmalıdır.
3. Zaman alıcıdır.(40 dak.)
4. Yöntem ışığa duyarlıdır. Bu nedenle tüm örnekler ışıktan korunmalıdır.
5. Elde edilen rengin şiddeti çalışılan proteine göre değişir.

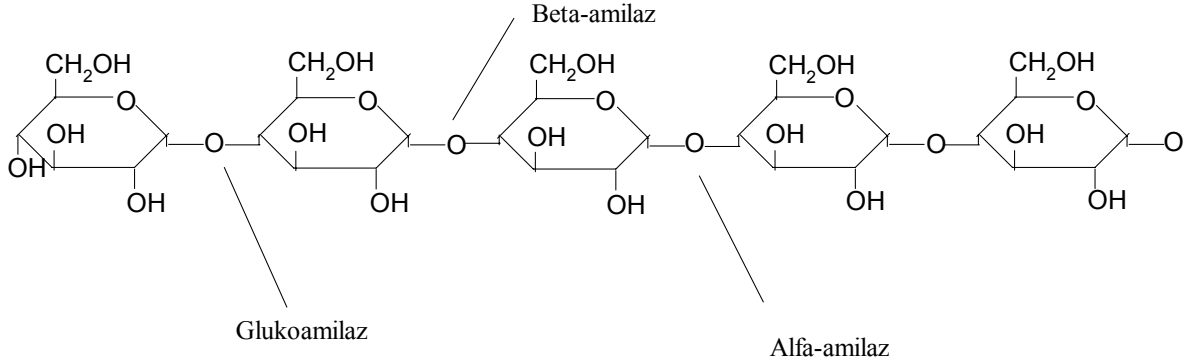
2.6. Çalışmada Kullanılan Enzimler

2.6.1. Glukoamilaz Enziminin Özellikleri

Glukoamilaz (EC 3.2.1.3) polisakkaritleri, indirgenmeyen zincir uçlarından, α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bağlarını hidroliz ederek parçalayan bir enzimdir. Glukoamilaz enzimi başlıca glukoz şurubu, nişastadan fruktoz şurubu üretiminde ve alkol eldesinde kullanılan bütün tahıl ve nişastaların hidrolizinde kullanılır.

Glukoamilaz, nişastayı β -D-glukoz bileşenine parçalayan ve ekzo davranan bir enzimdir. Glukoamilaz enzimi aynı zamanda amiloglukosidaz, glukamilaz veya I-amilaz olarak da adlandırılabilir. Daha teknik olan ismi ise α -(1 \rightarrow 4) glukan glikohidrolazdır. Burada glukan glukoz birimlerini, glikohidrolaz ise iki glukoz birimi arasında kırılan bağı nitelemektedir. Enzim komisyonu (IUBM) tarafından verilen enzim kodu EC 3.2.1.3 'tür. Buradaki 3 sayısı, su eklenmesiyle büyük moleküllerde meydana gelen hidrolitik parçalanmayı katalizleyen hidrolazları ifade etmektedir. 2 sayısı, glikozidik bağ kırılmasını katalizleyen enzimler olan glikozidazları belirtmektedir. Bu grupta birçok enzim vardır ve glukoamilaz 3.'dür (EC 3.2.1.3).

Glukoamilaz enzimi aynı zamanda α -1,6 ve bazen de α -1,3 bağlarını çok yavaş bir hızla hidroliz eder. Bu enzim uzun zaman inkübe edildiğinde nişastayı tamamen hidrolize edebilir. Glukoamilaz enziminin optimum pH ve sıcaklık aralığı sırasıyla 4.5-5 ve 46-60°C'dir. (Fogarty 1983; Vihinen ve Mantsala 1989)



Şekil 2.6.1.1. Hidrolitik enzimler ve etki ettikleri kimyasal bağlar

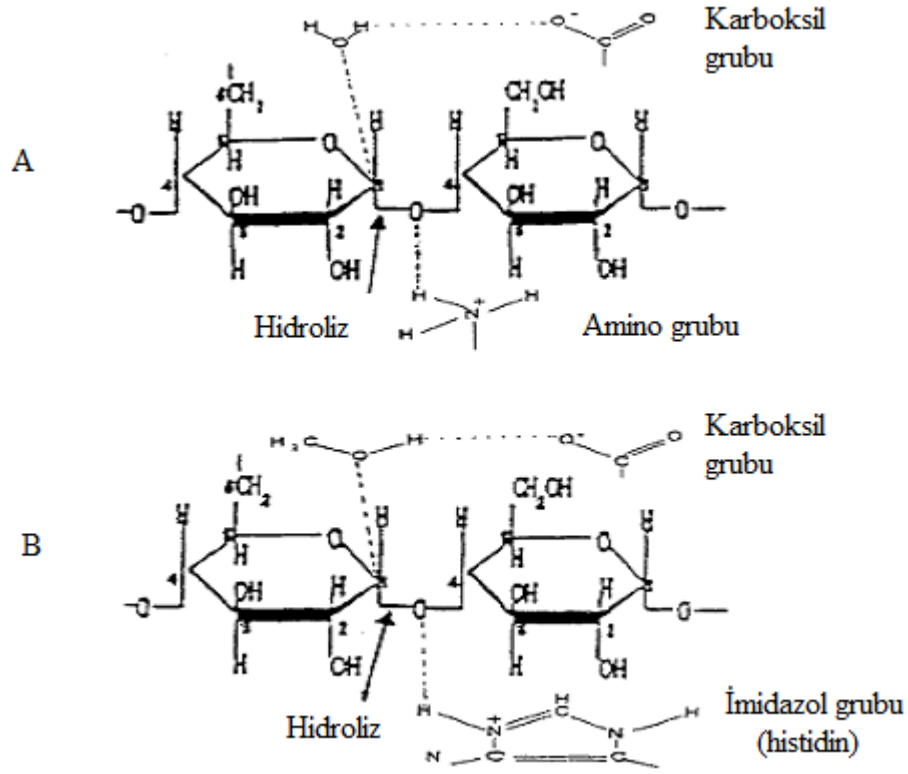
Aspergillus niger'den elde edilen glukoamilaz enziminin molekül ağırlığı 82500 daltondur. 440 aminoasitten oluşan katalitik bölüm (N-terminal) , 100 aminoasitten oluşan granüler-nişasta bağlanma bölümü (C-terminal) , bu iki bölümü birbirine çubuk şeklinde ve O -glikosil bağlarıyla bağlayan, 70 aminoasitten oluşan bir bağlayıcı bölge olmak üzere üç ayrı bölgeden oluşur. Bu 3 önemli bölgede yer alan amino asitler ise, (1) Ala1-Thr-440 (katalitik bölge), (2) Ser441-Thr551 (O-glikozillenmiş bağlayıcı segment) ve (3) Pro512-Arg616 (nişasta bağlanma bölgesi) şeklindedir (Svenson ve ark. 1983). O-glikozillenmiş bölge hidrojen bağları içeren düzenli nişasta yapısına bağlanmada önemli rol oynar. Bu bölge yarı rigid bir çubuk şeklindedir ve bu sayede katalitik ve nişasta bağlanma bölgeleri arasında güçlü bir bağ oluşturur (Williamson ve ark. 1992). O-glikozillenmiş bölgenin katalitik ve nişasta bağlanma bölgesinin aktivitesini nasıl etkilediğini görmek amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır. Isıtıldığı zaman katalitik bölge irreverzibil olarak yapısını kaybederken, bağlanma bölgesi O-glikozillenmiş bölgenin varlığı sayesinde reverzibil olarak yapısını dönüştürebilmektedir.

Yapılan kimyasal modifikasyon çalışmaları ile glukoamilaz enziminin katalitik aktivitesini göstermesindeki en önemli amino asidin triptofan olduğu belirlenmiştir (Rao ve ark. 1981). Trp120 substratın bağlanması ve katalitik aktivite için uygun geometrinin sağlanmasındaki en önemli kalıntı olduğu bilinmektedir (Clarke ve Svenson 1984).

Glukoamilaz enziminin çok zincirli mekanizmalarda rol aldığı ve enzimin rastgele tüm substrat moleküllerine etki ettiği ileri sürülmüştür (Solomon 1978). Glikozik bağ kırılmasını gösteren bir mekanizma Şekil 2.6.1.2 'de gösterilmektedir. D-glikozik bağ oksijeni, amino grubundaki bir hidrojen iyonu ile veya enzimin aktif bölgesinde yer alan imidazol grubu ile protonlanır. Bağın elektronca yoksun merkezi C-1, elektronları hidroksil grupları, su ve aktif bölgedeki serin grupları gibi elektron verici gruplardan alır. Ortaya çıkan yapı bağın C-1 karbon kısmından ayrılır, karbonyum iyonu ara ürünü ve nötral D-glikosil fragmenti oluşturur. Son basamak karbonyum iyonu ara ürününe hidroksil iyonu(veya bir su molekülü) katılmasını içerir. OH grubu β -konfigürasyonunda yapıya katılır bu yüzden hidroliz ürününün adı β -D-glukozdur (Solomon 1978).

Glukoamilazlar çok çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilebilir ancak buna rağmen çoğu glukoamilaz mantarlarda görülmektedir. *Aspergillus niger* veya *Rhizopus* türlerinden elde edilen enzimler malto-oligosakkaritlerin glukoza çevrilmesinde ticari olarak kullanılırlar (Fogarty 1983, Pandey 1995). Enzimler Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından güvenilir olarak sınıflandırılırlar. Daha önce glukoamilaz enziminin özellikleri kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır (Vihinen and Mantala 1989). 1950'lerde *Blackkoji* küfünden elde edilen glukoamilazın iki formunun bulunuşundan itibaren, glukoamilaz enziminin çeşitliliğine dair birçok rapor ortaya çıkmıştır. Glukoamilaz enziminin bu çeşitli formları birtakım mekanizmaların sonucu olarak ortaya çıkmaktadır: mRNA modifikasyonu, sınırlı proteoliz, karbohidrat içeriğindeki çeşitlilik veya birkaç yapısal gen varlığı (Pretorius ve ark. 1991).

Mantarlardan elde edilen ve birden beşe kadar olan formlardan oluşan glukoamilazlar genelde glikoproteinlerdir. İpliksi mantar *Aspergillus* biyoteknolojik endüstrisinde önemli yere sahip olan bir organizmadır.



Şekil 2.6.1.2. Glukoamilaz enziminin muhtemel çalışma mekanizması

Glukoz şurubu üretilmesi amacıyla nişasta prosesindeki uygulamalarına ek olarak birçok tür ikincil metabolitlerin üretilmesinde ve çeşitli hidrolitik enzimlerde glukoamilaz enzimi çok önemlidir. Ekstrasellüler glukoamilazın ticari üretiminde *Aspergillus niger* geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Glukoamilazın iki türü *Aspergillus niger*'den izole edilmiştir; glukoamilaz I (99 kDa) ve glukoamilaz IIa (112 kDa) (Pazur ve ark. 1971). Her iki form da kovalent olarak bağlanmış karbohidrat (D-manoz, D-glukoz ve D-galaktoz artıkları) içerirler. Bu glukoenzimlerdeki karbohidrat-protein bağı, L-serin ve L-treonin kalıntılarının hidroksil gruplarına oldukça glikozidik davranır. Ancak L-asparajin ve L-glutaminde de glukozilamin bağları bulunabilir. Enzimin iki formu *izoglikoenzimler* olarak adlandırılır. Aynı aminoasit içeriğine sahiptirler ancak amit gruplarının sayısı veya glikozilamin olarak bağlanmış birimler elektroforetik farklılıkların sebebidir (Pazur ve ark. 1971).

Proteazlardan sonra dünya çapında en çok satılan ikinci enzim olan glukoamilaz endüstride dekstroz üretimi, fırınlanmış ürünlerin eldesi, düşük kalorili bira üretimi ve alkol üretimi için tahıl hidrolizi gibi birçok uygulama alanına sahiptir.

Nişastanın şekerlere dönüştürülmesi yıllık 8 milyon tonluk bir üretimin yapıldığı büyük bir biyoteknolojik prosestir (Lee 1991). Bu proseste önemli bir uygulama alanı bulan glukoamilaz enzimi nişastadan glukoz ve fruktoz şurubunun (HFCS) üretiminde geniş çapta kullanılmaktadır. Başlangıçta D-glukoz üretimi için Kirchoff 1811 ve Saussure 1815 tarafından bulunan asit hidrolizi kullanılmaktaydı. Ancak bu reaksiyonda verim oldukça düşüktü. Günümüzde ise nişasta, amilolitik enzimler olarak da adlandırılan α -amilaz ve glukoamilaz enzimleri kullanılarak, sıvılaştırma (liquifaction) ve sakkarifikasyon olarak adlandırılan iki aşamada hidroliz edilmektedir. Sıvılaştırma olarak bilinen ilk aşamada 85-100°C 'deki nişata α -amilaz ile muamele edilerek dekstrinler elde edilir (Fin 1987, Lee 1991). Dekstrinler suda çözünürdürler ve immobilize glukoamilaz enzimi içeren bir reaktörden geçirildiğinde glukoz birimlerine hidroliz olurlar. Oluşan glukoz şurubu % 96-98 oranında D-glukoz içerir. Elde edilen glukoz şurubu ya kristalize glukoz üretiminde ya da fruktoz üretiminde başlangıç maddesi olarak kullanılır.

Fruktoz şurubu (HFCS) birçok önemli uygulamada, şeker kamışı ve şeker pancarından elde edilen şekerin yerini almıştır. Çünkü fruktoz glukozdan daha tatlıdır (Finn 1987). Amerika'da yıllık fruktoz şurubu satışı yaklaşık 4 milyon ton civarındadır (Lee 1991). Mısır nişastasından fruktoz şurubu eldesinde de glukoz şurubu eldesine benzer şekilde önce nişasta ısıya dayanıklı α -amilaz enzimi kullanılarak lineer oligosakkaritlere dönüştürülür. Ardından sakkarifikasyon aşamasında ortamın pH değeri 4.5 'e ayarlanır ve sıcaklık 60°C 'ye düşürülerek sıvılaştırma aşamasında oluşan oligosakkaritler glukoamilaz enzimi ile muamele edilir. Birkaç saflaştırma proseüründen sonra glukoz şurubu elde edilir. Oluşan glukoz şurubu bir ileriki aşamada glukoz izomeraz enzimi ile muamele edilerek glukoz, fruktoza dönüştürülür. Fruktoz şurubu üretiminde immobilize glukoz izomeraz kullanımı endüstriyel uygulamalarda immobilize enzim kullanımının ilk örneğidir.

Glukoamilaz enzimi fırınlanmış ürünlerin eldesinde unun kalitesini arttırmak, hamurun bayatlamasını geciktirmek, işlenebilirliğini kolaylaştırmak, ekmeğin kabuk rengini arttırmak gibi amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır (James ve Simpson 1996). Fırınlanmış ürünlerin eldesinde kullanılan diğer fungal ve bakteriyel enzimler α - ve β -amilaz, proteazlar, glukoamilaz, pentosanazlardır.

Düşük kaliteli tahıllar ve üretim fazlası nişasta içerikli ürünler yakıt etanol, metan ve laktik asit gibi değerli kimyasalların üretiminde kullanılabilir. (Lee 1991, Linko ve Wu 1993) Brezilya, Kanada, Güney Afrika ve Amerika gibi ülkelerde yıllık üretim fazlası tarım ürünleri fazla olduğundan bu ürünler etanol üretiminde kullanılmaktadır.

Bira, malt arpa ve şerbetçiotunun sulu ekstraktının alkolik fermentasyonundan elde edilir (Potter 1986). Önce arpa boyutlarına göre ayrılır ve büyük olanlar içlerinde proteaz ve amilaz gibi enzimlerin sentezi için 7 günlük bir periyotta bekletilir. Bu sırada endosperm fermente edilebilir şekerlere ve aminoasitlere parçalanır. Ardından arpalar renk ve tat oluşumu için ısıtılır. Bu aşamada nişasta ya da şeker gibi ilave maddeler eklenir. Ayrıca bu aşamada nişastayı parçalayan enzimler olan amilaz ve glukoamilaz ilave edilir. Bu sayede nişasta bira mayasının fermente edebileceği forma dönüştürülür (Broderic 1977, Lewis ve Young 1995).

2.6.2. Glukoamilaz Enziminin İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar

İmmobilizasyon metodlarının geliştirilmesinden bu yana glukoamilaz enziminin immobilizasyonuna ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır. Fischer ve arkadaşları 1977 yılında protein adsorpsiyonu için gözenek çapı 400-1000Å arasında değişen makrogözenekli camlar hazırlamış ve bu materyali *Endomicopsis bispora*'dan elde edilen glukoamilazın bağlama kapasitesini arttırmışlardır.

Glukoamilaz enziminin immobilizasyonu için selüloz mikrokürelerin kullanılabilirliği de araştırılmıştır (Chen ve Tsao 1977). İlk olarak poroz (75-80%porozite)

selüloz yataklar hazırlanmış ve sıradan selüloz üzerine enzim immobilize etmede kullanılan kimyasal prosedürünün poroz selüloz yataklar üzerine de uygulanabileceği gösterilmiştir. Sonuçlar sıradan selüloza göre yatakların daha çok enzim taşıdığını göstermiştir.

Endomikopsis'den elde edilen glukoamilaz, glutaraldehit kullanılarak kovalent bağlama ile AE-selüloz üzerine immobilize edilmiştir. pH, tampon konsantrasyonu, sıcaklık ve immobilizasyon zamanı gibi değişkenler için aktivite tayini yapılmıştır. Maximum aktivite 0,2 M Na-fosfat tamponunda, pH 5.0-7.0 'de ve 4-20°C 'de 4-24 saat'de saptanmıştır. Substrat varlığında, immobilize glukoamilazın nişasta aktivitesi yükselmiş ve glukozun buna bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Kim ve Starostina 1978).

Kaetsu ve arkadaşları 1979 yılında yaptıkları bir çalışmada, 2-hidroksietil metakrilat gibi hidrofilik camsı monomerlerin indüklenmiş ışımaya polimerizasyonu ile hazırlanan materyalin enzim immobilizasyonunda kullanımını araştırmıştır. Immobilize edilmiş enzim aktivitesinin, düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen polimerizasyonda yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen polimerizasyona göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda polimerize edilmiş kompozitin, monomer konsantrasyonuna dayalı buz kristallenmesinden dolayı daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, enzimin kısmen polimer yüzeyine tutunduğu, gözeneklerden kısmen izole olduğu ve kısmen de polimer matriksinin içinde kaldığı düşünülmüştür. Enzim reaksiyonlarının tekrarlanmasıyla aktivitede gözlenen düşüşün enzim sızıntısının neden olduğu belirlenmiştir.

Klesov ve Gerasimas 1979 yılında yaptıkları bir çalışmada substrat eksikliğinde enzimin termal inaktivasyonunun incelenmesinde yeni kinetik bir yaklaşımda bulunmuştur. Metod çözünür ve poroz silikaya immobilize edilen glukoamilazın inaktivasyon kinetiğinin araştırılmasında uygulanmıştır. Substratın (maltoz veya maltodekstrinler) bağlanmasının glukoamilazın termal kararlılığını arttırdığı bulunmuştur. Kararlılık etkisinin normal enzimde (40 kat) immobilize enzime (15 kat) göre daha önemli olduğu görülmüştür.

Bir başka çalışmada glukoamilaz, maleikanhidrit (% 4-8 mol), 4,4'-diamin difenil oksidiyle N-vinil pirolidonun kopolimerleşmesi sonucu oluşan polimere immobilize edilmiştir (Iarovenko ve ark. 1979). Absorpsiyon ve kovalent bağlanma gibi iki farklı metotla immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon ile yapılan immobilizasyon sonucunda glukoamilaz aktivitesi 20.000-60.000 U/g polimer bulunurken, kovalent bağlamada 40-120 ünite/g polimer olarak belirlenmiştir. Kovalent bağlanma ile gerçekleştirilen immobilizasyon, absorpsiyonla immobilizasyona göre daha uzun bir etki göstermiştir.

Borosinova ve arkadaşları tarafından 1979 yılında yapılan bir çalışmada N-karbetoksi-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin kullanılarak glukoamilaz ve asit proteinaz, silokrom C-80 üzerine immobilize edilmiş ve gama-aminopropil trietoksi silan ve daha sonra da süksinik anhidrit ile modifiye edilmiştir. Maksimum protein bağlanma yüzdesi glukoamilaz için %46, asit proteinaz için ise %35 olarak bulunmuştur.

Kennedy ve Kalogerakis 1980 yılında yaptıkları bir çalışmada, glutaraldehit çapraz bağlanmış jelatin partiküllerinin mikrokapsüllenme ile enzim immobilizasyonu için uygulanabilirliğini yüzey bağlayıcı enzim ilavesiyle genişletilmişlerdir. Sonuçta çift yönlü immobilize enzim bağlayıcılar hazırlanmasına bir metot oluşmuştur. Enzimin kapsül yüzeyine bağlanması enzimin ligand olarak kullanıldığı, geçiş metallerinin şelatlanması prosesi ile gerçekleşmiştir. Glukoamilaz enzimi, titan-üre, titan-akrilamid, titan-sitrik asit ve titan-laktoz kompleksleri veya titan (IV) klorür kullanılarak, titani şelat merkezi haline getirerek immobilize edilmiştir.

Aspergillus niger'den elde edilen glukoamilazın akriloklorür ile kimyasal modifikasyonu çalışılmıştır (Gerasimas ve ark. 1980). Enzimin amino gruplarının % 60-70'inin etkileştiği gözlenmiştir. Çözünür akriloglukoamilazın aktivitesi ve termal kararlılığı doğal enzimin aktivitesinden çok az miktarda düşüktür.

Bir başka çalışma gosipol kullanılarak silanlanmış silokrom ile bağlanmış glukoamilazın immobilizasyon şartları ile ilgilidir (El'chits ve ark. 1981). İmmobilize enzimin kinetik özellikleri de belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'ı immobilizasyon ile değişmemiştir ve sıcaklık optimumu da 50°C 'den 60°C 'ye kaymıştır, Km'de ise belirgin bir artış gözlenmiştir. Glukoamilaz immobilizasyonunda gosipolu bağlayıcı olarak kullanmak enzim aktivitesinde yüksek verim sağlamıştır.

Ram ve Venkatasubramanian tarafından 1982 yılında yapılan bir çalışmada, glukoamilaz ve pullulanaz yeniden yapılandırılmış sığır postu kollajen membran üzerine kovalent azit bağlama metodu kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilize edilmiş glukoamilaz ve pullulanaz aktiviteleri sırasıyla 0,91 ve 0,022 mg eşdeğer dekstroz membran/min cm² bulunmuştur. İmmobilize glukoamilazın yarılanma ömrü 50 gün iken pullulanazınki 7 gündür. Bu diğer araştırmacıların bulduğu kararlılığın oldukça üstündedir. Serbest ve immobilize enzimlerin 80% alfa-1-6-glukozidik bağlar içeren mısır nişastası substratı üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Serbest pullulanazın kararlılığı pH'ın fonksiyonu olarak daha yakından incelendiğinde yüksek pH değerlerinde termal kararlılığın arttığı belirlenmiştir. 50°C'de ve pH 5.0'de, serbest enzim 24 saat sonunda inaktive olurken, pH 7.0'de ve 72 saat sonunda immobilize enzim aktivitesinin yarısını hala korumuştur.

Bir başka çalışmada, serbest glukoamilaz aktivitesi, silokroma immobilize edilmiş glukoamilaz ile karşılaştırılmıştır (Ivanova ve El'chin 1982). Glukoendomikopsin G15x, glukonigrin G20x ve Aspergillus awamori 466 kültür sıvısı doğal enzim kaynağı olarak, 2,4-toluilendiizosiyanat, siyanürklörür, glutarikaldehit ve gosipol de çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Enzimin silanlanmış silokrom üzerine immobilizasyonunda en iyi sonuç Aspergillus awamori 466 kültür sıvısı çözücü, gosipol de çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığında elde edilmiştir.

Kvesitadze ve Dvali 1982 yılında yaptıkları bir çalışmada , α -amilaz ve glukoamilaz enzimlerinin immobilizasyonunu silika taşıyıcıları, değişik silokrom tipleri ve silikajeller

üzerine birçok eşleme metodu kullanarak araştırmıştır. En aktif immobilize glukoamilaz titan tuzlarıyla elde edilmiştir. Bu aktiviteler glutaraldehit veya azo eşleşmesiyle elde edilenlerin iki katı değerdedir. Yüksek substrat konsantrasyonunda, 45°C'de, silika taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş *A. oryzae* α -amilaz, *B. subtilis* α -amilaz ve *A. niger* glukoamilazın yarı ömürleri sırasıyla 14, 35 ve 65 gün olarak belirlenmiştir.

Glukoamilaz ve glukoz oksidaz, karbodiimit ile muamele edilmiş çeşitli boyutlardaki karbon partikülleri üzerine immobilize edilmiştir (Bailey ve Cho. 1983). Alınan veriler immobilize enzimin poröz partiküller içerisine düzensiz bir şekilde dağıldığını göstermiştir. Immobilize edilmiş glukoamilaz enziminin spesifik aktivitesi enzim yüklemesi arttıkça azalmıştır.

Fungal alfa-amilaz (EC 3.2.1.1) ve glukoamilaz (EC 3.2.1.3), mikrogözenekli plastik yapraklardan yapılmış materyallere kimyasal olarak bağlanmıştır (Hauser ve ark. 1983). Enzimlerin immobilizasyonu ve bunu takip eden kimyasal reaksiyonlar reaktantların plakaya uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Immobilize enzim için pH ve sıcaklığın kısa süreli etkileri ve kinetikleri incelenmiştir. %50 çözünmüş katılarda ticari olarak uygun DE-42 mısır şurubu kullanılarak glukoamilaz ve fungal alfa-amilaz için 2000-5000 saatlik yarılanma ömrüne ulaşılmıştır. Reaktörler 50°C'de glukoamilaz için pH 4.3'te fungal alfa-amilaz için ise pH 5.5'te çalıştırılmıştır. Glukoamilaz reaktörüne ve daha sonra fungal alfa-amilaz reaktörüne hammaddenin pompalanmasıyla tipik DE-62 mısır şurubu iki basamaklı reaktör sisteminde devamlı olarak üretilmiştir.

Ivanova ve arkadaşları 1985 yılında değişik metodlarla (adsorpsiyon, kovalent bağlanma) immobilize edilen glukoamilazın katalitik aktivitesi ve kararlılığını araştırmıştır. En yüksek kararlılık kovalent bağlanma ile elde edilmiştir. Bağlanma etkisi ve immobilize glukoamilazın özellikleri, çözünmez taşıyıcıların doğasına ve enzimin hazırlanmasındaki saflaştırma derecesine bağlıdır. Enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanmayı destekleyen çapraz bağlayıcısının seçimi oldukça önemlidir. Immobilize glukoamilazın optimum aktivitesi ve kararlılığı farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak elde edilmiştir (2,4-toluendiizosiyanate,

glutarik dialdehid, gosipol). Çözünür ve immobilize glukoamilazın katalitik özellikleri ve kararlılığı da belirlenmiştir.

Glukoamilaz, invertaz ve selüloz, poli (vinil alkol) (PVA) membran içerisine hapsedilmiş ve ultraviyole ışık ışınlamasıyla çapraz bağlanmıştır (Imai ve ark. 1986). Glukoamilaz immobilizasyonunun koşulları PVA içerisindeki enzim konsantrasyonuna, PVA'daki duyarlaştırıcı (sodyum benzoat) konsantrasyonuna, ışın yayma zamanına ve membran kalınlığına göre incelenmiştir. İmmobilize edilmiş glukoamilaz enziminin çeşitli özellikleri değerlendirilmiştir. İmmobilize edilmiş glukoamilaz enzimi için elde edilen V_{max} değeri daha küçükken K_m değeri doğal enziminkinden daha büyüktür. Ayrıca, K_m değerinin substratın molekül büyüklüğünden etkilendiği görülmüştür.

Imai ve arkadaşları tarafından 1986 yılında yapılan bir başka çalışmada, invertaz poli(etilen-vinil alkol) membran yüzeyine iyonik olarak bağlanmış ve farklı moleküler boyuttaki iki aminoasetal, 2-dimetil-aminoasetoaldehidmetilasetal (AAA) ve 3-(N,N-dimetilamino-n-propandiamin) propiyonaldehidmetilasetal (APA) ile modifiye edilmiştir. Çözeltideki enzim konsantrasyonuna, pH değerine, immobilizasyon çözeltisindeki iyonik şiddete ve immobilizasyon zamanına göre immobilizasyon koşulları belirlenmiştir. İmmobilize edilmiş invertaz enziminin çeşitli özellikleri değerlendirilmiştir. APA ile daha uzun moleküler bağlarla bağlanmış invertaz için gözlenen Michaelis sabiti, K_m değeri, AAA ile bağlanmış invertaza göre daha küçüktür. *Rhizopus delemar*'dan elde edilen glukoamilaz aynı şekilde bağlanmaya çalışılmıştır. Ancak immobilize edilmiş glukoamilazın miktar ve aktivitesinin invertaz enziminden oldukça az olduğu görülmüştür.

Fiber ve kağıt formunda enzim immobilizasyonu, sodyum aljnat ve enzimlerin sulu katkı maddelerinin divalent metalik iyon çözeltilerinde hazırlanmasıyla ve oluşan kısa kesilmiş fiberlerin kağıt haline getirilmesiyle yapılmıştır (Kobayashi ve ark. 1987). Kullanılan glukoamilaz, siklodekstrin glukano-transferaz, endo-poligalakturonaz ve proteaz gibi enzimlerin hapsedme verimleri kalsiyum aljnat fiberlerinde ve bunların kağıtlarında, bunun karşılığı olan yataklarda olduğundan daha yüksektir.

Üç tip organik polimer ve yatak şeklinde silika jeller, 2,3-epoksipropil metakrilatın graft polimerizasyonu ile aktive edilmiştir ve immobilizasyonda kullanılmıştır. Bazı durumlarda destek materyali üzerindeki epoksit grupları NH_2 gruplarına modifiye edilmiştir. Enzim olarak peroksidaz, glukoamilaz ve üreaz kullanılarak elde edilen sekiz aktif matriksin destek materyali olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Proteinin immobilizasyon verimi ve enzimlerin spesifik aktiviteleri NH_2 grubu içeren destek materyallerinde epoksit uçlu kollar içerenlere göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Maksimum enzim immobilizasyonu ve depolanma kararlılığı, 2,3-epoksipropil metakrilatın graft polimerizasyonu ile aktive edilmiş silikajel yataklarla elde edilmiştir. Test edilen sekiz matrikste de immobilize enzimler yüksek kararlılık göstermiştir ve 28 gün sonunda orjinal aktivitelerinin %82'sini korumuşlardır. Geliştirilen bu matriksler proses-basamaklı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir niteliktedir (Wojcik ve ark. 1990).

Amiloglukosidaz enzimi iki hidrofilik önpolimer kullanılarak kovalent bağlama ile immobilize edilmiştir: Hipol FHP 2002 (köpük oluşturur) ve Hipol FHP 8190H (jel oluşturur). Poliüretan köpüklerinde immobilize edilmiş enzimin yüzde aktivite değeri %25 +/- 1,5 'dir. Köpüğe immobilize edilmiş enzimin K_m değeri 0,76 mg/ml'den (serbest) 0.86 mg/ml'ye (immobilize) çıkarken, V_{max} değeri 90,9'dan (serbest) 12,4 nmol glukoz/dak/ml'ye (immobilize) düşmüştür. Amiloglukozidaz enziminin uzun zamanlı depolanma kararlılığı köpüğe immobilize edilerek incelenmiştir. Immobilize enzimde %70 aktivite kalırken, serbest enzimde yalnızca %50 aktivite kalmıştır. Immobilizasyon aynı zamanda çeşitli denature edici ajanlara karşı (sodyum klorür, üre ve etanol) enzim kararlılığını geliştirmiştir. Yüksek sıcaklıklarda (95°C) serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize enzim daha yüksek kararlılık göstermiştir. Bu sonuç tekniğin nişasta hidrolizi için kullanışlı olduğunu göstermiştir (Storey ve ark. 1990).

Janowski ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları bir çalışmada, gözenekli camın 3-aminopropiltrioksosilan ile sililasyonu ile elde edilen gözenekli camın enzim immobilizasyonunda kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Gözenekli camın sililasyondan önce aminosilan ile tetraetoksosilan modifikasyonu taşıyıcıların hidrolitik kararlılığının

arttırmasına neden olmuştur. Sulu çözültide modifiye edilmiş ve taşıyıcılara immobilize edilmiş glukoamilaz daha yüksek aktivite göstermiştir.

Szajani ve arkadaşları tarafından 1991 yılında yapılan bir çalışmada ise bir seri değişik yapıda suda çözünebilir disüstitüe karbodiimidin enzim immobilizasyonundaki kullanılabilirliği test edilmiştir. Deneylerde, destek materyali olarak karboksilik fonksiyonel grupları bulunan poliakrilamit-tipi polimer yataklar kullanılmıştır. İmmobilize edilen enzimler; aminoasilaz (N-açilamino asit amidohidrolaz; EC 3.5.1.14), arjinaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1), siklodekstrin glikotransferaz (α -1,4-glukan 4-glikoziltransferaz, EC 3.2.1.19), glukoamilaz (1,4- α -D-glukan glikohidrolaz, EC 3.2.1.3), ve karboksipeptidaz B (peptidil-L-lizin [L-arginin] hidrolaz; EC 3.4.17.2). Sonuçta şu bulunmuştur ki; immobilizasyon derecesi kullanılan karbodiimidin yapısına bağlıdır.

Glukoz oksidaz (GOx) ve glukoamilaz (GA) karbohidrat kısımlarıyla, glutaraldehit ile çapraz bağlanmış ve adipik dihidrazid ile türevlendirilmiş polietilenimin kapanmış magnetit üzerine immobilize ve koimmobilize edilmiştir (Pieters ve Bardeletti, 1992). İmmobilizasyondan sonra kalan aktivitenin maltoz ve maltodekstrin substrat olmak üzere GA için sırasıyla %88 ve %70 kadar yüksek olduğu belirlenmiştir.

1992 yılında Pieters ve arkadaşları tarafından yapılan daha sonraki bir çalışmada glukoamilaz (GA) periodat ile yükseltgenerek karbohidratları aracılığı ile glutaraldehit (M-GAD) kullanılarak çapraz bağlanmış ve adipik dihidrazid (ADH) ile derive edilmiş polietilenimin kaplı magnetitten yapılmış düşük maliyetli magnetik mikroküreciklerin üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. Karbohidratları ADH ile çapraz bağlamadan oluşan kararlılaştırma sonrası kalan aktivite %54'ten %71'e yükselmiştir. Vm değerleri hesaplanmış ve aktivite değerleri 50°C'de ve pH 4.5 'ta, substrat olarak maltodekstrin (DE11-14) kullanılarak ölçülmüştür. Bu uygulama enzim kararlılığını kanıtlamış ve deaktivasyon hız sabitini (kd) değerinin üçte birine indirmiştir. %30'luk maltodekstrin çözültisi 50°C'de ve pH 4.5'te geri dönüşümlü, magnetik mikropartiküllerinde immobilize GA içeren akışkan yataklı reaktörde sürekli olarak

hidrolize edilmiştir. Küçük partikül boyutu (20 mikron) reaktörde yüksek enzim yüklemesini sağlamış ve dış basınç düşmesine ve buna bağlı kanal problemlerinden kaçınmak amacıyla tavsiye edilen yüksek yatak hacmine olanak vermiştir. Proses koşulları altında 2 haftalık hidroliz sonucunda %70'lik dönüşüm gözlenmiştir. Bu da yüksek dönüşümlü şuruba karşılık gelmektedir. İmmobilize edilen GA başlangıç aktivitesinin yalnızca %4'ünü kaybetmiştir.

Amiloglukosidaz nonkovalent etkileşimlerle granüler tavuk kemiği (BIOBONE) üzerine immobilize edilmiştir (Schafhauser ve Storey 1992). Amiloglukosidaz için hesaplanmış spesifik aktivite immobilizasyon ile 75,3 +/- 0,8'den 43,5 +/- 9,6 U/mg proteine düşmüştür. Glikojen substrat olarak kullanılarak incelenen kemik immobilize enzimin Km değeri 3,04 +/- 0,38 mg/mL (serbest) 'den 9,04 +/- 1,51 mg/mL'a (immobilize) yükselmiştir, ancak nişasta substrat olarak kullanıldığında Km değeri bir değişim göstermemiştir. Tüm substratlar için enzim immobilizasyonunda Vmax değerlerinde düşüş gerçekleşmiş, ancak bu başlangıçta kemiğe bağlanan yüzde enzim miktarının büyük oranda kaymasına neden olmuştur. Aynı zamanda immobilizasyonun çeşitli katkı maddelerinin varlığında (örn., deterjan, KCl ve etanol) veya düşük ya da yüksek pH reaksiyon koşulları altında enzim kararlılığını arttırdığı kanıtlanmıştır. Bağlanmış amiloglukosidaz enzimi ılımlı (23°C) ve yüksek (55°C) sıcaklıklarda 5 defa arka arkaya kullanıldığında yüksek aktivitesini korumuştur. Lineweaver-Burk ve Arrhenius eğrilerinden elde edilen veriler substrat ve ürün difüzyon sınırlarının minimal olduğunu göstermiştir.

1996 yılında Popa tarafından yapılan bir çalışmada akrilik destekler içeren küresel parçacıklar üzerine glukoamilaz absorpsiyon ve desorpsiyon prosesleri çalışılmıştır. Akrilik destek içerisindeki glukoamilaz immobilizasyon reaksiyon dinamikleri kinetik (reaksiyon derecesi, reaksiyonun yarılanma süresi, reaksiyonun hız sabiti) ve termodinamik parametreler(aktivasyon enerjisi) açısından incelenmiştir.

Wei ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada bienzim elektrotlu kapiler alan elektroforezinde (CZE) türetilmemiş karbohidratların belirlenmesinde yeni bir yaklaşım kullanmışlardır. Bienzim elektrot iki enzimin, glukoz oksidazın ve amiloglukosidazın platin mikroelektrodun üzerine immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Metodun uygulanabilirliğini incelemek amacıyla maltoz ve glukoz substrat olarak kullanılmıştır. Bu elektrot kullanılarak, türetilmemiş glukoz ve maltoz ayırmadan sonra 60mM borat tamponunda (pH 9.3) CZE ile analiz edilmiştir. Bir haftalık sürekli uygulama sonucunda bienzim elektrodun maltoz veya glukozu olan tepkisinde herhangi bir bozunma gözlenmemiştir.

Novo (Copenhagen, Denmark)'dan elde edilen amiloglukosidaz gözenekli silika partikülleri üzerine silan-glutaraldehit kovalent metoduyla immobilize edilmiştir (Zanin ve De Moraes 1998). Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı 30% (w/v) α -amilaz ve sıvılaştırılmış cassava nişastası ile pH 4.5'te, 35-75°C aralığında belirlenmiştir. Serbest amiloglukosidaz enzimi aktivitesini 240 dakika 50°C'ye kadar korumuştur. Immobilize enzim ise daha yüksek kararlılık göstermiştir ve aktivitesini aynı sürede 60°C'ye kadar korumuştur. Serbest enzimin yarı ömrü 55, 60, 65,70 ve 75°C'de sırasıyla 20.6, 6.44, 2.07, 0.69 ve 0.24 saat iken immobilize enzim için aynı sıcaklıklarda yarı ömürler sırasıyla 116.4, 30.88, 8.52, 2.44 ve 0.73 saattir. Termal deaktivasyon enerjisi serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 50,6 ve 57,6 kcal/mol'dür ve bu da immobilizasyon ile kararlılığın arttığını doğrular niteliktedir.

Kovaleva 2000 yılında yaptığı bir çalışmada 1,4- α -glukanohidrolaz (glukoamilaz) ile 2,1- β -D-fruktanohidrolazın (inulaz) iyonitlere kovalent immobilizasyonunun kinetik termodinamik yönlerini araştırmış ve immobilizasyonun, aktivasyon enerjisinde artışa neden olduğunu bulmuştur. Polisakkaritlerin hidrolizi ve entalpideki değişim doğal enzim ile karşılaştırılmıştır. Matrikse bağlanma sırasında polieptit zincir ile aktif gruplar arasında birçok noktadan etkileşim olmuştur. Sonuçta Michaelis sabiti K_m artarken, maksimum hidroliz hızı V_{max} 'da azalmıştır.

Roadze ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada, *A. awamori* 466 'dan elde edilen glukoamilaz çeşitli destek materyallerine immobilize edilmiştir. Enzimin sorpsiyonunun; miktarına, destek materyalinin tipine ve immobilizasyon koşullarına bağlı olduğu belirlenmiştir. Doğal ve immobilize enzimin asidik inaktivasyon kinetikleri çalışılmış ve immobilize enzimin sıcaklık ve pH açısından daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Enzimin bağlanma mekanizması ise IR spektroskopisi ile incelenmiştir.

A. niger'den elde edilen ve immobilize edilen glukoamilaz enzimi maltodekstrinden glukoz üretmek amacıyla kullanılmıştır (Tanrıseven ve ark. 2002). Enzim, jelatinize mısır nişastasına enzim adsorpsiyonu ve aljinat fiber hapsedme metotlarının birleştirilmesiyle oluşturulan yeni bir yöntemle immobilize edilmiştir. Immobilizasyon % 22'lik bağlı aktivite ile sonuçlanmış ve enzimin aktivitede herhangi bir düşüş olmaksızın aktif kaldığı gözlenmiştir. Optimum koşullar immobilizasyondan etkilenmemiş ve serbest ve immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4.3 ve 60°C olarak bulunmuştur. Maltodekstrinin, serbest ve immobilize enzim ile hidrolizindeki için kinetik parametreler de hesaplanmıştır.

Bir başka çalışmada; α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilaz enzimlerinin bütül akrilat ve pentaeritrit triakrilat veya etilen glikol dimetakrilat kopolimerleri üzerine immobilizasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Özellikle -OH, -COOH ve -NH₂ fonksiyonel gruplarını içeren kopolimerler üzerinde durulmuştur. Fonksiyonel gruplar etilendiamin ile aminoliz edilerek polimer matriksi üzerine tutturulmuştur. Aynı yapıya sahip belirli destek materyalleri, glutaraldehit, divinil sülfon veya karbodiimit ile aktive edilmiştir. Araştırılan yedi destek materyalinden, bütül akrilat ve etilen glikol dimetakrilatın kopolimerinin üç amilolitik enzimin immobilizasyonu için en uygun olduğu bulunmuştur. Seçilen immobilize enzim uygulamalarının aktiviteleri ile termal ve pH kararlılıkları belirlenmiştir (Bryjak 2003).

Glukoamilaz enzimi poröz polimer destek materyali üzerine immobilize edilmiştir (Huo ve ark. 2004). Immobilize edilmiş glukoamilaz enziminin özellikleri ve immobilize

enzim aktivitesi ile poröz polimer destek materyalinin özellikleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Doğal enzimle karşılaştırıldığında, immobilize glucoamilazın sıcaklık profili genişlemiş ve optimum pH değeri de değişmiştir. İmmobilize glucoamilaz enziminin optimum substrat konsantrasyonu doğal enziminkinden yüksektir. 23 günlük depolamadan sonra, doğal enzim başlangıç aktivitesinin yalnızca %58'ini korurken immobilize glucoamilaz enzimi başlangıç aktivitesinin %84'ünü korumuştur. 7 kez arka arkaya kullanıldıktan sonra da immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %85'ini korumuştur.

A. niger'den elde edilen glucoamilaz (GA) iyonik adsorbsiyon ile polietilenimin (PEI) ile kaplanmış DEAE-agaroz, Q1A-Sepa mikroküreler ve Sepa mikroküreler EC-EP3 üzerine immobilize edilmiştir (Torres ve ark. 2004). İmmobilizasyon koşulları (pH, polimer boyutu) optimize edildikten sonra adsorbsiyon direncinin PEI-Sepa mikrokürlerde, Q1A-Sepa mikrokürelerde ve DEAE- destek materyallerinde olduğundan çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Çünkü glucoamilaz enzimini PEI-destek materyali (örn., 1 M NaCl at pH 5.5) üzerinden uzaklaştırmak için yüksek iyonik şiddet gerekir. Termal kararlılık ve optimal sıcaklık da immobilizasyon ile artmıştır. Geri kazanılmış aktivitenin, düşük yüklemenin kullanıldığı durumlar hariç kullanılan substrata bağlı olduğu görülmüştür (maltoz veya nişasta).

2005 yılında Sanjay ve Sugunan tarafından yapılan bir çalışmada, *A. niger* 'den elde edilen glucoamilaz, aktif kil (montmorillonit) (K-10) üzerine adsorbsiyon ve kovalent bağlama ile immobilize edilmiştir. İmmobilize edilen glucoamilaz enzimi XRD kullanılarak karakterize edilmiştir, yüzey alanı ölçümleri yapılmış ve nişasta hidrolizi için immobilize enzim aktivitesi reaktörde test edilmiştir. XRD göstermiştir ki enzim, 2,25 nm'ye kadar genişleyebilen tabakası olan kil matriksin lamellerarası boşluklarına girer. Kovalent olarak bağlanmış glucoamilazın Michaelis sabiti (K_m) serbest enzimin K_m değerinden daha küçüktür. Her iki immobilize sistem de 96 saatlik sürekli işlem sonrasında başlangıç aktivitesinin neredeyse %100'ünü korumuştur.

Kimyasal olarak sentezlenmiş polianilin, glutaraldehit (PANIG) ile aktive edilmiş ve glukoamilaz bunun üzerine immobilize edilmiştir (Silva ve ark. 2005). Sıcaklıkla muamele edildiğinde immobilize glukoamilaz enzimi (PANIG-GA) serbest enzime göre daha iyi sonuç vermiştir. Immobilize ve serbest enzimin pH profili benzer özelliktedir. Bununla birlikte PANIG-GA alkalın aralığında (pH 8.0 – 10.0 arasında) daha yüksek kararlılık göstermiştir. Nişasta için serbest enzimin Km değeri ($4,76 \text{ mgmL}^{-1}$) immobilize glukoamilaz enziminin değerinden ($0,43 \text{ mgmL}^{-1}$) daha yüksek iken, immobilize glukoamilaz enzimi için bulunan Vmax değeri ($0,95 \mu\text{mol min}^{-1}$) serbest enzimin değerinden ($8,58 \mu\text{mol min}^{-1}$) daha küçüktür. İnce tabaka kromatografisi (TLC) serbest ve immobilize enzimin nişasta hidroliz ürünleri arasında hiçbir değişiklik göstermemiştir.

Epoksi gruplar içeren makro gözenekli, hidrofilik ve reaktif destek materyalleri, glisidil metakrilat (GMA) ve metakrilik asitin (MAA) süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Lineer poli(vinil asetat) (PVAc) ve toluen karışımı gözenek oluşturuju ajanlar olarak kullanılırken, divinil benzen (DVB) çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen destek materyalleri glukoamilaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmıştır (Bai ve ark. 2006). Destek materyalindeki epoksi gruplarının mükemmel reaktifliklerinden dolayı glukoamilaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize glukoamilazın geri kazanılan aktivite değeri %78 dir. Immobilize glukoamilaz için elde edilen Km değeri ise serbest enzimin Km değerinin 3 katı kadar, Vmax değeri ise immobilize glukoamilazda serbest enzimden biraz daha büyüktür. Sonuç olarak immobilize glukoamilaz kullanılarak çözünebilir nişastanın hidrolizi için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 5.0-6.0 ve 55°C olarak bulunmuştur. Diğer yandan, immobilize glukoamilaz enzimi mükemmel termal kararlılık, tekrar kullanım ve asit ve bazlar için dayanıklılık göstermiştir.

Bu çalışmada, glukoamilaz ve tripsin enzimlerinin *N*-isopropilakrilamit ve 2-hidroksietil metakrilat veya modifiye edilmiş glisidil metakrilat termo duyarlı kopolimerleri üzerine immobilizasyonu değerlendirilmiştir (Agnieszka ve ark. 2007). Metot duyarlı polimerlerin şişme özelliklerine dayanmaktadır. Soğutmada polimerler genişler ve yüzeye

adsorblanan enzimi içine çeken bir pompa gibi çalışır ve daha sonra enzim glutaraldehit ile çapraz bağlanır bu sayede birbiri içine geçmiş polimer ağı oluşur. Çalışmada destek materyali-enzim sisteminin özellikleri ve kısmen de çapraz bağlamanın depolanma kararlılığına etkisi üzerinde odaklanılmıştır. Modifiye edilmemiş termo duyarlı destek materyalleri için de veriler elde edilmiştir ve etilendiamin ile hidrofilleştirilmiş destek materyalleri ile karşılaştırılmıştır. Her iki enzim için de en yüksek kalan immobilize enzim aktivitesinden dolayı TH8-NH₂ destek materyali en uygun olandır. Her ikisinde de düşük molekül ağırlıklı substratlar tercih edilmektedir.

Milasovic ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada bir gram makro gözenekli polimer üzerine 190 mg periodat oksitlenmiş glukoamilaz immobilize etmeyi başarmıştır. Kovalent olarak immobilize edilmiş enzim 1100U/g spesifik aktiviteye sahiptir. Sıcaklık ve pH optimumları ile birlikte kinetik parametreler de belirlenmiştir. İmmobilize edilmiş enzim, derişik maltoz ve nişasta hidrolizat şuruplarının hidrolizi için farklı tipte reaktörlerde test edilmiştir. Reaktördeki 4 haftalık sürekli kullanım boyunca immobilize enzim aktivitesinde herhangi bir düşme olmaksızın 1L reaktör hacmine karşı 1300 kg glukoz üretmiştir.

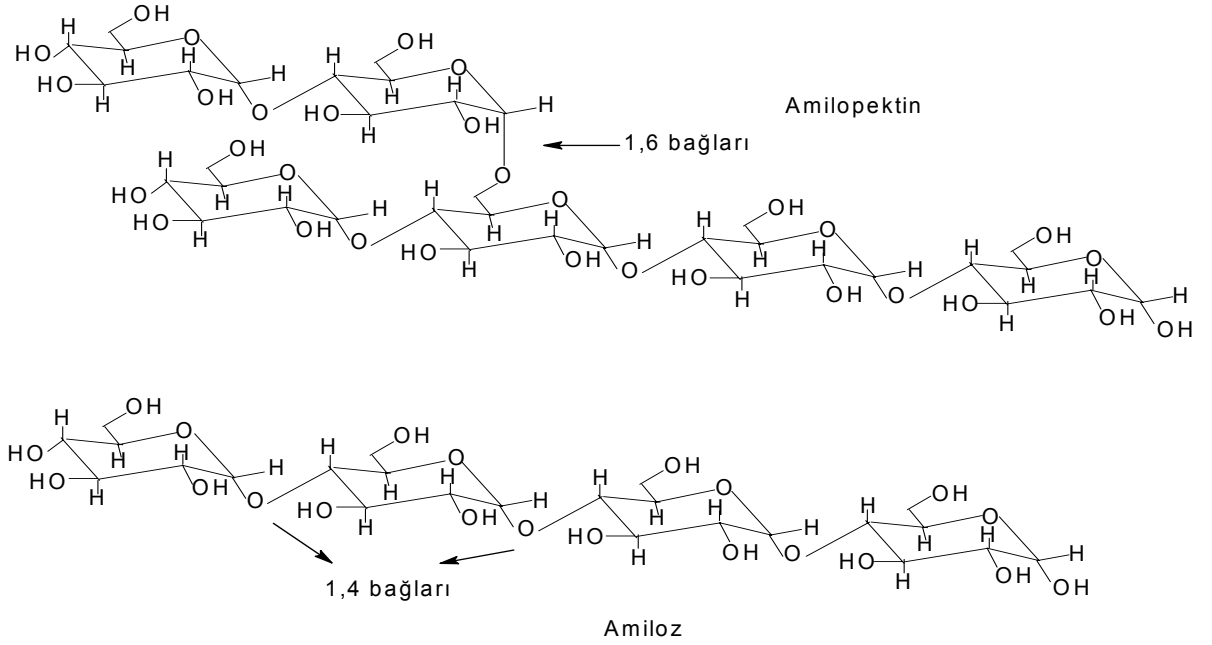
A. niger'den elde edilen glukoamilaz enziminin immobilizasyonu için orijinal bir metot geliştirilmiştir (Tanrıseven ve Ölçen, 2008). Enzim, polietilen glikol ve çözünebilir jelatin varlığında poliglutaraldehit ile aktive edilmiş jelatin partikülleri üzerine immobilize edilmiştir ve işlem %85 immobilizasyon verimi ile sonuçlanmıştır. İmmobilize edilen enzim 30 gün boyunca tamamen aktiftir. Ayrıca immobilize enzim 60 ve 90 gün içerisinde sırasıyla aktivitesinin %90 ve %75 'ini korumuştur. Enzimin optimum koşulları immobilizasyondan etkilenmemiştir. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4°C ve 65°C'dir. Serbest ve immobilize glukoamilaz enzimi ile maltodekstrinin hidrolizinin kinetik parametreleri de belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimler için Km değerleri sırasıyla 7,5 ve 10,1 g maltodekstrin/l 'dir. Vmax değerleri ise 20 ve 16 µmol glukoz/ (min µl enzim) olarak hesaplanmıştır. Bu yeni geliştirilen metot basittir ama etkilidir ve diğer bazı enzimler için de kullanıma uygundur.

2.7. Çalışmada Kullanılan Substrat ve Özellikleri

2.7.1. Nişasta

Çok sayıda monosakkarit biriminin biraraya gelmesi sonucu polisakkaritler meydana gelir. Eğer birleşen birimlerin hepsi aynı ise bu bir "biyohomopolimer"dir. Farklı birimlerin birleşmesinden ise "biyoheteropolimerler" meydana gelir. Biyohomopolisakkaritlerin en önemlileri nişasta ve selülozdur.

Glikoz canlıların önemli bir enerji sağlama maddesi, nişasta ise enerji depolama maddesidir. Yapısı çok sayıda D-glukoz moleküllerinin maltozda olduğu gibi, α -1,4 şeklinde birleşmesiyle meydana gelmiştir. Nişasta, tahıllarda, baklagillerde, patates gibi yumrulara bol miktarda bulunur. Az miktarda da bitkilerin hemen her yerinde bulunur. Tahıl nişastası, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki türün karışımından oluşmuştur. Amiloz, tahıl nişastasının % 20 -30 'unu oluşturur. Suda çözünür ve iyot ile mavi renk verir. Reaksiyon, iyot moleküllerinin glukoz birimleri tarafından oluşturulan tünelciklerin boşluğuna yerleşmesi sonucu meydana gelen formun farklı fiziksel özellikler göstermesi esasına dayanır. Nişastanın molekül yapısı Şekil 2.7.1.1 'de gösterilmiştir.

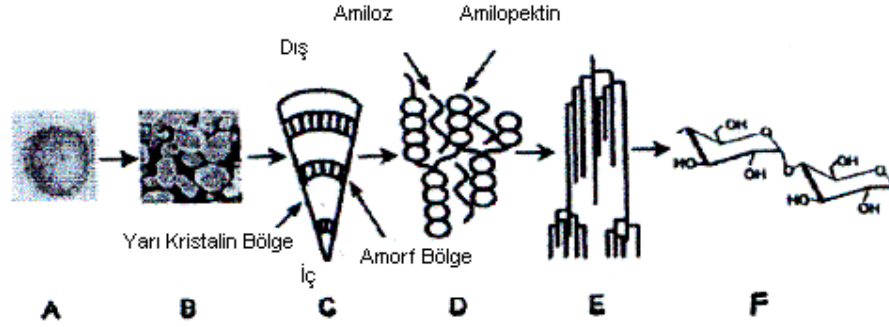


Şekil 2.7.1.1. Nişastanın molekül yapısı

Nişasta granülleri amorf ve kristalin bölgelerden oluşmaktadır. Nişastanın kristal yapı özelliği uzun ve esnek polimer zincirinde yer alan OH grupları arasındaki hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Yumru ve köklerde bulunan nişastada kristalin bölge yalnızca amilopektinden oluşurken amiloz amorf bölgededir. Tahıl nişastasında ise amilopektin yine kristalin bölgenin ana komponentidir. Amiloz ise zayıf kristal yapıli lipidler ile kompleks yapılar oluşturarak granülü güçlendirmektedir. Şekil 2.7.1.2. nişastanın organizasyonu şematik olarak gösterilmektedir.

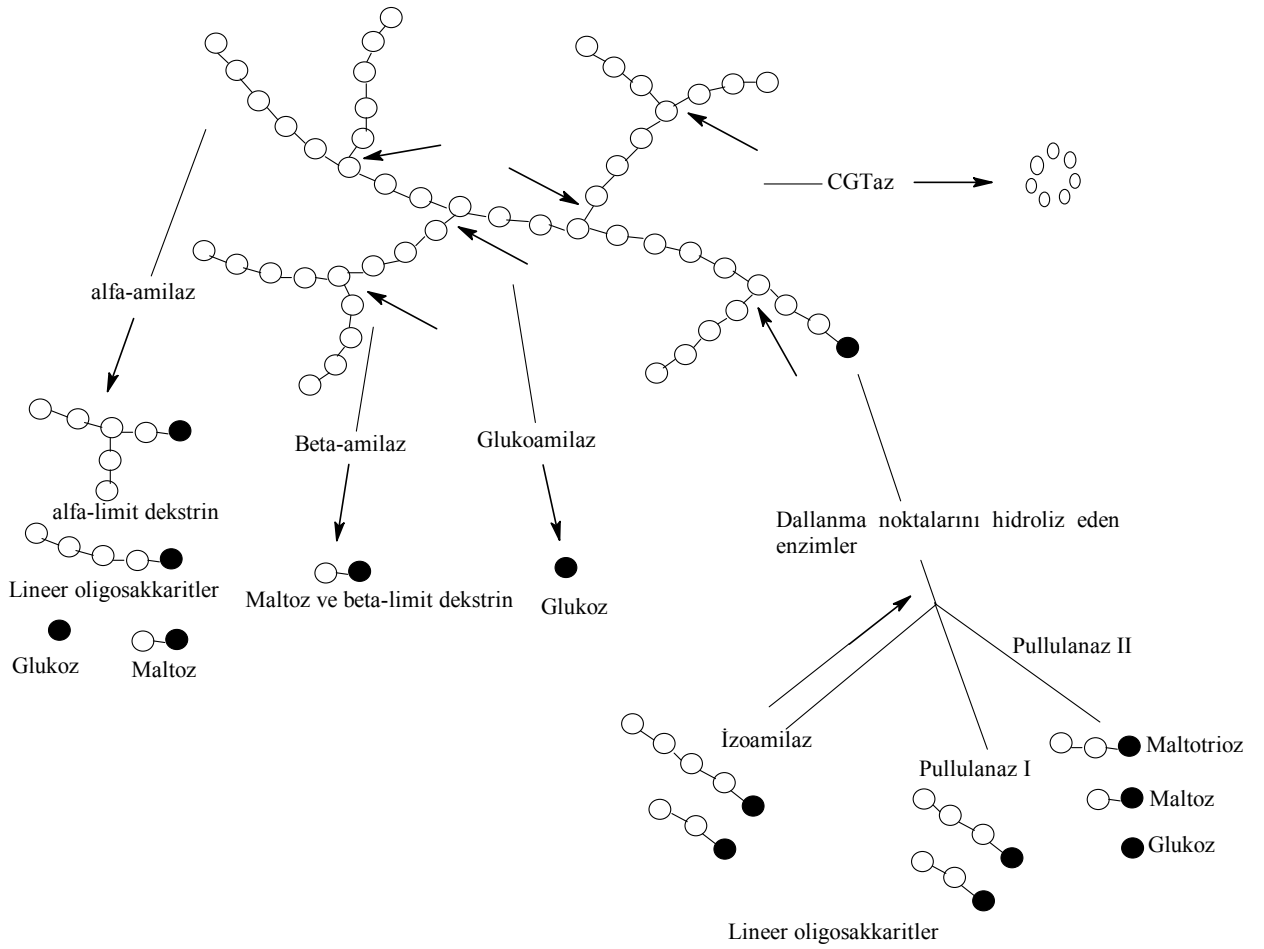
Amilopektin, tahıl nişastasının % 70 - 80 'ini oluşturur, molekül ağırlığı büyüktür, $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ ve zincirler 250 - 5000 glikoz biriminden oluşmuştur. Molekülde fazlaca $\alpha - 1,6$ şeklinde dallanmalar bulunur (Şekil 2.7.1.1). Yaklaşık 20 - 30 glikoz birimlik aralıklarla 13 - 18 birimlik dallanmalar vardır. Patates nişastasındaki amilopektin yüzdesi daha fazladır ve molekül ağırlığı da diğer nişastalara göre daha yüksektir. Amilopektin suda çözünmez, iyot ile mavi - kırmızı bir renk verir. Sıcak suda kolloidal olarak dağılır ve buna "nişasta pişmiş" denir. Bu olay bir hidroliz olmayıp, su moleküllerinin sıcaklığın etkisiyle

dallanmış olan nişasta moleküllerinin arasına girmesi ve sağlam yapıyı dağıtarak bozması şeklindedir (Beutler 1981).



Şekil 2.7.1.2. Nişastanın organizasyonu: a) Nişasta granülü b) Nişasta granüllerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü c) Yarı kristalin ve amorf bölgeler d) yarı kristalin bölge e) Amilopektin yapısının organizasyonu f) α-1,4 bağlı glukoz molekülleri

Bütün nişasta türleri asitli su ile ısıtılınca glikoza hidroliz olur. Amilaz enzimi de nişastayı maltoz veya glikoza kadar hidrolizler, maltoz ise "maltaz" enzimi ile glikoza hidrolizlenir. Ayrıca nişastalar karbonhidrat kaynağı olarak tüketilir. Kıvam koyulaştırıcı olarak yiyeceklerde kullanılır. Nişasta gıdasal olmayan uygulamalarda kumaşların dayanıklılığını ve kağıt yüzeylerinin kalitesini arttırmakta yaygın olarak kullanılır. Şekil 2.7.1.3'de nişastadan çeşitli ürünler elde etmede kullanılan enzimler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7.1.3. Nişastadan çeşitli ürünler elde etmede kullanılan enzimler

2.8. Enzim Katalizinin Mekanizması

Enzimler, kimyasal dengeye erişilmesini hızlandırır. Bu hızlandırma, kimyasal katalizörlerin çok üstündedir. Buna örnek olarak üreaz enziminin kataliz gücünü verebiliriz: Üreaz enzimi, üreyi aşağıdaki reaksiyona göre hidroliz ederek NH_4^+ ve HCO_3^- iyonlarına dönüştürmektedir.



pH 8.0 , 20°C ve su içinde bu reaksiyonun hız sabiti enzim yokluğunda $3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ iken, enzim varlığında $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Böylece üreaz enziminin bu reaksiyonu 10^{14} kat hızlandırdığı görülmektedir. Benzer hesaplamalar diğer enzimatik reaksiyonlar için de yapıldığında, enzimlerin reaksiyonları $10^8 - 10^{20}$ kat arasında hızlandırdığı gözlenir. Enzimlerin bu olağanüstü kataliz gücünde başlıca dört önemli faktör rol oynar:

1- Enzim, substrat molekülünü bağlayarak, parçalanacak bağın aktif merkezdeki katalitik gruba çok yakın durmasını ve ara ürünün kolayca oluşmasını sağlar.

2- Bazı enzimler, substratla dayanıksız kovalent ara ürünler oluştururlar; böylece reaksiyonun kolaylaşmasını sağlarlar.

3- Proton verici veya proton alıcı olarak fonksiyon gören bazı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla bir enzim, genel bir asit veya baz katalizini gerçekleştirebilir.

4- Enzim, substrat molekülündeki parçalanacak olan bağın gerilmesi veya deformasyonunu sağlayarak, bağın parçalanmasını kolaylaştırır.

2.9. Enzim Aktivitesi ve Miktarının Tayini

Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanarak bulunur. Bu iş için enzim hakkında bilgiler gerekmektedir: (1) katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi, (2) enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacının olup olmadığı, (3) substrat ve varsa kofaktörü için K_m değerleri, (4) optimum pH 'sı, (5) enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı ve (6) substratın kayboluş veya ürünün oluşum hızlarının tespit edilebildiği basit bir analitik metot.

Enzim aktivitesi tayin edilirken optimum pH ve doyumluğun üzerindeki substrat konsantrasyonları seçilir. Böylece sıfırıncı mertebeden bir reaksiyon oluşur. Kofaktörlü enzimlerle ilgili tayinlerde, koenzim veya metal iyonları konsantrasyonları da doyumluğun çok üzerinde alınır. Bu durumda sistemde hızı sınırlayan tek faktör enzim konsantrasyonudur. Yani hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır ve çözeltideki enzim seviyesini direkt olarak verir. Ürünün oluşum hızının ölçülmesi genellikle substratın harcanma hızına göre daha hassas sonuçlar verir. Çünkü tayinlerdeki substrat

konsantrasyonu oldukça yüksektir ve harcanan miktar da buna oranla çok düşüktür. Dolayısıyla farkı hassas olarak belirlemek imkansızdır. Reaksiyon ürünleri özel kimyasal veya spektroskopik metotlarla ölçülür. İkincisi daha avantajlıdır, çünkü reaksiyonun devamı boyunca ölçüm yapabilmek ve buna paralel olarak sonuçları grafik üzerine kaydetmek mümkündür.

Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi "enzim ünitesi" (birimi) cinsinden verilir. 25°C'da ve optimal şartlarda 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına "1 enzim ünitesi"(EU veya U şeklinde gösterilir) denilmesi genelde kabul edilmiştir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi mol olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır. 1 katal enzim, belirli şartlar altında saniyede bir mol madde dönüşümüne sebep olur. Bazı enzimler için özel ünite tanımları da vardır. "Spesifik aktivite" (özümlü aktivite) terimi de 1 mg protein başına enzim ünitesi (E.U./mg protein) olarak tarif edilir. Bu, enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim izolasyonu esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında, proteinlerde uygulanan metotlar aynen geçerlidir.

2.9.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesine, bir başka deyimle, enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörler şöyle sıralanabilir: 1- substrat konsantrasyonu, 2- enzim miktarı, 3- pH, 4- sıcaklık, 5- iyonik şiddet, 6- varsa kofaktör konsantrasyonu, 7- inhibitör ve aktivatör konsantrasyonları. pH ve sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen en önemli iki etkidir.

2.9.1.1. pH'nın etkisi

Her enzim için aktivite maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla birlikte bütün enzimlerin pH - aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. pH-enzim aktivitesi ilişkisinde önemli faktörler şunlardır:

(1) Substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grupların pK' sı, (2) Enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının pK'sı, (3) Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK'sı, (4) Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı. pH - aktivite eğrileri, her bir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu elde edilir. Çünkü birçok enzimin Km sabiti pH ile değişir.

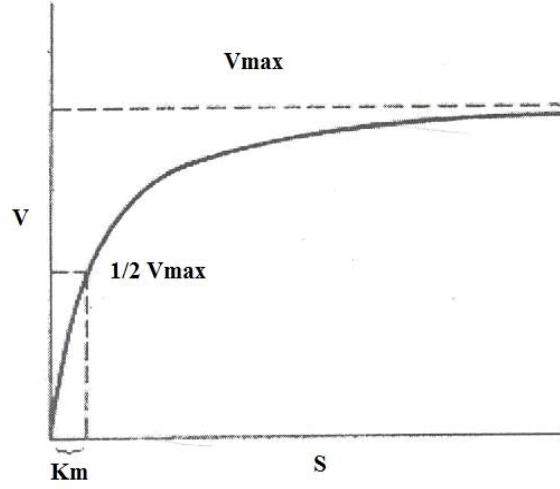
2.9.1.2. Sıcaklığın Etkisi

Bütün kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla artar. Enzimli reaksiyonlar bu genelden farklı bir davranış göstermez. Artan sıcaklıkla enzimatik reaksiyon hızı artar, fakat, 50-60°C üzerine çıktığında aktivitede düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkla enzim yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklanır. Bir enzim için, 10°C' lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı Q10 değeriyle ifade edilir. Şöyle ki; mesela 20°C ve 30°C sıcaklıklarda belirli miktarda enzim için ölçülen aktivitelerden yüksek olanının, düşük olana bölünmesiyle elde edilen sayı o enzim için Q10 değerini oluşturur. Bütün enzimler için Q10 değeri 1,7 ile 2,5 arasında değişir. Bundan dolayı, belirli sıcaklıkta gerçekleştirilen laboratuvar ölçümlerinde 0,1°C 'lik hassasiyetin korunması gerekir.

Sıcaklık bir in vivo aktivite düzenleme aracı değildir. Çünkü, canlılar sıcaklığın nispeten sabit olduğu izotermal sistemlerdir.

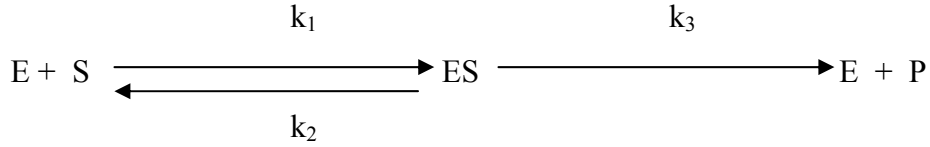
2.10. Enzim Kinetiği

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, Şekil 2.10.1'deki eğriyi verecek bir model geliştirdiler. Bu model birçok enzimin kinetik özelliğini açıklamada başarılı olmuştur.



Şekil 2.10.1. Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi.

Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu,



denklemleriyle gösterdiler. Buna göre; E enzimi ve S substratı k_1 hız sabiti ile ES enzim-substrat kompleksini oluşturmaktadır. ES kompleksinin iki yolu vardır: Ya k_2 hız sabiti ile tekrar E ve S 'ye ayrışacak veya k_3 hız sabiti ile ürüne (P) dönüştürülecektir. Burada ürünün tekrar ES kompleksine dönüşmeyeceği farz edilmektedir. Ürün konsantrasyonunun ihmal edilebilecek seviyede olduğu başlangıç durumunda, bu varsayım tamamen doğrudur. Yukarıdaki reaksiyonda ürünün oluşum hızı

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [ES] \quad 2.10.1$$

eşitliği ile verilir. Burada ES terimini enzim ve substrat konsantrasyonları gibi bilinen değerler cinsinden göstermemiz gerekmektedir. ES 'nin oluşma ve parçalanma hızlarını

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] \quad 2.10.2$$

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad 2.10.3$$

denklemleri vermektedir. ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon boyunca nisbeten sabit kaldığı, yapılan spektroskopik çalışmalarda bulunmuştur. Bu da ES kompleksi oluşma hızının parçalanma hızına eşit olmasıyla mümkündür. Böylece

$$\frac{-d[ES]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt}$$

eşitliğinden,

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad 2.10.4$$

eşitliği çıkar. 2.10.4 'ten $[ES]$ 'yi çekip bir düzenleme yaparsak

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad 2.10.5$$

bulunur. 2.10.5 eşitliğindeki sabitleri tek bir terimde toplamak için, $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ yazarız. Burada K_m 'ye Michaelis sabiti adı verilir. Bu sabit yerine konulduğunda

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad 2.10.6$$

çıkarmak.

2.10.6 eşitliğinde pay'da bulunan $[E]$ ve $[S]$ terimlerini inceleyelim: Burada herhangi bir andaki S konsantrasyonunu başlangıçtaki ile aynı alabiliriz. Çünkü enzim konsantrasyonu substrat konsantrasyonundan pek çok defa küçük olduğundan reaksiyon

boyunca S konsantrasyonunun değişmediğini kabul edebiliriz. Fakat serbest haldeki enzim konsantrasyonu ($[E]$), toplam enzim konsantrasyonu ($[E_T]$) ile $[ES]$ arasındaki farka eşittir. Yani,

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad 2.10.7$$

Bu ifadeyi 2.10.6 eşitliğinde $[E]$ 'nin yerine koyarsak

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_m} \quad 2.10.8$$

elde edilir. 2.10.8 denklemini $[ES]$ için çözdüğümüzde

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad 2.10.9$$

eşitliği çıkar. $v = k_3[ES]$ denkleminde $[ES]$ yerine 2.10.9 denkleminin sağ tarafı konursa,

$$v = k_3 [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad 2.10.10$$

elde edilir. $[E_T] = [ES]$ doygunluk halinde reaksiyon maksimum hızla yürür. Öyle ise,

$$V_{\max} = k_3 [E_T] \quad 2.10.11$$

olacaktır. 2.10.11'i 2.10.10'da yerine koyduğumuz zaman

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \quad 2.10.12$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğe Michealis-Menten denklemi adı verilir ve Şekil 2.10.1' deki

eğrinin kinetik özelliklerini ifade eder. Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_m \gg [S]$ olacağından, $[S]$ ihmal edilir ve

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m} \quad 2.10.13$$

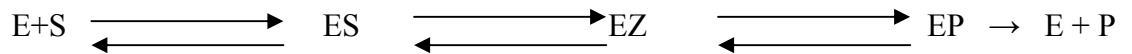
doğru denklemi elde edilir. Şekil 2.10.1 'deki eğrinin başlangıç kısmı, 2.10.13 denklemindeki $v-[S]$ ilişkisini göstermektedir. $[S] \gg K_m$ olduğu yüksek substrat konsantrasyonunda 2.10.12 eşitliğindeki K_m ihmal edilir ve $v = V_{\max}$ olur. Burada bütün enzim substratla doymuş ve artan $[S]$ ile hız değişmeyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır.

Şimdi özel bir durumu ele alalım: Hızın $V_{\max}/2$ olduğu durumda, değerleri Michaelis-Menten eşitliğinde yerine koyarsak,

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad 2.10.14$$

$[S] = K_m$ sonucunu elde ederiz. Buradan K_m sabitinin tanımını, "maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu" olarak çıkarabiliriz. Birimi de mol/L'dir.

Michaelis-Menten denklemi, enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde, bütün enzimler için temel bir ifadedir. Fakat birçok enzim, bu eşitliği çıkartırken kabul ettiğimiz bazı ideal şartlara uymayabilir. Mesela, birden fazla enzim-substrat kompleksinden sonra ürün oluşabilir. Yani,

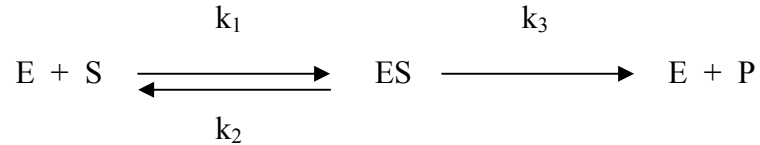


basamakları sonucunda katalizleme meydana gelir. Bundan başka bazı reaksiyonlarda iki veya daha çok sayıda substrat olabilir. Böyle bir durumda ES_1 , ES_2 ve ES_1S_2 gibi üç ayrı enzim-substrat kompleksi oluşabilir. Bu tip enzim reaksiyonlarının kinetik analizi çok karmaşıktır ve çözümleri bilgisayarlar aracılığıyla yapılır. Bununla birlikte bütün enzimlerin kinetiğinin analizinde başlangıçta Michaelis-Menten eşitliğinden faydalanılır.

2.10.1. K_m ve V_{max} Değerlerinin Önemi

Enzimlerin K_m değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. K_m değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_m değeri vardır.

K_m değerinin iki anlamı vardır. Birincisi K_m , enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi, K_m değerinin

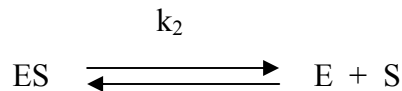


denklemlerle gösterilen katalizleme mekanizması basamaklarının hız sabitleriyle ilişkisi vardır. Yukarıda $K_m = k_2 + k_3 / k_1$ eşitliğini göstermiştik.

Şimdi k_2 'nin k_3 'ten çok büyük olduğu bir durumu ele alalım. Bu ES 'nin E ve S vermek üzere ayrışmasının, ürünün oluşmasından daha hızlı olduğu bir haldir. Bu durumda ($k_2 \gg k_3$ iken)

$$K_m = \frac{k_2}{k_1}$$

olur.



k_1

denklemine göre ES'nin ayrışma sabiti,

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1}$$

şeklinde ifade edilir. Yani $k_2 \gg k_3$ olduğu zaman, K_m ES 'nin ayrışma sabitine eşittir. Bu durumda K_m , ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_m zayıf bağlanmayı, düşük bir K_m kuvvetli bağlanmayı ifade eder. Sonuç olarak K_m , $k_2 \gg k_3$ iken, enzimin substrata olan ilgisinin derecesini gösterir.

Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Aynı zamanda substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler.

V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. Çünkü, $V_{max} = k_3[E_T]$ ile verilen maksimum hıza belirli konsantrasyondaki enzimin substratıyla doyumluk durumunda erişilir. Doygunluğun çok üzerindeki substrat konsantrasyonlarında hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Yani, enzim miktarını iki misline çıkardığımız zaman hız da iki misline çıkar. V_{max} teriminin birimini "ürüne çevrilen substratın mol sayısı / birim zaman" ve E_T 'nin birimini de "mol enzim" alırsak (substrat ve enzim aynı çözelti hacmi içinde olduğundan konsantrasyonlardaki hacim birimleri birbirini götürür), k_3 hız sabitinin birimi de "ürüne çevrilen substrat mol sayısı / mol enzim x birim zaman" olacaktır. Buradan "birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı" olarak tarif edilen "turnover sayısı"nın k_3 hız sabitine eşit olduğunu buluruz.

2.10.2. V_{max} ve K_m Değerlerinin Grafikle Tayini

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler, Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_m sabiti ve enzimin katalitik

aktivitesini gösteren V_{max} değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunur. Değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar tayin edilir. Bulunan değerler ya 2.10.12 denklemindeki yerlerine konularak veya Şekil 2.10.1 'deki eğri çizilerek K_m ve V_{max} belirlenir. Fakat, bazen bu deneylerden elde edilen " v " değerleri yanlış olabilir. Bu Şekil 2.10.1 'deki eğri üzerinde pek fark edilmez. Dolayısıyla bu eğriden ekstrapolasyonla sağlıklı V_{max} ve K_m değerleri elde edilemez. Aynı zamanda her enzimin doygun olduğu substrat konsantrasyonu hazırlanamayabilir. Bu yüzden Şekil 2.10.1 'deki eğrinin her noktası deneysel yoldan bulunamaz. Bunun sonucu olarak da V_{max} ve K_m tespit edilemez.

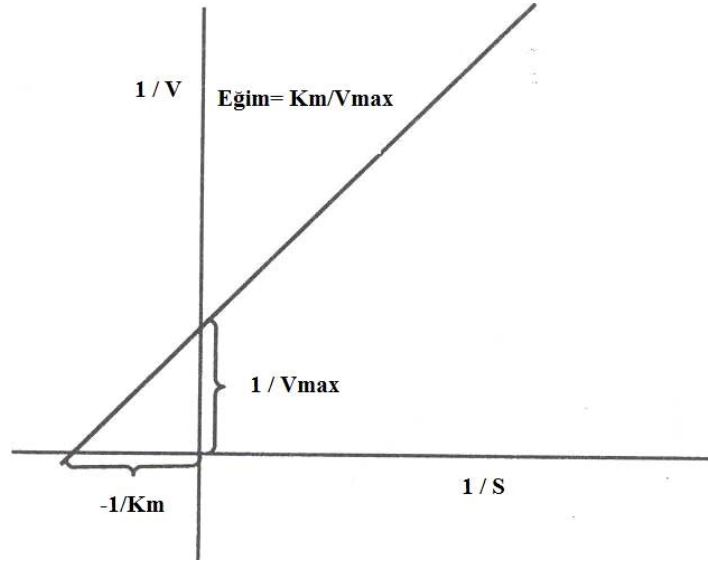
Yukarıda saydığımız sebeplerden dolayı Michaelis-Menten eşitliğini bir doğru denklemine dönüştürmek lazımdır. Bunu, eşitliğin her iki tarafını ters çevirerek gerçekleştirebiliriz.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]}$$

eşitliğinden;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

ifadesi çıkartılabilir. Bu $y = mx + n$ doğru denkleminde benzerdir. Doğrunun çizildiği grafikte $x = 1/[S]$, $y = 1/v$, eğim $m = K_m / V_{max}$ ve y ekseninin kesildiği nokta $1/V_{max}$ olur. Yukarıdaki ifadenin çizimi Şekil 2.10.2 'te gösterilmektedir. Bu çizime "Lineweaver-Burk grafiği" adı verilir.



Şekil 2.10.2 Lineweaver-Burk grafiği

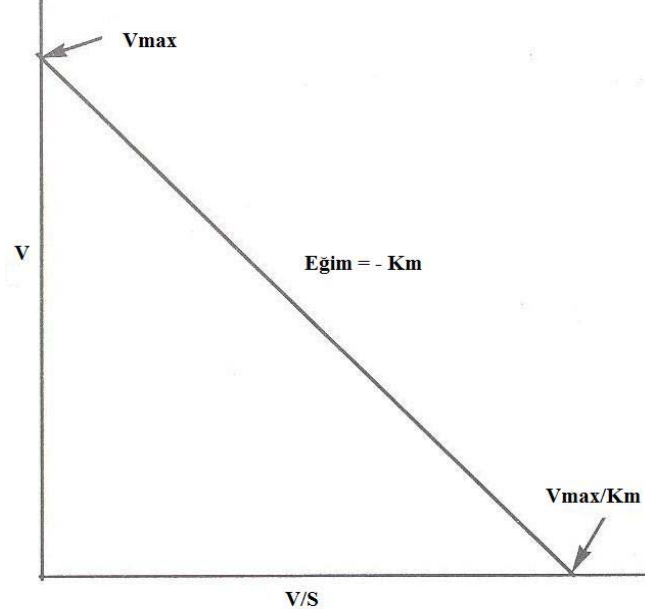
Doğru x-eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_m$ 'yi verir. Görüldüğü gibi bu grafikten faydalanarak V_{max} ve K_m değerleri bulunabilir. Deneylerde ortaya çıkan yanlış sonuçlar da, doğru üzerinde büyük sapmalar halinde, kolayca fark edilebilir.

Her ne kadar bu çizim şekli pek sık kullanılırsa da, pek hassas değildir. Çünkü grafik üzerinde düşük substrat konsantrasyonları ve onlara karşılık gelen hız değerleri daha çok yer almaktadır. Genellikle düşük substrat konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar daha az sağlıklıdır. Bu aksaklıkları ortadan kaldırmak için Lineweaver-Burk denkleminin her iki tarafının $V_{\text{max}} \times v$ ile çarpılması ve gerekli düzenlemelerin yapılmasıyla

$$v = -K_m \cdot \frac{v}{[S]} + V_{\text{max}}$$

doğru denklemi elde edilmiştir. v , $v/[S]$ 'ye karşı çizildiği zaman Şekil 2.10.3 'deki doğrusal grafik bulunur. Bu grafiğe Eadie-Hofstee grafiği adı verilir. Şekilden görüldüğü

gibi bu çizimden K_m ve V_{max} kolayca bulunabilmektedir. Aynı zamanda Lineweaver-Burk grafiğinde güç fark edilebilen doğrusal sapmalar burada rahatlıkla gözlenebilmektedir.



Şekil 2.10.3 Eadie-Hofstee grafiği

2.11. Çalışmada Kullanılan Destek Materyali ve Özellikleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan destek materyalinin önemi büyüktür. İsbetli olarak seçilen bir destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını artırır. İyi bir destek materyali büyük yüzeysel alan, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özelliklere sahip olmalıdır.

Destek materyalleri organik ve inorganik olarak sınıflandırılabilir. Organik destekler doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olmak üzere

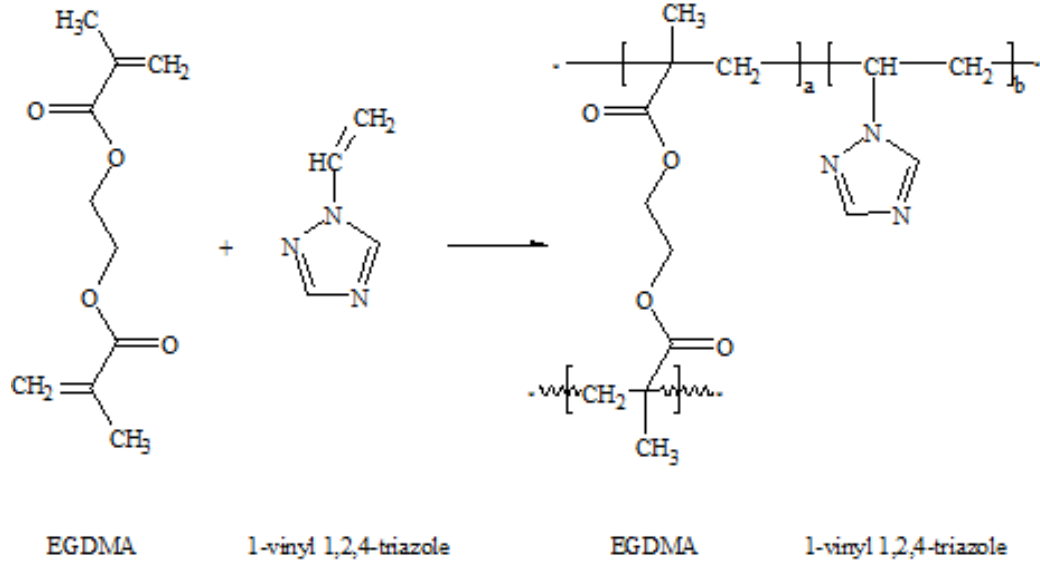
sınıflandırılabilir. Organik desteklere oldukça fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak kullanılan pek çok immobilize enzim sistemi bu desteklerle hazırlanır. Yaygın olarak kullanılan polisakkarit desteklerinden olan yosunlar ve selülozlar enzimleri bağlama (agaroz, dekstran, selüloz türevleri) ve hapsetme (aljinat, karregen) amacıyla kullanılırlar. Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmasıdır. Polisakkarit desteklerde hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonunu sağlar. Bununla birlikte polisakkarit desteklerin nükleofilik özelliklerinin zayıf olması nedeni ile aktivasyonu alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları ilavesi ile sağlanır.

Sentetik polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak çok kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar. Yaygın olarak kullanılan sentetik taşıyıcılar polistiren, vinil ve allil polimerler, poliamitler, poliakrilatlar, polimetakrilatlar, ve bunların türevleridir.

Bu çalışmada, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ile 1-vinil-1,2,4-triazolün (VTAZ) kopolimerizasyonu ile elde edilmiş olan poli(EGDMA-VTAZ) polimeri üzerine Cu(II) iyonları adsorbe edildikten sonra kullanılmıştır (Uzun ve ark. 2006).

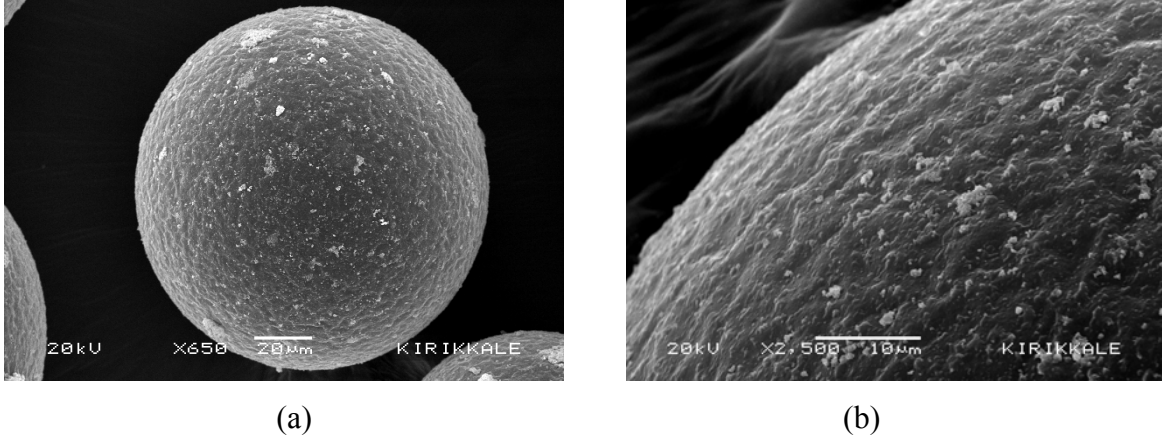
Çapraz bağlı poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri hidrofilik polimer ağlarıdır ve üç boyutlu yapılarını koruyarak, çözünmeden, yüksek miktarda su emme kapasitesine sahiplerdir. Süspansiyon polimerizasyonu sonucunda da boyutları 150-200 nm arasında değişen küresel poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri oluşur. Civa porozimetresi verilerine göre mikrokürelerin ortalama gözenek boyutu 740 nm'dir. Bu da mikrokürelerin birçok makro gözeneğe sahip olduğunu gösterir. Polimer mikrokürelerin yüzey morfolojileri ve yapıları taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş ve şekil-2.11.2'deki gibi görüntülenmiştir. Polimerik mikroküreler pürüzlü bir yüzeye sahiptirler. Yüzeyin pürüzlülüğü yüzey alanının artmasına neden olmaktadır. Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerinin spesifik yüzey alanı 65,8 m²/g, şişme oranı ise 84% 'tür. Su molekülleri

polimer zincirine daha kolay girerler ve sulu ortamda polimerin su çekme oranında artış meydana gelir. Yüksek oranda çapraz bağlı yapılarından dolayı mikroküreler sağlam yapıdadır ve bu nedenle kolon uygulamaları için de uygundur.



Şekil 2.11.1. Poli(EGDMA-VTAZ) polimerinin sentez reaksiyonu

KAYNAK: UZUN, L., KARA, A., TÜZMEN, N., KARABAKAN, A., BEŞİRLİ, N., DENİZLİ, A. 2006. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol dimethacrylate–1-vinyl-1,2,4-triazole) copolymer beads for heavy-metal removal. Journal of Applied Polymer Science, vol. 102., p. 4276–4283



Şekil 2.11.2. Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerinin SEM mikrografı (a) Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerin yüzey görüntüsü; (b) Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerin kesit görüntüsü.

Poli (EGDMA-VTAZ) polimerinin yapısındaki 1-vinil-1,2,4-triazol (VTAZ) ligandı azot atomundaki ortaklanmamış elektron çiftleri nedeniyle Cu(II) iyonu için çok uygun bir lewis bazıdır. Bu özellikten yararlanarak poli (EGDMA-VTAZ) polimeri üzerine Cu^{+2} iyonları tutturulmuştur. Diğer yandan da glukoamilaz enzimi yapısında fazla miktarda azot uçlu amino asit içermekte ve bu uçlarda Cu^{+2} iyonu için iyi bir ligand konumundadır. Tüm bu özelliklerden yararlanarak poli (EGDMA-VTAZ)- Cu^{+2} matriksi hazırlanmış, glukoamilaz enzimi bu matriks üzerine immobilize edilmeye çalışılmıştır. Bu yaklaşım enzim taşıyıcı destek materyallerinin hazırlanmasında klasik immobilizasyon yöntemlerine üstünlük sağlamaktadır. İmmobilize metal-afinite taşıyıcının hazırlanmasında pahalı, zaman alıcı ve kritik aşama şelat oluşturucu ligandın adsorbsiyon matriksine bağlanmasıdır. Ancak çalışmamızda kullandığımız poli (EGDMA-VTAZ) polimerinde yer alan VTAZ monomeri melat-şelat oluşturucu ligand olarak görev yapmış ve polimerik destek materyalinde herhangi bir modifikasyona gerek kalmaksızın Cu^{+2} iyonları direkt olarak mikroküreler üzerine adsorbe edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasallar

- Fluka (10115) ; *Aspergillus niger* 'den saflaştırılmış glukoamilaz (EC 3.2.1.3)
- Merck 101253 ; Çözünür nişasta (ekstra saf)
- Sigma F 9252 ; (2 N) Follin- Ciocalteu's Fenol Reagent (fosfomolibdik and fosfotungstik asid)
- Merck 159297; Na₂CO₃
- Merck 106462; NaOH
- Merck 102780; CuSO₄.5H₂O
- Merck 108085; C₄H₄KNaO₆4H₂O
- Merck 100314; Der HCl , %37 , d=1,19 g/mL, M=36,46g/mol
- Merck 106579; Na₂HPO₄.12H₂O
- Merck 106580; NaH₂PO₄.2H₂O
- Sigma A 6283; CH₃COOH , %100 , d=1,19 g/mL, M=60,05 g/mol
- Sigma S 9513; CH₃COONa.3 H₂O
- Across 156441000 ;C₇H₄N₂O₇ (Dinitrosalisilik asit)
- Sigma S 4672 ; Na₂SO₃
- Sigma P 1037 ; C₆H₅OH

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Tampon Çözelti Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler

a) 1 M sodyum hidrojen fosfat stok çözeltisi : 358,14 g Na₂HPO₄.12H₂O suda çözülerek saf su ile hacmi 1 L 'ye tamamlanmıştır.

b) 1 M sodyum dihidrojen fosfat stok çözeltisi : 156,01 g NaH₂PO₄.2H₂O suda çözülerek saf su ile hacmi 1 L 'ye tamamlanmıştır.

0,1 M derişiminde $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ tampon çözeltilerin hazırlanmasında Ek-1 'de verilen çizelgeden yararlanıldı. Örneğın pH = 6.5 olan 0,1 M fosfat tamponunun hazırlanması için 30,4 mL 1 M sodyum hidrojen fosfat çözeltisi ile 69,6 mL 1 M sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karıştırılarak elde edilen stok çözelti saf su ile 1L 'ye seyreltildi.

c) *1M asetik asit stok çözeltisi*: 57,2 mL %100 (w/w) , d=1,19 g/mL CH_3COOH saf su ile 1 L 'ye tamamlanmıştır.

0,1M derişiminde pH=3 ile 6 arasında $\text{CH}_3\text{COONa} / \text{CH}_3\text{COOH}$ tampon çözeltilerin hazırlanabilmesi için Ek-2 'de verilen çizelgeden yararlanıldı. Örneğın pH = 4,5 olan 0,1M asetat tamponunun hazırlanması için 64,5 mL 1 M asetik asit çözeltisi ile 4,830 g sodyum asetat karıştırılarak elde edilen çözelti saf su ile 1L 'ye seyreltildi.

3.1.2.2. İmmobilizasyonda Kullanılan Çözeltiler

a) *Glukoamilaz (enzim) çözeltisi*: İstenilen derişimdeki enzim çözeltisi, 0,0001 g hassasiyetindeki terazi ile glukoamilaz enziminin istenilen pH ve hacimdeki fosfat yada asetat tamponu içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Çözelti kullanılmadığı zaman buzdolabında (4°C) saklandı.

3.1.2.3. Glukoamilaz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

a) *Dinitrosalisilik asit (DNS) reagenti*: 2,5 g DNS 70-80 mL saf suda tamamen çözülür. Üzerine 2,5 g NaOH yavaş yavaş ilave edilir. Ardından çözeltiye 0,125 g sodyum sülfıt ve 0,5 g fenol eklenir. Tamamen çözünme gerçekleştikten sonra çözelti 250 mL 'ye tamamlanır.

b) *0,1M NaOH* : 0,4 g NaOH tartılarak bir miktar suda çözüldükten sonra saf su ile 100 mL 'ye tamamlanmıştır.

c) % 1,5 (w/v) nişasta çözeltisi : 1,5 g çözümlenir nişasta (Merck) bir miktar sıcak saf su içerisinde çözülerek saf su ile 100 mL 'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.

d) % 40 (w/v) Na-K Tartarat çözeltisi : 40 g Na-K Tartarat tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.4. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

a) 0,1 N NaOH çözeltisi: 4 g NaOH suda çözülerek saf su ile hacmi 1 L 'ye tamamlanmıştır.

b) % 2 (w/v) sodyum karbonat çözeltisi (Lowry A) : 20 g Na₂CO₃ katısı 0,1 N NaOH çözeltisi kullanılarak çözülmüş ve yine 0,1 N NaOH çözeltisi ile hacmi 1 L 'ye tamamlanmıştır.

c) % 1 (w/v) bakır sülfat çözeltisi (Lowry B₁) : 1 g CuSO₄.5H₂O suda çözülerek saf su ile hacmi 100 mL 'ye tamamlanmıştır.

d) % 2 sodyum-potasyum tartarat çözeltisi (Lowry B₂): 2 g Na-K tartarat suda çözülerek saf su ile hacmi 100 mL 'ye tamamlanmıştır.

e) Alkali bakır çözeltisi : Kullanımdan hemen önce 24,5 mL Lowry A , 250 µL Lowry B₁ ve 250 µL Lowry B₂ çözeltilerinin karıştırılması ile hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltinin 1 saat içerisinde kullanılması gerekmektedir.

f) 1N Follin-Ciocalteu's Fenol (fosfomolibdik ve fosfotungstik asit) çözeltisi: Bu çözelti 2 N stoklar halinde satılır. Kullanımdan hemen önce çözelti 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiştir.

3.2. Metodlar

3.2.1. Poli(EGDMA-VTAZ) Mikrokürelerin Sentezi

Poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreler süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlanmıştır. Reaksiyonda başlatıcı olarak AIBN (bisazoizobutironitril), stabilizatör olarak poli(vinil alkol), gözenek yapıcı (diluent) olarak ise toluen kullanılmıştır. 200 mg poli(vinil alkol) 50 mL saf su içerisine ilave edilmiş ve ardından dispersiyon fazının hazırlanması için EGDMA (6 mL;32 mmol) ve toluen (4mL) ayrı bir yerde oda sıcaklığında 15 dakika karıştırılmıştır. VTAZ (3mL;35mmol) ve AIBN (100 mg) hazırlanan dispersiyon fazının (organik faz) içerisine ilave edilmiştir. Daha sonra organik faz ilk olarak hazırlanan sulu faza ilave edilmiş ve polimerizasyon reaktöründe 400 rpm hızda manyetik olarak karıştırılmıştır. Reaktör 4 saat süre ile polimerizasyon sıcaklığı olan 70 °C'ye ısıtılmış ve ardından sıcaklık 80 °C'ye yükseltilerek 2 saat süre ile 600 rpm hızda karıştırılarak polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşan mikroküreler, reaksiyona girmeden kalan monomer ve gözenek yapıcının (toluen) uzaklaştırılması için aşırı miktarda etanol ve su ile yıkanmış ve saf su içerisinde 4°C'de depolanmıştır.

3.2.2. Cu²⁺ iyonlarının şelatlanması

Cu²⁺ iyonlarının poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri üzerine şelatlanması şöyle gerçekleşir: Mikrokürelerin 1.0 gramı, 50 ppm Cu²⁺ iyonu içeren 50 mL, pH 5.0 (asitliği HCl ve NaOH ile ayarlanmış) sulu çözelti ile karıştırılır ki bu pH değeri oda sıcaklığında şelat oluşumu için Cu²⁺ iyonları için optimum değerdir. Balon manyetik karıştırıcıda 100 rpm hızla 1 saat süreyle dengeye gelinceye dek karıştırılır. Ayrıca metal-şelatlanmış mikroküreler 4°C'de 10 mM Tris-HCl tamponunda (pH 7.4) saklanmıştır.

3.2.3. Glukomilaz Adsorpsiyon Çalışmaları

Cu^{2+} iyonları ile şelatlaştırılmış poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelere üzerine glukomilaz adsorpsiyonu çeşitli pH değerlerinde, asetat tamponu (0,1 M, pH 3.0-5.5) ve fosfat tamponu kullanılarak (0.1 M, pH 6.0-8.0) gerçekleştirildi. Glukoamilaz enziminin başlangıç konsantrasyonu 1.0 mg/mL'dir. Adsorpsiyon deneyleri 25°C'de 4 saat boyunca sürekli olarak karıştırılarak gerçekleştirildi. Bu işlemin sonunda enzim adsorblanmış mikrokürelere enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı ve tamponla 3 defa yıkandı. Mikrokürelere kullanılmaya kadar 4°C'de taze tampon çözeltisinde saklandı. Çözeltideki protein miktarını belirlemek için Lowry metodu kullanıldı ve adsorblanmış glukoamilaz enzim miktarı Eşitlik 3.2.3.1 kullanılarak hesaplandı

$$Q = [(C_0 - C)V] / m \quad 3.2.3.1$$

Burada, Q birim kütlede mikroküre üzerine adsorblanmış glukoamilaz enzim miktarıdır (mg/g); C_0 ve C , başlangıç çözeltisindeki ve sulu çözeltideki glukoamilaz konsantrasyonudur (mg/mL); V, sulu fazın hacmidir (mL); ve m de kullanılan mikrokürelere kütlesidir (g). Poli(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} mikrokürelere adsorpsiyon kapasitesini belirlemek amacıyla ortamdaki glukoamilaz enzimi konsantrasyonu pH 6.5'te 0.5-2.5 mg/mL değerleri arasında değiştirildi

3.2.4. Protein Tayini

Çalışmamızda protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır (Lowry ve ark. 1951). Protein miktarı belirlenirken enzim çözeltisi üzerine 1 mL alkali bakır çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından bu örnek üzerine 100 µL 1 N Follin-Ciocalteu's Fenol (fosfomolibdik ve fosfotungstik asit) çözeltisi eklenerek yine oda sıcaklığında 30 dakika bekleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler için gerekli blank çözelti ise protein örneği yerine tampon çözelti kullanılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan örneklerin absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda Shimadzu marka UV-1700 spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5. Protein ve Glukoz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Protein kalibrasyon grafiğinin hazırlanması için konsantrasyonu 0.1 ile 0.6 mg/mL arasında değişen glukozamilaz çözeltileri hazırlanmış ve Lowry metodu kullanılarak protein miktarları belirlenmiştir.

Glukoz kalibrasyon grafiğinin hazırlanması için de konsantrasyonu 0.1 ile 0.3 mg/mL arasında değişen glukoz çözeltileri hazırlanmış ve glukoz miktarı DNS metodu ile belirlenerek grafiğe geçirilmiştir.

3.2.6. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz İçin Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize glukozamilaz enziminin aktivitesi, 0.5 mL seyreltilmiş serbest enzim veya immobilize glukozamilaz enzimini içeren 0.5 mL asetat tamponu (0.1 M, pH 4.5) kullanılarak belirlendi. 1.5% (w/v) çözünebilir nişasta suda jelatinize edilerek (15 dk, 100°C, sürekli karıştırma) hazırlandı ve bu çözeltiden 0.5 mL alınarak başlangıçta hazırlanmış olan enzim çözeltisi üzerine ilave edildi. Reaksiyon 60°C'de 15 dakikalık inkübasyondan sonra 5mL NaOH çözeltisi (0.1 M) eklenerek durduruldu. İmmobilize enzim için reaksiyonun durdurulması ise mikrokürelerin basitçe reaksiyon ortamından ayrılması ile gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamındaki glukoz içeriği dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlendi (Miller 1959). Reaksiyon durdurulduktan sonra ortama DNS reagenti eklenerek karışım 90 °C 'da 5 dakika bekletildi ve ardından soğutulularak üzerine %40 'lık Na-K tartarat çözeltisi eklendi. Oluşan rengin şiddeti 540 nm'de ölçüldü. Tüm aktivite ölçümleri 3 defa tekrarlandı. Glukoamilaz enzimi için birim aktiflik, pH 4.5' te 60°C'de 1 dakikada çözünebilir nişastadan 1.0 µmol glukoz açığa çıkarabilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.7. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize glukoamilaz enzimi için optimum pH ve reaksiyon sıcaklığı belirlenirken geniş bir pH (pH 3.0 - 5.5 aralığında 0,1M sodyum asetat tamponu, pH 6.0-8.0 aralığında 0.1M fosfat tamponu) ve sıcaklık aralığında (25-80°C) serbest ve immobilize enzimin nişasta ile Bölüm 3.2.6 'da anlatıldığı şekilde inkübe edilmesiyle aktivite tayini yapıldı.

3.2.8. Tekrar Kullanım

İmmobilize enzimi içeren Poli(EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikrokürelerinin tekrar kullanımını incelemek amacıyla glukoamilaz enzimi adsorbsiyon ve desorbsiyon döngüsü 10 defa tekrarlandı. Glukoamilaz enziminin poli(EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikroküreleri üzerinden desorbsiyonu 50mM EDTA kullanılarak yapıldı. Mikroküreler fosfat tamponuyla (0.1 M, pH 7.0) birçok kez yıkandı ve tekrar enzim immobilizasyonunda kullanıldı.

3.2.9. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enziminin Michaelis-Menten Sabitlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin kinetik parametreleri (Km ve Vmax) 60°C'de asetat tamponu içerisinde (0.1 M, pH 4.5) çözünebilir nişasta [0.1 – 2.0% (w/v)] ile verdikleri reaksiyonun başlangıç hızları ölçülerek belirlendi. Bu amaçla, serbest ve immobilize glukoamilaz enzimi 1.0 ve 20 mg/mL aralığında değişik konsantrasyonlardaki çözünebilir nişasta çözeltilerine eklenerek başlangıç aktiviteleri Bölüm 3.2.6 'da anlatıldığı gibi belirlendi.

3.2.10. Termal Kararlılık

Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin termal kararlılığı ise asetat tamponunda (0.1 M, pH 4.5) ve üç farklı sıcaklıkta (60-65-70°C) enzimin kalan aktivitesi ölçülerek belirlendi. Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin enzimatik aktivitesi ise yine Bölüm 3.2.6'da anlatılan metot ile belirlendi.

3.2.11. Depolanma Kararlılığı

Depolanma kararlılığı için 4°C'de sodyum asetat tamponunda (0.1M, pH 4.5) saklanan serbest ve immobilize glukoamilaz enzim aktiviteleri Bölüm 3.2.6'da belirtilen deney koşullarında 2 ay süre boyunca aralıklarla ölçüldü.

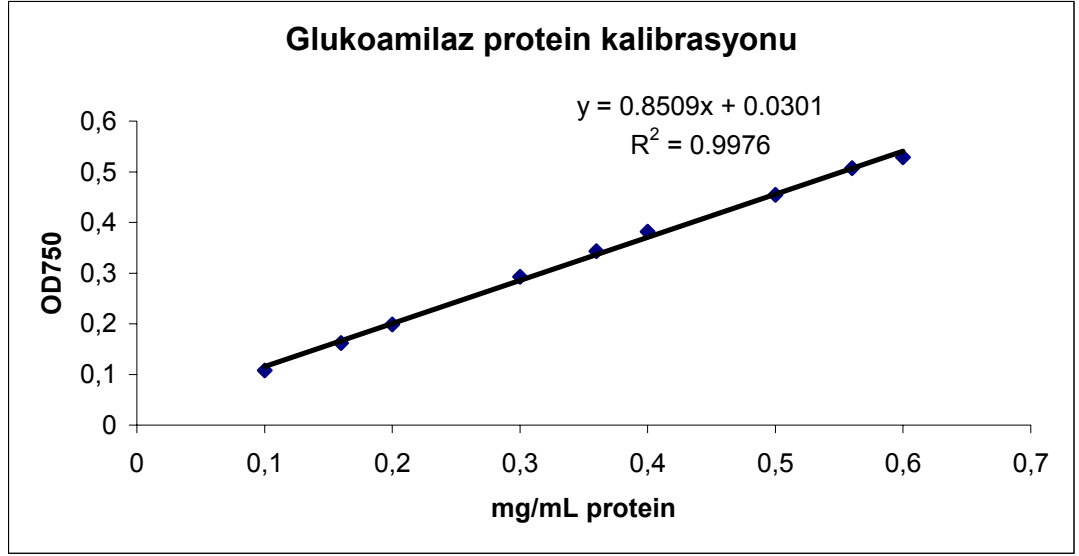
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Protein Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Protein kalibrasyon grafiğinin hazırlanması için konsantrasyonu 0.1 ile 0.6 mg/mL arasında değişen glukozamilaz çözeltileri hazırlanmıştır. Lowry metodu kullanılarak protein miktarları belirlenmiş ve Çizelge 4.1.1’ de verilen absorbans değerleri elde edilmiştir. Protein kalibrasyon grafiği Şekil 4.1.1 ‘deki gibidir. Çalışmanın bundan sonraki tüm aşamalarında adsorblanan protein miktarları bu kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1.1. Protein kalibrasyonu absorbans değerleri

Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Absorbans ($\lambda=750$ nm)
0.10	0.108
0.16	0.162
0.20	0.199
0.30	0.293
0.36	0.343
0.40	0.382
0.50	0.454
0.56	0.507
0.60	0.529



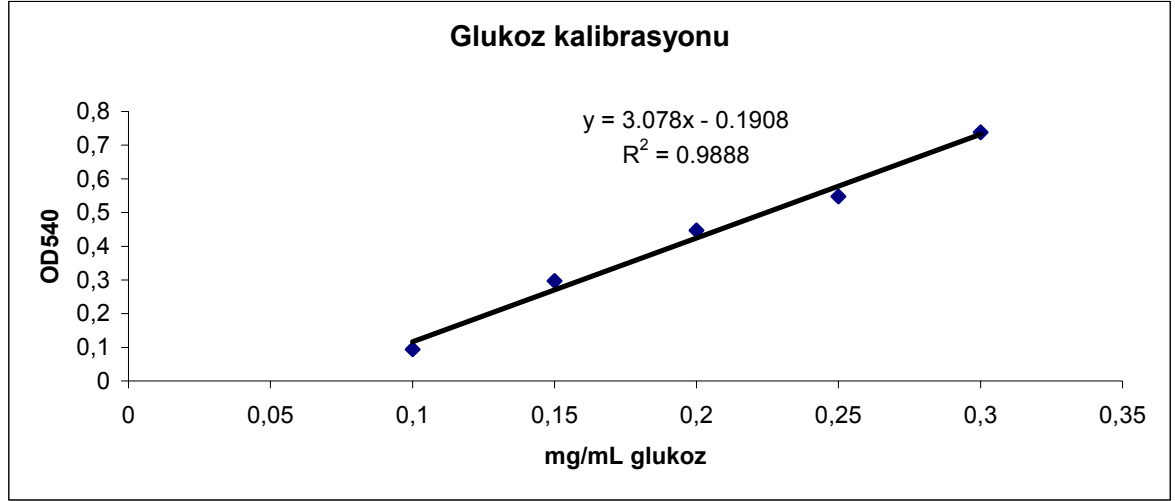
Şekil 4.1.1. Protein Kalibrasyon Grafiği

4.2. Glukoamilaz Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Glukoz kalibrasyon grafiğinin hazırlanması için de konsantrasyonu 0.1 ile 0.3 mg/mL arasında değişen glukoz çözeltileri hazırlanmış ve glukoz çözeltileri için 540 nm’de elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.2.1’de özetlenmiştir. Glukoz kalibrasyon grafiği Şekil 4.2.1’de ki gibidir. Çalışmanın bundan sonraki tüm aşamalarında aktivite değerleri bu kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2.1. Glukoz kalibrasyonu absorbans değerleri

Glukoz konsantrasyonu (mg/mL)	Absorbans ($\lambda=540$ nm)
0.10	0.094
0.15	0.297
0.20	0.447
0.25	0.548
0.30	0.738



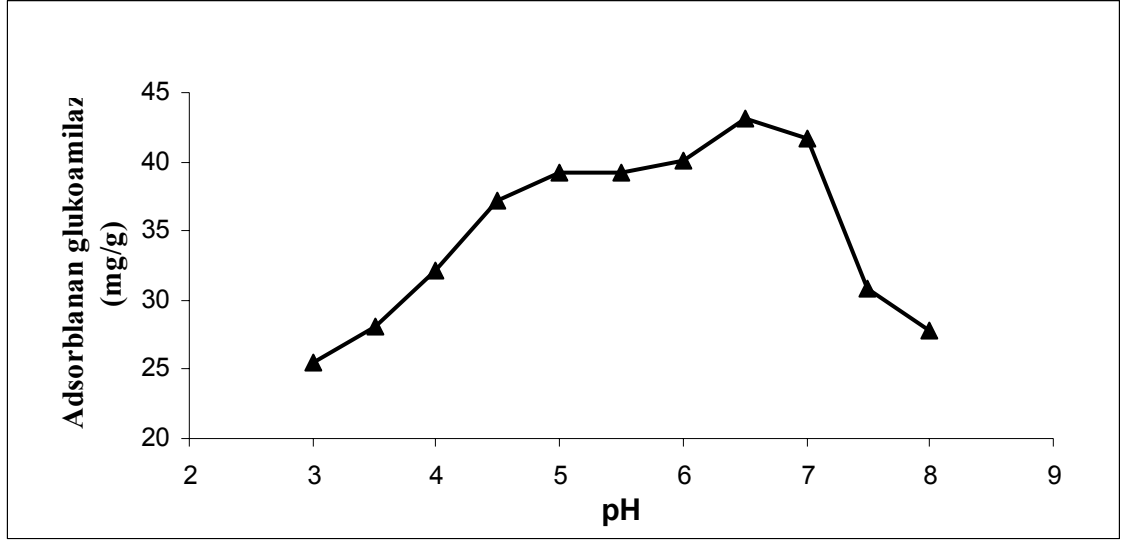
Şekil 4.2.1. Glukoz kalibrasyon grafiği

4.3. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu⁺² mikrokürelerin Glukoamilaz Adsorbsiyon Kapasitesine pH etkisi

Proteinlerin adsorbsiyonlarını etkileyen en önemli parametrelerden biriside pH 'dır. Adsorbsiyon çalışmaları 1mg/mL glukoamilaz konsantrasyounda, pH 3-8 aralığında Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde yapılmış ve adsorbsiyon miktarı Q (mg protein/g polimer) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.1 ve Şekil 4.3.1 'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum adsorbsiyonun pH 6.5 'de gerçekleştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3.1. Glukoamilaz adsorbsiyon kapasitesine pH etkisi

pH	Q(mg/g)
3.0	25.44
3.5	28.08
4.0	32.08
4.5	37.13
5.0	39.25
5.5	39.24
6.0	40.12
6.5	43.06
7.0	41.66
7.5	30.90
8.0	27.73



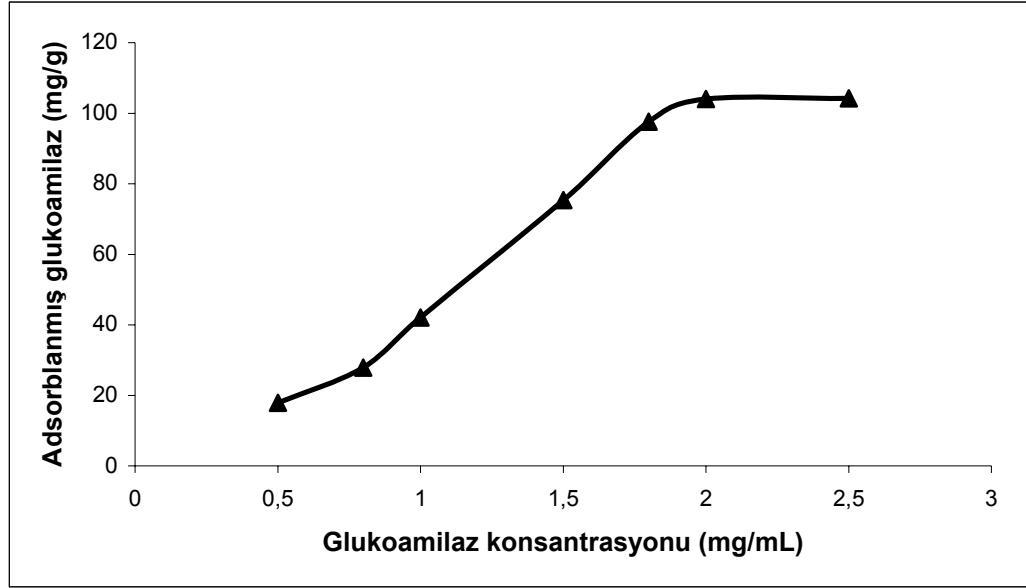
Şekil 4.3.1. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikroküreler üzerine glukoamilaz immobilizasyonuna pH etkisi: glukoamilaz konsantrasyonu, 1.0 mg/ml; zaman 4 saat; T 25 °C.

4.4. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikrokürelerin Glukoamilaz Adsorbsiyon Kapasitesine Konsantrasyon Etkisi

Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikrokürelerinin adsorbsiyon kapasitesini belirlemek amacıyla ortamdaki glukoamilaz enzimi konsantrasyonu maksimum adsorbsiyonun gerçekleştiği pH olan 6.5 'te 0.5-2.5 mg/ml değerleri arasında değiştirilerek adsorbsiyon miktarı Q (mg protein/g polimer) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.1 ve Şekil 4.4.1 'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum adsorbsiyonun 104 mg/g ile pH 6.5 'de gerçekleştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.4.1. Glukoamilaz adsorbsiyon kapasitesine konsantrasyon etkisi

Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Q(mg/g)
0.5	17.90
0.8	27.85
1.0	42.13
1.5	75.35
1.8	97.58
2.0	104.0
2.5	104.0



Şekil 4.4.1. Poli(EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikrokürelerinin adsorbsiyon verimi üzerine glukoamilaz enzimi konsantrasyonunun etkisi: pH 6.5; zaman 4 saat; T 25 °C.

4.5. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklık Etkisi

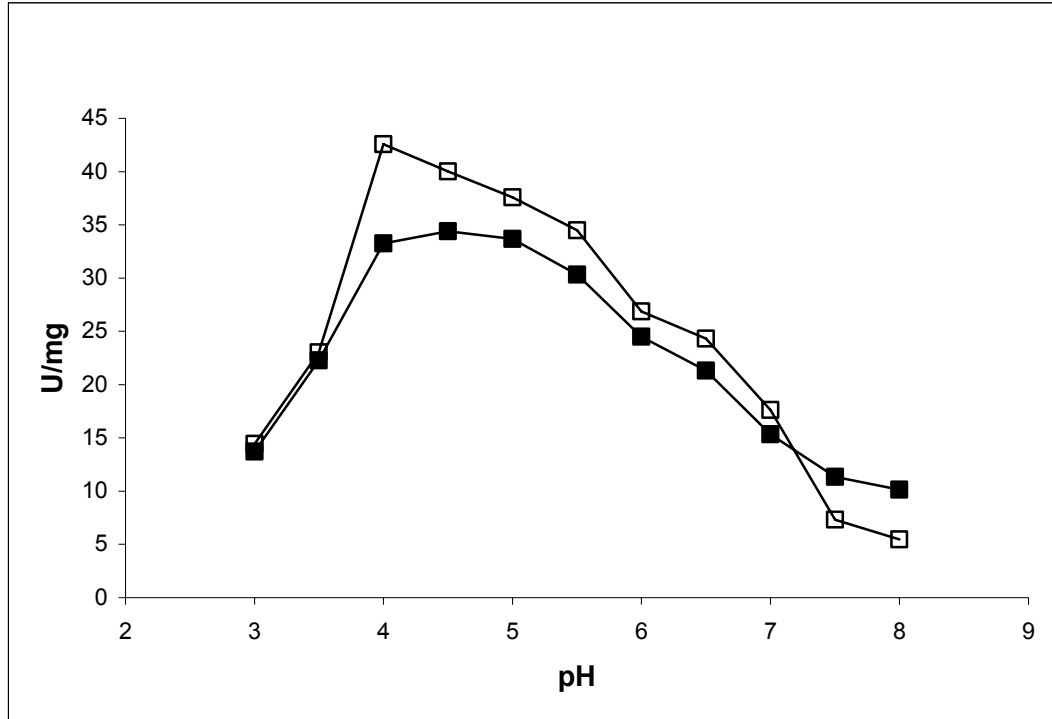
Serbest ve immobilize glukoamilaz enzimi için optimum pH ve reaksiyon sıcaklığı belirlenirken geniş bir pH (pH 3.0 - 5.5 aralığında 0.1M sodyum asetat tamponu, pH 6.0-8.0 aralığında 0.1M fosfat tamponu) ve sıcaklık aralığında (25-80°C) serbest ve immobilize enzimin nişasta ile inkübe edilmesiyle aktivite tayini yapıldı. Serbest glukoamilaz enzim aktivitesine pH etkisi için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.1 ve Şekil 4.5.1 'de, immobilize glukoamilaz enzimi için elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.5.2 ve Şekil 4.5.1 'de özetlenmiştir. Serbest glukoamilaz için maksimum aktivite pH 4 'de 42.57 U/mg, immobilize enzim için ise pH 4.5 'de 34.41 U/mg olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5.1. Serbest enzim aktivitesinin pH ile değişimi

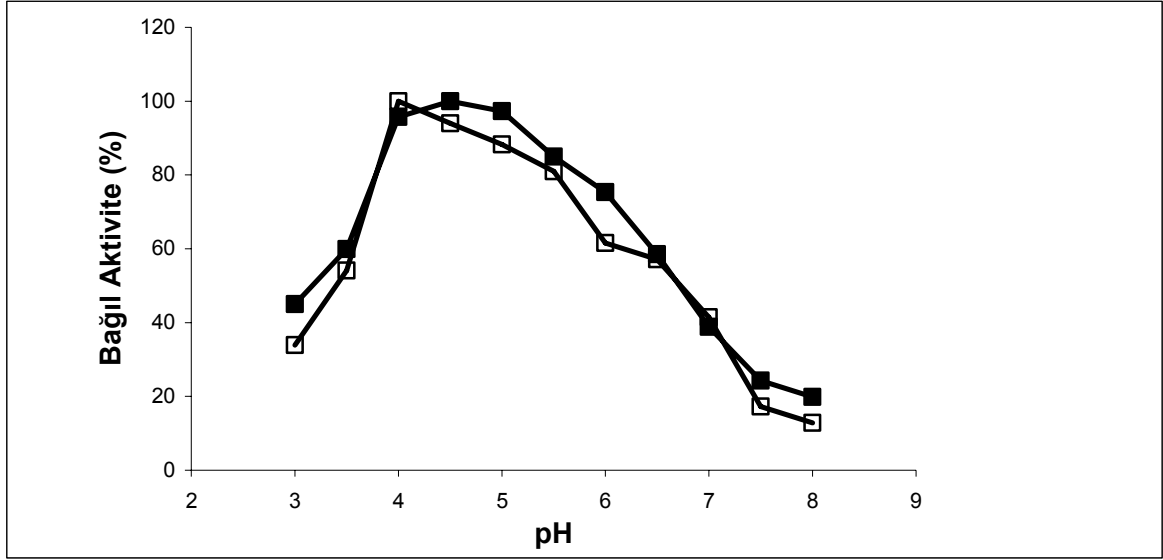
pH	U/mg	% Aktivite
3.0	14.44	33.92
3.5	23.03	54.12
4.0	42.57	100.00
4.5	40.01	93.99
5.0	37.58	88.29
5.5	34.48	81.01
6.0	26.87	63.12
6.5	24.31	57.11
7.0	17.63	41.42
7.5	7.33	17.23
8.0	5.46	12.83

Çizelge 4.5.2. İmmobilize enzim aktivitesinin pH ile değişimi

pH	U/mg	% Aktivite
3.0	13.73	39.89
3.5	22.28	64.74
4.0	33.24	96.61
4.5	34.41	100.0
5.0	33.67	97.84
5.5	30.31	88.08
6.0	24.48	71.14
6.5	21.30	61.90
7.0	15.33	44.55
7.5	11.35	32.98
8.0	10.14	29.49



Şekil 4.5.1 Serbest ve immobilize glucoamilaz enzim aktivitesine pH etkisi. (□) Serbest enzim; (■) immobilize enzim (Spesifik aktivite).



Şekil 4.5.2 Serbest ve immobilize glucoamilaz enzim aktivitesine pH etkisi. (□) Serbest enzim; (■) immobilize enzim (Bağıl aktivite).

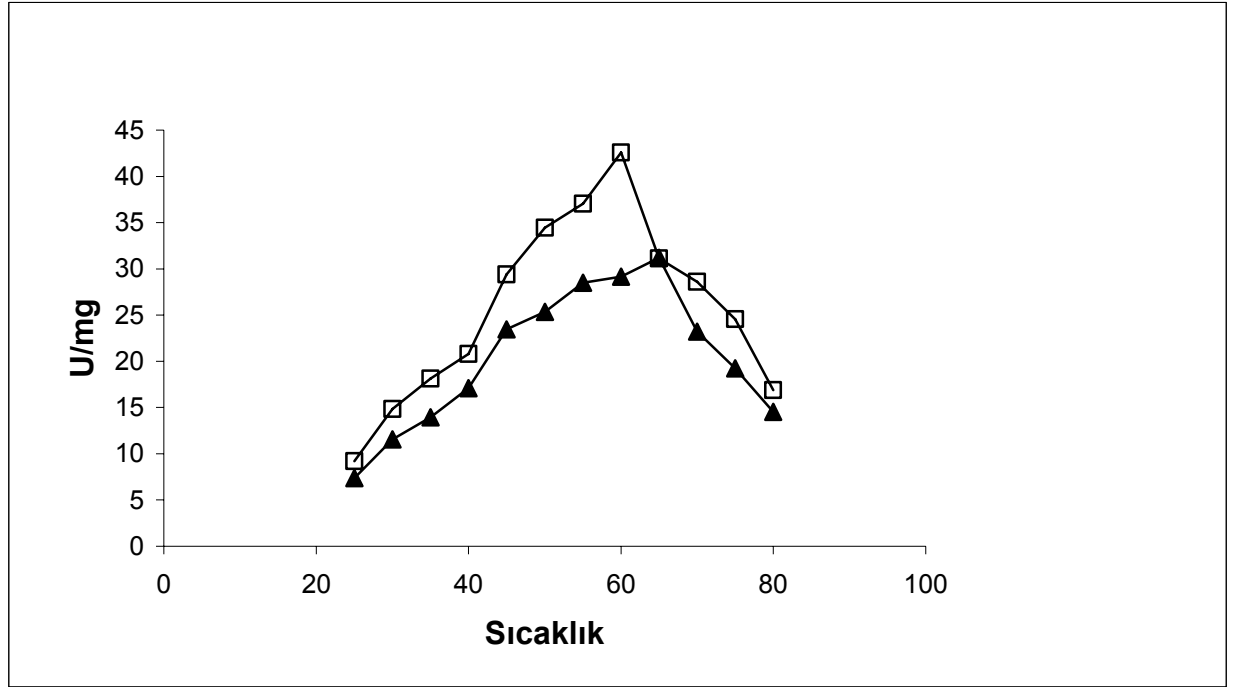
Serbest glucoamilaz enzim ativitesine sıcaklık etkisi için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.3 ve Şekil 4.5.3 'de, immobilize glucoamilaz için elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.5.4 ve Şekil 4.5.4 'de özetlenmiştir. Optimum sıcaklık serbest glucoamilaz enzimi için 60 °C ve immobilize glucoamilaz için ise 65 °C olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5.3. Serbest enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

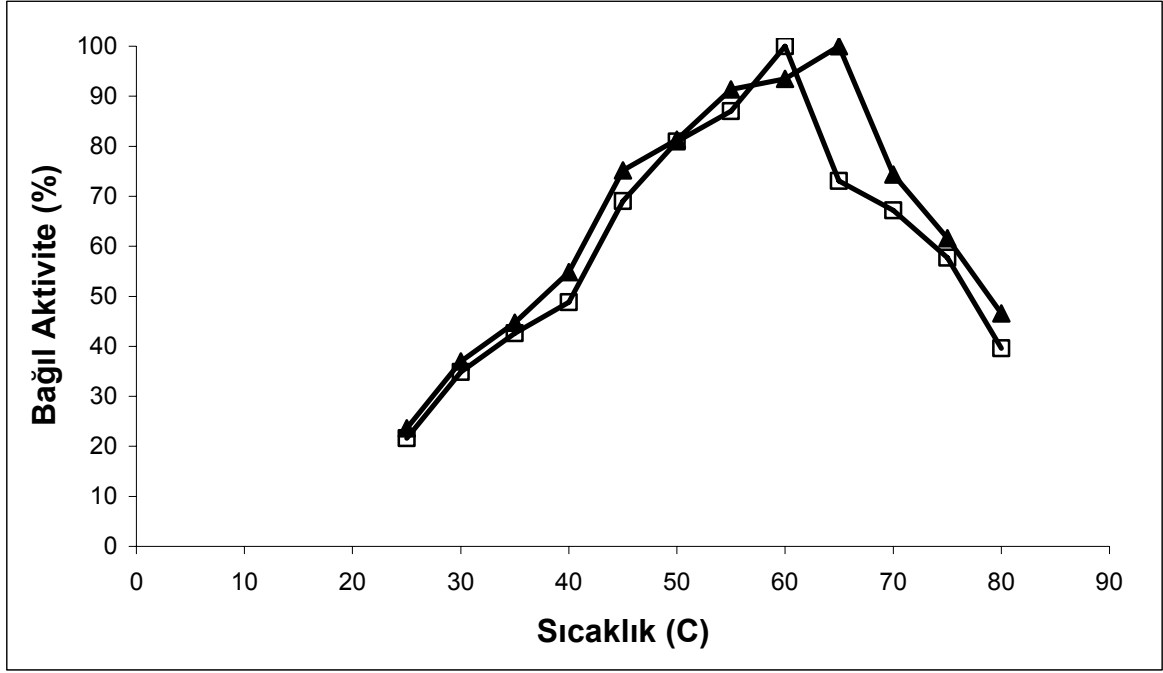
Sıcaklık (°C)	U/mg	% Aktivite
25	9.19	21.60
30	14.85	34.89
35	18.13	42.59
40	20.79	48.83
45	29.38	69.02
50	34.46	80.95
55	37.04	87.02
60	42.57	100.0
65	31.11	73.09
70	28.60	67.18
75	24.55	57.68
80	16.87	39.63

Çizelge 4.5.4. İmmobilize enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	U/mg	% Aktivite
25	7.36	23.62
30	11.54	36.98
35	13.95	44.72
40	17.09	54.80
45	23.45	75.19
50	25.36	81.30
55	28.51	91.39
60	29.15	93.46
65	31.19	100.0
70	23.20	74.36
75	19.22	61.60
80	14.53	46.57



Şekil 4.5.3. Serbest ve immobilize glucoamilaz enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi. (□) Serbest enzim; (▲) immobilize enzim (Spesifik aktivite).



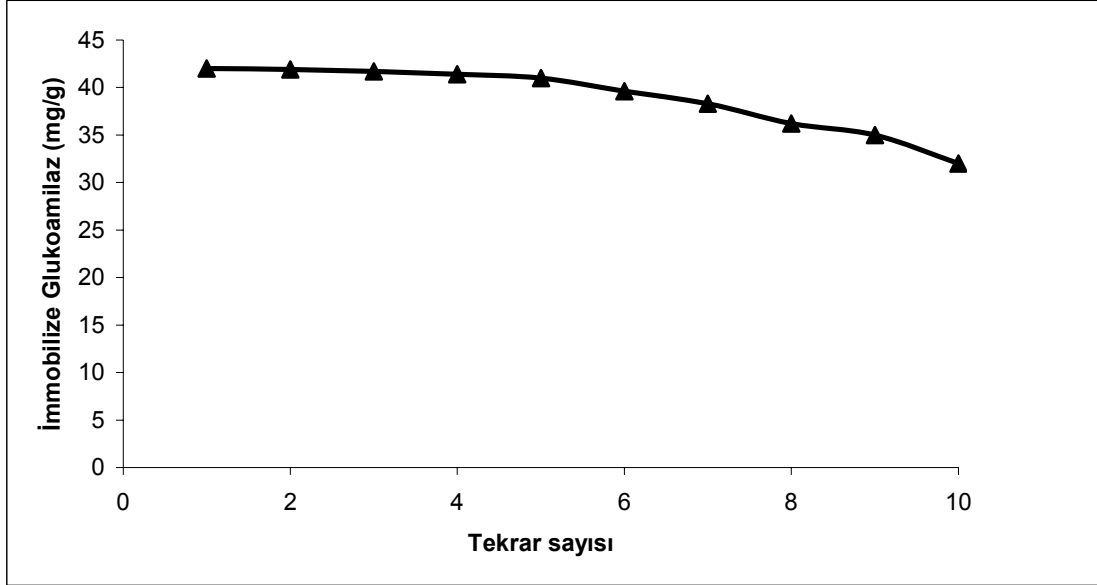
Şekil 4.5.4 Serbest ve immobilize glucoamilaz enzimi aktivitesine sıcaklık etkisi. (□) Serbest enzim; (▲) immobilize enzim (Bağlı aktivite).

4.6. Tekrar Kullanım

Serbest enzim bir kez, immobilize enzimler ise aktifliğini koruduğu sürece pek çok kez kullanılabilir. Immobilize glucoamilazın tekrar kullanımına ilişkin değerler Çizelge 4.6.1’de verildiği gibidir. Aktifliğin kullanım sayısı ile değişimi ise Şekil 4.6.1’de görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre 10 kez ard arda kullanım sonunda immobilize invertaz enzimi başlangıç aktivitesinin %76 ‘sini korumaktadır.

Çizelge 4.6.1. İmmobilize glukoamilazın tekrar kullanılabilirliği

Kullanım Sayısı	U/mg
1	42.0
2	41.9
3	41.7
4	41.4
5	41.0
6	39.6
7	38.3
8	36.2
9	35.0
10	32.0

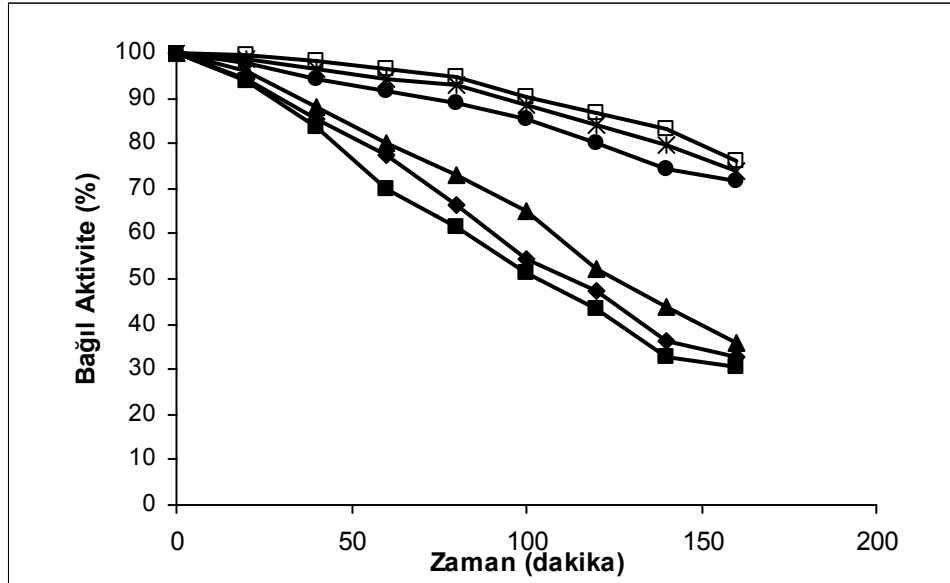
**Şekil 4.6.1** İmmobilize glukoamilaz enziminin tekrar kullanımı : glukoamilaz konsantrasyonu, 1.0 mg/ml; pH 6.5; zaman 4 saat; T 25 °C.

4.7. Termal Kararlılık

Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin termal kararlılığı ise asetat tamponunda (0.1 M, pH 4.5) ve üç farklı sıcaklıkta (60-65-70°C) enzimin kalan aktivitesi ölçülerek belirlendi.

Çizelge 4.7.1. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı

Zaman (dakika)	Serbest Enzim			İmmobilize Enzim		
	60 °C	65 °C	70 °C	60 °C	65 °C	70 °C
0	100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
20	96	94.34	93.70	99.75	98.67	97.65
40	88	85.54	83.50	98.40	96.34	94.32
60	80	77.62	69.80	96.67	94.35	91.78
80	73	66.40	61.70	94.70	92.70	88.78
100	65	54.32	51.20	90.15	88.60	85.32
120	52	47.50	43.20	86.70	84.12	79.89
140	44	36.40	32.78	83.40	79.86	74.54
160	36	32.90	30.50	75.89	73.94	71.76



Şekil 4.7.1. Serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin termal kararlılığı. (■) Serbest enzim, 60 °C; (●) serbest enzim, 65 °C; (▲) serbest enzim, 70 °C; (□) immobilize enzim, 60 °C; (○) immobilize enzim, 65 °C; (△) immobilize enzim, 70 °C.

4.8. Depolanma Kararlılığı

Depolanma kararlılığı için 4°C’de sodyum asetat tamponunda (0.1M, pH 4.5) saklanan serbest ve immobilize glukoamilaz enzim aktiviteleri Bölüm 3.2.6 ’da belirtilen deney koşullarında 2 ay süre boyunca aralıklarla ölçüldü. Serbest ve immobilize glukoamilaz için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8.1 ve Şekil 4.8.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8.1. Serbest ve immobilize enzimin depolanma kararlılığı

Zaman (gün)	Serbest Enzim		İmmobilize Enzim	
	U/mg	%Aktivite	U/mg	%Aktivite
1	34.41	100	42.57	100
5	26.15	76	-	-
10	19.95	58	41.71	98
15	9.29	27	40.86	96
20	0	0	40.01	94
25			37.03	87
30			34.05	80
35			30.22	71
40			25.11	59
45			21.28	50
50			19.58	46
55			17.00	40
60			15.32	36



Şekil 4.8.1. Serbest ve immobilize glucoamilaz enziminin depolanma kararlılığı. (■) Serbest enzim; (□) immobilize enzim.

4.9. Serbest ve İmmobilize Glukoamilaz Enziminin Michaelis-Menten Sabitlerinin Belirlenmesi

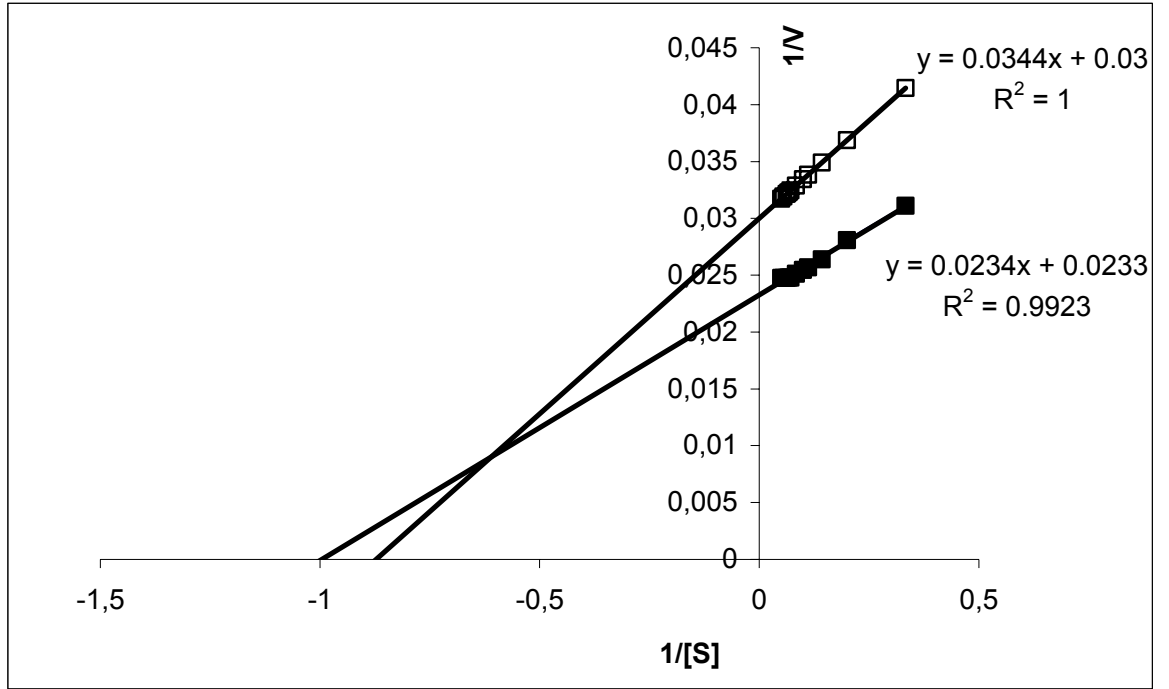
Serbest ve immobilize glucoamilaz enzimi 1.0 ve 20 mg/ml aralığında değişik konsantrasyonlardaki çözünebilir nişasta çözeltisine eklenerek başlangıç aktiviteleri Bölüm 3.2.6 'da anlatıldığı gibi belirlendi. Elde edilen veriler Çizelge 4.9.1, Şekil 4.9.1 ve Çizelge 4.9.2 'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.9.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Başlangıç aktivitelerin substrat konsantrasyonuna göre değişimi

[S] mg/mL	1/[S] mL/mg	Serbest Enzim		İmmobilize Enzim	
		V(U/mg)	1/V(mg/U)	V(U/mg)	1/V(mg/U)
3	0.333	32.15	0.0311	24.11	0.0414
5	0.200	35.61	0.0280	27.11	0.0368
7	0.142	37.91	0.0263	28.64	0.0349
9	0.111	38.96	0.0256	29.56	0.0338
10	0.100	39.27	0.0254	29.90	0.0334
12	0.083	39.82	0.0251	30.42	0.0328
14	0.071	40.36	0.0247	30.80	0.0324
15	0.066	40.38	0.0247	30.96	0.0322
16	0.062	40.40	0.0247	31.10	0.0321
18	0.055	40.40	0.0247	31.33	0.0319
20	0.050	40.40	0.0247	31.52	0.0317

Çizelge 4.9.2. Serbest ve Cu²⁺-şelatlanmış poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri üzerine immobilize edilmiş glukoamilaz enziminin özellikleri.

Enzim yapısı	Km (mg/mL)	Vmax (U/mg)	Vmax /Km	Geri Kazanım (%)
Serbest	1.00	42.9	42.9	100
İmmobilize	1.15	33.3	28.9	77



Şekil 4.9.1. Lineweaver-Burk Grafiği(■) Serbest enzim; (□) immobilize enzim.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Kopolimer Mikrokürelerin Özellikleri

Çapraz bağlı poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri hidrofilik polimer ağlarıdır ve üç boyutlu yapılarını koruyarak, çözünmeden, yüksek miktarda su emme kapasitesine sahiplerdir. Süspansiyon polimerizasyonu sonucunda da boyutları 150-200 nm arasında değişen küresel poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri oluşur. Civa porozimetresi verilerine göre mikrokürelerin ortalama boyutu 740 nm'dir. Bu da mikrokürelerin birçok makro gözeneğe sahip olduğunu gösterir. Polimerik mikroküreler pürüzlü bir yüzeye sahiptirler. Yüzeyin pürüzlülüğü yüzey alanının artmasına neden olur. Poli(EGDMA-VTAZ) mikrokürelerinin spesifik yüzey alanı $65.8 \text{ m}^2/\text{g}$, şişme oranı ise % 84 olarak bulundu. Su molekülleri polimer zincirine daha kolay girerler ve sulu ortamda polimerin su çekme oranında artış meydana gelir. Yüksek oranda çapraz bağlı yapılarından dolayı mikrokürelerin sağlam yapıda olduğunu söyleyebiliriz bu yüzden kolon uygulamaları için uygundurlar.

5.2. Glukoamilaz adsorbsiyonuna pH Etkisinin incelenmesi

Pearson'ın Lewis asit – Lewis baz kuramına göre, Cu^{+2} iyonu, diğer yumuşak asitler gibi aromatik ve alifatik amino grubu içeren ligandlardaki azot atomlarının bağ yapmayan eşleşmemiş elektronlarıyla etkileşirler. Bu nedenle, glukoamilaz enziminin amino asit yan grupları (örn. özellikle histidinin imidazol grupları) ile Cu^{+2} iyonları arasında kuvvetli bir bağ oluşabilir (Porath 1990). Çalışmamızda Cu^{2+} iyonu, bu avantajlı özelliğinden yararlanılarak 1-vinil-1,2,4-triazol ligandı ile koordine oldu ve enzim polimere Cu^{2+} iyonları aracılığıyla bağlandı. Glukoamilaz enziminin poli(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} mikroküreleri üzerine immobilizasyonuna pH'nin etkisi pH 3.0 - 7.0 aralığında incelendi ve sonuçlar Şekil 4.3.1' de verildi. Proteinlerin net yüklerinin sıfır olduğu nokta izoelektrik noktalarıdır ve bu nedenle sulu çözeltilerinde maksimum adsorbsiyon genellikle izoelektrik noktalarında gözlenir (Gunzer ve ark. 1984). Bu çalışmada kullanılan glukoamilaz

enziminin izoelektrik noktası 4.5 'tir. Şekil 4.3.1' de görüldüğü gibi glukoamilaz enziminin maksimum adsorbsiyonu daha nötral pH değerlerine kayarak pH 6.5'te gözlenmiştir. Osman ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada tirozinaz enzimi poli(EGDMA-VIM)-Cu⁺² şelat mikroküreler üzerine immobilize edilmiştir. Enzimin izoelektrik noktası 4.5 olmasına karşın proteinin maksimum adsorbsiyonu daha nötral bir değere kayarak pH 6.5 'te gerçekleşmiştir. Immobilize metal afinite kromatografisinde sert ve sınır metal iyonları aynı örnek için farklı selektivite gösterebilmektedir. Örneğin immobilize Fe⁺³ proteinleri asidik pH değerlerinde adsorblarken, adsorbsiyon Cu⁺² iyonları için nötral pH değerlerinde gerçekleşmektedir (Rodakiewicz-Nowak ve ark 2002). Çalışmamızda elde edilen bu sonuç glukoamilaz enzimi ile Cu²⁺ iyonu tutturulmuş polimerik matriks arasındaki spesifik etkileşimin kanıtıdır. Adsorbsiyonun pH 5.0 ve 7.0 aralığında en yüksek düzeyde olduğu, asidik (pH<4.5) koşullarda ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. pH 4.5 'dan daha düşük pH değerlerinde düşük protein bağlama kapasitesinin gözlenmesi hem destek materyaline bağlı Cu⁺² iyonları miktarının daha az olmasına hemde aminoasit yan zincirlerinin protonlanması ve metal iyonuna koordine olma yeteneğinin azalmasına bağlanabilir. Ortamın bazik tarafa kayması durumunda adsorbsiyon kapasitesindeki azalma ise hidroksil iyonlarının da Cu⁺² iyonlarına koordine olmak için yarışmasından kaynaklanabilir.

5.3. Glukoamilaz Adsorbsiyonuna Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi

Cu²⁺-şelatlanmış poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreler üzerine glukoamilaz enziminin adsorbsiyonu incelendiğinde, adsorbsiyon ortamında, glukoamilaz enzimi konsantrasyonundaki artışın adsorbsiyon veriminde artışa neden olduğu görülmektedir. Bu artış glukoamilaz konsantrasyonu 2mg/ml değerine ulaşınca kadar devam etmiş ve bu değerden sonra doyuma ulaşmıştır. Poli(EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikroküreleri için maksimum glukoamilaz adsorbsiyon miktarı 104mg/g olarak belirlenmiştir. Bu artış glukoamilaz enzimi ile şelatlanmış Cu²⁺ iyonları arasındaki spesifik etkileşimden kaynaklanmaktadır. Porath metal-afinite adsorbsiyonundaki moleküler etkileşimleri şöyle sınıflandırmıştır: (i) elektrostatik kuvvetlerden kaynaklanan iyonik bağ oluşumu; (ii)

örtüşen orbitallerde elektronlarla koordine bağlar; (iii) hidrofobik etkileşimler (Porath 1990). α -amilaz enzimi poli (EGDMA-VIM)- Cu^{+2} metal şelat matriks üzerine immobilize edilmiş ve 0.4 mg/mL değerinde doygunluğa ulaşılarak maksimum adsorbsiyon miktarı 38.9 mg/g olarak belirlenmiştir (Kara ve ark. 2005). Glukoamilaz enziminin immobilizasyonuna ilişkin diğer çalışmalarda çok farklı adsorbsiyon kapasiteleri elde edilmiştir. Örneğin montmorilonit için 10 mg/g (Sanjay ve Sugunan 2005), yüzey modifiye taşıyıcılar için 3.97mg/g (Parak ve ark. 2005), polietilenimin kaplı sephabead 35 mg/g (Torres ve ark. 2004) ve PVA-DVB-g-GMA-IDA- Cu^{2+} şelat matriks için 101.8 mg/g (Wang ve ark. 2007) olarak belirlenmiştir.

5.4. İmmobilize Enzim Aktivitesini Etkileyen Koşulların İncelenmesi

Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir. Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim-substrat kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı kompleks oluştuğunda reaksiyon hızı maksimumdur. Bu nedenle serbest enzimler için reaksiyon hızının maksimum olduğu pH değeri belirlenir. Genellikle enzimlerin optimum pH değeri 3 ile 8 arasındadır. Ekstrem pH değerlerinde yüksüz olan aminoasitler iyonlaşır ve benzer yüklü iyonlar arasında ortaya çıkan elektrostatik itmeler proteinlerin doğal yapısını bozar buda enzimin denaturasyonuna neden olur. Bu durumda reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır veya sıfıra düşebilir. Çalışmamızda substrat olarak kullanılan nişasta için, serbest ve immobilize glukoamilaz enziminin hidroliz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi 3.0 ve 8.0 değerleri arasında incelendi. Maksimum aktivite serbest glukoamilaz enzimi için pH 4 'te 42.57 U/mg olarak belirlenirken, immobilize enzim için optimal aktivite pH 4.5 'da 34.41 U/mg olarak gözlenmiştir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize glukoamilaz enzimi geniş pH aralığında mükemmel bir uyum göstermiştir. Bu da glukoamilaz molekülerinin poli(EGDMA-VTAZ)- Cu^{2+} matriksi ile çok noktalı iyonik kompleks oluşturarak daha kararlı hale gelmesinden kaynaklanmaktadır (Arıca ve ark 2004) .

Sıcaklığın artması moleküllerin kinetik enerjisini arttırdığından tüm kimyasal reaksiyonların, bu arada biyokimyasal reaksiyonlarında hızlarını artırır. Genelde sıcaklığın 10 °C artmasıyla, reaksiyon hızlarında yaklaşık iki kat artar. Biyokimyasal reaksiyonlarda da aynı durum gözlenmekle birlikte protein yapısında bulunan enzimler, belirli sıcaklıktan sonra (50°C 'ın üzerinde) denatüre olmaya başlarlar. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (α -sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezinde etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir.

Çalışmamızda, serbest glukoamilaz enzimi için optimal sıcaklık değeri 60°C iken immobilize enzim için bu değer 65°C'ye kaymıştır. 25-80°C sıcaklık aralığında elde edilen aktivite değerleri yüzde maksimum aktivite olarak ifade edilmiştir. Serbest enzim için bağlı aktivite değeri sıcaklığın 25°C'den 60°C'ye doğru yükselmesiyle artmıştır ve 60°C'de maksimuma ulaşmıştır. Bu sıcaklık aralığında, termal deaktivasyon yavaş olacaktır ve katalizlenmiş reaksiyon hızı üzerine fark edilir bir etkisi olmayacaktır. Ancak, sıcaklığın yükselmesiyle relatif aktivitede artış gözlenmiştir. 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, termal deaktivasyondan dolayı serbest enzim aktivitesi azalmıştır. Bununla beraber 25-65°C aralığında sıcaklığın devamlı olarak artmasıyla immobilize glukoamilaz enziminin aktivitesi de artmıştır. İmmobilize glukoamilaz enzimiyle yüksek sıcaklıklara doğru olan kayma çok noktalı şelatlanmış etkileşimlerden kaynaklanmaktadır (Sarı ve ark. 2006). Bu nedenle enzimin substratına bağlanması amacıyla optimum konformasyona düzenlenmesi için aktivasyon enerjisinde artış olur (Osman ve ark. 2005). 55-65°C değerleri arasında relatif aktivite 90%'dan fazla iken serbest glukoamilaz enzimiyle karşılaştırıldığında, immobilize glukoamilaz enzimi reaksiyon sıcaklığının artışına karşı daha yüksek dayanıklılık göstermiştir. İmmobilize glukoamilaz enziminin kararlılığın artmasının nedeni moleküllerin sınırlı konformasyonel hareketleridir (Yodoya ve ark. 2003).

İmmobilizasyon işleminden sonra enzimin spesifik aktivitesinde bir miktar azalma gözlenmesi kaçınılmazdır. Bizim çalışmamızda da, maksimum aktivite serbest glukoamilaz enzimi için pH 4'te 42.57 U/mg olarak belirlenirken, immobilize enzim için optimal aktivite pH 4.5 'da 34.41 U/mg olarak gözlenmiştir. Enzim aktivitesindeki bu azalma,

immobilizasyon işlemi sırasında enzim moleküllerinin yapısal değişikliklere uğramasından kaynaklanmaktadır. Enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar enzimin aktif bölgesinin korunması ve enzimin destek materyaline, substrat moleküllerinin aktif bölgeye ulaşabileceği bir konformasyonda bağlanmasıdır. Ayrıca kuramsal bilgiler kısmında açıklandığı gibi enzimin katı destek üzerine immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikroçevreyi etkileyebilir. Bu da enzimin serbest halde gösterdiği davranışların değişmesine neden olur. Bu değişiklikler bölme etkisi, difüzyon sınırlaması, yapısal değişiklikler, sterik sınırlamalar ve inaktivasyon olarak sıralanabilir.

Çalışmamızda destek materyali olarak kullanılan poli(EGDMA-VTAZ) mikroküreleri gözenekli bir yapıya sahiptir ve bu gözenekler yüzey alanını arttırarak metal şelat oluşum kapasitesini arttırmaktadır (Uzun ve ark. 2006). Gözenekli destek materyalleri yüksek miktarda protein yüklemesine izin veren geniş yüzey alanları ile immobilizasyon uygulamaları için idealdir. Bu tür destek materyallerinin en büyük dezavantajı protein adsorbsiyonu için kullanılan alanın büyük kısmının iç alan olmasıdır. Gözenekli materyallerin iç yüzey morfolojisi sadece proteinin bağlanması için değil aynı zamanda difüzyon sınırlamalarını minimuma indirmek amacıyla substrat molekülleri içinde kolay ulaşılabilir olmalıdır. Bu nedenle gözenekler nedeniyle ortaya çıkabilecek difüzyon sınırlaması ya da oluşabilecek sterik sınırlamalar immobilize enzimlerdeki aktivite azalışına neden olan etmenler olarak gösterilebilir.

Difüzyonel sınırlama fiziksel büyüklük ile ilgilidir. Eğer polimer desteğinin gözenek çapı substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzyonu ve enzim ile teması geçmesi engellenir ve bu da enzimin katalitik etkinliğini azaltır. Glukoamilaz enziminin substratı olan nişastanın büyük bir yapıya sahip olması difüzyonel sınırlama nedeniyle substratın aktif bölge ile temasının zorlaştığını ve bunda aktivite kaybına neden olduğunu düşündürmektedir.

Sterik sınırlamalar ise enzimin aktif uçları substrat moleküllerinin yaklaşmasına elverişli değil ise ortaya çıkar. Örneğin enzimin aktif uçları destek maddesine dönük ise substratın aktif merkeze yaklaşması engellenir.

İmmobilizasyon sırasında gerçekleşen biospesifik etkileşimlerin, aktif merkezden uzak olan aminoasitlerin yan zincirleri ile gerçekleşmesi gerekir. Aktif merkezde ya da aktif merkeze yakın bölgelerde yer alan aminoasitlerin yan zincirleri ile destek maddesi arasında etkileşimlerin gerçekleşmesi durumunda aktif bölgenin konformasyonu bozulabilir ve enzim aktivitesini tamamen kaybedebilir (Taylor 1991).

Enzim çözeltileri kararlı değildir ve kullanıldıkça aktiviteleri azalır. Sıcaklığın, serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı üzerine etkisi incelenmiş ve immobilizasyonun enzime herhangi bir kararlılık kazandırıp kazandırmadığı araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, 100 dakikalık inkübasyon periyodu süresince immobilize glukoamilaz enzimi 60°C'de aktivitesinin %95'ini korumuştur, serbest enzim ise başlangıç aktivitesinin %70'ini korumuştur. 70°C'de immobilize ve serbest glukoamilaz enzimi sırasıyla aktivitesinin %90 ve 50'sini korumuştur. İmmobilizasyon, glukoamilaz enziminin ısı ve denatürasyon dayanıklılığını fark edilir derecede arttırmıştır. 60-70°C'de 180 dakikalık inkübasyondan sonra serbest enzime kıyasla immobilize glukoamilaz enziminin kalan aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuç daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile uyumlu olup (Arıca ve ark. 2001) immobilizasyonun enzime kararlılık kazandırdığının bir kanıtıdır.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere kıyaslandığında gösterdikleri en önemli avantajlardan biride depolanma kararlılığıdır. Çünkü serbest enzimler tampon çözeltiler içerisinde bekletildiklerinde aktivitelerini kolayca kaybederler. Serbest ve immobilize glukoamilaz enzim çözeltileri asetat tamponunda (0.1 M, pH 4.5) , 4 °C'de saklandı ve aktiviteleri 60 gün süreyle ölçüldü. Serbest glukoamilaz enzimi tüm aktivitesini 20 gün içerisinde kaybederken (Şekil 4.8.1) , poli-(EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikroküreleri üzerine immobilize edilmiş glukoamilaz enzimi aynı süre içerisinde aktivitesinin yalnızca %5'ini

kaybetmiştir. Bu sonuç bize immobilize enzimin kararlılığının arttığını açıkça göstermektedir. Enzim moleküllerinin bir yüzeye tutturularak immobilize edilmesi enzim aktivitesi üzerinde yüksek kararlılık etkisinin ortaya çıkmasını sağlar. Çünkü immobilize enzimin aktif konformasyonu substrat ve enzim molekülleri arasında çok noktalı bağ oluşumu ile kararlı hale getirilir.

İmmobilize enzimin en büyük avantajı tekrar kullanımıdır. Glukoamilaz enziminin poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikroküreleri üzerinden desorbsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirildi. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikrokürelerden glukoamilaz desorpsiyonu oda sıcaklığında 3 saat süre ile 50 mM EDTA içeren desorbsiyon ortamında gerçekleştirildi. Daha sonra aynı mikroküreler glukoamilaz enziminin immobilizasyonunda tekrar tekrar kullanıldı. Adsorbsiyon-desorbsiyon işlemleri 10 kez tekrarlandı ve glukoamilaz enziminin immobilizasyon kapasitesinin değişmediği gözlemlendi. Bu işlemler sırasında enzim aktivitesinin değişmediğini de belirtmemiz gerekir (Şekil 4.6.1). 10 kez tekrar kullanımın ardından immobilize glukoamilaz enzimi aktivitesinin %76'sını halen korumaktadır. Bu da enzim bağlanmış mikrokürelerin biyokatalitik sistemlerde ne kadar kullanışlı olduğunu gösterir. Bu sonuçlar Cu²⁺-şelatlanmış poli (EGDMA-VTAZ) mikrokürelerinin enzim immobilizasyonunda, başlangıç adsorbsiyon ve kapasite değerlerinde kayda değer bir kayıp olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilceğini göstermiştir.

5.5. Kinetik Sabitler

Kinetik parametreler, Michaelis sabiti (Km) ve reaksiyonun maksimum başlangıç hızı (Vmax), çözünebilir nişasta substrat olarak kullanılarak (Çizelge 4.9.1) ve Lineweaver-Burk grafiği ile belirlenmiştir (Şekil 4.9.1). Serbest enzim için, Vmax değeri 42.9 U/mg enzim olarak hesaplanırken Km değeri 1.00 mg/mL bulunmuştur. İmmobilize glukoamilaz enzimi için de kinetik sabitler belirlenmiş ve Km değeri 1.15 mg/mL olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyon proseslerinde maksimum hızın yarısına ulaşıldığı andaki substrat konsantasyonunu gösteren Km değeri artarken, ulaşılan maksimum hız değeri Vmax değeri azalmaktadır. Bu değişiklikler, destek materyalinde meydana gelen

konformasyonel değişiklikler, sterik engel ve difüzyon etkisi gibi birçok faktörden kaynaklanmaktadır (Uhlich ve ark. 1996). Çalışmamızda, beklendiği gibi, glukoamilaz enziminin Cu^{2+} -şelatlanmış poli(EGDMA–VTAZ) mikroküreler üzerine adsorbsiyon-desorbsiyonu sonrası K_m ve V_{max} değerleri etkilenmiştir. İmmobilize glukoamilaz enzimi için bulunan ve serbest enzime göre daha büyük olan K_m değerleri, substratın maruz kaldığı difüzyon sınırlamaları ile açıklanabilir. Cu^{2+} -şelatlanmış poli(EGDMA–VTAZ) mikroküreleri üzerine immobilize edilen glukoamilaz enzimi için V_{max} değerleri verilere göre 33.3 U/mg enzim olarak hesaplandı. Aynı zamanda V_{max}/K_m değerleri serbest enzim için 42.9 U/mg, immobilize enzim içinse 28.9 U/mg olarak belirlendi. V_{max}/K_m değeri enzimin substratına olan afinitesini gösteren bir parametredir. Enzimin substratına olan afinitesindeki değişim, enzimde yapısal değişiklikten (örn. konformasyonel değişimler) ve büyük substratın immobilize enzimim aktif bölgesine girememesinden kaynaklanmaktadır.

6.SONUÇ

İmmobilize proteinlerin en önemli uygulamalarının başında immobilize enzimlerin endüstriyel işlemlerde katalizör olarak kullanılması yer almaktadır. Yüksek spesifite, artan reaksiyon hızları, non-toksisite, daha ılımlı pH, sıcaklık ve basınç koşulları nedeniyle immobilize enzimlerin kullanımı fruktoz, yarı-sentetik penisilinler ve amino asitler gibi bileşiklerin elde edilmesinde etkili ve ekonomik olarak da tercih edilen bir yaklaşım haline gelmiştir (Taylor 1991).

Çalışmamızda, poli(etilen glikol dimetilakrilat-1-vinil-1,2,4-triazol) [poli (EGDMA-VTAZ)] hidrojel (ortalama çap 150-200µm) etilen glikol dimetilakrilat (EGDMA) ve 1-vinil-1,2,4-triazol (VTAZ)'ın kopolimerizasyonu ile hazırlandı. Poli (EGDMA-VTAZ) mikroküreleri 65.8 m²/g spesifik yüzey alanına sahiptir. Poli (EGDMA-VTAZ) mikroküreleri şişme çalışmaları ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. Cu⁺² iyonları poli (EGDMA-VTAZ) mikroküreleri üzerine şelatlaştırıldı ve daha sonra metal-şelatlanmış mikroküreler kesikli sistemde glukoamilaz enzimi adsorbsiyonunda kullanıldı. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikrokürelerinin maksimum glukoamilaz adsorbsiyon kapasitesi pH 6.5 'te 104 mg/g olarak belirlendi. Glukoamilaz enziminin Michaelis sabiti Km adsorbsiyona bağlı olarak artarken Vmax değeri azalmıştır, bu da enzimin substratına karşı olan afinitesinin azaldığının bir göstergesidir. Poli (EGDMA-VTAZ)-Cu²⁺ mikroküreleri üzerine adsorblanmış glukoamilaz enziminin optimum sıcaklığı 65°C olarak belirlendi. Depolanma kararlılığının adsorbsiyonla arttığı bulunmuştur. Birbirini takip eden 10 kesikli reaksiyon sonucunda adsorblanmış glukoamilaz enziminin aktivitesinin %76 'sı kalmıştır ki bu da biyokatalitik uygulamalarda enzim bağlanmış mikrokürelerin ne kadar kullanışlı olduğunu gösterir.

Zaman alıcı ve yüksek maliyetli metal şelat prosedürü düşük maliyetli uygun adsorban arayışını gerektirmiştir. İMAK'ın esas avantajı basit bir metot olması, yaygın kullanıma sahip olması ve şelatlayıcı destek materyallerin ucuz olmasıdır. Aynı zamanda bu materyaller, proteinlerin daha ılıman koşullarda elüe edilmesini ve biyolojik

aktivitelerinin korunmasını sağlar. Metal şelatlanmış adsorban hazırlanmasında kullanılan bu yeni yaklaşım bilinen tekniklere göre birçok avantaja sahiptir. Metal-şelat adsorban hazırlama prosesindeki pahalı ve kritik basamak şelatlayıcı ligandın adsorbsiyon matriksine bağlanmasıdır. Bu prosedürde, komonomer VTAZ metal-şelatlayıcı ligand olarak davranır ve matriksi şelatlayıcı-ligand immobilizasyonu için aktive etmeye gerek yoktur. Diğer bir önemli nokta ise kovalent bağlanmış şelatlayıcıların matriksten yavaşça ayrılmalarıdır. Metal-şelatlayıcı ligandın ayrılması herhangi bir immobilize metal-şelat afinite adsorbsiyon tekniğinde karşılaşılabilen ve adsorbsiyon kapasitesinde düşmeye neden olan genel bir problemdir. Metal-şelatlayıcı ligandın adsorbandan sızması, saflaştırılmış protein analizi ile karışabilir ve kirlenmeye neden olur. Bu açıdan, metal-şelatlayıcı ligand immobilizasyon basamağı elimine edilmiştir. Metal-şelatlayıcı ligand ve/veya komonomer VTAZ, EGDMA ile polimerize edilmiş ve ligand sızıntısı olmamıştır. Bu saflaştırma metodu, çok basamaklı saflaştırma metotlarının eksikliklerinin üstesinden gelecek niteliktedir.

Sonuç olarak bu yaklaşım destek materyali üzerinde şelat yapıcı ligandın oluşumunu sağlamak amacıyla uygulanan aktivasyon aşamasını ortadan kaldırarak immobilizasyon prosesinin kolayca uygulanmasını sağlamıştır. Ayrıca bu yöntem Cu^{+2} iyonları tutturulmuş poli (EGDMA-VTAZ) polimeri üzerinde adsorbe olan enzimin kolayca desorbe edilmesiyle destek materyalinin ve enzimin tekrar kullanımını mümkün kılmaktadır. Glukoamilaz enzimi için laboratuvar koşullarında elde edilen bu sonuçların uygun endüstriyel proseslerin geliştirilmesi ile daha da elverişli bir duruma geleceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

AGNIESZKA, H., JOLANTA, B., ANDRZEJ, W.T. 2007. Immobilization of glucoamylase and trypsin on crosslinked thermosensitive carriers. *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 41, p. 197-204.

AKGÖL, S., DENİZLİ, A. 2004. Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption. *Journal of Molecular Catalysis.*, vol. 28, p. 7-14.

ARICA, M. Y., BAYRAMOĞLU, G. 2004. Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, vol. 27, p. 255–265.

ARICA, M.Y., TESTERECİ, H.N., DENİZLİ, A. 1998. Dye-ligand and metal chelate poly[2-hydroxyethylmethacrylate] membranes for affinity separation of proteins. *Journal of Chromatography A*, vol. 799, p. 83-91.

ARICA, M.Y., YAVUZ, H., DENİZLİ, A. 2001. Immobilization of glucoamylase on the plain and on the spacer arm-attached poly(HEMA-EGDMA) microspheres. *Journal of Applied Polymer Science.*, vol. 81, p. 2702–2710

BAHAR, T., ÇELEBİ, S. S. 1999. Immobilization of glucoamylase on magnetic poly(styrene) particles. *Journal of Applied Polymer Science.*, vol. 72, p. 69-73.

BAHAR, T., CELEBİ, S.S. 2000. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR). *Enzyme and microbial technology.*, vol. 26, p. 28–33.

BAI, Y., LI, Y., WANG, M. 2006. Study on synthesis of a hydrophilic bead carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 39, p. 540-547.

BAILEY, J.E., CHO, Y.K. 1983. Immobilization of glucoamylase and glucose oxidase in activated carbon: Effects of particle size and immobilization conditions on enzyme activity and effectiveness. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 25(8), p. 1923-1935.

BERTRAND, C. J., KAREN, C. W. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques.*, vol.37, p. 790-802.

BEUTLER, HD. 1981. In methods of enzymatic analysis. *Starch.*, Edition Verlag Chemie., vol. 6, p. 2-10.

BICKERSTAFF, G. F. 1995. Impact of genetic technology on enzyme technology. Genetic Engineering & Biotechnology., vol.15, p. 13-30.

BORISOVA, V.N., LOMAKO, O.V., MOTINA, L.I., NAKHAPETIAN, L.A. 1979. Immobilization of glucoamylase and acid proteinase on modified silichrome using N-carbethoxy-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline. Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya., vol. 15(5), p. 744-746.

BRYJAK J. 2003. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. Biochemical Engineering Journal., vol. 16, p. 347-355.

CABRAL, J. M. S., KENNDY, J. F. 1991. Covalent and coordination immobilization of proteins, in protein immobilization (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York., p. 73-138.

CAO, L., SHELDON, L. W. L. 2003. Immobilized enzymes: carried-bound or carrier-bound or carrier-free. Current Opinion in Biotechnology., vol. 14, p. 387-394.

CAO, L., VAN RANTWIJK, F., SHELDON, R. A. 2002. Cross-lined enzyme aggregate: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. Organic Letters., vol. 2, p. 1361-1364.

CHEN, L.F., TSAO, G.T. 1977. Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads. Biotechnology and Bioengineering., vol. 19(10), p. 1463-1473.

CHIBATA, I. 1978. Immobilized enzymes (Chibata, I., ed.) , New York, London, Sydney, Toronto : John Wiloy & Sons.

CLARKE, A.J., SVENSSON, B. 1984. Identification of an essential tryptophanyl residue in the primary structure of glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. Carlsberg Research Communications., vol. 49, p. 559-566.

CZÌCHOCKÌ, G., DAUTZENBERG, H., CAPAN, E., VORLOP, K.D. 2001. New and effective entrapment of polyelectrolyte–enzyme-complexes in lentikats. Biotechnology Letters., vol. 23, p. 1303–1307.

DENİZLİ, A., PİSKİN, E. 2001. Review: Dye-ligand affinity systems. Journal of Biochemical and Biophysical Methods.,vol. 49, p. 391-416.

DENİZLİ, A., SENEL, S., ARİCA, M.Y. 1998. Cibacron Blue F3GA and Cu(II) derived poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for Iysozyme adsorption. Colloids Surfaces B, vol. 11, p. 113-122.

DENİZLİ, A., YAVUZ, H., GARİPCAN, B., YAKUP ARICA, M. 2000. Nonporous monosize polymeric sorbents: Dye and metal chelate affinity separation of Iysozyme. *Journal of Applied Polymer Science.*, vol. 76, p.115-124.

DUNN, M.J., HARRİS, ELV., ANGAL, S. 1992. Protein determination of total protein concentration. *Protein Purification Methods*, Oxford: IRL Press.

EL'CHITS, S.V., IVANOVA, L.A., KHROBATENKO, A.P., GERNET, M.V., RAKHİMOV, M.M. 1981. Glucoamylase immobilization on silochrome using gossypol. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal.*, vol. 53(1), p. 21-25.

FINN, R.K. 1987. Conversion of starch to liquid sugar and ethanol. In *Biotec 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology*, vol. 1. (C.P. Hollenberg and H. Sahn, eds.) p. 101-107, Gustav Fisher, New York.

FISCHER, J., HEYER, W., JANOWSKI, F., WOLF, F., SCHELLENBERGER, A 1977. Immobilization of proteins on macroporous glasses involving maleinimide as the anchoring group. *Acta Biologica Et Medica Germanica.*, vol. 36(7-8), p. 999-1005.

FUENTE, M., JORGETE, V., MAQUIESE, B. C. C., PESSELA, O., ABIAN, C., MATEO, J. M. Guisan 2004. New cationic exchanger support for reversible immobilization of protein, *Biotechnology Progress.*, vol. 20, p. 284-288.

GEMEINER, P. 1992. Materials for enzyme engineering, in *Enzyme Engineering* (Gemeiner, P., ed.), Ellis Horwood, New York., p. 13-119.

GERASİMAS, V.B., CHERNOGLAZOV, V.M., KLESOV, A.A. 1980. Effect of progressive chemical modification on the activity and thermal stability of soluble and immobilized glucoamylase. *Biokhimia.*, vol. 45(6), p. 1086-1092.

GOODEN, F. B. 1997. Immobilization of enzymes and cells. *Humana pres*, New Jersey., p. 3-5.

GROBOILLOT, A., BOADI, D. K., PONCELOT, D., NEUFELD, R. J. 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology.*, vol.14, p. 75-107.

GUNZER G., HENNRİCH N. 1984. Purification of α_1 -proteinase inhibitor by triazine dye affinity chromatography, ion-exchange chromatography and gel filtration on fractogel TSK. *Journal of Chromatography A.*, vol. 296 , p. 221-229.

GUTIÈ' RREZ R., MARTI' N DEL VALLE E. M., GALA M. A. 2007. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. *Seperatian & purification reviews.*, vol. 36:1, p.71 - 111

HAIDER, T., HUSAIN, Q. 2007. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus Oryzae* beta galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules.*, vol. 41, p. 72-80.

HARTMAN, M., HOLM, O. B., JOHANSEN, G. A., SKJAK-BREAK, G., STOKKE, B. T. 2002. Mode of action of recombinant *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase Alge2 and Alge4. *Biopolymers.*, vol. 63, p. 77-88.

HAUSSER, A.G., GOLDBERG, B.S., MERTENS, J.L. 1983. An immobilized two-enzyme system (fungal alpha-amylase/glucoamylase) and its use in the continuous production of high conversion maltose-containing corn syrups. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 25(2), p. 525-539.

HUO, Y., LI, Y., YUAN, Z., HUANG, J. 2004. Immobilization of glucoamylase onto novel porous polymer supports of vinylene carbonate and 2-hydroxyethyl methacrylate. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 119(2), p. 121-132.

HUTCHENS, T.W., YIP, T.T., PORATH, J. 1988. Protein interaction with Immobilized ligands: Quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatographic approaches using immobilized metal affinity adsorbents. *Analytical Biochemistry.*, vol.170, p 168-182.

IAROVENKO, V.L., PISARENKO, T.N., USTINNIKOV, B.A., RODZEVICH, V.I., CAMOILOVA, N.A. 1979. Immobilization of commercial glucoamylase on the polymer carrier. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya.*, vol.15(6), p. 869-873.

IMAI, K., SHIOMI, T., UCHIDA, K., MIYA, M. 1986. Immobilization of enzyme onto poly(ethylene-vinyl alcohol) membrane. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 28(2), p. 198-203.

IMAI, K., SHIOMI, T., UCHIDA, K., MIYA, M. 1986. Immobilization of enzyme into poly(vinyl alcohol) membrane. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 28(11), p. 1721-1726.

IVANOVA, L.A., EL'CHIN, S.V., 1982. Properties of immobilized glucoamylase preparations. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal.*, vol. 54(3), p. 331-334.

IVANOVA, L.A., RAKHIMOV, M.M., EL'CHITS, S.V., RUZIEVA, D.M., SANDUL, G.V. 1985. Activity and stability of glucoamylase preparations in different methods of immobilization. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal.*, vol. 57(1), p. 31-36.

JAMES, J.A. and SIMPSON, B.K. 1996. Application of enzymes in food processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition.*, vol. 36(5), p. 437-463.

JANOWSKI, F., FISCHER, G., URBANIAK, W., FOLTYNOWICZ, Z., MARCINIEC, B. 1991. Aminopropylsilane treatment for the surface of porous glasses suitable for enzyme immobilisation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.*, vol. 51(2), p. 263-272.

KARA, A., OSMAN, B., YAVUZ, H., BEŞİRLİ, N., DENİZLİ, A. 2005. Immobilization of α - amylase on Cu^{2+} chelated Poly (ethylene glycol dimethacrylate - n-vinyl imidazole) matrix via adsorption. *Reactive and Functional Polymers.*, vol. 62, p. 61-68.

KAETSU, I., KUMAKURA, M., YOSHIDA, M. 1979. Enzyme immobilization by radiation-induced polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 21(5), p. 847-861.

KENNEDY, J.F., KALOGERAKIS, B. 1980. Immobilization of glucoamylase on gelatin by transition-metal chelation. *Biochimie.*, vol. 62(8-9), p. 549-561.

KİM, G.I., STAROSTINA, V.K. 1978. Glucoamylase immobilized on AE-cellulose. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya.*, vol. 14(4), p. 548-553.

KLESOV, A.A., GERASIMAS, V.B. 1979. Substrate thermostabilization of soluble and immobilized glucoamylase. *Biokhimiia.*, vol. 44(6), p. 1084-1092.

KOBAYASHI, Y., MATSUO, R., OHYA, T., YOKOI, N. 1987. Enzyme-Entrapping behaviors in alginate fibers and their papers. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 30(3), p. 451-457.

KOVALEVA, T.A. 2000. Kinetic-thermodynamic aspects of catalysis of polysaccharides by native end immobilized amylases. *Biofizika.*, vol. 45(3), p. 439-444.

KVESİTADZE, G.I., DVALI, M.S. 1982. Immobilization of mold and bacterial amylases on silica carriers. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 24(8), p. 1765-1772.

LEE, B.H. 1991a. Bioconversion of starch wastes. In *Bioconversion of Waste Materials to Industrial products.* (A.M. Martin, ed.) p. 265-291, Elsevier Science Publishing Company., New York.

LINKO, Y.Y., WU, X.Y. 1993. Improvement and estimation of enzymic starch saccharification process. *Biotechnology Techniques.*, vol. 7, p. 551-556.

LIU, C.H., WU, J.Y., CHANG, J.S. 2007. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. *Bioresource Technology.*, vol. 99, p. 1904-1910.

LOPEZ-SERRANO, P., CAO, L., VAN RANTWIJK F. 2002. Cross-lined enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letter.*, vol. 24, p. 1379-1383.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry.*, vol. 193, p. 265.

MILLER G.N. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.*, vol. 81, p. 426-428

MİLOSAVIĆ N., PROĐANOVIĆ R., JOVANOVIĆ S., VUJČIĆ Z. 2007. Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA). *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 40, p. 1422-1426.

MOSBACH, K. 1976. *Methods in Enzymology.* Academic Press, New York., p. 44

ODABAŞI, M. 2007. Protein kromatografisi yaz okulu kitapçığı., p. 136

O'DRISCOLL, K. F. 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels, in *Methods in Enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York., p. 169-183.

OH, J.T., KİM, J.H. 2000. Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PnSS microspheres. *Enzyme and microbial technology.*, vol. 27,p. 356-361.

OSMAN, B., KARA, A., BEŞİRLİ, N. 2007. Tyrosinase immobilization on Cu⁺² chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate -n-vinyl imidazole) beads. *Hacettepe Journal of Biological Chemistry.*, vol. 35(3), p. 233-241.

PARK, D., HAAM, S., JANG, K., AHN, I.S., KİM, W.S. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis, *Process Biochemistry.*, vol. 40 , p. 53-61.

PEARSON, R.G. 1968. Hard and Soft Acids and Bases. HSAB, Part 1 Fundamental principles. *Journal of Chemical Education.*, vol. 45, p.581-587.

PEARSON, R.G. 1973. Hard and soft acids and bases. In *Benchmark Papers in Inorganic Chemistry*; Pearson, R.G. ed., Hutchinson & Ross: Stroudsburg, PA, 53-59, 67-85.

PIETERS, B.R., BARDELETTI, G. 1992. Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: kinetic studies on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase. *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 14(5), p. 361-370.

PIETERS, BR., BARDELETTI, G., COULET, P.R. 1992. Glucoamylase immobilization on a magnetic microparticle for the continuous hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 32, p. 37-53.

PONGJANYAKUL, T., PUTTIPATKHACHORN, S. 2007. Modulating drug release and matrix erosion of alginate matrix capsules by microenvironmental interaction with calcium ion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*, vol. 67, p. 187-195.

POPA, I. 1996. Glucoamylase absorption and desorption process. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition.*, vol. 7(11), p. 925-936.

PORATH, J. 1990. Amino acid side chain interaction with chelateliganded crosslinked dextran, agarose and TSK gel. *Journal of Molecular Recognition.*, vol. 3, p. 123-127.

POTTER, N.N. 1986. *Food Science*. 4th ed. Van Nostrand Reinhold/AVI, New York.

PRICE, NC., 1996. *Proteins*, Labfax, Academic Pres, Oxford

RAM, K.A., VENKATASUBRAMANIAN, K. 1982. Enhancement of starch conversion efficiency with free and immobilized pullulanase and alpha-1,4-glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering.*, vol. 24(2), p. 355-369.

RAO, V.B., SASTRI, N.V.S., RAO, P.V.S. 1981. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosa*. *Biochemical Journal.*, vol. 193, p. 379-385.

RODAKIEWICZ-NOWAK J., MONKIEWICZ M., J HABER. 2002. Enzymatic activity of the *A. bisporus* tyrosinase in AOT/isooctane water-in-oil microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.*, vol. 208, p. 347-356.

RUADZE, I.D., ZHEREBTSOV, N.A., SLEPOKUROVA, I.U.I., SELEMENEV, V.F., SHKUTINA, I.V., STOIANOVA, O.F. 2001. Immobilization of glucoamylase from *Aspergillus awamori* 466, and properties of the preparation. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya.*, vol. 37(2), p. 202-208.

SANJAY G., SUGUNAN S. 2005. Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. *Catalysis Communications.*, vol. 6, p. 525-530.

SARI M., AKGÖL S., KARATAS M., DENİZLİ A. 2006. Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 45 (9), p. 3036-3043.

SCHAFHAUSER, D.Y., STOREY, K.B. 1992. Immobilization of amyloglucosidase onto granular chicken bone. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 32, p. 89-109

SENEL, A., SAY, R., ARICA, Y., DENİZLİ, A. 2001. Zinc ion-promoted adsorption of lysozyme to Cibacron Blue F3GA-attached microporous polyamide hollow-fiber membranes. *Colloids Surfaces A*, vol. 182, p.161-173.

SILVA R.N., ASQUIERI E.R., FERNANDES K.F. 2005. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. *Process Biochemistry.*, vol. 40, p. 1155-1159.

SRERE, P. A., UYEDA, K. 1976. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. *Method in Enzymology*, Academic, New York., vol. 44, p. 11-19.

ST CLAIR, N.L., NAVIA, M.A. 1992. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *Journal of American Chemical Society.*, vol. 114, p. 7314-7316.

STOREY, K.B., DUNCAN, J.A., CHAKRABARTI, A.C. 1990. Immobilization of amyloglucosidase using two forms of polyurethane polymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 23(3), p. 221-236.

SVENSSON, B., LARSEN, K., SVENDSEN, I. 1983. Amino acid sequence of tryptic fragments of glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Research Communication.*, vol. 48, p. 517-527.

SZAJÁNI, B., SÜDİ, P., KLAMÁR, G., JÁSZAY, Z.M., PETNEHÁZY, I., TÖKE, L. 1991. Effects of carbodiimide structure on the immobilization of enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 30(2), p. 225-231.

TANRISEVEN, A., BOZKURT ULUDAĞ, Y., DOĞAN, Ş. 2002. A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 30, p. 406-409.

TANRISEVEN, A., ÖLÇER, Z. 2008. A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin. *Biochemical Engineering Journal.*, vol. 39, p. 430-434.

TAYLOR, R. A. 1991. Commercially available support for protein immobilization. *Protein Immobilization* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York., p. 139-160.

TOMAR, M., PRABHU, KA. 1985. Immobilization of glucoamylase on DEAEcellulose activated with chloride compounds. *Enzyme and microbial technology.*, vol. 7, p. 557-560.

TORRES R., MATEO C., FUENTES M., PALOMO J.M., ORTÍZ C., FERNANDEZ-LAFUENTE R., GUÍSAN J.M. 2002. Reversible immobilization of invertase on sepabeads coated with polyethyleneimine: Optimization of the biocatalyst's stability. *Biotechnology Progress.*, vol. 18, p. 1221-1226.

TORRES R., C. C. PESSELA B., MATEO C., ORTÍZ C., FUENTES M., GUÍSAN J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE R. 2004. Reversible Immobilization of Glucoamylase by Ionic Adsorption on Sepabeads Coated with Polyethyleneimine. *Biotechnology Progress.*, vol. 20, p. 1297-1300.

UHLICH, T., ULBRICHT, H., TOMASCHEWSKI, G. 1996. Enzyme and Microbial Technology., vol. 19, p. 124.

UZUN, L., KARA, A., TÜZMEN, N., KARABAKAN, A., BEŞİRLİ, N., DENİZLİ, A. 2006. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol dimethacrylate-1-vinyl-1,2,4-triazole) copolymer beads for heavy-metal removal. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 102., p. 4276-4283.

WANG, F., GUO, C., LIU, H., LIU, C. 2007. Reversible immobilization of glucoamylase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, vol. 48, p. 1-7

WEI, H., WANG, T., LI, S.F. 1997. Detection of underivatized carbohydrates in capillary electrophoresis with a bienzyme electrode. *Electrophoresis.*, vol. 18(11), p. 2024-2029.

WILLIAMSON, G., BELSHAW, N.J., NOEL, T.R., RING, S.G. WILLIAMSON, M.P. 1992b. Glycosylation and stability: Unfolding of glucoamylase induced by heat and guanidine hydrochloride. *European Journal of Biochemistry.*, vol. 207(2), p. 661-670.

WILLIAMSON, G., BELSHAW, N.J. WILLIAMSON, M.P. 1992a. O- glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase: Conformation and role in binding. *Biochemical Journal.*, vol. 282(2), p. 423-428.

WÓJCIK, A., LOBARZEWSKI, J., BŁASZCZYŃSKA, T. 1990. Immobilization of enzymes to porous-bead polymers and silica gels activated by graft polymerization of 2,3-epoxypropyl methacrylate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.*, vol. 48(3), p. 287-301.

WOODWARD, J. 1985. Immobilized enzyme: adsorption and covalent coupling. *Immobilized Cells and Enzymes: a Practical Approach*, IRL, Oxford., vol. 44, p. 3-17

YAVUZ, H., ODABASI, M., AKGÖI, S., DENİZLİ, A. 2005. Immobilized metal affinity beads for ferritin adsorption. *Journal of Biomaterial Science.*, vol.16, p. 673-684.

YODOYA, S., TAKAGI, T., KUROTANI, M., HAYASHI, T., FURUTA, M., OKA, M. AND HAYASHI, T. 2003. Immobilization of bromelain onto porous copoly (γ -methyl-L-glutamate/L-leucine) beads. *Journal of European Polymer.*, vol. 39, p. 173–180.

ZANIN, G.M., DE MORAES, F.F. 1998. Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized amyloglucosidase in the saccharification of liquefied cassava starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 70-72, p. 383-394.

EKLER**Ek-1 Değişik pH Değerlerinde 0,1M Fosfat Tamponlarının Hazırlanması:**

pH	1 M Na₂HPO₄·12H₂O(mL)	1 M NaH₂PO₄·2H₂O(mL)
5,8	7,9	92,1
6,0	12,0	88,0
6,2	17,8	82,2
6,4	25,5	74,5
6,5	30,4	69,6
6,6	35,2	64,8
6,8	46,3	53,7
7,0	57,7	42,3
7,2	68,4	31,6
7,4	77,4	22,6
7,6	84,5	15,5
7,8	89,6	10,4
8,0	93,2	6,8

Verilen miktarların karıştırılmasıyla elde edilen 1 M 'lık stok çözelti destile su ile 1000 mL 'ye seyreltilir.

Ek-2 : Değişik pH Değerlerinde 0,1M Asetat Tamponlarının Hazırlanması:

pH	1 M CH₃COOH (mL)	CH₃COONa.3H₂O(g)
3	98,3	0,233
3,5	94,8	0,709
4	85,2	2,014
4,5	64,5	4,830
5	36,5	8,640
5,5	15,4	11,511

Verilen miktarların karıştırılmasıyla elde edilen çözeltiler destile su ile 1000 mL 'ye seyreltilir.

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca bana her türlü imkanı sağlayan ve hiçbir desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof.Dr. Necati Beşirli'ye en içten teőekkürlerimi sunarım.

Baőladıęım günden bu güne yanımda olan ve beni cesaretlendiren, bana yol gösteren ablam Bilgen Osman'a yardımlarından dolayı teőekkürü bir borç bilirim. Her aşamada arkamda olan babam Dr. Recep Kök'e, annem Sevhan Kök'e ve abim Mehmet Ata Kök'e sabır ve desteklerinden dolayı teőekkür ederim.

Çalıőmamı destekleyen Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu'na da teőekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

14.06.1983 yılında Bursa 'da doğdu. İlk , orta ve lise öğrenimini Bursa 'nın çeşitli okullarında başarı ile tamamladı. 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. Bu dönem içerisinde İngilizce öğretmenliği sertifika programını da başarı ile tamamladı. Aynı yıl U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.