

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**α -AMİLAZ ENZİMİNİN
FOTOİMMOBİLİZASYONU**

Ümran YARAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN**

İSTANBUL 2008

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

α -AMİLAZ ENZİMİNİN
FOTOİMMOBİLİZASYONU

Ümran YARAR
(141102620060059)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN

İSTANBUL 2008

ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, organik Kimya programında Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (BAPKO) tarafından desteklenen FEN-YLS-120707-0155 numaralı “ α -amilaz enziminin fotoimmobilizasyonu” adlı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarında yardımları ve katkılarıyla beni yönlendiren, yakın ilgileri ve desteklerini esirgemeyen başta tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN olmak üzere Prof. Dr. Atilla Güngör’e; Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN’a; ihtiyaç duyduğumda imkanlarını kullanmama izin veren Biyokimya Programı Başkanı Prof. Dr. Ayşe OGAN’a ve Araştırma Görevlilerine sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca sonsuz desteğini ve dostluğunu bana her zaman hissettiren, bana her konuda yardımcı olan İlçin NAZİK’e; A. Aslı–Nurettin ÖZDEMİR’e; Özlem–Umut ORPAK’a; Habibe ÇAKICI’ya; benim için her zaman moral kaynağı olan diğer çalışma arkadaşlarıma;

Çalışmalarım boyunca bana enerji veren, beni neşelendiren, sonsuz desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan dayım Zülküf YALVAÇ’a;

Bugüne kadarki öğrenim hayatım boyunca beni sabır ve anlayışla destekleyen, her zaman yakın ilgi ile yanımda olan her şeyime aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SEMBOLLER.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar.....	xii
BÖLÜM I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
I.1. GİRİŞ.....	1
I.2. AMAÇ.....	2
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. ENZİMLER.....	3
II.1.1. Enzimlerin Özellikleri.....	4
II.2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	6
II.2.1. İmmobilizasyonun Avantajları.....	7
II.2.2. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi.....	8
II.3. GLUKOAMİLAZ.....	9
II.3.1. Fiziksel Özellikleri.....	9
II.3.2. Endüstrideki Kullanım Alanları.....	11
II.4. NİŞASTA.....	12
II.5. ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN TAŞIYICILAR.....	14
II.5.1. Morfolojik Yapıya Göre Sınıflama.....	15
II.5.2. Kimyasal Yapıya Göre Sınıflama.....	16
II.5.2.1. Doğal Polimerler.....	16
II.5.2.2. Sentetik Polimerler.....	21
II.6. ENZİM İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ.....	22

II.6.1. Çapraz Bağlama Yöntemleri.....	22
II.6.2. Kovalent Bağlama Yöntemi.....	24
II.6.2.1. Kovalent Bağlanma Yöntemleri.....	27
II.6.3. Taşıyıcıya Bağlanma.....	30
II.6.3.1. Fiziksel Adsorbsiyon Yöntemi.....	30
II.6.3.2. İyon Bağlanma Yöntemi.....	32
II.6.3.3. Metal Bağlama Yöntemi.....	32
II.6.4. Hapsetme Yöntemi.....	33
II.6.4.1. Mikrokapsülle Hapsetme Metodu.....	34
II.6.4.2. Kafes Tipi Hapsetme Metodu.....	35
BÖLÜM III. ÇALIŞMALAR.....	36
III.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	36
III.2. KULLANILAN CİHAZLAR.....	37
III.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	38
III.3.1. N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid Monomeri Sentezi ve FT-IR ile Karakterizasyonu.....	39
III.3.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	40
III.3.3. Protein Tayini.....	41
III.3.3.1. Bovine Serum Albumin'in Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması.....	41
III.3.3.2. Bağlanan Enzim Miktarının Belirlenmesi.....	43
III.3.4. İmmobilizasyon Üzerine Bağlanma Zamanının Etkisi.....	43
III.3.5. Enzim İmmobilize Edilmiş Filmlerin Hazırlanması.....	44
III.3.6. pH 6,9 Sodyum Fosfat Tamponun Hazırlanması.....	44
III.3.7. Nişasta Çözeltilisinin Hazırlanması.....	44
III.3.8. 3,5-Dinitrosalisilik Asit Renk Reaktifinin Hazırlanması...45	
III.3.9. Serbest ve İmmobilize Olmuş α - Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümleri.....	45
III.3.9.1. Serbest α -Amilazın Aktifliğine pH'ın Etkisi.....	46
III.3.9.2. Serbest α -Amilaz'ın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.47	
III.3.9.3. Serbest α -Amilaz'ın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	48

III.3.9.4. İmmobilize Edilen α -Amilazın Aktifliğine pH'nın Etkisi.....	49
III.3.9.5. İmmobilize Edilen α -Amilazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi.....	50
III.3.9.6. İmmobilize Edilen α -Amilazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	51
III.3.9.7. İmmobilize Edilen α -Amilazın Tekrar Kullanılabilirliği.....	53
III.3.10. İmmobilize Edilen α -Amilazın Kinetiği.....	55
III.3.10.1. Ekstinksiyon Sabitinin (ϵ) Bulunması.....	55
III.3.10.2. Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi.....	56
III.3.10.3. Substrat Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi.....	57
BÖLÜM IV. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	64
IV.1. KARAKTERİZASYON.....	64
IV.2. İMMOBİLİZASYON VERİMİ.....	66
IV.3. İMMOBİLİZASYON ÜZERİNE BAĞLANMA ZAMANININ ETKİSİ.....	66
IV.4. ENZİM BAĞLI MONOMERİN SEM GÖRÜNTÜLERİ.....	67
IV.5. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE pH'NIN ETKİSİ.....	68
IV.6. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ.....	69
IV.7. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE DEPOLAMA SÜRESİNİN ETKİSİ.....	71
IV.8. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ.....	71
IV.9. İMMOBİLİZE EDİLEN ENZİMİN KİNETİK PARAMETRELERİ.....	71

BÖLÜM V. SON DEĞERLENDİRMELER.....	73
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

α -AMİLAZ ENZİMİNİN FOTOİMMOBİLİZASYONU

Bu çalışmada, UV ile sertleştirilebilen N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomeri sentezlenerek enzim bağlama potansiyeli incelendi.

Sentezlenen monomer, kovalent bağlanma için Brom ile aktifleştirilerek, enzimin yüzeyindeki gruplardan ılıman şartlarda (0 °C, 30 dakika) reaksiyon vermesine olanak sağlandı. Bu yöntemde, sülfonil bromür uçlu monomer proteinin amino gruplarıyla reaksiyona girerek, sülfonamid bağları oluşturdu. Polimerik destek UV-ışınları yardımıyla sertleştirme tekniğiyle hazırlandı.

İmmobilizasyon verimi 68,18 mg/g monomer olarak bulundu. Maksimum aktivite pH 6,5'ta gözlemlendi. İmmobilizasyon, pH'a bağımlı olan enzim aktivitesini değişmemiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık yaklaşık 30 °C bulunmuşken, immobilize enzim için yaklaşık 50 °C'ye kaymıştır. Serbest enzim 15 gün içinde aktivitesini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 30 gün içinde aktivitesinin sadece % 30'nu kaybetmiştir.

ABSTRACT

PHOTOIMMOBILIZATION OF α -AMYLASE ENZYME

In this study, UV-curable N-(4-Sodiumsulphophenyl)-maleimide monomer was synthesized and its potential for enzyme binding was investigated.

The Bromine, which is used to activate the synthesized monomer for covalent attachments, has the advantage of giving reaction with the surface groups of enzyme under very mild conditions (0 °C, 30 minute). In this procedure, sulfonyl bromide pendant monomer reacted with amino groups of the protein to form sulfonamide bonds. Polymeric support was prepared by UV-curing technique.

The Immobilization yield was found to be as 68.18 mg/g monomer. The maximum activity was observed at pH 6.5. Immobilization did not change the pH-dependency of the enzyme activity. It was found that the optimum temperature for the free enzyme was approximately 30 °C, while it shifted to nearly 50 °C for the immobilized enzyme. Free enzyme lost its activity completely within 15 days. Immobilized enzyme lost only 30 % of its activity in 30 days.

SEMBOLLER

A	: Absorbsiyon değeri
C	: Örneğin konsantrasyonu ($\mu\text{mol/ml}$)
E_A	: Aktivasyon enerjisi
IU	: Glukoamilaz aktivite birimi ($\mu\text{mol/dakika}$)
K_m	: Michaelis-Menten sabiti (mg/mL)
l	: Işığın aldığı yol (cm)
m	: Doğrunun eğimi
pH	: Ortamın asitliği (0-14)
S	: Nişasta Konsantrasyonu (mg/mL)
V_{max}	: Maksimum reaksiyon hızı ($\text{mg/dakika}\times\text{mL}$)
ΔA	: En büyük absorpsiyon değeri ile en küçük absorpsiyon değeri arasındaki fark
ΔG	: Serbest enerji
Δt	: En büyük absorpsiyon değerinin meydana geldiği zaman ile en küçük absorpsiyon değerinin meydana geldiği zaman arasındaki fark
α	: Alfa
β	: Beta
ϵ	: Ekstinksiyon sabiti ($\text{mL/mg}\times\text{cm}$)
ι-	: Ioda
κ-	: Kappa
λ-	: Lambda

KISALTMALAR

AE-	: Aminoetil
BSA	: Bovine Serum Albümin
CM-	: Karboksimetil
DEAE-	: Dietilaminoetil
ECTEOLA-	: Epiklorohidrintrietaanolamin
EEDQ	: N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin
(ES)	: Enzim-Substrat Kompleksi
FTIR	: Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi
G	: 1, 4-bağlı α -L Gulunorik Asit
GA	: Glukoamilaz
His	: Histidin
Lys	: Lisin
M	: 1,4-bağlı β -D-Mannuronik Asit
NMR	: Nükleer Magnetik Rezonans
PEG-DA	: Poli (Etilen Glikol) Diakrilat
PEG-MA	: Poli (Etilen Glikol) Monoakrilat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEAE-	: Trietilaminoetil
TGA	: Termogravimetrik Analiz Cihazı
Tyr	: Tirosin
UV	: Ultraviyole
X-ray	: X-Işını Toz Kırımı Cihazı

ŞEKİLLER

SAYFA NO

Şekil II.1 Enzim Katalizli ve Katalizsiz Reaksiyonların Aktivasyon Enerjileri.....	5
Şekil II.2 Aspergillus Awamori mikroorganizmasından elde edilen Glukoamilaz X100 enziminin X-ray ile elde edilen görüntüsü.....	9
Şekil II.3 Glukoamilaz enziminin bölümleri.....	10
Şekil II.4 Amilozun yapısı.....	13
Şekil II.5 Amilopektinin yapısı.....	14
Şekil II.6 Selülozun yapısı.....	16
Şekil II.7 Dekstranın yapısı.....	17
Şekil II.8 Agarozun yapısı.....	18
Şekil II.9 Glutaraldehit ile moleküller arası çapraz bağlanma.....	23
Şekil II.10 Enzimdeki NH ₂ gruplarının oligomerlerle konjugasyon reaksiyonu.....	24
Şekil II.11 Amino asit yan zincirlerinin reaktif grupları.....	26
Şekil II.12 Selülozun TiCl ₄ ile aktivasyon reaksiyonu.....	29
Şekil II.13 TiCl ₄ aktive edilmiş selüloza enzim bağlanması.....	30
Şekil III.1 N-(4-sodyumsülfofenil)-halfimidin yapısı.....	39
Şekil III.2 N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid'in yapısı.....	40
Şekil III.3 Enzim bağlı N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid'in yapısı.....	41
Şekil III.4 BSA'nın kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil III.5 İmmobilizasyon üzerine bağlanma zamanının etkisi.....	44
Şekil III.6 Maltozun kalibrasyon grafiği.....	46
Şekil III.7 Serbest α-Amilaz'ın pH-aktivite grafiği.....	47
Şekil III.8 α-Amilaz'ın sıcaklık (°C) - (%) aktivite grafiğidir.....	48
Şekil III.9 α-Amilaz'ın Depolama süresi (gün) - (%) aktivite grafiği.....	49
Şekil III.10 İmmobilize enzimin pH- (%) aktivite grafiği.....	50
Şekil III.11 İmmobilize enzimin sıcaklık (°C) - (%) aktivite grafiği.....	51
Şekil III.12 İmmobilize enzimin zaman (gün) - (%) aktivite grafiği.....	53
Şekil III.13 İmmobilize enzimin kullanım sayısı - (%) aktivite grafiği.....	53
Şekil III.14 Nişasta konsantrasyonu (mg/mL) – absorpsiyon grafiği.....	56
Şekil III.15 2 numaralı örneğin zaman (dakika) – absorpsiyon grafiği.....	58

Şekil III.16 3 numaralı örneğin zaman (dakika) – absorbsiyon grafiği.....	59
Şekil III.17 4 numaralı örneğin zaman (dakika) – absorbsiyon grafiği.....	59
Şekil III.18 5 numaralı örneğin zaman (dakika) – absorbsiyon grafiği.....	60
Şekil III.19 6 numaralı örneğin zaman (dakika) – absorbsiyon grafiği.....	60
Şekil III.20 İmmobilize olmuş α -Amilazın Michealis – Menten eğrisi.....	61
Şekil III.21 İmmobilize olmuş α -Amilazın Linewear-Burke Eğrisi.....	62
Şekil III.22 Linewear-Burke Grafiği.....	63
Şekil IV.1 Sentezlenen monomerinin FTIR spektrumu.....	64
Şekil IV.2 Sentezlenen monomerin ^{13}C NMR spektrumu.....	65
Şekil IV.3 Sentezlenen monomerin TGA spektrumu.....	66
Şekil IV.4 Polimerik yüzeyin görüntüsü.....	67
Şekil IV.5 Polimere bağlanan küresel parçacığın görüntüsü.....	68
Şekil IV.6 Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine pH'nın etkisi.....	69
Şekil IV.7 Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	70

TABLÖLAR

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo III.1 Çözeltilerin Konsantrasyon Değerleri.....	41
Tablo III.2 Örneklerin 585 nm'deki Absorbsiyon Değerleri.....	42
Tablo III.3 Hazırlanan Standartların Konsantrasyon ve Absorbsiyon Değerleri.....	45
Tablo III.4 Filmlerin İçerdiği Enzim Bağlı Monomer Miktarı, Absorbsiyon Değerleri, Enzim Konsantrasyonu, pH Değeri, Aktivite ve % Aktivite Değerleri.....	50
Tablo III.5 Filmlerin İçerdiği Enzim Bağlı Monomer Miktarı, Absorbsiyon Değerleri, Enzim Konsantrasyonu, Sıcaklık Değeri, Aktivite ve % Aktivite Değerleri.....	51
Tablo III.6 Filmlerin İçerdiği Enzim Bağlı Monomer Miktarı, Absorbsiyon Değerleri, Enzim Konsantrasyonu, Zaman, Aktivite ve % Aktivite Değerleri.....	52
Tablo III.7 Filmlerin İçerdiği Enzim Bağlı Monomer Miktarı, Absorbsiyon Değerleri, Enzim Konsantrasyonu, Kullanım Sayısı, Aktivite ve % Aktivite Değerleri.....	54
Tablo III.8 Hazırlanan Örneklerin İçerdiği Nişasta Miktarı, Distile Su Miktarı, Hazırlanan Örneğin Konsantrasyonu (C) ve Her Örneğin Absorbsiyon Değerleri.....	55
Tablo III.9 Kullanılan Filmin İçerdiği Enzim Miktarı, pH 6,9'da Hazırlanmış Nişasta Çözeltisi (mL), Tampon Miktarı (mL), Dakika Dakika Kesilen Reaksiyonların Verdiği Absorbsiyon Değerleri ve Ortalama Absorbsiyon Değerleri.....	57
Tablo III.10 Kullanılan Enzim Miktarı, Nişasta Konsantrasyonu, pH 6,9'da Hazırlanmış Nişasta Çözeltisi (mL), Tampon Miktarı (mL), Dakika Dakika Kesilen Reaksiyonların Verdiği Absorbsiyon Değerleri ve Ortalama Absorbsiyon Değerleri.....	58
Tablo III.11 Nişasta Konsantrasyon (S)–Hız (V) Değerleri.....	61
Tablo III.12 Nişasta Konsantrasyon (1/S)–Hız (1/V) Değerleri.....	62

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Enzimler, kimyasal katalizörlerden farklı olarak, reaksiyonları sulu çözeltilerde normal sıcaklık ve pH, düşük sıcaklık gibi çok ılımlı koşullarda katalizleyen, böylelikle ısıya duyarlı substratların bozunması olasılığını azaltan, prosesteki enerji gereksinimlerini ve korozyon etkilerini azaltan katalizörlerdir. Bunların dışında yüksek substrat özgürlüğüne sahiptirler. Reaksiyonlarda arzulanmayan yan ürünlerin daha az oluşmasına neden olurlar, dolayısıyla materyal maliyetini düşürürler ve ürün ayrıştırma işlemlerinin daha kolay yapılmasına katkıda bulunurlar [1].

Bütün bu üstünlüklerine karşın endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde uygulamaları gayet sınırlıdır. Çünkü uzun uygulama sürelerinde düşük bağlı stabilite gösterirler, izolasyonları zordur ve pahalıdır. Bu gibi sakıncaların bir kısmını gidermenin en iyi yolu enzim molekülünü bir katı matris üzerine bağlayarak ya da matris içinde tutuklayarak gerçekleştirilecek olan immobilizasyon işlemidir [2, 3]. Böylelikle enzim molekülü reaksiyon ortamında çözünmez hale getirilerek katalitik proses sonunda kolaylıkla geri kazanılabilir ve daha sonraki proseslerde tekrar kullanılabilir.

İmmobilizasyon fikri 1970'lerde gelişti ve Japonya'da kurulan Tanaka Seiyako Şirketi immobilizasyon yöntemini ticari amaçla kullanan ilk şirkettir [4].

İmmobilize enzimlerin çözünür enzimlere olan üstünlüğü aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler,
- Katalitik prosesin sürekli bir şekilde çalıştırılması, kolaylıkla kontrol edilmesi mümkün olur,
- Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilebilir,
- Ürünler kolaylıkla ortamdan ayrılabilirler,
- Bazı hallerde enzimin aktivite ve stabilite gibi özellikleri immobilizasyon sonucu gelişebilir,
- Prosesin atık ve malzeme taşınması gibi sorunları en aza iner, çevre dostu bir prosestir,

- Üretim maliyeti düşer [1].

Enzimlerin immobilizasyonu için çeşitli metodlar vardır. Bunlar fiziksel metodlar ve kimyasal olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir [5-7]. Bununla birlikte immobilizasyon metodları aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir [8]:

- Kovalent Bağlanma metoduyla enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanırlar.
- Çapraz Bağlanma metoduyla enzimler çok fonksiyonlu reaktiflerle çapraz bağlanırlar. Bu reaktifler enzim molekülleri arasında bağ oluştururlar.
- Adsorbsiyon metodu, enzim moleküllerinin taşıyıcıların yüzeyine adsorblanmaları esasına dayanır.
- Tutuklanma metodu, enzimler yapay ya da doğal polimer kafesleri içinde tutuklanırlar veya yarı geçirgen membranlar içine alınırlar.

Son yıllarda enzimler, biyoteknoloji alanında yaşanan hızlı gelişmelere paralel olarak bir çok yeni uygulama alanı bulmuştur [1].

Önemli bir endüstriyel enzim olan Glukoamilaz doğal olarak iki farklı yapıda bulunur. Bunlardan molekül ağırlığı büyük olana GAI ve küçük olana GAII adı verilir. Örneğin; *Aspergillus Niger*den elde edilen GAI enziminin molekül ağırlığı 82500'dür, üç bölümden oluşur. Yaklaşık 440 aminoasitten oluşacak katalitik bölüm (N-terminal), 100 aminoasitten oluşan granüller-nişasta bağlama bölümü (C-terminal) ve bu iki bölümü birbirlerine çubuk şeklinde ve O-glikosil bağlarıyla bağlayan, 70 aminoasitten oluşan bir bağlayıcı bölgeden oluşur. GAII enzimlerinde ise nişasta bağlanma bölgesi bulunmaz. Bu enzimlerin nişasta hidroliz aktiviteleri diğer GAI enzimlerine göre daha azdır. Ancak maltooligosakkaritleri hidroliz açısından diğer GA enzimleri ile aralarında aktivite farkı yoktur [9, 10].

I.2 AMAÇ

Bu çalışmada α -amilaz enzimini immobilize etmek için öncelikle sodyum-N-(4-sülfenil)-maleimid monomeri sentezlenerek, enzimle kovalent bağlanması sağlanacaktır. Sodyum-N-(4-sülfenil)-maleimid'e bağlanan α -amilaz enzimi, çeşitli reaktif akrilatlar, çapraz bağlayıcı ve fotobaşlatıcıdan oluşacak sistemde Ultra Viyole (UV) ışınları yardımıyla sertleştirilerek polimerik filmler hazırlanacaktır.

Polimerik film içinde immobilize edilen enzimin değişik pH, sıcaklık, depolama süresi, tekrar kullanılabilirlik gibi özellikleri immobilize olmayan α -amilaz enzimiyle karşılaştırılacaktır. Elde edilecek sonuçlara göre immobilize olan enzimin endüstride rutin işlemlerde kullanılabilirliği tartışılacaktır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. ENZİMLER

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir [11].

Enzimlerin insanlığın hizmetinde kullanılması hemen hemen insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanlar daha ilk çağlarda ekmek, şarap, peynir v.b. gıda maddelerinin hazırlanmasında ve ayrıca ilaç olarak farkında olmadan enzimlerden yararlanmışlardır. Hücre dışı bir enzimatik aktivitenin oluşu ilk kez 1783 yılında Spanallazi tarafından atmacaların mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek ispatlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchoff buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekere dönüştüğünü belirlemiştir [12]. 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlediğini keşfetmesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir [16].

Payen ve Persoz'un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri olmuştur. Bugün amilaz olarak bilinen bu enzim o günlerde diastaz olarak adlandırılmıştı ve günümüzde enzimlere ilişkin pek çok geleneksel ve tüm sistematik adlandırmalardaki -ase eki kaynağını bu çalışmadan almıştır [13]. 1834 yılında Schwann pepsini oldukça saf olarak elde etmeyi başarmıştır [12].

Enzimlerin keşfinin başladığı ilk yıllarda birçok araştırmacı fermantasyon olaylarında mayalar ve etkilerini göz önüne aldıkları için enzimleri tanımlamaya yönelik olarak ferment terimini kullanmışlardır. 19. yüzyılın ikinci yarısından sonra özellikle Liebig ve Pasteur, fermantasyon olayının yaşayan hücrelerden bağımsız düşünülemeyeceğini vurgulamışlardır. Sonuçta bugün enzimler ve mikroorganizmalar olarak ayrılan iki olgu o tarihlerde organize edilmemiş fermentler ve organize fermentler olarak iki gruba ayrılmıştır. Enzim terimini ilk kullanan ise

1878 yılında Kühne olmuştur. Enzimlerin spesifikliği ve anahtar-kilit modeli gibi kavramlar ise 19. yüzyılın sonlarında Fisher tarafından ortaya konmuştur.

Enzimlerin bugün anladığımız anlamda saflaştırılmalarına ilişkin ilk çalışmalar 1922-1928 yılları arasında Willstaetter ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Enzimler konusundaki diğer önemli adım 1926 yılında Summer'in üreazi kristalize formda elde etmesiyle başlamıştır.

Doğal olarak enzimlerin saflaştırılması ve kristalizasyonu enzimoloji açısından çok büyük öneme sahip olmakla beraber, diğer çalışma konularını yaşayan hücrelerde enzimlerin lokalizasyonunun belirlenmesi, fotosentez, solunum, biyolojik oksidasyon ve biyokimyasal reaksiyonlardaki görevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının incelenmesi, kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla belirlenebilmesi oluşturmaktadır [14]. Enzim molekülünün üç boyutlu konformasyonunun tam anlamıyla açıklığa kavuşturulabilmesi ise X-ışınları kristalografisi yardımıyla gerçekleştirilebilmiştir. Bu konudaki ilk ayrıntılı çalışma da yumurta lizoziminin kristalografik analizi olmuştur [15].

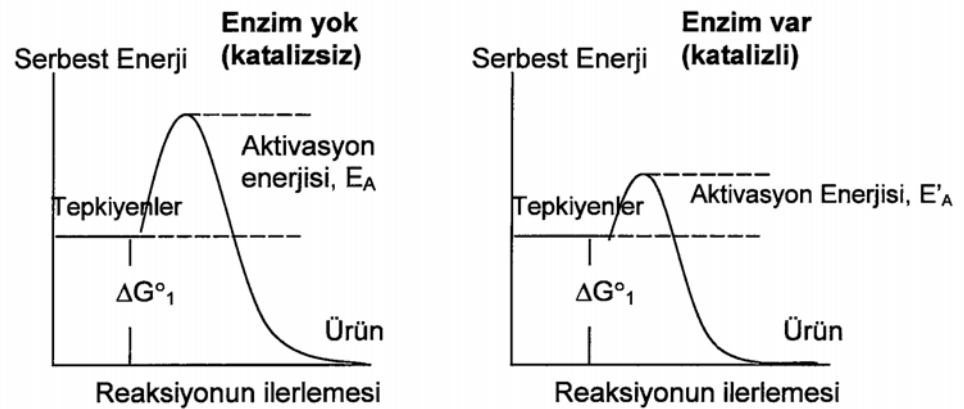
II.1.1. Enzimlerin Özellikleri

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir [11]. Önemli genel özellikleri şunlardır:

- Enzimlerin çoğu, pH'sı 5'den küçük, 9'dan büyük çözeltilerde ve 40°C'nin üstünde aktifliğini kaybeder. Enzimlerin buzdolabında 2-5°C'de saklanması ile aktifliklerini daha uzun süre korumaları sağlanabilir [17].
- Enzimler reaksiyon sonunda değişmeden çıkar ve aynı reaksiyon için tekrar tekrar kullanılabilir.
- Enzimlerin tepkimeleri çift yönlü olup, moleküllerin parçalanmasını veya birleşmesini sağlarlar [18].
- Enzimler tepkimenin yönünü değil, dengenin oranını belirlerler. Dengenin yönünü belirleyen faktörler; konsantrasyon, sıcaklık, gerekli ısı ve basınç şeklinde sıralanabilir [19].
- Enzimler takım halinde çalışır. Birinin son ürünü kendisinden sonraki enzimin substratı olabilir. Örneğin, amilaz enzimi nişastayı iki

glukozlu maltoza, maltaz enzimi de maltozu glikoza parçalar. Glikozda bir seri enzim aracılığı ile laktik aside dönüştürülür. Yani; reaksiyonun her basamağında ayrı bir enzim görev alır [19].

- Genellikle yüksek derecede seçicilik gösterirler.
- Enzimler substrata bağlanarak enzim substrat kompleksi oluşturarak katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjilerini düşürürler [20].
- Kapasiteleri fazladır, az miktarda enzim kısa zamanda büyük miktarlarda ürün üretebilir.
- Aktiviteleri substratları tarafından değil; kimyasal maddeler tarafından kontrol edilir.
- İnsan vücudunda yaygın olarak bulunmaktadır.
- Kimyasal katalizörler, birden fazla kimyasal tepkimede rol oynarken enzimler genellikle tek bir tepkimeyi kataliz etmektedir.
- Bazı enzimler, yapı bakımından birbirine benzeyen substratların hepsine etki edebilmektedir. Bu tür enzimlere gevşek özgüllük gösteren enzimler denir.
- Enzimler belirli bir aktivatör ile aktifleşirler ve aktivatörlerini değiştirmezler. Ancak bir aktivatör, birden çok enzimi aktifleştirebilir. Bu yüzden bir hücrede enzim miktarı aktivatör miktarından fazladır [19].



Şekil II.1: Enzim katalizli ve katalizsiz reaksiyonların aktivasyon enerjileri.

- Katalizledikleri tepkimeler ve substratları konusunda ileri derecede spesifiktirler.

Enzimler kimyasal bakımdan protein yapısında moleküllerdir. Ancak, çoğu durumda söz konusu proteine, protein olmayan daha küçük yapıları organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş bir yapı gözlenir. Bu son durumda enzimin protein kısmı ‘apoenzim’, protein olmayan parçası ise ‘prostetik grup’ veya ‘koenzim’ olarak tanımlanmaktadır [21, 22]. Apoenzim ve koenzimin oluşturduğu aktif yapıya haloenzim denilmektedir. Sıklıkla karşılaşılan kofaktörler arasında metal iyonları (Zn^{2+} , Fe^{2+} gibi) ve organik yapıda olan (NAD^+ , FAD gibi) koenzimler yer alır. Enzimler genellikle bir tek substratı ürüne dönüştürür. Enzim moleküllerinde aktif merkez denilen özel bir cep yada yuva bulunur. Aktif merkez substrata uyumlu olan üç-boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif merkez substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. Enzim-substrat kompleksi enzim-ürün kompleksine dönüşür ve sonrada enzim üründen ayrılır [23, 24]. Enzimler protein yapıda olduklarından, bulundukları doğal ortam sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda tersinmez olarak denatürasyona uğrarlar, aktivitelerini kaybederler [25, 26]. Kofaktör ve koenzimler olmadan bileşik enzimler aktivite göstermezler. Örneğin; Sitokrom oksidaz Cu^{2+} , DNA polimeraz Zn^{2+} , üreaz enzimi Ni^{2+} iyonları gibi kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Yine tükürükte bulunan amilaz enziminin nişastayı parçalaması için kofaktör olarak Cl^- iyonuna ihtiyacı vardır [27].

II.2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıdır. Başka bir ifadeyle; suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak, bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketin sınırlandırılması olayına enzim immobilizasyonu denir [16]. İmmobilize enzim terimi aşağıdaki tanımlamaları kapsar:

- Uygun tekniklerle suda çözünmez forma dönüştürülen enzim,

- Enzim molekülünün kendisi reaktör içinde kalacak fakat ürünü ve substrat geçişini sağlayacak bir membrana sahip olan ultra filtrasyon reaktörü içindeki çözünür enzim,
- Suda çözünmeyen bir polimere bağlanarak mobilitesi sınırlanmış fakat çözünür halde olan enzimdir [1].

Enzim immobilizasyonu çalışmalarının çeyrek asırlık bir geçmişi vardır. Daha 1916 yılında NELSON ve GRİFFEN invertazı aktif kömürde adsorplayarak immobilize etmişler ise de bu çalışmada amaç; enzimi immobilize etmek değil saflaştırmaktır. 1961 yılına kadar bu alanda yapılan çalışmalar sayılı olmakla birlikte özellikle ZİTTLE, McLAREN, MANECKE, KATCHAESKİ ve MİTZ bu araştırma alanına önemli katkılarda bulunmuşlardır. [16, 28, 29]. 1961 yılından sonra enzim immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin uygulamaları üzerindeki çalışmalar giderek yoğunluk kazanmış ve günümüzde en ilginç araştırma konularından biri olmuştur [30].

II.2.1. İmmobilizasyonun Avantajları

Son yıllarda enzimler kimya, biyoteknoloji ve diğer endüstri alanlarında çok çeşitli amaçlar için kullanılmaya başlanmıştır. Bu enzimlerin (katalizörlerin) pahalı ve ortam koşullarına karşı dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir.

Enzim üretiminde genellikle mikrobiyal kaynaklar kullanılmasına rağmen, bu yolla enzim saflaştırılması çok masraflıdır. Çeşitli kaynaklardan izole edilen enzimlerin reaksiyon ortamında aktivitelerini yitirmeden geri kazanmaları olanaksızdır. Bu durum enzimlerin çok spesifik ve pahalı katalizör olmalarına neden olur ve maliyeti yükseltir. Serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanmazlar [30]. Bu gibi sakıncaların bir kısmını gidermenin en iyi yolu enzim molekülünü bir katı matriks üzerine bağlayarak ya da matris içinde tutuklayarak gerçekleştirilecek olan immobilizasyon işlemidir. Böylelikle enzim molekülü reaksiyon ortamında çözünmez hale getirilerek katalitik proses sonunda kolaylıkla geri kazanılabilir ve daha sonraki proseslerde tekrar kullanılabilir. İmmobilize enzimlerin çözünür enzimlere olan ana üstünlükleri aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.

- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendine parçalanması (autolysis, self-digestion) olasılığı azalır.
- Ürün enzimle kontamine olmaz, çünkü enzim matrikste tutulur.
- Katalitik prosesin sürekli bir şekilde çalıştırılması, kolaylıkla kontrol edilmesi mümkün olur.
- Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilebilir [31].
- Bazı hallerde enzimin aktivite ve stabilite gibi özellikleri immobilizasyon sonucu gelişebilir.
- Prosesin atık ve malzeme taşınması gibi sorunları en aza iner, çevre dostu bir procestir.
- Üretim maliyeti düşer [1].

II.2.2. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde öncelikle enzimin bağlanacağı destek materyalinin yapısı dikkate alınmalıdır [32].

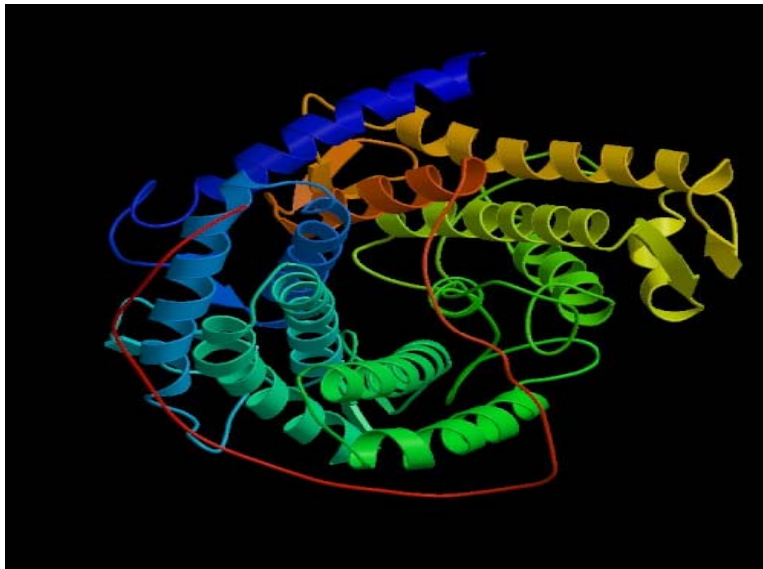
Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

- 1- Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.
- 2- Enzim, tepkimenin yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
- 3- Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile tepkimeye girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfus etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
- 4- Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfhidril enzimleri, sistein ile tepkimeye sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.
- 5- İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
- 6- İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır [33].

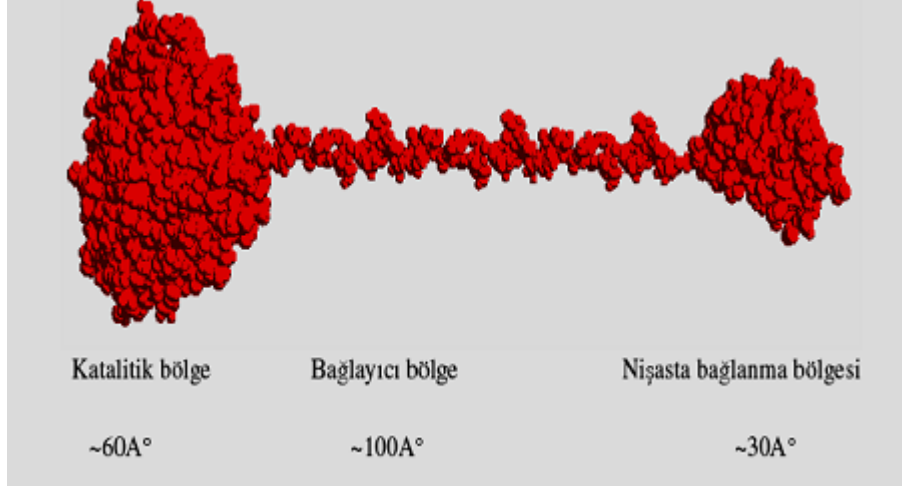
II.3. GLUKOAMİLAZ

II.3.1. Fiziksel Özellikleri

Glukoamilaz (GA; 1,4 α -D-glukan glucohydrolase EC 3.2.1.3.), çeşitli mantar türlerinden, özellikle *Aspergillus* ve *Rhizopus* türlerinden hücre dışı enzim olarak üretilir. *Aspergillus niger*'den elde edilen glikoamilaz endüstriyel ölçekte en yaygın kullanılamıdır. Glikoamilaz enziminin özellikleri, elde edildiği kaynağa ve saflaştırma için seçilen yönteme göre değişebilmektedir [34]. Glikoamilaz enzimi nişasta ve oligosakkaritlerin indirgen olmayan uçlarından α -1,4- ve α -1,6-glikozidik bağlarını hidroliz ederek D-glikoz meydana getirir. Şekil II.2'de GA enziminin X-ray ile elde edilen yapısı gösterilmiştir. Önemli bir enzim olan glikoamilaz doğal olarak iki şekilde bulunur. Molekül ağırlığı büyük olana GAI ve küçük olana GAII adı verilir. *Aspergillus niger*'den elde edilen GAI enziminin molekül ağırlığı 82500'dür ve üç bölümden oluşur. Yaklaşık 440 aminoasitten oluşan katalitik bölüm (N-terminal), 100 aminoasitten oluşan granüler nişasta bağlanma bölümü (C-terminal) ve bu iki bölümü çubuk şeklinde ve O-glikosil bağlayan, 70 aminoasitten oluşan bir bağlayıcı bölgeden oluşur. Şekil II.3'te Glukoamilaz enziminin bölümleri gösterilmiştir. GAII enzimlerinde ise nişasta bağlanma bölgesi bulunmaz. Bu enzimlerin nişasta hidroliz aktiviteleri GAI enzimlerine göre daha azdır. Ancak maltooligasakkaritleri hidrolizleri açısından diğer GA enzimleri ile aktivite farkı yoktur.



Şekil II.2: *Aspergillus Awamori* mikroorganizmasından elde edilen Glukoamilaz X100 enziminin X-ray ile elde edilen görüntüsü



Şekil II.3: Glukoamilaz enziminin bölümleri

Glikoamilaz enzimleri değişik miktarlarda mannoz ve az miktarda da glikozamin içeren glikoproteinlerdir. Yapılan bir çalışmada GA enzimidaki mannoz grupları glikoz ile yer değiştirilmiş ve bu değişimin nişasta hidrolizini olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur. Nişasta hidrolizinin gerçekleşmesi için GA enziminin nişastaya adsorplanması gerekir. GA enzime bağlı olan karbonhidrat zincirlerinin enzim nişasta hidroliz yeteneği ile ilişkisi vardır [35].

Enzimin elde edildiği kaynağa ve saflaştırma yöntemine göre, pH ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi değişiktir. *Aspergillus* türlerinden elde edilen glikoamilazın aktivitesi için bulunan optimum pH değeri 3.5 ile 5.0 arasındadır. *Rhizopus*'dan elde edilen enzim için ise bu değer 4.5 ile 5.5 arasındadır.

Yapılan araştırmalarda *Aspergillus niger*'den elde edilen glikoamilazın, *Rhizopus delemar*'dan elde edilen enzime göre çok daha kararlı olduğu belirlenmiştir. Glikoz veya oligosakkaritler enzim kararlılığını artırırken, kalsiyum klorür ise azaltmaktadır [36].

Karbohidrazların en önemli kaynağını *Bacillus* oluşturmaktadır. Bir karbohidraz olan α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir [37]. α -Amilaz enzimi, nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Nişasta, çok sayıda glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler [38].

Fungal α -amilazlar sıcaklığa bakteriyel α -amilazlardan daha az stabil olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel; özellikle de *Bacillus* amilazları oluşturmaktadır [11]. Bu cinsin 7 tanesinin sentezlediği α -amilaz enzimi çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar; *B. subtilis* [39], *B. Amyloliquefaciens* [40], *B. caldolyticus* [41], *B. coagulans* [42], *B. licheniformis* [43], *B. macerans* [44] ve *Amylosacchariticus*'dur [39].

II.3.2. Endüstrideki kullanım Alanları

Bugün ticari kullanımda, α -amilaz nişastayı dekstrine dönüştürmede kullanılır. Oluşan dekstrin soğutma esnasında jelleşmeyip çözünür haldedir. Bu noktada dekstrin, glukoamilaz tarafından daha ileri parçalanmalara uğratarak yüksek konsantrasyonlu glukoz şurubu elde edilir [45].

Yapılan çalışmaların çoğunda α -amilazın aktiflik tayinleri aşağıda verilen metodlardan birisi ile yapılır.

- Nişastadan oluşan şeker miktarı ölçülür [46,47].
- Reaksiyon sonucunda nişasta miktarındaki azalma iyot ile oluşan spesifik reaksiyon yardımıyla ölçülür [48,49].

Bir kromojenik grup substrata bağlanır ve bu substrattan geriye kalan çözünür kısmının optik yoğunluğundaki değişim monitör yardımıyla izlenir [50].

Termostabil α -amilazın uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glikoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermentasyonunda kullanılmaktadırlar [51-53].

Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan, *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo β -glukanazlardır [54].

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma (sökme) adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır [55].

Gıda endüstrisinde, nişastanın α -amilaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkan ürünler, yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmasından önce oluşan kısa moleküllü ilk

üründür. Dekstrinler çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite arttırıcı, yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır [56].

α -amilaz enzimi ekmek üretiminde, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir. Bu sorun, ortama α -amilaz ilave edilerek giderilmektedir [57].

II.4. NİŞASTA

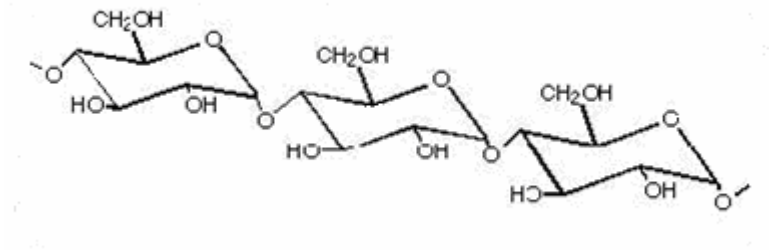
Çok sayıda monosakkarit birimlerinin, disakkaritlerde olduğu gibi oksijen köprüleriyle birleşmesi sonucu polisakkaritler meydana gelir. Eğer birleşen birimlerin hepsi aynı ise bu bir “biyohomopolimerdir”dir, farklı birimlerin birleşmesinden ise “biyoheteropolimerler” meydana gelir. Biyohomo polisakkaritlerin en önemlileri nişasta ve selülozdur [45].

Glikoz canlıların önemli bir enerji sağlama maddesi, nişasta ise enerji depolama maddesidir. Yapısı çok sayıda D-glukoz moleküllerinin maltozda olduğu gibi, 1,4 α 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 ürün 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. Ayrıca bu tünelcikleri 6,7 ve 8 glukoz birimlerinden ibaret halka şeklindeki parçalara ayıran enzimler vardır. Bu ürünlere “siklodekstrin” veya “Schardinger-Dekstrin” adı verilir.

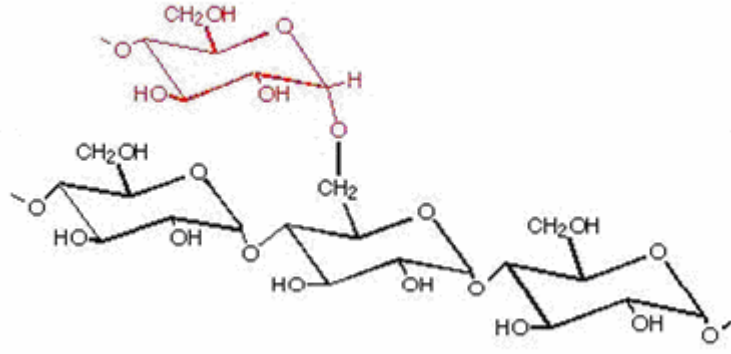
Glikoz birimlerinin 1,4 α şeklinde bağlanması açılı olduğundan ve bu açılar hep aynı yöne doğru olduğundan tersiyer yapısı sarmal şeklindedir. Bu şekilde oluşan amilozun molekül ağırlığı 5×10^4 - 5×10^5 arasında değişir, yani yaklaşık olarak 200-2000 glikoz birimlerinden oluşmuştur. Molekül sarmal olmakla birlikte çizgiseldir ve yan dallanmalar yoktur.

Amilopektin, tahıl nişastanın % 70-80'ini oluşturur, molekül ağırlığı büyüktür, 5×10^5 - 5×10^6 ve zincirler 250-5000 glikoz birimlerinden oluşmuştur. Molekülde fazlaca 1,6 α şeklinde dallanmalar bulunur. Yaklaşık 20-30 glikoz birimlik aralıklarla 13-18 birimlik dallanmalar vardır [58,59]. 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 pişmişi” denir. Bu olay bir hidroliz olmayıp, su moleküllerinin sıcaklığın etkisiyle dallanmış olan nişasta moleküllerinin arasına girmesi ve sağlam yapıyı dağıtarak bozması şeklindedir [60]. Bütün nişasta türleri asitli su ile ısıtılınca glikoza hidrolizlenir. Amilaz enzimi de nişastayı maltoz veya glikoza kadar hidrolizler. 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.

α -Amilaz tarafından hidroliz edilen nişastadan oluşan indirgenmiş hemiasetal grupları 3,5-dinitro-salisinat ile tayin edilebilir [61]. Oluşan nitroamino salisilik asit konsantrasyonu kolorimetrik olarak ölçülür. Yeniden oluşan terminal grupların konsantrasyonu, doğrudan doğruya enzim aktifliğine karşılık gelir. Amilozun yapısı Şekil II.4'te, Amilopektinin yapısı Şekil II.5'te gösterilmiştir [62].



Şekil II.4: Amilozun yapısı



Şekil II.5: Amilopektinin yapısı

II.5. ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN TAŞIYICILAR

İmmobilizasyon (tutuklama), enzimlerin katalitik aktifliklerini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır [63]. İmmobilize bir enzimin ana komponentleri enzim molekülü ve taşıyıcıdır ve immobilize enzim sisteminin performansını etkileyen en önemli komponent taşıyıcı yani matrikstir. İmmobilizasyonda, immobilizasyon işlemi esnasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır [64]. Uygun olarak seçilen destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını artırır [31, 65]. İyi bir destek materyali büyük yüzeysel alan, geçirgenlik (permeability), çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, uygun biçim ve partikül büyüklüğü, mikrobiyal etkilere dayanıklılık [66], yüksek tutuculuk, yüksek rijidite (sertlik ve sağlamlık), rejenere gibi özelliklere sahip olmalıdır.

İmmobilizasyonda kullanılan matriksler morfolojik yapılarına göre gözenekli ve gözeneksiz [1], bileşimlerine göre doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır [67].

II.5.1. Morfolojik Yapıya Göre Sınıflama

Gözeneksiz yapıda (Non-Poröz) taşıyıcılar yapılarında gözenekler (porlar) bulunmayan taşıyıcılardır. Yüzey alanlarının çok küçük olması enzim molekülünün bağlanmasını sınırlar. Bağlanma miktarını arttırmak için çok ince öğütülmüş partiküller kullanmak gerekir. Bu da immobilize enzimin reaksiyon ortamından ayrılması işlemlerinde güçlük çıkarır. Dolgu yataklı reaktörlerde büyük basınç düşmelerine ve düşük akış hızlarına neden olur. Bununla birlikte bazı avantajları da vardır. Enzimin molekülleri taşıyıcının dış yüzeyine bağlanacağından substrat ve ürünler için difüzyon güçlükleri görülmez. Enzimin kendisini kuşatan çevre ile doğrudan temasta olur.

Gözenekli (poröz) taşıyıcılar, organik ya da inorganik yapıda olabilirler. Birim ağırlık başına yüksek yüzey oranına sahiptirler, bu yüzden yüksek enzim bağlama yetenekleri vardır ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan ideal taşıyıcılardır. En önemli sakıncaları ise enzim bağlanmasında kullanılan yüzeyin iç yüzey olmasıdır. İç yüzeyler hem enzim bağlanmasını kolaylıkla sağlayacak şekilde hem de substrat ve ürünün enzime kolayca ulaşabilmesine izin verecek şekilde olmalıdır. Aksi takdirde difüzyon güçlükleri ortaya çıkar. İç yüzeyler enzimi türbülans ve sert dış çevre koşullarından korurlar.

Gözenekli taşıyıcılar rasgele ya da kontrollü gözenek dağılımında olabilirler. Rasgele por dağılımlı taşıyıcılar sınırlı sayıda gözeneğe sahiptirler. Total yüzeylerinin küçük bir kısmı etkin olarak kullanılabilir durumdadır. Kontrollü por dağılımı olan taşıyıcılar ise geniş bir por dağılımına sahiptir. Bunlarda por büyüklüğü ile yüzey alanı arasında ters bir orantı vardır. Bu da özel bir enzim substrat sistemi için por çapının optimasyonunu olanaklı kılar.

Bir kısım gözenekli taşıyıcılar jeller olarak sınıflandırılabilirler. Jeller enzimlerin tutuklanmasında, kovalent olarak ya da adsorbtif olarak bağlanmasında geniş olarak kullanılırlar. Ancak elastik karakterlerinden dolayı tam stabil por yapısına sahip değildirler ve kolaylıkla sıkıştıklarından tapa akışlı reaktörlerde basınç düşmelerine neden olurlar. Diğer taraftan elastik yapıda olmaları onların arzulanan konformasyonda üretilmelerini olanaklı kılar. Karıştırılmalı tank reaktörlerinde rijit yapıdaki jellere kıyasla daha az deformasyona uğrarlar [1].

II.5.2. Kimyasal Yapıya Göre Sınıflama

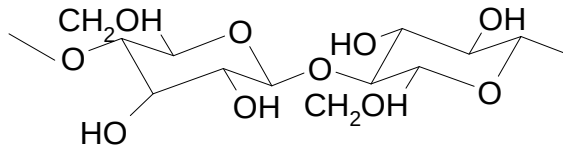
Organik taşıyıcılar; doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olmak üzere sınıflandırılabilir. Organik taşıyıcılar da doğal ve sentetik olmak üzere kendi aralarında ikiye ayrılırlar.

Organik taşıyıcılar istenmeyen fiziksel özelliklerinden dolayı fiziksel, kimyasal, termal ve mikrobiyal degradasyonlara karşı enzim prepasyonlarının zayıf stabiliteye sahip olması inorganik taşıyıcıların organik olanlara karşı bazı avantajlara sahip olmasını sağlar [1]. Fakat organik desteklere oldukça fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak mevcut olan birçok immobilize enzim sistemi organik taşıyıcılarda immobilize edilmişlerdir [66]. Organik taşıyıcılarda hidrofilik ya da hidrofobik karakteristikleri içeren doğal makromoleküller (polimerler) ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilirler.

II.5.2.1. Doğal Polimerler

Polisakkaritler, polisakkarit omurgası içeren ve en geniş olarak kullanılan taşıyıcılar alglerden ve selülozdan elde edilirler [1]. Polisakkarit desteklerinden olan agaroz, dextran, selüloz türevleri enzimleri bağlamada ve alijnat ile karregenen ise hapsetme amacıyla kullanılır [68, 69].

Polisakkarit olarak selüloz, enzimlerin kovalent bağlanması için taşıyıcı olarak kullanılabilen ilk malzemelerden biridir. Şekil II.6'da selüzon yapısı gösterilmiştir. Kimyasal olarak, selüloz birbirlerine (1→4) glikozidik bağlarıyla bağlanmış olan β -D-glukopiranozid birimlerinden oluşan, bitkisel bir elyaf olup, buna ek olarak hidrojen bağlarıyla zincir içi etkileşimlerde söz konusudur.

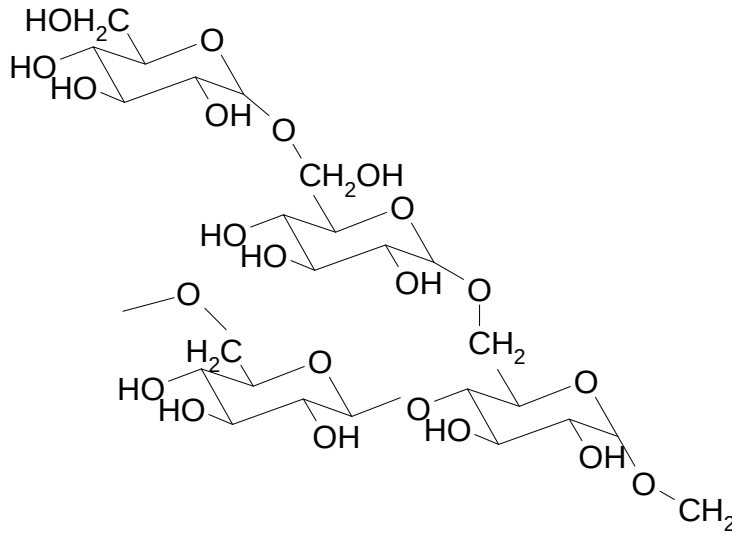


Şekil II.6: Selülozun yapısı

Polisakkaritlerin hidroksil grupları taşıyıcı ile enzim molekülleri arasında yeterince kovalent bağlar oluşturacak yeterlilikte reaktiviteye sahip olmamakla birlikte, selüloz polihidrik alkollerle ilintili bütün reaksiyonlara girer, böylelikle geniş bir aralıkta aktif selüloz türevleri hazırlanabilir.

4-aminobenzil-, aminoetil-(AE-), dietilaminoetil-(DEAE-), karboksimetil-(CM-), epiklorohidrintrietaanolamin-(ECTEOLA-), oksi-, fosfo-, sülföetil-, trietilaminoetil-(TEAE-) ticari olarak mevcut olan kimyasal olarak değiştirilmiş çeşitli selüloz tipleridir. Bunlar iyon değiştirici olarak kullanılabilirler. Bu şekilde değiştirilmiş olan selülozlar iyonik bağlama ile enzimlerin doğrudan immobilizasyonunda kullanılabilirler, aynı zamanda çok çeşitli kovalent bağlama yöntemlerinin kullanılmasına da olanak verirler. Enzimler bu taşıyıcılara genellikle amino grupları üzerinden geçerek bağlanır. Enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan selüloz türevlerinden bazıları triazinil-selüloz, bromoasetil-selüloz, selüloztrans-2,3-karbonat, selüloz imidokarbonat, selüloz azid, selüloz karbonil, diazoseleüloz, izosiyanatoseleüloz'dur.

Çapraz bağlı dekstran esaslı çözünmeyen gözenekli taşıyıcılar moleküler elek özelliğine sahip olup jel filtrasyon kromatografisi için taşıyıcı olarak geliştirilmişlerdir ve ticari olarak mevcuttur (SephadexR). Şekil II.7'de dekstranın yapısı gösterilmiştir. İnklüzyon sınırları ve su tutma kapasiteleri ile karakterize edilirler. Bu özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda kabul gören materyaller sınıfında yer almışlardır.

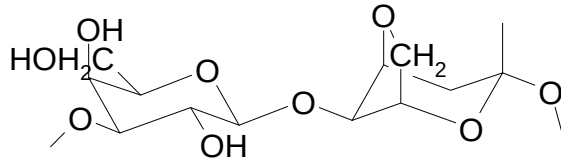


Şekil II.7: Dekstranın yapısı

Ticari olarak mevcut olan dekstran jelleri suda çözünen polimerin epiklorohidrin ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanır. Çapraz bağlı dekstranlar enzim immobilizasyonunda kullanılması için aktive edilmiş olmalıdır. Bu amaçla en sık

kullanılan işlemlerden biri CNBr aktivasyon yöntemi olup, aktivasyon sonucunda dekstranın siklik trans-2,3-imidokarbonat türevi elde edilir.

Agaroz, kimyasal olarak saflaştırılmış lineer galaktan hidrokolloidi olup agardan izole edilir. Arabinoz birimlerinin tekrarlarından oluşan polimerlerdir. Şekil II.8’de agarozun yapısı gösterilmiştir. Arabinoz (1→3) bağlı β-D-galaktopiranoz ve (1→4) bağlı 3,6-anhidro-α-2-galaktopiranoz strüktüründen ibarettir.



Şekil II.8: Agarozun yapısı

Agaroz jelleri diğer jellerden mekanik olarak daha stabil olup daha büyük gözeneklere sahiptir. Mikrobiyal degradasyona karşı dirençlidir, zira agar parçalayan enzimler (agaraz) sadece deniz yosunları üzerinde bulunan bazı mikroorganizmalarda bulunmaktadır.

Agaroz jelleri makroporöz hidrofilik ve non-adsorban olma gibi mükemmel özellikleri olmasına karşın, bazı sakıncalara da sahiptir: Agaroz jelleri ısı ile steriliye edilemezler; kuvvetli alkali çözeltiye ve organik çözücüler varlığında parçalanırlar; nötral pH’da bile çözünür hale geçme özellikleri vardır; ıslak halde saklanmalıdırlar zira kurudukları zaman irreversibl olarak kırılmaya uğrarlar. Bu yetersizliklerin bir çoğu epiklorhidrin, 2,3-dibromopropanol ya da divinilsülfon gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak azaltılabilir ve jellerin mekanik özellikleri ve kimyasal dirençliliği artırılabilir.

Agar ve Agaroz enzimlerin tutuklanması yöntemlerinde kullanılmakla birlikte çapraz bağlı agaroz (Sephadex^R) enzimlerin kovalent immobilizasyonu için aktive edilebilir. Bu amaçla çapraz bağlı dekstranlar da kullanılan yöntemler agaroz çapraz bağlanması için de kullanılabilir.

Doğal asidik polisakkaritler de enzim immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanılabilir. Asidik polisakkaritlere bir örnek alginik asit ya da alginattır. Alginatlar pH 5.0-10.0 aralığında kimyasal olarak çok stabildirler. Yüksek asit konsantrasyonları ve yüksek sıcaklıklar alginatların dekarboksilasyonuna sebep

olurlar. Halojenler ya da periadotlar gibi oksidasyon ajanlarıyla ve polifenoller ya da tioller gibi redoks sistemleriyle degradasyonlara uğrarlar [1].

Çözünmeyen alginat lifleri ılıman koşullarda sol jel ile jel arasındaki iyon değişimi sayesinde kolayca üretilebilir. Jel liflerinin oluşumunda α -L-Gluronik Asit yapılarına bağlı kalsiyum iyonları iyonik çapraz bağla bağlanır. Jelleşme seviyesi kullanılan metal iyonları ile alginat yapısındaki M/G asit oranına bağlıdır. Çünkü, M ve G yapıları arasında metal iyonlarına karşı ilgi farklıdır. Bu özellikler kullanılarak farklı özelliklerdeki jeller elde edilebilir [70]. Aljinat jelleri K^+ , Mg^{+2} , fosfat ya da kelat oluşturan maddelerin varlığı dışında (özellikle bunların yüksek konsantrasyonlarında) mekanik olarak stabildirler. Bu sakıncasının ötesinde enzim sızdırması ve substrat difüzyon sınırlaması bu taşıyıcının uygulanabilirliğini sınırlar. Bununla birlikte alginat jellerinde immobilizasyon; güvenli, hızlı, ılımlı, basit, ucuz ve çok yönlü bir teknik olup biyokatalizörlerin geniş bir aralığında kullanılmaktadır.

Alg Polisakkaritleri, polisakkaritleri biyokatalizörlerin immobilizasyonu için en sık kullanılan taşıyıcılardır. Bu materyaller kürecik formunda olup zon elektroforezinde destek materyali olarak ve moleküler elek olarak kullanılırlar. Bunların içinde agaroz immobilize enzimler için taşıyıcı moleküller olarak kullanılmaya başlanmıştır [1].

Aljinik asit, üronik asidin iki türünün birleşmesiyle meydana gelen heteroblok bir kopolimerdir. B-1,4-D-Mannuronik Asit (M) ve α -1,4-L-Gluronik Asit (G)'inin gelişigüzel birleşmesi ile meydana gelir [70]. Farklı seviyelerde de olsa, bütün aljinat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunur [71]. Aljinik asit genellikle sodyum, potasyum, amonyum tuzları ile propilen glikol esteri şeklinde bulunur. Aljinik asit ve kalsiyum aljinatın sudaki çözünürlüğü son derece sınırlı iken sodyum, potasyum, amonyum tuzları ile propilen glikol esteri suda kolaylıkla çözünebilirler.

Aljinatın yüksek molekül ağırlığına sahip olması, suda çözünürlüğünün iyi olması ve biouyumluluğu nedeniyle birçok uygulama alanı vardır. Gıda endüstrisinde stabilizatör ve koyulaştırıcı olarak kullanıldığı gibi, kozmetik, kağıt, plastik ve ilaç endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır [72]. Ayrıca aljinatın iki değerlikli metal çözeltileri içerisine damlatılmasıyla meydana getirilen alijinat bilyeleri, ağır metal içeren atık suların arıtılması çalışmalarında kullanılmakta [73, 74] dolgu kolon reaktör tasarımında da önem taşımaktadır [75].

Karragenan, yapısal olarak agara çok benzeyen, kırmızı ve kahverengi yosun ve deniz otlarından temin edilen polisakkaritlerdir. Karregenalar sülfatlaşmış polisakkarit polimerleri olup “Rhodophyceae” sınıfı çeşitli deniz yosunlarından ekstrakte edilirler [76]. Genellikle dallanmamış olup AB disakkariti şeklinde tekrarlayan ünitelerden meydana gelirler [77].

Karragenanın 3 değişik formu bulunmaktadır. Bunlar kappa (κ), iota (ι) ve lambda (λ) karragenandır. κ -Karragenan en fazla bulunan ve kullanılan türüdür. En fazla bulunan türü olan κ -karragenan (1,3)- β -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- α -D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmuştur [78].

Farklı deniz yosunlarından elde edilen karragenanlar farklı özellikler gösterirler. kappa (κ) ve iota (ι) tipi karragenanların soğuk suda çözünmeleri zordur ve ısıtma ile daha iyi çözünür hale gelebilirler. Fakat lambda (λ) karragenan tipi soğuk suda çok rahat çözünmektedir. Değişik tipteki karragenanlar jel haline getirilebilir. Jellerin akıcılığı, esnek yada sert olmaları ısıtma ile istenildiği şekilde elde edilebilir. Oluşan karragenan çözeltisinin akışkanlığı; polimer derişimine, çözelti sıcaklığına ve karragenanın tipine bağlıdır [79,80].

Çözünmeyen karragenan lifleri ılıman koşullarda sol jel arasındaki iyon değişimi sayesinde kalsiyum iyonlarının bağlanması ile kolayca üretilebilir [80]. Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı bağlanan enzimi koruyan ve hidrofilik karakter sağlayan aktive olmadan kalmış olan hidroksil gruplarına sahip olmasıdır. Polisakkarit moleküllerinin hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonunu sağlar. Bununla birlikte polisakkarit taşıyıcıların nükleofilik karakterinin çok zayıf olması nedeniyle enzim moleküllerinin bağlanması için olan aktivasyondan önce alifatik ya da aromatik amino grupları, karboksil ve tiol grupları gibi fonksiyonel grupların matrikse sokulması gerekli olabilir (indirekt bağlanma) [81]. Karragenan ve aljinatların hücre immobilizasyonu için polimerik destek maddeleri olarak seçildikleri çalışmalara özellikle 1980’lerde sıkça rastlanmaktadır. Antibiyotik, organik asit, optikçe aktif amino asit üretiminden steroid dönüşümlerine kadar pek çok alanda çeşitli mikrobial hücrelerin kendi başlarına veya enzimlerle birlikte immobilizasyonları bu doğal polimerlerle başarıyla gerçekleştirilebilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar arasında maya, bakteri ve bitki hücreleri [82], α -amilaz üretiminde *Bacillus subtilis* bakterisi [83], *Nitrobacter agilis* hücreleri [84],

κ -karragenan ile, maya hücreleri [85], propiyonik asit bakterileri [86], N-karbamil- β -alanin üretiminde bakteriyal hidantoinaz [87], nişasta dönüşümünde termofilik bakteriler [88], Ca-alginat ile immobilize edilmişlerdir.

II.5.2.2. Sentetik Polimerler

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. Akrilik polimerleri enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan sentetik polimerlerdir. Bu polimerler, enzim hapsetme veya kovalent bağlama amacıyla kullanılmıştır. Poliakrilat ve polihidroksi alkil metakrilat ve bunların türevlerinin ticari olarak bulunması, enzim immobilizasyonu amacıyla kullanılmasına olanak sağlamıştır. Poliakrilat ve polimetakrilat, akrilik asit ve metakrilik asitlerin polimerizasyonu ile elde edilir. Akrilatlar esas olarak daha hidrofobik veya negatif yüklü matriksler hazırlanmasında diğer organik bileşiklerle kopolimer oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Polihidroksi alkil metakrilatlar, hidrofobik organik matriks olarak hidroksil gruplarının sayısına göre geliştirilmiş mekanik özelliklere sahiptirler ve biyolojik dirençleri yüksektir. Enzim bağlanmasında bu tip matriksler daha çok çözünür karbodiimitlerle aktiflenir. Makrogözenekli taşıyıcılar, bir çapraz bağlayıcı reaktif ve hidroksi alkil metakrilatın radikalik süspansiyon kopolimerleşmesi ile küresel formda hazırlanırlar [81].

İnorganik destekler üzerinde fiziksel ya da kimyasal yöntem ile enzimlerin immobilizasyonu yüksek mekaniksel dirençle sahip olması, pH, sıcaklık ve basınca bağlı yapısal değişimler göstermemesi, mikrobial saldırıya karşı koyması ve rejenerasyon kabiliyetinin olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir [89]. İnorganik taşıyıcıların çoğunun yüzeyi camdaki silanol grupları gibi oksit ve hidroksil gruplarından oluşmuştur. Bunlar aktivasyon ve enzim bağlanması için ılımlı reaktif bir yüzey sağlar [1]. İnorganik destek materyalleri immobilize enzimler için mükemmel taşıyıcılar olarak gösterilmiştir. Ayrıca değişik araştırmacılar tarafından gözenekli cam üzerine immobilize edilmiş β -galaktosidaz ile sütteki ve sulu çözeltideki laktozun hidrolizi incelenmiştir [90].

II.6. ENZİM İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ

Enzim immobilizasyonu için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir [91, 92].

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşumuna bağlı olmadan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzimlerin immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu, v.b) enzimin destek maddesindeki mikrobölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır [93-95]. En yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

II.6.1. Çapraz Bağlama Yöntemi

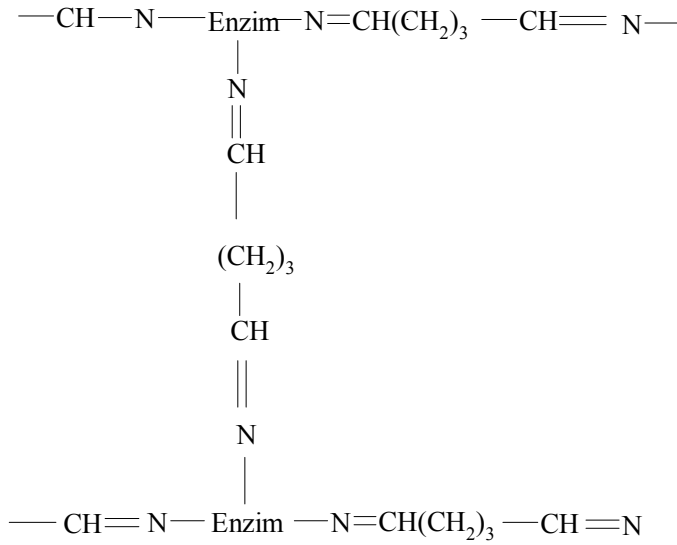
Küçük moleküllü bi- veya multi-fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan da kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zordur. Enzim aktifliği, reaksiyon süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, protein ve reaktif konsantrasyonu, pH, immobilize edilecek enzim gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur [96-101]. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir:

- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorbsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonudur [102].

Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan çok fonksiyonlu maddeler; glutaraldehit, diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, triklor-s-triazin, hekzametilen diizosiyanat, klorformat ve karbodiimidazol, heterosiklik halojenürler,

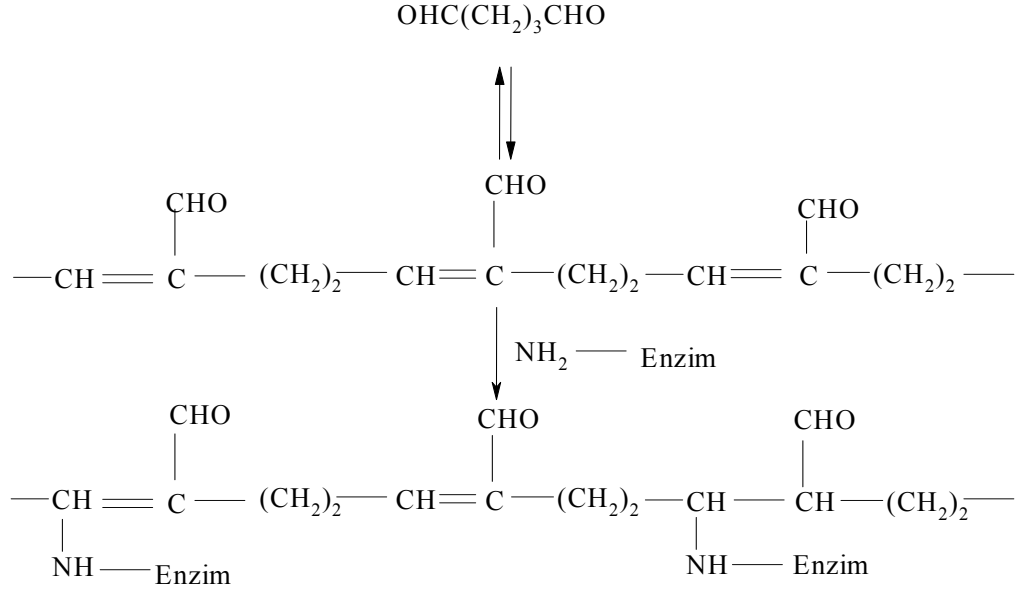
bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, tranzisyon metal iyonları ve epiklohidrinlerdir [1, 100]. Karbonil içeren bileşiklerden oluşan reaktifler enzim molekülünün L-Lizil rezidürleri ile reaksiyona girer (Schiff bazı oluşumu). Diazo bileşikleri L-Lizil, L-Histidil, L-Tirozil, L-Arginil ya da L-Sisteinil rezidürleri ile diazo bağı oluşturarak birleşir. İzosiyanatlar primer amino gruplarıyla peptid bağı oluşturur. Alkil iyodürler nükleofilik gruplarla alkilleyerek bağ yapar. İyodoasetamidler ise L-Sisteinil rezidürlerini alkiler.

Glutaraldehit ile moleküller arası çapraz bağlama Şekil II.9'da gösterilmiştir.



Şekil II.9: Glutaraldehit ile moleküller arası çapraz bağlanma

Enzim ve Glutaraldehit arasındaki bağlar irreversibil olup ekstrem pH ve sıcaklıklara dayanıklıdır. Glutaraldehit ticari sulu çözeltilerinde etilenik çifte bağlar içeren α - β -ansatüre oligomerler yapısındadır. Enzimdeki NH_2 grupları bu oligomerler ile konjugasyon reaksiyonları verir. Şekil II.10'da enzimdeki NH_2 gruplarının oligomerlerle konjugasyon reaksiyonu gösterilmiştir.



Şekil II.10: Enzimdeki NH₂ gruplarının oligomerlerle konjugasyon reaksiyonu [1]

Proteinlerin en fazla çözünmesi izoelektrik noktalarına yakın pH değerlerinde meydana gelir. Çözünmezleştirme derecesi iyonik gücün artmasıyla azalır [102].

Bu yöntemin en önemli avantajı tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu yöntemin dezavantajı ise yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır [100]. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Fazla miktarda enzime ihtiyaç duyulur. Bu sakıncalardan dolayı bu immobilizasyon yöntemi çoğunlukla adsorbsiyon gibi diğer immobilizasyon yöntemleri ile birlikte uygulanır [1, 103]. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnız immulonojik testlerde kullanılmışlardır [102].

II.6.2. Kovalent Bağlama Yöntemi

Kovalent bağlanmayla enzim immobilizasyon yöntemi enzim molekülü ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiye geçmesini engeller [93]. Kovalent bağlanma, genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun

yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir [104, 105].

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme metodunun doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır [31].

Çapraz bağlamada olduğu gibi kovalent bağlanma yöntemi de oldukça kuvvetlidir öyle ki substrat varlığı ya da yüksek iyonik kuvvetli çözeltilerin varlığında dahi çözeltiliye enzim geçmeyen stabil immobilize enzim preparatlar elde edilir [1].

Bu yöntemde enzimin katalitik görevde yer almayacak kısımlarının destek materyaline kovalent bağlanması esas olmalıdır. Böylece enzim aktivitesini yitirmemiş olur. Enzim üzerindeki aktif bölgeyi korumak için birkaç yöntem vardır. Bunlar:

- Enzimin aktif bölgesini yarışmalı inhibitörle inhibe ettikten sonra kovalent bağla destek materyaline bağlanması, sonrada inhibasyonun ortadan kaldırılarak enzimin aktifleştirilmesi,
- Enzimin ilk önce bir ara maddeye bağlanması, sonra bu ara maddenin destek katısına bağlanması,
- Zimojen (enzimin aktif yapıda olmadığı) yapıda destek ortamına bağlanması ve bağlanmadan sonra enzimin aktifleştirilmesidir [103].

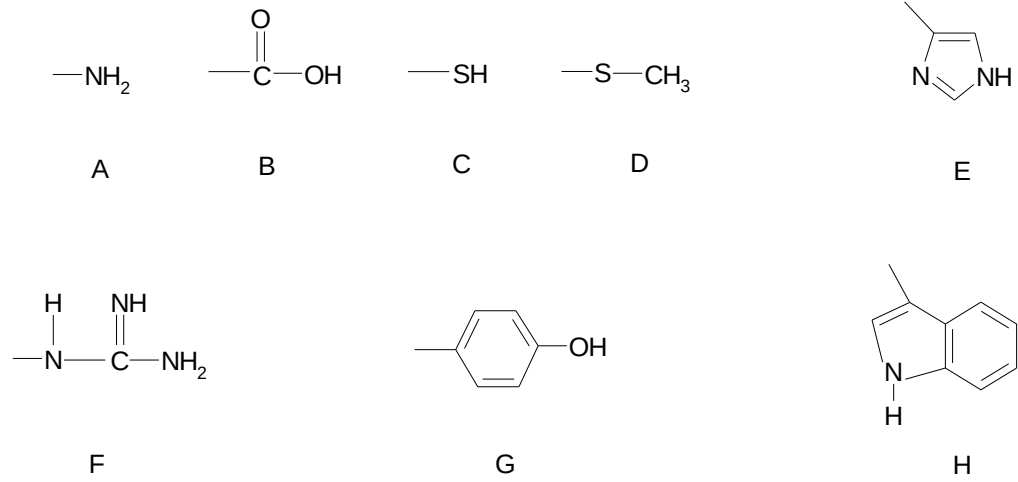
Kovalent bağ yapmaya yatkın grupları olan ya da aktive olmaya duyarlı grupları olan matrikslerle çok çeşitli bağlanma reaksiyonlarının olması bu yöntemi genellikle çok uygulanabilen bir immobilizasyon yöntemi kılar.

Kovalent yöntemlerin çeşitli dezavantajları da mevcuttur. Kovalent bağlanma yöntemleri genellikle karmaşık ve pahalı yöntemlerdir. Enzim bağlama işlemi sırasında enzimde oluşan değişiklikler nedeniyle, immobilize enzim aktivitesinde azalmalar görülür. Bu durumun nedeni, kovalent bağlanma yönteminde kullanılan reaktiflerin genellikle enzim için zararlı ve toksik olmalarıdır (siyanojen bromür, benzokinon, glutaraldehit vb.) [106].

Özgün bir yöntemle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda göz önünde tutulması gereken ana etkenler; ılımlı koşullarda kovalent bağ oluşturmak için uygun olacak protein fonksiyonel grupları, enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlama

reaksiyonları, enzim immobilizasyonu için fonksiyonalize edilmiş uygun taşıyıcılardır [1].

Kovalent bağlanmayla immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel grupları taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak siyanojen bromür, epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir. Aktifleştirilmiş destek materyallerine kovalent bağla bağlanan enzimlerin fonksiyonel grupları, polipeptid zincirlerinin α -amino grupları, arjinin ve lisinin α -amino grupları [91], glutamat ve aspartatinin α -karboksil grupları ve zincirlerin α -karboksil grupları [105, 107], serin ve treanin hidroksil grupları [108], tirozinin aromatik zincirleri [33, 109], histidinin imidazol halkası [110, 111], triptofanın indol halkası [31, 112] ve sisteinin sülfidril grupları gibi gruplardır. Şekil II.11'de amino asit yan zincirlerinin reaktif grupları gösterilmiştir. Immobilizasyon reaksiyonunda aktifleştiriciler enzimlerin bu fonksiyonel grupları ile ve taşıyıcıların içerdiği diazonyum tuzu, asit azid, izosiyanat, imin, imido-ester ve halojenürler gibi reaktif gruplar ile kovalent bağ oluştururlar [93, 105, 107, 113].



Şekil II.11: Amino asit yan zincirlerinin reaktif grupları: (A): N-terminal amino asitlerin amino grubu ve lizinin e-amino grubu. (B): C-terminal amino asitlerin ve aspartik asit ve glutamik asidin serbest karboksil grupları. (C): Sisteinin sülfhidril grubu (D): Metiyoninin tiyoeter grubu (E) : Histidinin imidazol grubu (F): Argininin guanidil grubu (G): Tirozinin fenolik grubu (H): Triptofanın indolil grubu [5, 7, 96, 114-117]

II.6.2.1. Kovalent Bağlanma Yöntemleri

Enzim moleküllerinin katı bir taşıyıcıya bağlanması enzimin amino asit rezidürleri ve taşıyıcıların fonksiyonalize grupları arasındaki reaksiyonları içerir.

Çözünmez enzim-taşıyıcı konjugatlar oluşturan en basit işlemler enzim çözeltisinin aktive edilmiş reaktif taşıyıcı ile temasıyla elde edilir. Bununla birlikte enzimlerin direkt bağlanması için böyle reaktif grupları içeren birkaç taşıyıcı vardır. Çoğunlukla kullanılan taşıyıcı materyaller böyle reaktif gruplara sahip değildirler fakat hidroksil, amino, amido ve karboksil grupları gibi enzim immobilizasyonu için aktive edilebilen grupları içerirler. Taşıyıcıların aktivasyonunda kullanılan reaksiyonlar ve enzim immobilizasyon yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

A) Açılma Reaksiyonları

Enzim proteini üzerinde kovalent bağlanma ile immobilizasyon için en sık kullanılan fonksiyonel grup lizinin -NH₂ grubudur. Bu grup; asit azidi veya anhidridi taşıyan polimerler ile [118, 119], karbodiimid ile aktive edilmiş karboksil grubu taşıyan polimerler ile [120, 121], aktif ester grubu (örnek; hidroksisüksinimid) taşıyan polimerler [122], karboksi ve sulfonilklorür içeren taşıyıcılar ve N-alkil-5-fenil oxazolyum [123] (Woodward reaktifi), N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin (EEDQ) [124] ve karbonildiimidazol [125] gibi kondanase edici reaktiflerle aktive edilen karboksilat polimerleri ile kolayca reaksiyon vermektedir. Açılma reaksiyonları genellikle yumuşak koşullarda (pH 7.5-8.5, düşük sıcaklık) gerçekleşirler.

Asit anhidriti ve azidleri proteinin serbest amino grupları ile reaksiyon verir [126, 127]. Ancak alifatik veya aromatik hidroksil grupları ve -SH grupları ile yan reaksiyonlarda mümkündür [128].

B) Alkilme ve Arilme Reaksiyonları

Özellikle halojen-süstitüe aromatik halkalar enzim molekülünü serbest-NH₂ grubu üzerinden bağlarlar. Benzen halkasının nitrolanması reaktiviteyi arttırmaktadır [129].

Serbest hidroksil grubu taşıyan doğal veya sentetik polimerler (örneğin; selüloz, çapraz bağlı dextran ve agaroz) s-triklortriazin ile aktive edilebilmektedirler.

Monohaloasetil fonksiyonel grubu içeren polimerler de protein üzerindeki serbest -NH₂ grubunun alkilasyonu sayesinde enzimleri bağlayabilmektedir [130].

Arilleme ve alkilleme reaksiyonu açılmeden daha yavaştır ve protonlanmamış nükleofillere gereksinim duyarlar. Dolayısıyla pH'a çok bağımlıdır.

C) Diazolama Reaksiyonları

Aromatik primer amin grubu taşıyan polimerik taşıyıcılar diazonyum tuzu oluşturarak protein moleküllerini fenol (Tyr), imidazol (His) veya serbest $-NH_2$ (Lys) grupları üzerinden bağlayabilirler [129, 131, 132].

D) Karbamilasyon ve Tiyokarbamilasyon Reaksiyonları

İzosiyanat ve izotiyosiyanat grubu taşıyan birçok polimer enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılabilir [133, 134]. Bu tip polimerler proteinlerin yalnız serbest $-NH_2$ grubu ile reaksiyon verirler ve üre veya tiyoüre türevleri oluşur. Sülfhidril, aromatik hidroksil, imidazol ve karboksil grupları üzerinden oluşturulan karbamil türevleri kararsız olup zayıf alkali ortamda ve hidrazin gibi nükleofillerin varlığında derhal bozunmaktadırlar [135]. Daha kararlı olduklarından izotiyosiyanat türevlerine tercih edilirler.

E) CN-Br Yardımı ile Bağlama

Siyanogen bromür ile aktive edilmiş polihidroksi-polimerleri gerek enzim immobilizasyonu gerekse affinite reçinelerinin hazırlanması bakımından son derece önemlidir. Özellikle selüloz, çapraz bağlı dextran ve agaroz gibi suda çözünmeyen polisakkaritler CN-Br ile kolayca aktive edilebilmektedir. Aktivasyon oldukça yüksek pH'larda (10-11.5) gerçekleşirken protein üzerindeki serbest $-NH_2$ grubu zayıf alkali ortamda reaksiyon verir ve protein taşıyıcıya bağlanır [136, 137].

F) İmidoesterler ile Reaksiyonlar

İmidoester fonksiyonel grubu taşıyan polimerler de protein immobilizasyonunda kullanılmaktadır [138]. Bu reaktifler polimerik nitrillerin alkol ve HCl ile muamelesi sonucu oluşmaktadır. İmidoester seçimli olarak protein üzerindeki serbest $-NH_2$ grupları ile reaksiyon verir.

G) Polimerik Aldehitler ile Reaksiyonlar

Aldehid fonksiyonu içeren polimerler, polisakkaritlerin periyodat ile oksidasyonu sonucu oluşan poli-dialdehid türevleri Schiff bazı oluşturarak proteinleri bağlayabilmektedirler. Protein üzerindeki serbest $-NH_2$ grubu yanında $-SH$ ve

imidazol grupları da benzeri reaksiyon vermektedirler. Bu yöntemin uygulaması çok sınırlıdır [139, 140]. Çünkü, Schiff bazı oluşumu bir denge reaksiyonudur ve sulu çözeltide özellikle düşük pH değerlerinde aldimin oluşumu olasılığı azdır [141]. Ayrıca birçok nükleofil dengeyi geri döndürür ve serbest amin (protein) oluşumuna sebep olur. $-CH=N-$ bağlarının indirgenerek sabitleştirilmesi aynı koşullarda disülfid bağları da parçalanacağından enzimatik aktivite kaybına neden olmaktadır [142].

H) SH-Disülfid Değişimi Reaksiyonları

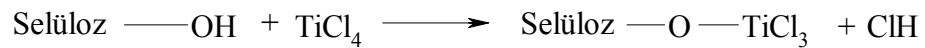
2,2-Dipiridildisülfid gibi proteinlerdeki sülfhidril gruplarının kantitatif tayininde kullanılan maddeler [143] SH- disülfid değişimi reaksiyonlarında aracı görevi yapar.

I) Ugi Reaksiyonu

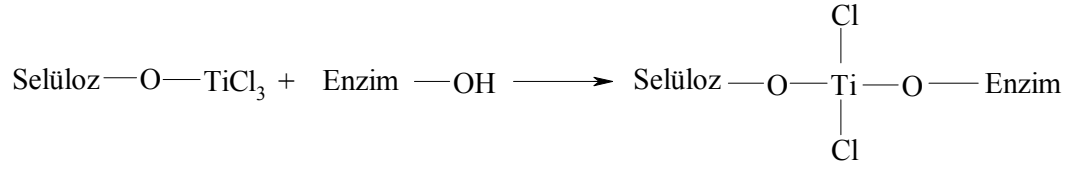
Kısaca ‘Dört Komponent Kondenzasyonu’ (4CC) olarak da bilinen Ugi reaksiyonu; karboksil, primer amin, aldehid ve izonitril fonksiyonel grupları arasında gerçekleşir [144, 145]. Bu reaksiyon yardımıyla enzim immobilizasyonunda taşıyıcı seçimi için çok değişik seçenekler vardır, taşıyıcı dört fonksiyonel gruptan herhangi birini taşıyabilir [146, 147]. Ugi reaksiyonu ile enzim immobilizasyonu için enzimin aldehide duyarlı olması gerekir.

İ) Diğer Bağlanma Reaksiyonları

Transizyon elementlerinin tuzları selüloz, cam gibi taşıyıcıların aktivasyonunda kullanılmaktadır [148]. Bu amaçla en çok kullanılan tuz $TiCl_4$ ’dür. Şekil II.12’de selülozun aktive olmuş yapısı gösterilmektedir. Bağlanma özellikle serin üzerinden gerçekleşmektedir. Şekil II.13’te $TiCl_4$ aktive edilmiş selüloza enzimin bağlanması gösterilmiştir.



Şekil II.12: Selülozun $TiCl_4$ ile aktivasyon reaksiyonu



Şekil II.13: TiCl₄ aktive edilmiş selüloza enzim bağlanması

Ayrıca nikeloksit ve alüminanın alkilamin ve alkil izotiyosiyanat türevleri de enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır [149, 150].

Özellikle selüloz ve türevlerine protein bağlanmasında yaygın olarak kullanılabilecek yeni bir immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir [151]. Bu yöntemde selüloz önce periyodat ile kısmen oksitlenmekte ve ardından sırasıyla üre ve formaldehid ile muamele edilmektedir.

II.6.3. Taşıyıcıya Bağlanma

Enzimin katı taşıyıcıya bağlanmasından ibaret olan bir immobilizasyon yöntemidir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Immobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir [5, 7, 96, 114-117].

Bu teknik enzimin taşıyıcıya bağlanma moduna göre dört kategoride incelenebilir.

II.6.3.1. Fiziksel Adsorbsiyon Yöntemi

Fiziksel adsorbsiyon yöntemi en eski ve en basit enzim immobilizasyon yöntemidir. Ticari açıdan ilk başarılı enzim immobilizasyonu adsorbsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [28, 67, 93, 106, 152]. Proteinler ve özellikle enzimlerin katı

yüzeylerde adsorbsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Adsorbsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu değil enzimi saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorbsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığını görmekteyiz [28, 153].

İmmobilizasyon işlemi uygun koşullarda enzim ve taşıyıcı molekülleri bir çözelti içinde bir araya getirip belli bir temas sisteminden sonra çözünmez immobilizasyon preparasyonunun çözeltiden santrifüj ya da filtrasyonla ayrılması esasına dayanır. İmmobilizasyon işlemi sırasında reaktif gruplar işlevsel olmadığından enzim molekülünde konformasyonel değişimler ya olmaz ya da çok azdır [1].

Adsorbsiyonla immobilizasyon metodu basit olduğu, çeşitli yüklü taşıyıcılar seçilebildiği ve taşıyıcılar farklı fiziksel şekillerde kullanılabilirdiği için avantajlıdır. Ayrıca bu metodda enzim aktifliğini büyük ölçüde korur. Bu metod tersinirdir ve enzimin başka amaçlarla tekrar kullanımını sağlar [93].

Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir [1, 97]. Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorbsiyonu pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ve adsorbanın derişimi, sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır [93]. Özellikle hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi [154] adsorban ve protein arasında zayıf etkileşimler söz konusu olduğunda optimal adsorbsiyon ve retensiyon aktivitesi için bu değişkenlerin yakın kontrolü gereklidir [1, 97].

Katı taşıyıcıya adsorbe olan enzim miktarını etkileyen ana faktör immobilizasyon prosesinde birim taşıyıcı yüzeyine yönelecek olan enzim konsantrasyonudur. Enzim konsantrasyonunun artmasıyla aktivite de artar ve daha yüksek enzim konsantrasyonlarında asimtotik olarak bir satürasyon değerine ulaşır. Zaman ve sıcaklık enzimlerin adsorbsiyonlarında önemli parametrelerdir. Bu durum özellikle poröz taşıyıcılar olması halinde önemli bir etkindir [1].

Prensip olarak bir proteinin aktif yüzeylerde adsorbsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda örneğin; kaolenitte adsorblanmış üreazda olduğu gibi tersinir olmayan bir adsorbsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabiliriyorsa bu tür adsorbsiyon enzim immobilizasyonu için ideal bir durumdur. Desorbsiyon, reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine ve aktivitede sürekli bir değişmeye neden olur. Tersinir adsorbsiyonlar enzim immobilizasyonu için pek uygun değildir [97].

Genellikle kullanılan adsorbanlar alümina, aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO₃, kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır. Son yıllarda hidrofobik assosiyasyondan da enzim immobilizasyonunda yararlanılmaya başlanmıştır [1, 97]. Ligand olarak tanen içeren adsorbanların birçok enzimin immobilizasyonunda kullanılacağı ve bu immobilizasyonda hidrofobik kuvvetlerin önemli bir rolü olduğu öne sürülmektedir [155].

II.6.3.2. İyon Bağlanma Yöntemi

İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetine dayanır [93]. Bazı durumlarda iyonik bağlanma yanında fiziksel adsorbsiyon da etkili olmaktadır. Fiziksel adsorbsiyon ve iyonik bağlama arasındaki temel fark enzimin taşıyıcıya olan bağlanma kuvvetidir. İyon-iyon etkileşimi ile olan bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorbsiyondaki kuvvetlerden daha güçlüdür. Taşıyıcıdan enzim sızması fiziksel adsorbsiyonda olduğu gibi pH ve iyonik kuvvetteki bazı değişikliklerle bağlantılı olarak bazı hallerde meydana gelebilir. Enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlantının iyonik karakterine bağlı olarak ve immobilizasyon için ılımlı koşullara bağlı olarak immobilize enzim preparatlarının aktivitesini yüksek kılmak şeklinde enzim molekülü üzerinde küçük konformasyonel değişiklikler meydana gelebilir. İyonik bağlama için en çok kullanılan komplekslerden bazıları anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, aktif karbon, silikajel, diatomili topraklar ve killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir [1, 65, 93, 97, 156].

II.6.3.3. Metal Bağlama Yöntemi

İmmobilize enzimler genellikle titan ve zirkonyum metal tuzlarından oluşan geçiş metal bileşikleri kullanılarak organik taşıyıcı yüzeylerinin aktive edildiği ya da metal tuzlarından oluşan geçiş metal bileşikleri kullanılarak organik taşıyıcı yüzeylerinin aktive edildiği ya da metal tuzlarından taşıyıcı olarak çekiltelen hidröz metal oksitleri üzerinde hazırlanırlar. Bu yöntem enzimleri bağlamada kullanılan transisyon metallerinin şelat oluşturma özelliklerini esas alır.

Nükleofilik gruplar (hidroksi, amino, thiol vs.) tranzisyon metal iyonları için etkin ligandlardır ve bu nedenle tranzisyon metal iyonlarının taşıyıcılar ve enzimlerin her ikisiyle de kompleksler oluşturmaları beklenir. Selüloz ve silika gibi taşıyıcılar

yeni ligandlar olarak rol oynayan hidroksil gruplarına sahiptir. Örneğin selüloz rezidürler arasındaki glikozidik bağlarında bulunmayan visinal diol grupları ihtiva ederler, bu nedenle tranzisyon metal iyonları ile şelat oluşturmaya uyumludurlar; şelat titanyum iyonunun iki ligandının polisakkarit hidroksil grupları ile yer değiştirmesiyle meydana gelmektedir.

Sterik nedenlerden dolayı titanyum iyonu klorür ligandlarının ya da su ligandlarının hepsinin polisakkarit zincirlerindeki diğer hidroksil grupları ile yer değiştirmesi mümkün değildir. Bunun ötesinde, bu geriye kalan ligandlar komşu selüloz zincirlerinin hidroksil gruplarıyla da kapsamlı olarak yer değiştirmezler.

Şelat oluşumu titanyum bağlı selülozun ligandlarıyla yer değiştirebilen uygun molekül içeren gruplarla başarılabilir. Böylelikle proteinler asidik aminoasitlerin C terminal ucu, tirozil rezidürlerinin fenolik hidroksil, seril ve treonil rezidürlerinin alkolik hidroksil grupları, sisteinil rezidürlerinin serbest sülfidril grupları ve lizil rezidürlerinin N-terminal ϵ -amino grupları gibi ligant olarak rol oynayan gruplar içerirler.

Titanyum ile muamele edilmiş polimer ve protein arasındaki böyle bir bağın oluşumu aşağıdaki faktörlere bağlıdır:

- Protein molekülünde ligant olarak rol oynayacak grupların varlığı,
- Bu grupların titanyum atomları ile bir araya gelmesine izin veren sterik etkenler,
- Bu grupların enzimin aktif bölgesinde yer almaması,
- Polimer taşıyıcıda bağlı olan enzim moleküllerinin yakınlığıdır.

Metal bağlama yöntemiyle göreceli olarak yüksek spesifik aktiviteli preparatlar(% 30-80) elde edilir. Bu yöntemle elde edilen immobilize enzimlerin operasyonel stabilitesi de değişkendir, yüksek molekül ağırlıklı substratlarla genellikle düşük stabiliteler elde edilir (örneğin nişasta) [1].

II.6.4. Hapsetme Yöntemi

Yarı geçirgen membranlarda yada polimerik matrikslerde enzimin hapsedilmesi prensibine dayanan bir yöntemdir [66] enzim, sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir [157, 158]. Polimerik matriks, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri derecede sıkı olması gerekir.

Bu metot her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok kullanılan bir yöntemdir [66]. Enzimleri hapsetmek için çok çeşitli taşıyıcı malzemeler ve yöntemler kullanılmaktadır. Çeşitli hapsetme yöntemleri aşağıda belirtilmiştir:

- Jel polimerizasyonu
- Çözelti
- Süspansiyon
- Protein kopolimerizasyonu
- Çapraz bağlı polimerlerle jel oluşturma
- Poroz bir destekle jel oluşturma
- Fiziksel lokalizasyon
- Mikrokapsüller
- İçi boş (hollow) fiberler
- Ultrafiltrasyon [106].

II.6.4.1. Mikrokapsül İle Hapsetme Metodu

Bu methoda 10-1000 µm çaplı küçük yarı geçirgen membranlar içine enzim molekülleri hapsedilmektedir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzim moleküllerinin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe mikrokapsül içine giriş ve çıkışına izin verir [108]. Enzimlerin mikrokapsüllenmesi için basit iki metod vardır. Bunlar faz ayrımı (coacervation) ve ara yüzey polimerizasyonudur. Faz ayrımı metodunda, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. İkinci methodda (ara yüzey polimerizasyon metodu) ise enzimin sulu bir çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikrodamlarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllenmiş olur. Mikrokapsülleme ile hapsetme metodunda herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine çok yakındır. Bu metod ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır [158].

Bu yöntemin en büyük avantajı oldukça küçük bir hacimde enzim ile substratın etkileşme alanının göreceli olarak yüksek olmasıdır. Hapsetme yönteminin diğer avantajları; yöntemin çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem olması, çok

az miktar enzimle gerçekleştirilebilmesi, nötral ve suda çözünmeyen destek materyallerinin kullanılmasıdır.

Bu yöntemin dezavantajları da vardır. Bunlar:

- Enzimlerin hapsedildiği kafeslerin çaplarından daha büyük substrat molekülünün enzim aktif merkezine ulaşmasının olanaksız olması,
- Önemli difüzyon kısıtlamalarının olması (Bu kısıtlamalar kapsüllerin tanecik boyutları küçültülerek azaltılabilir),
- Enzimin zamanla çözeltiye sızması,
- Enzimin hapsedildiği mikroçevredeki koşulların kontrol edilememesi nedeniyle enzimin aktiflik ve kararlılığının azılmasıdır.

II.6.4.2. Kafes Tipi Hapsetme Metodu

Bu metod, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu metod da enzim içeren monomer veya polimer çözeltilerine UV veya gama ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer şebekesi oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu şebeke içerisine sürekli olarak girip çıkabilir.

Enzim kimyasal modifikasyona uğramaz ve enzimin intrinsik özelliklerinde herhangi bir değişim gözlenmez. Bu metod, farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevlerinin jelatinimsi doğası, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolanmasını sağlar.

Bu metodun sahip olduğu avantajlar aşağıda verilmiştir:

- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkiler.
- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilebilir.
- Polimerleşme genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleştirilir [67, 112, 159, 160].

Bu yöntemin dezavantajları çapraz bağlı polimer şebekesinden enzimin sızması, yalnızca küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve makromoleküler substratlar için çok düşük aktiflik göstermesidir.

BÖLÜM III

ÇALIŞMALAR

III.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

III.1.1. p-Aminosulfanilik Asit, (Merck).

III.1.2. Sodyum Asetat, (Merck).

III.1.3. Maleik Anhidrit, (Merck).

III.1.4. Trifenil Fosfin, (Fluka).

III.1.5. Sodyum Klorür, (Merck).

III.1.6. DiSodyum Hidrojen Fosfat Monohidrat, (Merck).

III.1.7. Potasyum DiHidrojen Fosfat, (Merck).

III.1.8. Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat, (Merck).

III.1.9. Bovine Serum Albümin (BSA), (BIO-RAD).

III.1.10. Coomassie Brilliant Blue, (BIO-RAD).

III.1.11. α -Amilaz (1,4- α -D-Glukan-glukanohidrolaz), (Merck).

III.1.12. Nişasta, (Merck).

III.1.13. Asetik Anhidrit, (Merck).

III.1.14. Sodyum Hidroksit, (Merck).

III.1.15. 1-Vinil-2-pirolidon, (Merck).

III.1.16. Poli (Etilen Glikol) Diakrilat (PEG-DA), $M_A = 258$ g/mol, (Aldrich).

III.1.17. Poli (Etilen Glikol) Monoakrilat (PEG-MA), $M_A = 375$ g/mol, (Aldrich).

III.1.18. Irgacure-184 (1-Hidroksi-sikloheksil-fenil keton), (Merck).

III.1.19. 3,5-Dinitrosalisilik Asit, (Merck).

III.1.20. Brom, (Merck).

III.1.21. Sodyum Sülfat, (Merck).

III.1.22. Diğer Kimyasallar

Deneyisel çalışmalar sırasında çeşitli amaçlarla; Metanol (Merck), Etanol (Merck), Aseton (Merck), N_2 gazı, Asetonitril (Merck), Diklorometan (Merck), gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır.

III.2. KULLANILAN CİHAZLAR

III.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hazırlanan enzim immobilize edilen filmlerin morfolojileri ve partikül boyutarı taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. Bunun için; JEOL, Model JSM-5919 LV, SEM cihazı kullanılmıştır.

III.2.2. Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi

Sentezlenen monomer ve monomere bağlanan enzimin yapısı FTIR ile incelenmiştir. Shimadzu 8300 marka FTIR spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Sıvı numuneler KBr tablet üzerinde, toz numuneler ise KBr pelletleri içinde analiz edilmiştir.

III.2.3. UV Spektrometre Cihazı

Shimadzu 1601 marka UV-Visible Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

III.2.4. UV Lambası

OSRAM Ultra-Vitalux, 300W, 230V, AC E27 FS1 UV lambası kullanılmıştır.

III.2.5. ^{13}C Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi

200 MHz Varian model T-60 NMR spektrometresi kullanılmıştır.

III.2.6. Termogravimetrik Analiz (TGA) Cihazı

Hazırlanan filmlerin termal dayanımları TGA ile ölçülmüştür. Netzsch STA 409 CD markalı TGA kullanılmıştır.

III.2.7. Su Banyosu

Clifton Digital Shaker Bath cihazıyla 30-100 °C aralığında çalışılmıştır.

III.2.8. Hassas Terazı

± 0,0001 g hassasiyetli Digital Sartorius Analitik Terazı kullanılmıştır.

III.2.9. Vakum Etüvü

Nüve EV018 marka etüv kullanılmıştır.

III.2.10. Distile Su Cihazı

Gerekli olan destile su Fistreem Cyckon marka cihazdan elde edilerek kullanıldı.

III.2.11. pH Metre

LCS LD 108 Dijital pH Metre kullanıldı.

III.2.12. Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı

Chiltren Isıtıcılı Magnetik Karıştırıcı, HS31 ile Janker & Kunkel, Laborteknik IKA-Magnetic Stirrer ile çalışıldı.

III.2.13. Otomatik Pipetler

Gilson marka otomatik pipetler kullanıldı.

III.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan deneysel çalışmalar şu şekilde sıralanabilir;

- ◆ N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomeri sentezi ve karakterizasyonu,
- ◆ N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimide enziminin kovalent bağlanma ile immobilizasyonu ve FTIR ile karakterizasyonu,
- ◆ İmmobilize olmuş enzimim miktar tayini,
- ◆ İmmobilizasyon üzerine bağlanma zamanının etkisi,

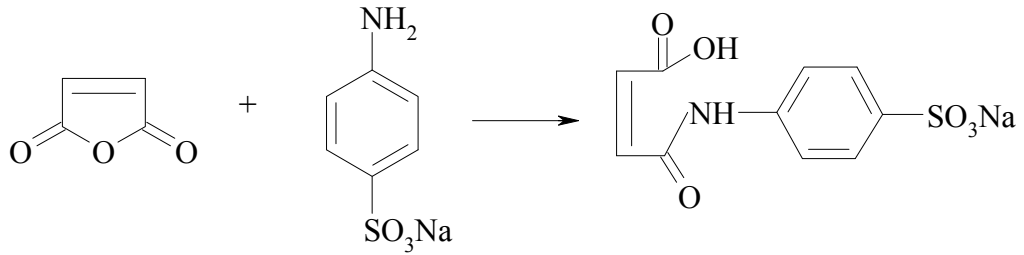
- ◆ Enzim İmmobilize edilmiş N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid polimerik filmlerinin hazırlanması,
- ◆ pH 6,9 Sodyum fosfat tamponun hazırlanması,
- ◆ Nişasta çözeltisinin hazırlanması,
- ◆ 3,5-Dinitrosalisilik asit renk reaktifinin hazırlanması,
- ◆ Polimerik film içinde immobilize edilen enzimin değişik pH ve sıcaklıklardaki aktivasyon değerleri, raf ömrü, tekrar kullanılabilirliği gibi özellikleri, immobilize olmayan α -amilaz enzimiyle karşılaştırılması,
- ◆ İmmobilize enzimin kinetik parametrelerinin belirlenmesidir.

III.3.1. N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid Monomeri Sentezi

N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomeri iki aşamalı prosesle sentezlendi.

Birinci aşamada; 10,32 g maleik anhidrit, metanolle hazırlanan 200 mL 0,1 N sodyum hidroksit ve 18,738 g sülfanilik asit üç boyunlu balona ilave edilerek azot atmosferi altında, 60°C’de, 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonunda sarı renkli N-(4-sodyumsülfofenil)-halfimid (Amik asit) elde edildi.

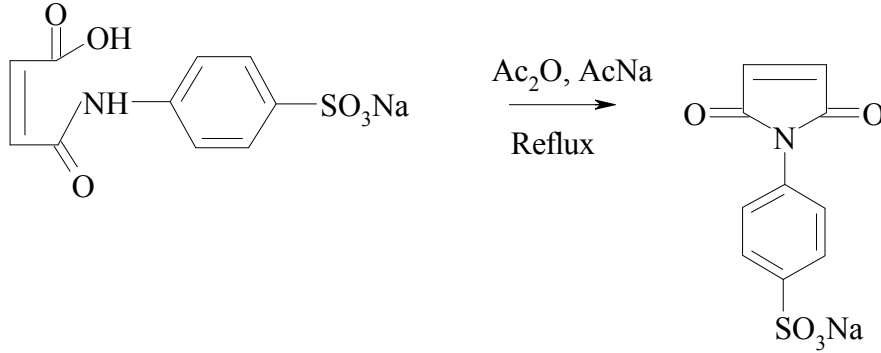
Oluşan N-(4-sodyumsülfofenil)-halfimid süzülerek karışımdan ayrıldı ve 40°C’de vakum etüvünde kurutuldu. N-(4-sodyumsülfofenil)-halfimidin yapısı Şekil III.1’deki gibidir.



Şekil III.1: N-(4-sodyumsülfofenil)-halfimidin yapısı

İkinci aşamada; 5 g (23,47 mmol) N-(4-sodyumsülfofenil)-halfimid, 0,43 g sodyum asetat ve 85 mL asetik anhidrit 250 mL’lik üç boyunlu balona ilave edilerek azot atmosferi altında, 85°C’de kahverenkli ürün oluşana kadar karıştırıldı. Karışım soğutulduktan sonra 52 mL etanol ile 35 mL asetondan oluşan karışım reaksiyon çözeltisine ilave edildi. N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid elde edildi. Ürün

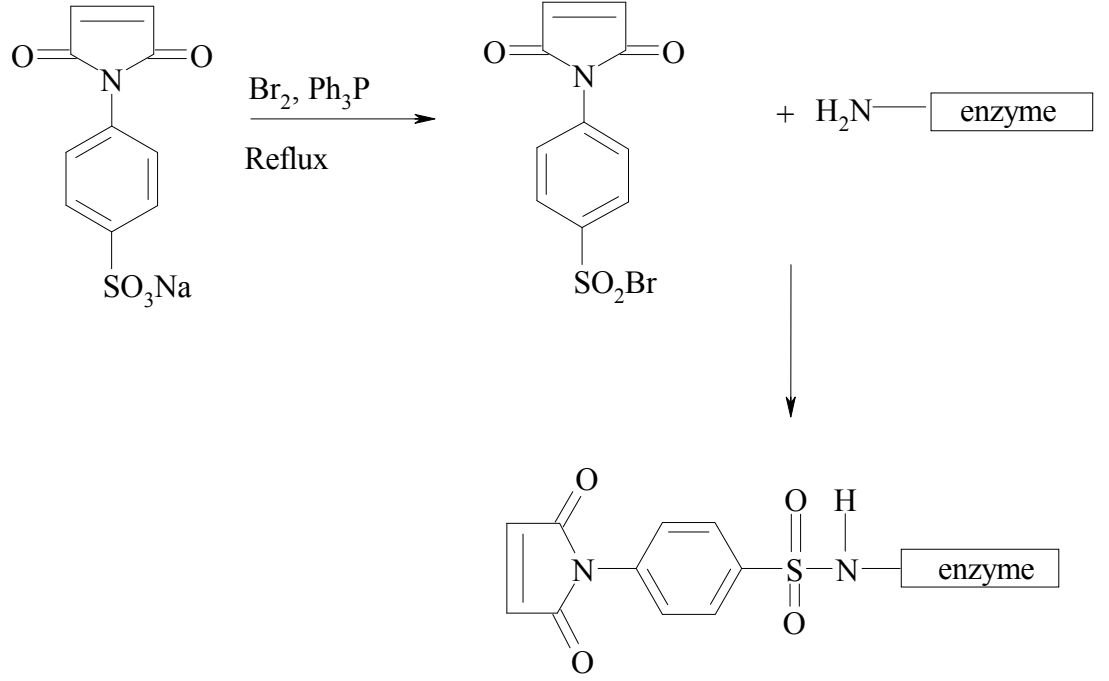
çöktükten sonra süzöldü ve 40°C’de vakum etöväünde kurutuldu. N-(4-sodyumsölföfenil)-maleimid’in yapısı Şekil III.2’deki gibidir [161].



Şekil III.2: N-(4-sodyumsölföfenil)-maleimid’in yapısı

III.3.2. Enzim İmmobilizasyonu

İki boyunlu balon buz banyosuna yerleştirildi. 10 mL asetonitril, 2,62 g (10 mmol) trifenil fosfin ilave edilerek karıştırılmaya başlatıldıktan sonra 0°C’de 0,52 mL brom dikkatlice, damlalar halinde ilave edildi. Bromun aşırı rengi kaybolana kadar karıştırılmaya devam ettirildi. Bromun aşırı rengi kaybolduktan sonra eser miktarda trifenil fosfin ilave edildi. Ardından 2,75 g (10mmol) N-(4-sodyumsölföfenil)-maleimid porsiyonlar halinde ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. 1saat sonra 0°C’de 190 mg α-amilaz enzimi ilave edilerek karıştırıldı. 30 dakika sonra 40 mL distile su ilave edildi, ürün 3×40 mL diklorometan ile ekstrakte edildi. Sulu faz bağlanmayan enzimi içerir ve bağlanan enzim miktarının tayininde kullanılmak üzere sulu faz buz dolabında muhafaza edildi. Ekstrakta kurutucu olarak sodyum sülfat ilave edildi. Ekstrakt süzme işlemiyle ayrıldı. Ekstrakt içindeki enzim bağı N-(4-sodyumsölföfenil)-maleimid, oda sıcaklığında, vakum altında, evaporatörde elde edildi [162]. Elde edilen enzim bağı monomerin yapısı Şekil III.3’deki gibidir.



Şekil III.3: Enzim bağlı N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid'in yapısı

III.3.3. Protein Tayini

İmmobilizasyon işleminden sonra bağlanmamış enzim miktarı tayininde Bradford yönteminden yararlanıldı [163].

III.3.3.1. Bovine Serum Albumin'in Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Protein tayini için önce Bovine Serum Albümin'in kalibrasyon eğrisinin oluşturulması gerekir. Bu nedenle Tablo III.1'deki konsantrasyon değerlerine sahip BSA çözeltileri hazırlandı.

Tablo III.1: Çözeltilerin Konsantrasyon Değerleri

Numune No:	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$):	0	10	20	30	40	60	100	120

0,002g/ml stok BSA çözeltisini hazırlandı. Mikropipet yardımıyla;

- 1- 0 $\mu\text{g/mL}$ BSA hazırlandı.
- 2- 0,002 g/ml stoktan, 5 μl (10 μg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 10 $\mu\text{g/mL}$ BSA hazırlandı.

- 3- 0,002 g/ml stoktan 10 µl (20 µg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 20 µg/ml BSA hazırlandı.
- 4- 0,002 g/ml stoktan 15 µl (30 µg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 30 µg /ml BSA hazırlandı.
- 5- 0,002 g/ml stoktan_20 µl (40 µg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 40 µg/ml BSA hazırlandı.
- 6- 0,002 g/ml stoktan 30 µl (60 µg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 60 µg/ml BSA hazırlandı.
- 7- 0,002 g/ml stoktan 50 µl (100 µg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 100µg/ml BSA hazırlandı.
- 8- 0,002/ml stoktan 60 µl (120 µg protein) alındı; 1ml'ye seyreltilerek 120 µg/ml BSA hazırlandı.

Daha sonra Bradford ayıracı ile 1'e 4 oranında distile su ile Coomassie Brilliant Blue Renk Reaktif çözeltilisi hazırlandı. UV spektrofotometre cihazı distile suya karşı sıfırlama yapıldıktan sonra 400-650 nm arsında dalga boyu taraması yapıldı. Yapılan tarama sonucunda maksimum absorbsiyon değerini 585 nm'de verdi. Hazırlanan çözeltililerle aşağıdaki örnekler hazırlandı:

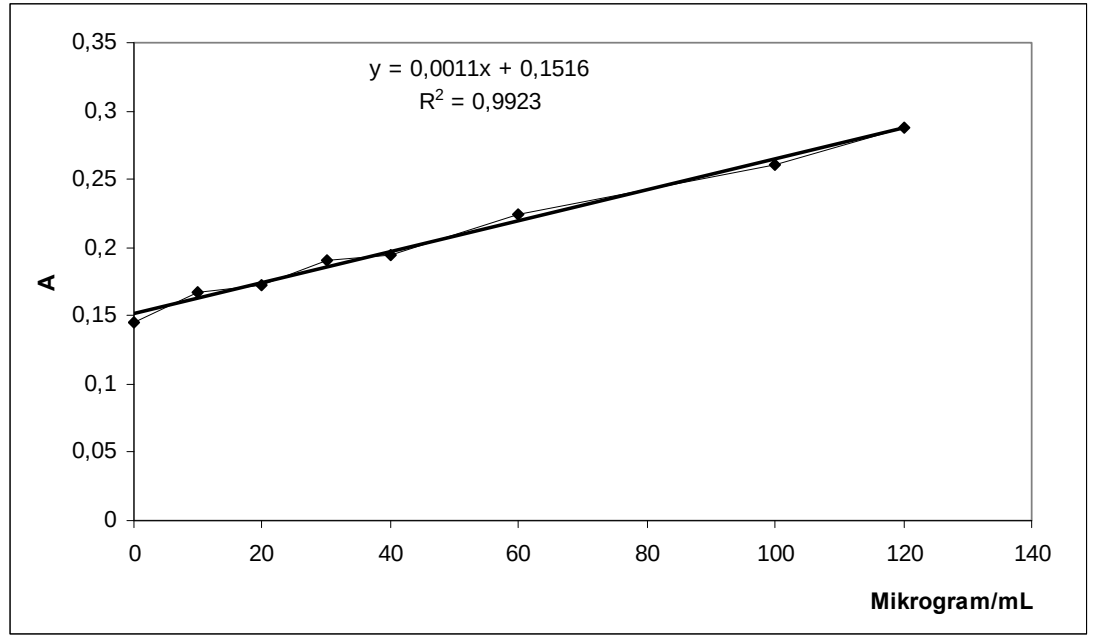
- 1- 0 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 2- 10 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 3- 20 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 4- 30 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 5- 40 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 6- 60 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 7- 100 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 8- 120 µg/ml BSA'dan 80 µl + 4ml Bradford,
- 9- Sulu faz'dan 80 µl + 4ml Bradford çözeltileri hazırlandı.

Hazırlanan örneklerin 585 nm'deki absorbsiyon değerleri Tablo III.2'de verilmiştir.

Tablo III.2: Örneklerin 585 nm'deki Absorbsiyon Değerleri

Örnek No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Absorbsiyon	0,145	0,167	0,173	0,190	0,195	0,224	0,260	0,288	0,155

Bu sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil III.4'deki gibidir.



Şekil III.4: BSA'nın kalibrasyon eğrisi

III.3.3.2. Bağlanan Enzim Miktarının Belirlenmesi

Elde ettiğimiz kalibrasyon eğrisinden yararlanarak sulu fazın 80 µl'sindeki enzim miktarını hesaplayabiliriz:

$$X = (0,155 - 0,1516) / 0,0011 = 3,09 \mu\text{g} \text{ enzim vardır.}$$

0,08ml'de	3,09 µg enzim varsa
40 ml suda	X

$$X = 1545.45 \mu\text{g} \approx 1,55 \text{ mg enzim monomere bağlanmamıştır.}$$

Bromlama işleminde 190 mg enzim kullanmıştık. Buna göre monomere bağlanan enzim miktarı = 190 - 1.55 = 187,5 mg enzim/2,75g monomere bağlanmıştır.

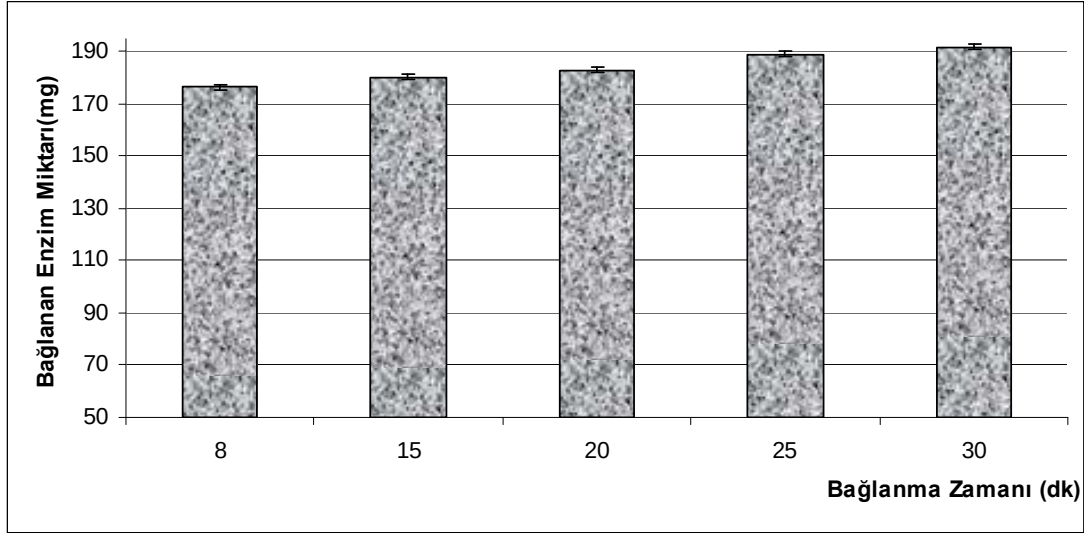
2,75g monomere	187,5 mg enzim bağlanmışsa
1g monomere	X mg enzim bağlanmıştır

$$X = 68,18 \text{ mg enzim/1 g monomere bağlanmıştır.}$$

III.3.4. İmmobilizasyon Üzerine Bağlanma Zamanının Etkisi

İmmobilizasyon üzerine bağlanma zamanının etkisini belirlemek için; immobilizasyon işleminde enzimi ilave ettikten sonraki karışma zamanları farklı tutularak deneyler yapıldı. Her deney sonucunda bağlanan enzim miktarları

hesaplandı. Elde edilen değerlere göre çizilen grafikte immobilizasyon üzerine bağlanma zamanının etkisi Şekil III.5’de gösterilmektedir.



Şekil III.5: İmmobilizasyon üzerine bağlanma zamanının etkisi

III.3.5. Enzim İmmobilize Edilmiş Filmlerin Hazırlanması

Formülasyon kütlece, %20,1 immobilize enzim içeren N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid, %30,8 PEG-DA, %12,2 PEG-MA, %33,9 1-Vinil-2-pirolidon, %3 serbest radikal başlatıcı (Irgacure-184) karışımıyla hazırlandı. Bu formülasyondan yararlanarak 5 g’lık film formülasyonu aşağıdaki gibi hazırlandı.

Bir behere; 1,005 g immobilize enzim içeren N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid, 1,54 g PEG-DA, 0,61 g PEG-MA, 1,695 g 1-Vinil-2-pirolidon, 0,15 g serbest radikal başlatıcı (Irgacure-184) ilave edildi. İmmobilize edilmiş N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid çözünene kadar bagetle karıştırıldı. İmmobilize edilmiş N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid çözündükten sonra Teflon™ kalıba döküldükten sonra 10 dakika UV lamba (OSRAM 300) altında sertleştirildi. Filmler kalıptan dikkatlice çıkarıldı. Elde edilen filmler SEM ve TGA ile karakterize edildi.

III.3.6. pH 6,9 Sodyum Fosfat Tamponun Hazırlanması

0,02 M Sodyum fosfat tamponu 0,006 M NaCl ile ayarlanır.

III.3.7. Nişasta Çözeltisinin Hazırlanması

1 g çözünür nişasta, 100 ml 0,006 M NaCl çözeltisiyle ayarlanmış 0.02 M sodyum fosfat tamponda çözünür. Çözünmesi için 80-90°C’ye kadar ısıtıldı. Soğutulup, son hacmi 100 ml’ye su ile seyreltildi.

III.3.8. 3,5-Dinitrosalisilik Asit Renk Reaktifinin Hazırlanması

20 ml 2N NaOH çözeltisi hazırlandı. Bir beherde 30 g Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat 50 mL suda çözüldü. Sonra 1 g 3,5-dinitrosalisilik asit ardından hazırlanan 2N 20 mL NaOH çözeltisi ilave edildi. Maddeler çözüldükten sonra çözelti 100 mL'ye seyreltili [164].

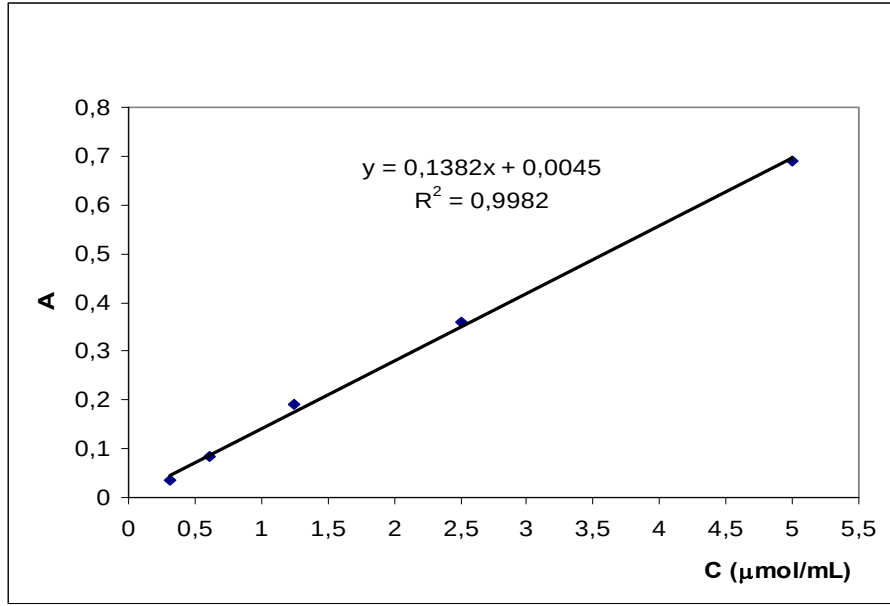
III.3.9. Serbest ve İmmobilize Olmuş α -Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümleri

α -Amilaz enziminin aktivitesi Bernfield Yöntemi kullanılarak ölçüldü [165]. Özetle; 0,006 M NaCl ile hazırlanmış 100 mL 0,02 M sodyum fosfat tamponunda 1 g nişasta çözdürüldü. Sonra α -amilaz içeren 3 adet polimerik filmler, tartıldı. Her biri birer test tüpün içerisine koyuldu. Akabinde 0,5 mL nişasta çözeltisi eklenerek 100 rpm çalkalama hızında, 30°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Reaksiyon 5. dakika sonunda 1 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika inkübe edildi. Sonra 10 mL distile su ilave edilerek seyreltili, soğuyana kadar bekletildi. Hidroliz olan şeker miktarı 540 nm'de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülerek belirlendi [166].

Farklı konsantrasyonlarda maltoz çözeltileri hazırlanarak standart eğri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyon ve 540 nm'deki absorpsiyon değerleri Tablo III.3'de verilmiştir. Bu değerlerle çizilen kalibrasyon grafiği Şekil III.6'da gösterilmektedir.

Tablo III.3: Hazırlanan standartların konsantrasyon ve absorpsiyon (A) değerlerini göstermektedir

C ($\mu\text{mol/mL}$)	0,306	0,612	1,250	2,500	5
A	0,036	0,083	0,192	0,359	0,689



Şekil III.6: Maltozun kalibrasyon grafiği

Kullanılan her filmin kütlesinden, içerdiği enzim miktarı bulunur. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak her bir filmin içerdiği enzim konsantrasyonu eğim denkleminde hesaplandı.

Enzimin aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

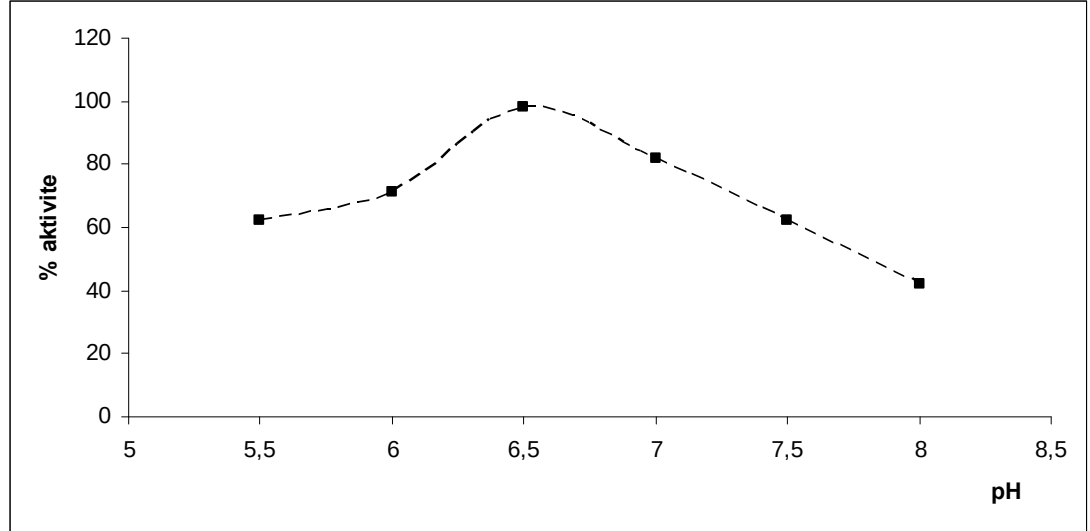
$$\text{Aktivite (IU mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{serbest kalan maltoz (}\mu\text{ mol)}}{\alpha\text{-amilaz miktarı (mg)} \times 5 \text{ dakika}}$$

III.3.9.1. Serbest α -Amilazın Aktifliğine pH'ın Etkisi

α -Amilaz'ın aktifliğine pH'ın etkisi daha önce aşağıdaki gibi çalışıldığından bu deneme tekrarlanmadı. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen pH- aktivite grafiği Şekil III.7'de verilmiştir.

1 g nişasta, 0,006 M NaCl ile ayarlanmış pH 5,5-8 aralığındaki 100 mL 0,02 M sodyum fosfat tamponlarında çözüldü. Daha sonra % 0,5'lik α -amilaz çözeltisi hazırlanarak 6 deney tüpüne konarak numaralandırıldı. Her bir tüpe, hazırlanan α -amilaz çözeltisinden 0,5 mL konuldu. Hazırlanan nişasta çözeltilerinden 0,5'er mL alınarak sırasıyla her tüpe ilave edildi. Akabinde 100 rpm çalkalama hızında, 30°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Reaksiyon 5. dakika sonunda 1 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu. Ardından kaynar su

banyosuna konularak 5 dakika inkübe edildi. Sonra 10 mL distile su ilave edilerek seyreltildi, soğuyana kadar bekletildi. Oluşan şeker miktarı 540 nm’de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülerek belirlendi [166]. pH 5,5-8 aralığındaki pH-(%) aktivite grafiği Şekil III.7’de gösterilmektedir.

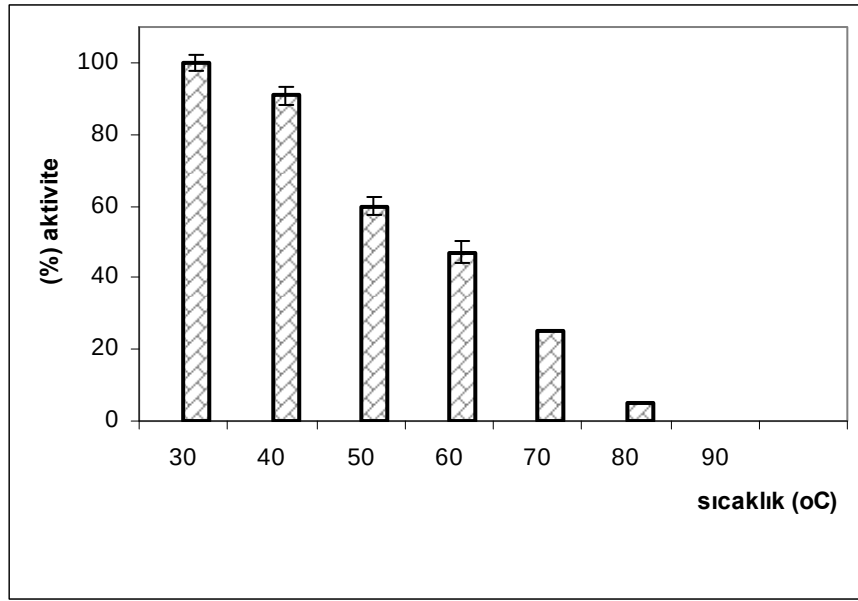


Şekil III.7: Serbest α -Amilaz’ın pH-aktivite grafiği

III.3.9.2. Serbest α -Amilaz’ın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

α -Amilaz’ın aktifliğine sıcaklığın etkisi daha önce aşağıdaki gibi çalışıldığından bu deneme tekrarlanmadı. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen sıcaklık- aktivite grafiği Şekil III.8’de verilmiştir.

% 0,5’lik α -amilaz çözeltisi hazırlanarak. 7 deney tüpü numaralandırıldı. Her bir tüpe, hazırlanan α -amilaz çözeltisinden 0,5 mL konuldu. 100 mL pH 6,9 sodyum fosfat tamponunda 1 g nişasta çözüldü. Hazırlanan nişasta çözeltisinden 0,5 mL alınarak, sırasıyla her tüpe ilave edildikten sonra 100 rpm çalkalama hızında, sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Reaksiyon, 5. dakika sonunda 1 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika inkübe edildi. Sonra 10 mL distile su ilave edilerek seyreltildi, soğuyana kadar bekletildi. Oluşan şeker miktarı 540 nm’de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülerek belirlendi [166]. 30–90 °C aralığındaki sıcaklık (°C) - (%) aktivite grafiği Şekil III.8’deki gibidir.

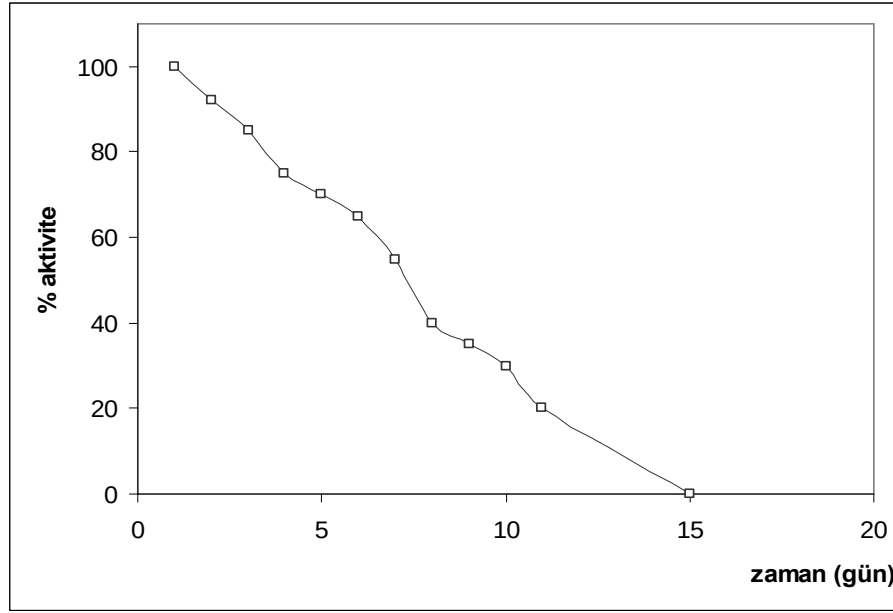


Şekil III.8: α -Amilaz'ın sıcaklık (°C)-(%) aktivite grafiğidir

III.3.9.3. Serbest α -Amilaz'ın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

α -Amilaz'ın aktifliğine depolama süresinin etkisi daha önce aşağıdaki gibi çalışıldığından bu deneme tekrarlanmadı. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen depolama süresi- aktivite grafiği Şekil III.9'da verilmiştir.

1 g nişasta, 0,006 M NaCl ile ayarlanmış pH 6,9 100 mL 0,02 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü. Daha sonra % 0,5'lik α -amilaz çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti tekrar yapılacak denemelerde kullanılmak üzere buzdolabında saklandı. Deney tüpüne, hazırlanan α -amilaz çözeltisinden 0,5 mL konuldu. Hazırlanan nişasta çözeltisinden 0,5 mL alınarak tüpe ilave edildi. Akabinde 100 rpm çalkalama hızında, 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Reaksiyon 5. dakika sonunda 1 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu. Ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika inkübe edildi. Sonra 10 mL distile su ilave edilerek seyreltildi, soğuyana kadar bekletildi. Oluşan şeker miktarı 540 nm'de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülerek belirlendi [166]. Aynı işlemler her gün aynı enzim çözeltisiyle tekrarlanarak serbest enzimin aktifliğine depolama süresinin etkisi belirlenmiştir. Depolama süresi (gün)-(%) aktivite grafiği Şekil III.9'da gösterilmektedir.



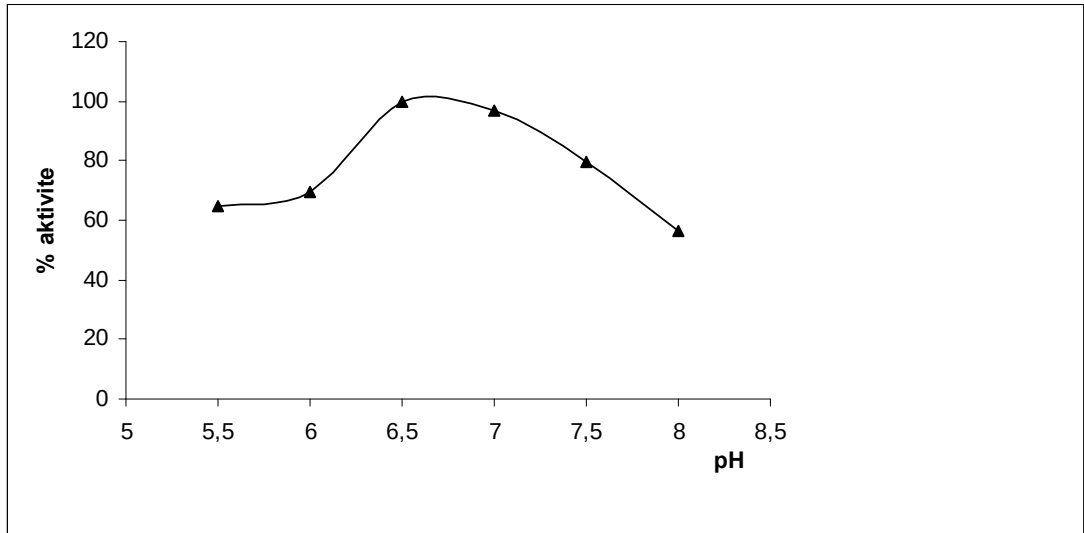
Şekil III.9: α -Amilaz'ın Depolama süresi (gün)-(%) aktivite grafiğidir

III.3.9.4. İmmobilize Edilen α -Amilazın Aktivliğine pH'nın Etkisi

pH 5,5-8 aralığında 0,006 M NaCl ile ayarlanmış 0,02 M sodyum fosfat tamponlarıyla Bölüm III.3.7.'deki gibi nişasta çözeltileri hazırlandı. Önceden hazırlanan filmlerden 6 adet alınıp herbirinin ağırlığı ölçüldü. Filmler kütlece %20,1 oranında enzim bağlı monomer içermektedir. Her filmin içerisinde bulunan enzim bağlı monomer miktarı ve enzim konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Tartılan filmlerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.9.'da bahsedilen Bernfield yöntemiyle 30 °C'de, 100 rpm çalkalama hızında yapıldı [165, 166]. Kullanılan filmlerin içerdiği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, pH değeri, hesaplanan aktivite ve (%) aktivite değerleri Tablo III.4'deki gibidir. Şekil III.10'da pH 5,5-8 aralığındaki (%) aktivite grafiği gösterilmektedir.

Tablo III.4: Filmlerin içerdği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, pH değeri, aktivite ve % aktivite değerlerini göstermektedir

Enzim miktarı (mg)	A	C (μmol/mL)	pH	Aktivite (μmol/mg×mL×dakika)	% Aktivite
1,153	0,047	0,308	5,5	0,053	64,92
1,203	0,052	0,344	6,0	0,057	69,57
0,889	0,055	0,365	6,5	0,082	99,99
1,099	0,065	0,438	7,0	0,079	96,91
1,273	0,062	0,416	7,5	0,065	79,59
1,386	0,049	0,322	8,0	0,046	56,59



Şekil III.10: İmmobilize enzimin pH- (%) aktivite grafiği

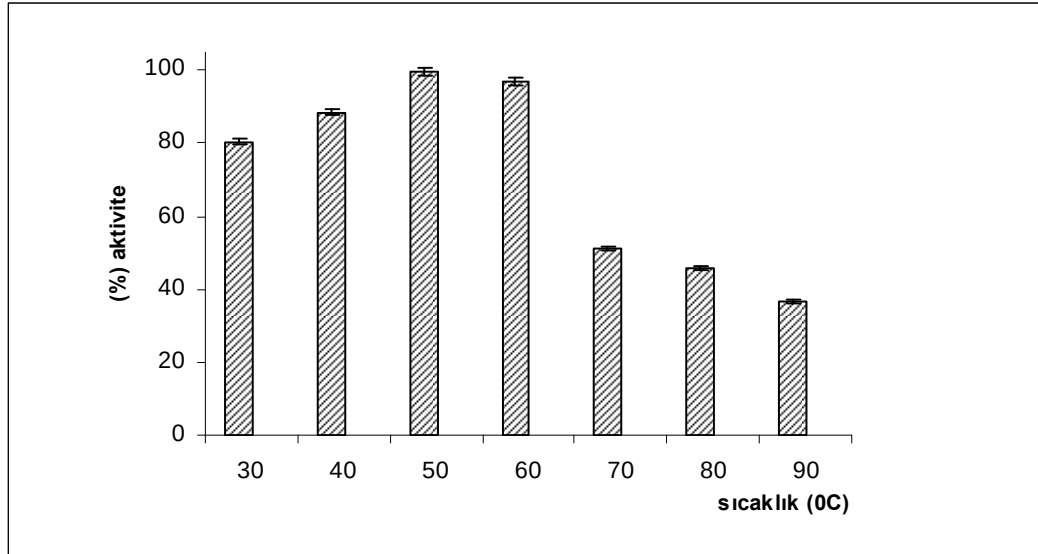
III.3.9.5. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Önceden hazırlanan filmlerden 7 adet alınıp her birinin ağırlığı ölçüldü. Filmler kütlege % 20,1 oranında enzim içermektedir. Her filmin içerisinde bulunan enzim bağlı monomer miktarı ve enzim konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Tartılan filmlerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.9.'da bahsedilen Bernfield yöntemiyle farklı sıcaklıkta, 100 rpm çalkalama hızında çalışılarak yapıldı [165, 166]. Kullanılan filmlerin içerdği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, sıcaklık değeri, hesaplanan

aktivite ve (%) aktivite değerleri Tablo III.5'deki gibidir. Şekil III.11'de 30-90 °C aralığındaki (%) aktivite grafiği gösterilmektedir.

Tablo III.5: Filmlerin içerdiği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, sıcaklık değeri, aktivite ve % aktivite değerlerini göstermektedir

Enzim miktarı (mg)	A	C (�mol/mL)	Sıcaklık (�C)	Aktivite (�mol/mg�mL�dakika)	% Aktivite
1,314	0,087	0,60	30	0,091	80
1,208	0,088	0,60	40	0,100	88
1,161	0,095	0,65	50	0,113	100
1,171	0,093	0,64	60	0,109	97
1,134	0,050	0,33	70	0,058	51
1,244	0,049	0,32	80	0,051	46
1,171	0,038	0,24	90	0,041	37



Şekil III.11: İmmobilize enzimin sıcaklık ( C)-(%) aktivite grafiği

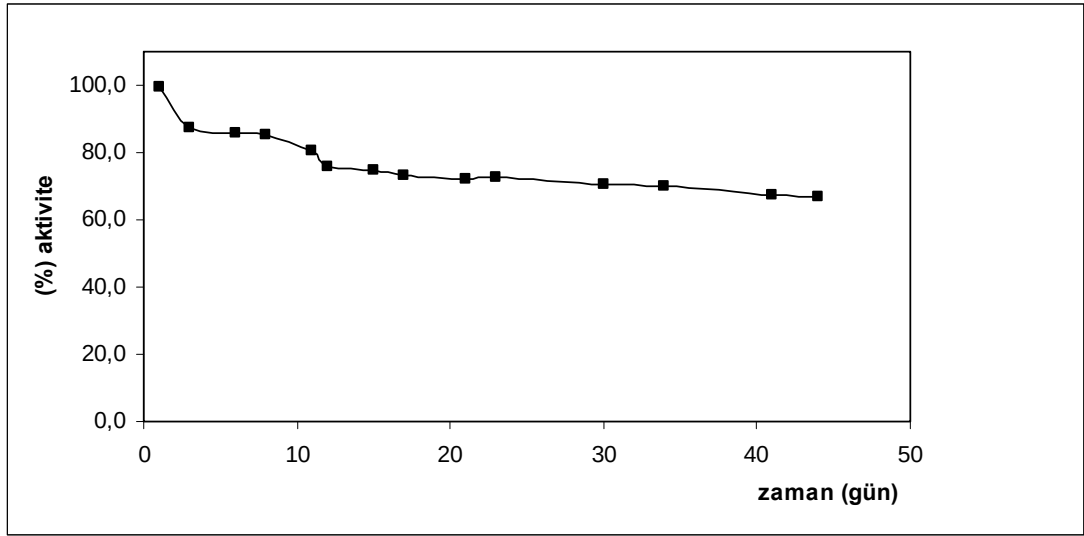
III.3.9.6. İmmobilize Edilen  -Amilazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Hazırlanan filmlerin hazırlandığı tarihten itibaren belirli zaman aralıklarında aktivasyon ölçümleri yapıldı. Herbirinin ağırlığı ölçüldü. Filmler k t lece %20,1 oranında enzim bağlı monomer içermektedir. Her filmin içerisinde bulunan enzim bağlı monomer miktarı ve enzim konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Tartılan filmlerin aktivasyon  l  m  Bölüm III.3.9.'da

bahsedilen Bernfield yöntemiyle 30 °C’de, 100 rpm çalkalama hızında çalışılarak yapıldı [165, 166]. Kullanılan filmlerin içerdiği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, sıcaklık değeri, hesaplanan aktivite ve (%) aktivite değerleri Tablo III.6’deki gibidir. Şekil III.12’de 1.–44. gün aralığındaki (%) aktivite grafiği gösterilmektedir.

Tablo III.6: Filmlerin içerdiği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, zaman, aktivite ve % aktivite değerlerini göstermektedir

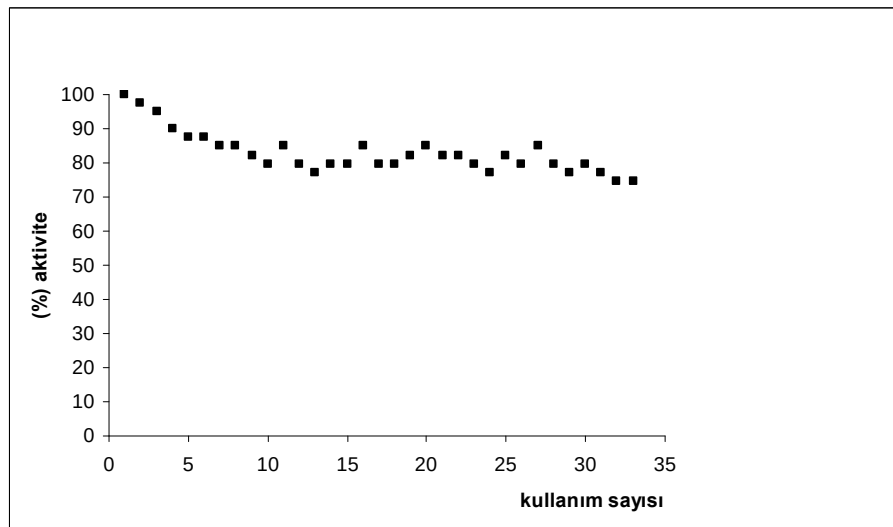
Enzim miktarı (mg)	A	C (μmol/mL)	zaman (gün)	Aktivite (μmol/mg×mL×dakika)	% aktivite
1,014	0,068	0,4595	1	0,091	99,6
1,174	0,069	0,4667	3	0,080	87,4
1,101	0,064	0,4305	6	0,078	85,9
0,999	0,058	0,3871	8	0,077	85,1
0,998	0,055	0,3654	11	0,073	80,4
1,000	0,052	0,3437	12	0,069	75,5
0,989	0,051	0,3365	15	0,068	74,7
1,100	0,055	0,3654	17	0,066	73,0
0,979	0,049	0,3220	21	0,066	72,2
1,016	0,051	0,3365	23	0,066	72,7
1,298	0,062	0,4161	30	0,064	70,4
0,988	0,048	0,3148	34	0,064	70,0
1,001	0,047	0,3075	41	0,061	67,5
0,987	0,046	0,3003	44	0,061	66,8



Şekil III.12: İmmobilize enzimin zaman (gün)-(%) aktivite grafiği

III.3.9.7. İmmobilize Edilen α -Amilazın Tekrar Kullanılabilirliği

Bu denemede aynı filmin tekrar tekrar kullanılarak aktivasyon değerleri kaydedildi. Filmin ağırlığı ölçüldü. Filmler kütlece % 20,1 oranında enzim bağlı monomer içermektedir. Her filmin içerisinde bulunan enzim bağlı monomer miktarı ve enzim konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Tartılan filmlerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.9.'da bahsedilen Bernfield yöntemiyle 30 °C'de, 100 rpm çalkalama hızında çalışılarak yapıldı [165, 166]. Kullanılan filmin içerdiği enzim bağlı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, kullanım sayısı, hesaplanan aktivite ve (%) aktivite değerleri Tablo III.7'deki gibidir. Şekil III.13'de 1. ve 33. kullanım aralığındaki (%) aktivite grafiği gösterilmektedir.



Şekil III.13: İmmobilize enzimin kullanım sayısı-(%) aktivite grafiği

Tablo III.7: Filmlerin içerdği enzim bağı monomer miktarı, absorpsiyon değerleri, enzim konsantrasyonu, kullanım sayısı, aktivite ve % aktivite değerlerini göstermektedir

Enzim miktarı (mg)	A	C (μmol/mL)	Kullanım sayısı	Aktivite (μmol/mg×mL×dakika)	% aktivite
1,177	0,044	0,285	1	0,049	99,99
	0,043	0,278	2	0,047	97,46
	0,042	0,271	3	0,046	94,93
	0,040	0,256	4	0,043	89,87
	0,039	0,249	5	0,042	87,34
	0,039	0,249	6	0,042	87,34
	0,038	0,242	7	0,041	84,81
	0,038	0,242	8	0,041	84,81
	0,037	0,235	9	0,039	82,27
	0,036	0,228	10	0,039	79,74
	0,038	0,242	11	0,041	84,81
	0,036	0,228	12	0,039	79,74
	0,035	0,220	13	0,038	77,21
	0,036	0,228	14	0,039	79,74
	0,036	0,228	15	0,039	79,74
	0,038	0,242	16	0,041	84,81
	0,036	0,228	17	0,039	79,74
	0,036	0,228	18	0,039	79,74
	0,037	0,235	19	0,039	82,27
	0,038	0,2424	20	0,041	84,81
	0,037	0,235	21	0,039	82,27
	0,037	0,235	22	0,039	82,27
	0,036	0,228	23	0,039	79,74
	0,035	0,220	24	0,038	77,21
	0,037	0,235	25	0,039	82,27
	0,036	0,228	26	0,039	79,74
	0,038	0,242	27	0,041	84,81
	0,036	0,228	28	0,039	79,74
	0,035	0,220	29	0,038	77,21
	0,036	0,227	30	0,039	79,74
	0,035	0,220	31	0,038	77,21
	0,034	0,213	32	0,036	74,68
	0,034	0,213	33	0,036	74,68

III.3.10. İmmobilize Edilen α -Amilazın Kinetiği

III.3.10.1. Ekstinksiyon Sabitinin (ϵ) Bulunması

Kinetik parametrelerin hesaplanabilmesi için substratın ekstinksiyon sabitinin bilinmesi gerekir. Bu nedenle parametrelerin bulunmasındaki ilk adım ekstinksiyon sabitinin (ϵ) bulunmasıdır.

Ekstinksiyon sabitini (ϵ) belirlemek için, Tablo III.8’de belirtilen çeşitli konsantrasyonlarda nişasta çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin absorpsiyonu 540 nm’de, UV-Visible Spektrofotometre suya karşı sıfırlandıktan sonra ölçüldü. Hazırlanan örneklerin içerdiği nişasta miktarı, destile su miktarı, hazırlanan örneğin konsantrasyonu (C) ve her örneğin absorpsiyon değerleri Tablo III.8’de verilmektedir.

Lambert Beer eşitliği aşağıda gösterilmiştir.

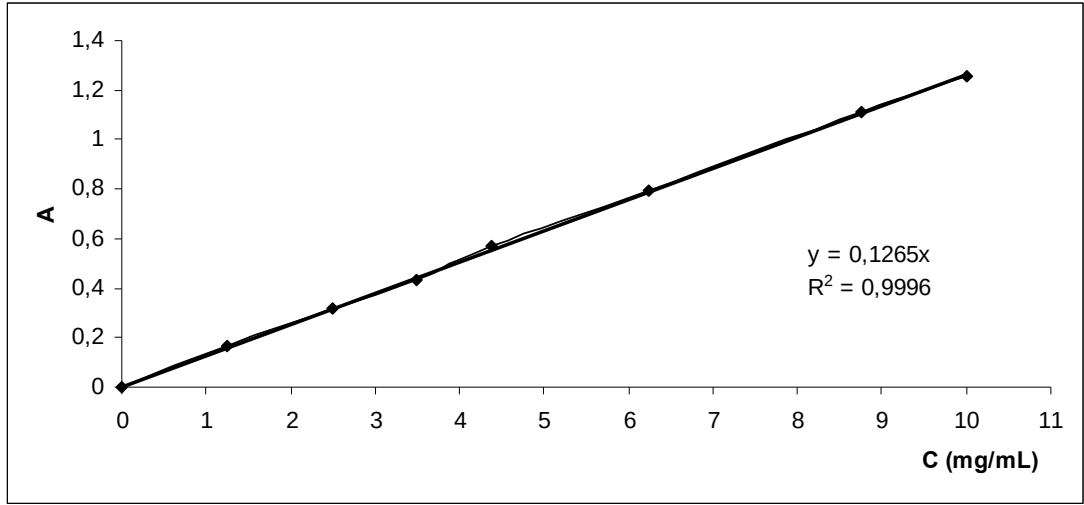
$$A = \epsilon \times C \times l \text{ (III.1)}$$

A: absorpsiyon; ϵ : ekstinksiyon sabiti (mL/mg×cm).; C: nişasta konsantrasyonu (mg/mL).; l: ışığın aldığı yol (1 cm)

Lambert Beer kanununa göre, elde edilen değerlerle çizilmiş bu grafiğin eğimi bize ekstinksiyon sabitini (ϵ) verir. Şekil III.14’de nişasta konsantrasyonuna karşı (mg/mL)–absorpsiyon (A) grafiği, eğim denklemi gösterilmektedir.

Tablo III.8: Hazırlanan örneklerin içerdiği nişasta miktarı, destile su miktarı, hazırlanan örneğin konsantrasyonu (C) ve her örneğin absorpsiyon değerlerini göstermektedir

Örnek No:	%1’lik pH 6,9’da hazırlanmış nişasta çözeltisi	Distile Su	C (mg/mL)	A
1	0	8	0	
2	1	7	1,25	0,168
3	2	6	2,5	0,319
4	2,8	5,2	3,5	0,435
5	3,5	4,5	4,375	0,569
6	5	3	6,25	0,796
7	7	1	8,75	1,108
8	8	0	10	1,254



Şekil III.14: Nişasta konsantrasyonu (mg/mL)–absorbsiyon grafiği

Bu grafiğin eğimini bize ekstinksiyon sabitini (ϵ) verir. Buna göre ekstinksiyon sabiti 0,1265'tir [167].

III.3.10.2. Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi

Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametrelerini belirleyebilmek için önce maksimum absorpsiyonu veren enzim miktarının tayin edilmesi gerekir. Bu nedenle çeşitli miktarlarda enzim içeren filmler kullanıldı. Filmlerin ağırlıkları ölçüldü. Filmler kütlece % 20,1 oranında enzim bağlı monomer içermektedir. 1 g monomere 68,18 mg enzimin bağlandığı Bölüm III.3.3.2.'de hesaplanmıştı [163]. Buna göre filmlerde bulunan α -amilaz miktarı bulundu. Tartılan filmlerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.9'da bahsedilen Bernfield yönteminden yararlanarak 30°C'de, 100 rpm çalkalama hızında, Tablo III.9'da belirtilen hacimlerde, farklı inkübasyon sürelerinin etkisi ele alınarak çalışıldı [165, 166]. Yapılan absorpsiyon ölçümünde şahit çözeltisi, 0,5 mL nişasta çözeltisi ile 7,5 mL pH 6,9 tamponla hazırlandı. Kullanılan filmin içerdiği enzim miktarı, nişasta miktarı, tampon miktarı, dakika dakika kesilen reaksiyonların verdiği absorpsiyon değerleri ve ortalama absorpsiyon değerleri Tablo III.9'daki gibidir.

Tablo III.9: Kullanılan filmin içerdği enzim miktarı, pH 6,9’da hazırlanmış nişasta çözeltisi (mL), tampon miktarı (mL), dakika dakika kesilen reaksiyonların verdiği absorbsiyon değerleri ve ortalama absorbsiyon değerleri

Nişasta çö-zeltisi	pH 6,9 tamponu	Enzim miktarı	AB 1	SOR 2	BANS 3	LAR 4	(daki 5	ka) 6	A _{ort}
0,5	7,5	0,0005	0,021	0,028	0,059	0,069	0,087	0,090	0,0590
0,5	7,5	0,001	0,051	0,057	0,054	0,089	0,089	0,091	0,0718
0,5	7,5	0,0015	0,074	0,097	0,111	0,117	0,130	0,132	0,1095
0,5	7,5	0,002	0,054	0,078	0,101	0,103	0,119	0,122	0,0961
0,5	7,5	0,0025	0,117	0,118	0,119	0,121	0,122	0,125	0,120
0,5	7,5	0,003	0,127	0,131	0,137	0,137	0,138	0,141	0,1352
0,5	7,5	0,0035	0,112	0,153	0,204	0,217	0,284	0,296	0,211
0,5	7,5	0,004	0,125	0,136	0,141	0,155	0,159	0,162	0,1461
0,5	7,5	0,005	0,126	0,139	0,143	0,158	0,204	0,208	0,1630

Yapılan deney sonucunda 0,0035 g enzimin maksimum absorbsiyon değerini verdiği Tablo III.9’da görülmektedir.

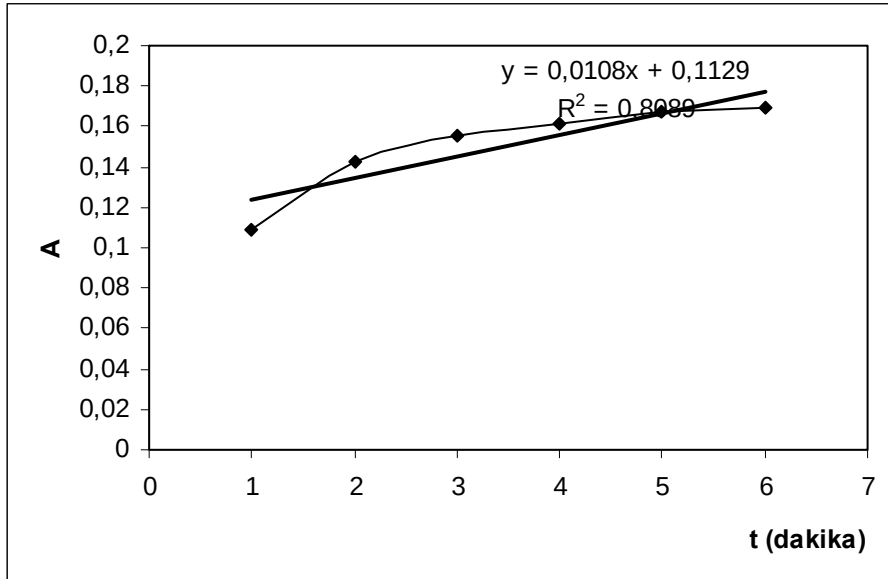
III.3.10.3. Substrat Konsantrasyonun Reaksiyon Hızına Etkisi

En uygun enzim miktarı Bölüm III.3.10.2.’de 0,0035 g olarak tespit edildi. Bu deneme 0,0035 g enzim içeren filmler seçildi. Tartılan filmlerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.9.’da bahsedilen Bernfield yönteminden yararlanarak 30°C’de, 100 rpm çalkalama hızında, Tablo III.10’da belirtilen hacimlerde, farklı inkübasyon sürelerinin etkisi ele alınarak çalışıldı [165,166]. Yapılan absorbsiyon ölçümünde şahit çözeltisi olarak 8 mL pH 6,9 tamponu kullanıldı. Hazırlanan her örnek için zaman (dakika) – absorbsiyon grafikleri Şekil III.15, Şekil III.16, Şekil III.17, Şekil III.18, Şekil III.19’da gösterilmiştir.

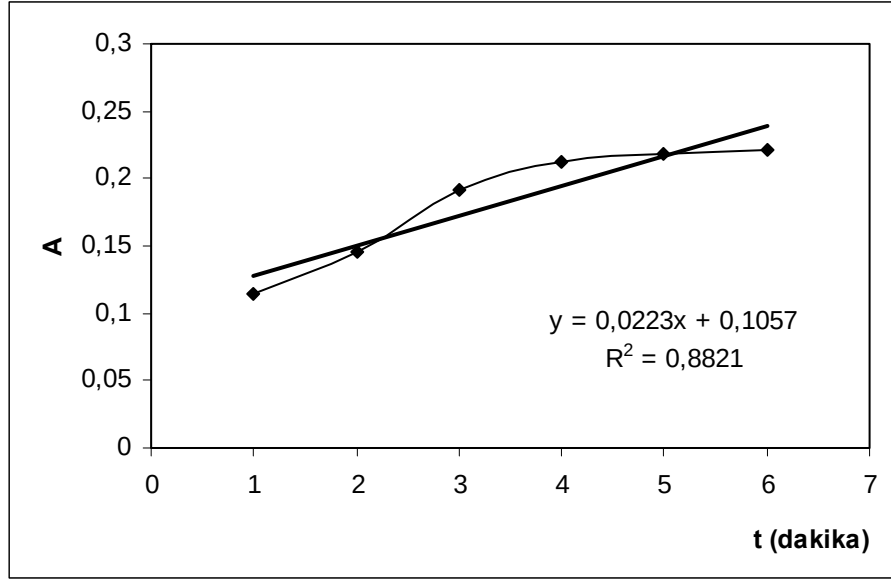
Hazırlanan örnek numarası, enzim miktarı, nişasta miktarı, tampon miktarı, dakika dakika kesilen reaksiyonların verdiği absorbsiyon değerleri ve ortalama absorbsiyon değerleri Tablo III.10’daki gibidir.

Tablo III.10: Kullanılan enzim miktarı, nişasta konsantrasyonu, pH 6,9'da hazırlanmış nişasta çözeltisi (mL), tampon miktarı (mL), dakika dakika sonlandırılan reaksiyonların verdiği absorpsiyon değerleri ve ortalama absorpsiyon değerleri

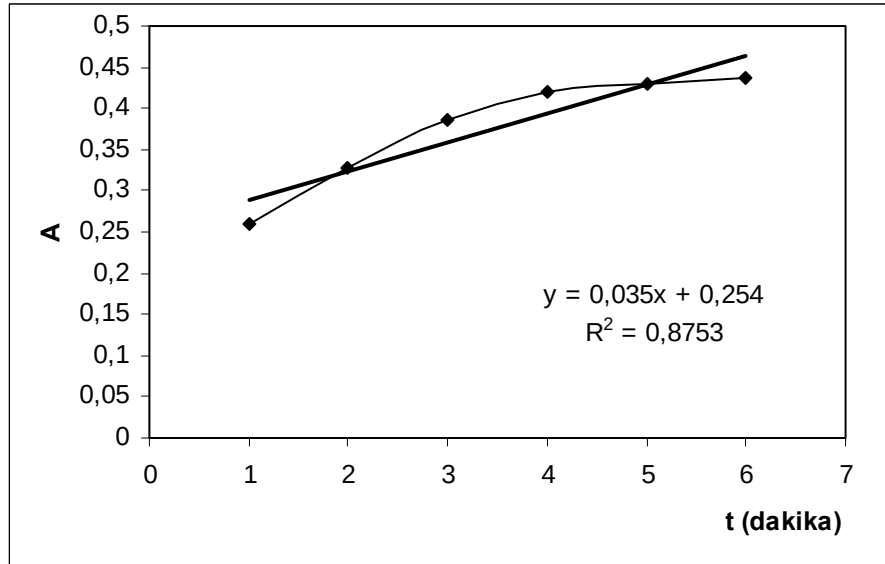
Örnek No:	Nişasta çözeltisi (mL)	pH 6,9 tampon çözeltisi (mL)	α -amilaz miktarı (g)	AB 1	SOR 2	BANS 3	LAR 4	(daki 5	ka) 6
1	0	8	0,0035						
2	1	7	0,0035	0,109	0,143	0,155	0,161	0,167	0,169
3	2	6	0,0035	0,114	0,145	0,191	0,212	0,218	0,222
4	3,5	4,5	0,0035	0,259	0,328	0,387	0,419	0,429	0,437
5	5	3	0,0035	0,382	0,394	0,432	0,489	0,545	0,557
6	7	1	0,0035	0,703	0,771	0,799	0,856	0,899	0,902



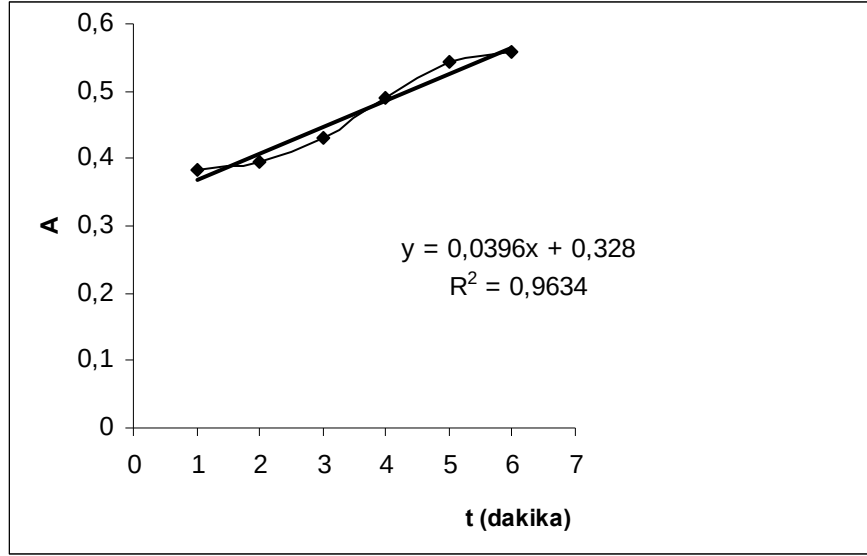
Şekil III.15: 2 numaralı örneğin zaman (dakika)–absorpsiyon grafiği



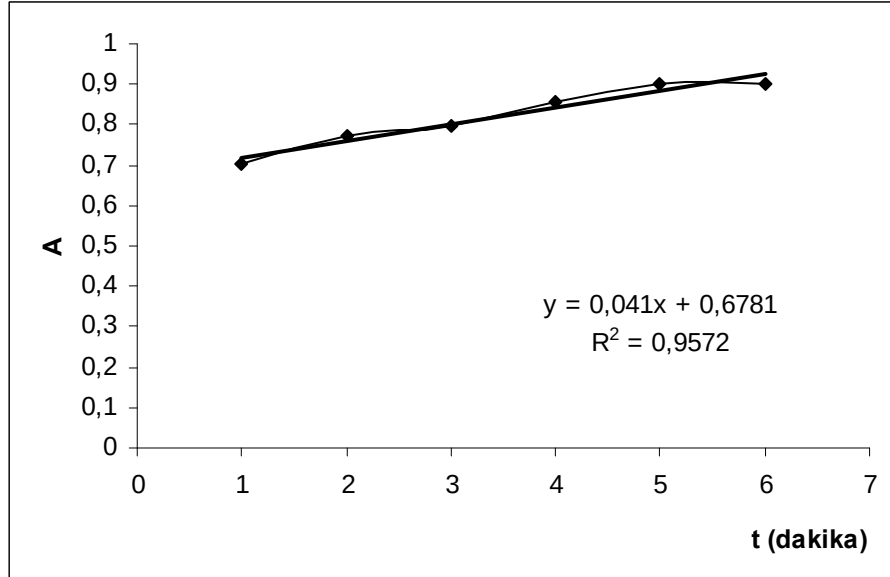
Şekil III.16: 3 numaralı örneğin zaman (dakika)–absorbsiyon grafiği



Şekil III.17: 4 numaralı örneğin zaman (dakika)–absorbsiyon grafiği



Şekil III.18: 5 numaralı örneğin zaman (dakika)–absorbsiyon grafiği



Şekil III.19: 6 numaralı örneğin zaman (dakika)–absorbsiyon grafiği

Yukarıda gösterilen örneklerin zaman (dakika)–absorbsiyon grafiklerinin eğim denklemlerinden yararlanarak her bir örneğin başlangıç hızları hesaplanır.

$$A = \epsilon \times C \times l \text{ (III.1)}$$

A: absorpsiyon; **ϵ :** ekstinksiyon sabiti (mL/mg×cm); **C:** konsantrasyon (mg/mL); **l:** ışığın aldığı yol (1 cm)

$$m = \Delta A / \Delta t \text{ (III.2)}$$

m: eğim; **ΔA:** En büyük absorpsiyon değeri ile en küçük absorpsiyon değeri arasındaki fark; **Δt:** En büyük absorpsiyon değerinin meydana geldiği zaman ile en küçük absorpsiyon değerinin meydana geldiği zaman arasındaki fark.

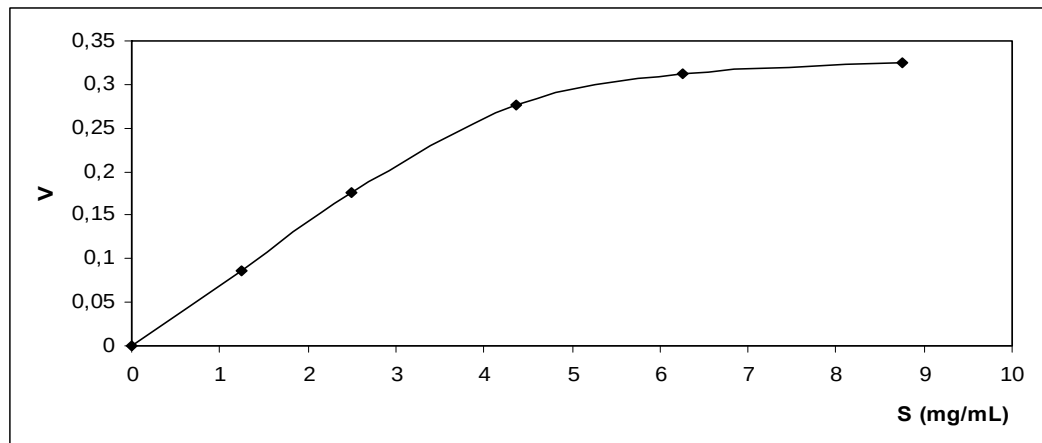
$$V = m/\epsilon \times l \text{ (III.3)}$$

V: hız (mg/dakika×mL); **m:** eğim; **ε:** ekstinksiyon sabiti (0,1265 mL/mg×cm);
l: ışığın aldığı yol (1 cm)

Bu eşitliklere göre elde edilen nişasta konsantrasyonu (mg/mL)–hız (mg/dakika×mL) değerleri Tablo III.11’de verilmiştir. Şekil III.20’de, Tablo III.11’de bulunan nişasta konsantrasyon (mg/mL)–hız (mg/dakika×mL) değerlerle çizilen Michaelis – Menten eğrisi gösterilmektedir.

Tablo III.11: Nişasta konsantrasyon (S)–hız(V) değerleri

Örnek No:	1	2	3	4	5	6
C (mg/mL) :	0	1,25	2,50	4,38	6,25	8,75
V (mg/dakika×mL) :	0	0,085	0,176	0,276	0,313	0,324



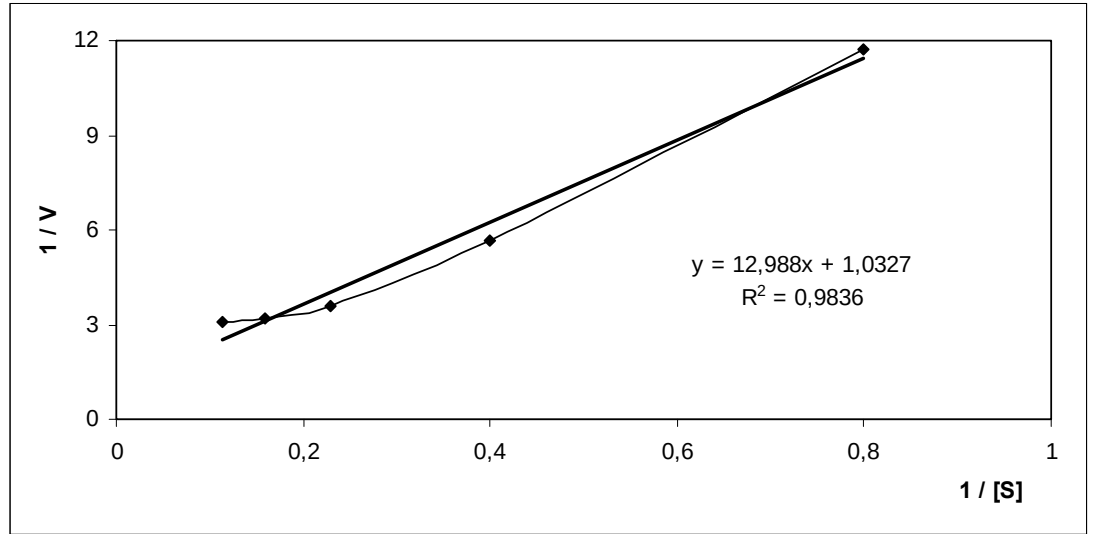
Şekil III.20: İmmobilize olmuş α-Amilazın Michaelis–Menten eğrisi

Tablo III.11’de verilen nişasta konsantrasyonu (mg/mL) ve hız (mg/dakika×mL) değerlerine göre hesaplanan 1/S ve 1/V değerleri Tablo III.12’de

verilmiştir. İmmobilize olmuş α -Amilazın Tablo III.12'deki değerleriyle çizilen Linewear-Burke eğrisi Şekil III.21'de gösterilmiştir.

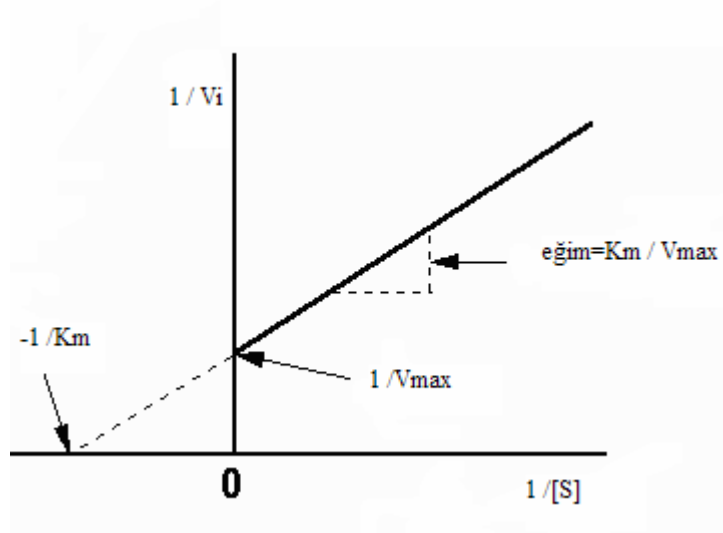
Tablo III.12: Nişasta konsantrasyon (1/S)–hız (1/V) değerleri

Örnek No:	1	2	3	4	5
1/C (mL/mg):	0,114	0,160	0,229	0,400	0,800
1/V (dakika×mL/mg):	3,085	3,194	3,614	5,672	11,71



Şekil III.21: İmmobilize olmuş α -Amilazın Linewear-Burke Eğrisi

Şekilde gösterilen Linewear-Burke eğrisinin eğimi Michaelis-Menten sabitinin (K_m) maksimum hıza oranını verir. Şekil III.22'de Linewear-Burke grafiği açıklamalı olarak ifade edilmiştir.



Şekil III.22: Lineweaver-Burke Grafiği

Buna göre hesaplanan $1/[S]$, $1/V_i$ değerleri Tablo III.12’de verilmiştir. Şekil III.21’de immobilize olmuş α -amilazın Lineweaver-Burke eğrisi gösterilmiştir. Bulunan eğim değerinden yararlanarak immobilize olmuş α -amilazın K_m ve V_{max} değerleri aşağıdaki gibi hesaplandı:

Elde ettiğimiz $y = 12,988x + 1,0327$ doğru denklemine göre, Lineweaver-Burke eğrisinin eğimi 12,988’dir.

$x = 0$ iken $y = 1,0327$ olur.

$x = 0$ iken; $y = 1/V_{max}$ olduna göre $1/V_{max} = 1,0327$ ’dir. Buna göre;

$V_{max} = 1/1,0327 = 0,96833543$ (mg/dakika×mL) olarak hesaplandı.

$eğim = K_m / V_{max} = 1 / V_{max} \times K_m$ ise;

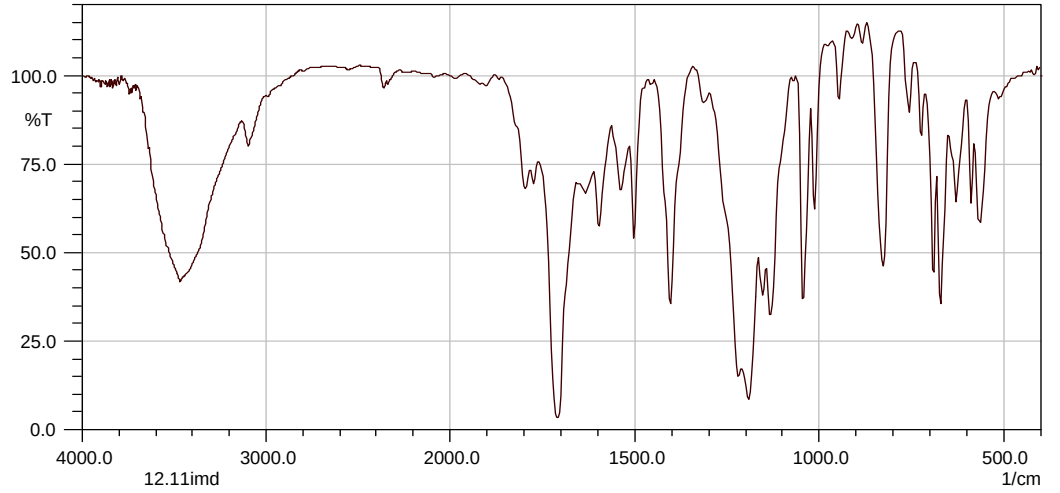
$K_m = 12,5767$ (mg/mL)’dir [167-170].

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

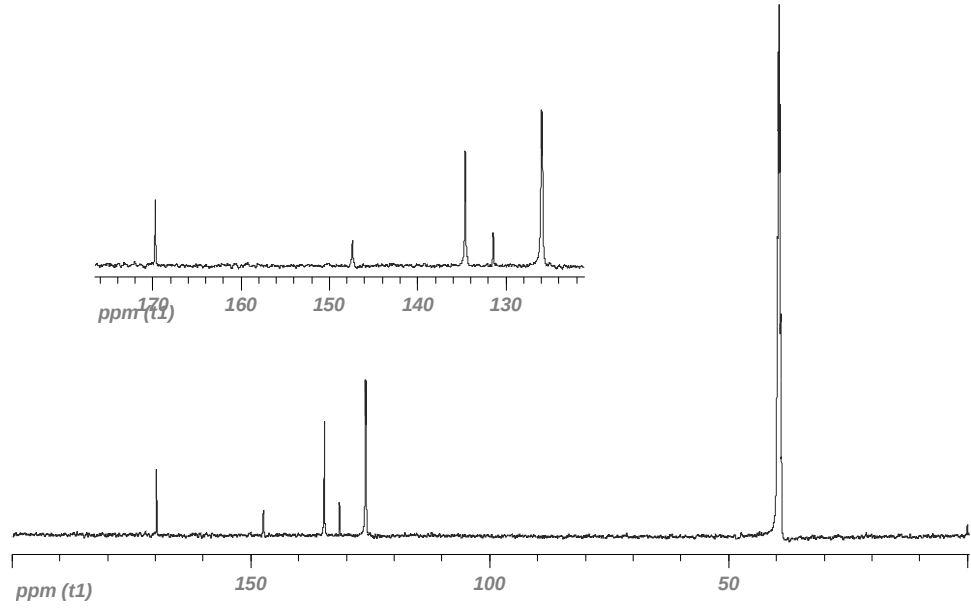
IV.1. KARAKTERİZASYON

Bu çalışmada α -amilaz enzimi yeni polimerik destek materyal üzerine immobilize edildi. Maleik anhidritin, p-aminosulfanilik asitle raksiyona girmesiyle N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid sentezlendi. Şekil IV.1’de N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomerinin FTIR spektrumu gösterilmektedir. 1778 cm^{-1} ’de ve 1706 cm^{-1} ’deki pikler maleimid halkasındaki (C=O) fonksiyonel grupların varlığını göstermektedir [171, 172].



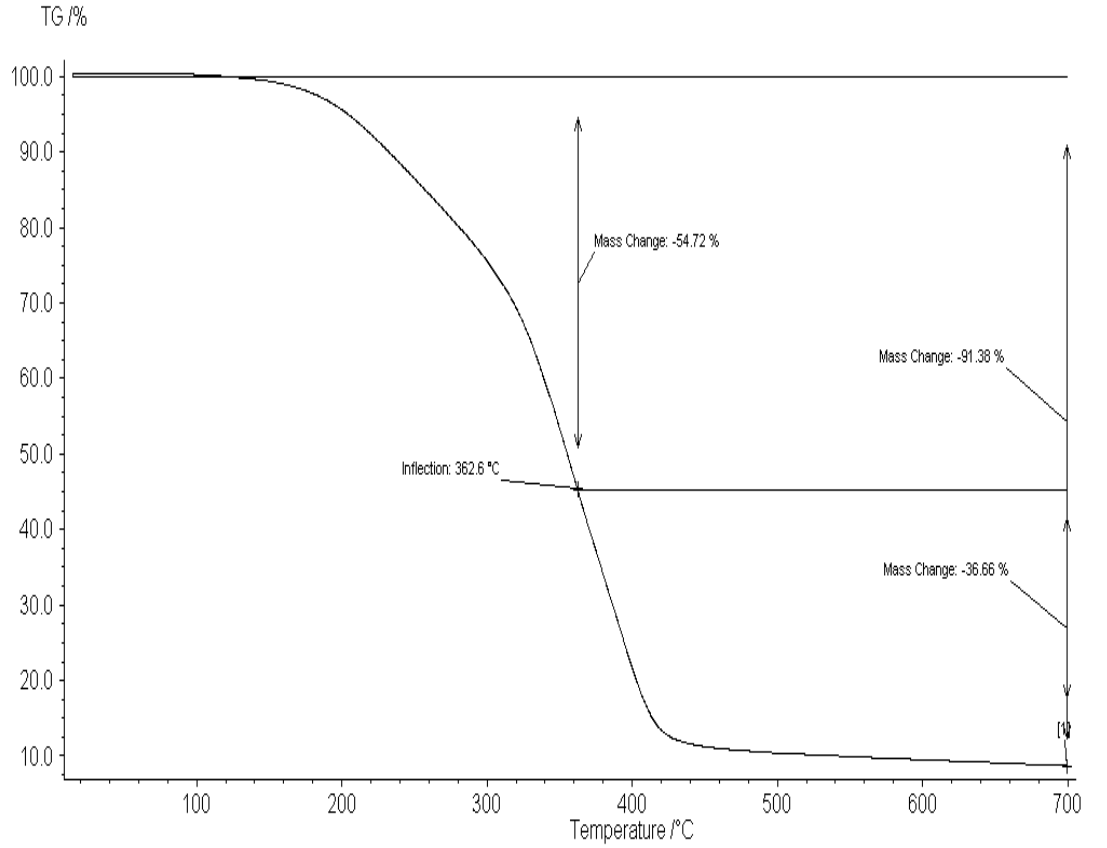
Şekil IV.1: Sentezlenen monomerinin FTIR spektrumu

N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomeri ayrıca ^{13}C NMR spektroskopisi yardımıyla da karakterize edildi. Şekil IV.2’de sentezlenen monomerin ^{13}C NMR spektrumu gösterilmiştir. İmidin yapısındaki karbonil karbonlarının piki 170 ppm’dedir [173]. Buda N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimidin başarıyla sentezlendiğinin kanıtıdır.



Şekil IV.2: Sentezlenen monomerin ^{13}C NMR spektrumu

Polimerik desteğin termal kararlılığı, TGA cihazı ile analiz edilmiştir. Şekil IV.3'te polimerik desteğin yüzde kütle kayıpları ve karşılık gelen sıcaklıklar gösterilmiştir. TGA termogramından elde edilen sonuçlara göre, immobilizasyon için hazırlanan polimerik desteğin, 100 °C sıcaklığa kadar bozunmadığı görülmektedir.



Şekil IV.3: Sentezlenen monomerin TGA spektrumu

IV.2. İMMOBİLİZASYON VERİMİ

Çeşitli çalışmalarda α -amilazın immobilizasyonunda bağlanma kapasitesinin hazırlanan destek materyallerin karakteristik özelliklerinden dolayı değişiklik gösterdiği görülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada α -amilaz, fonksiyonel amin gruplu cam küreler üzerine immobilize edilmiş ve 25,2 mg enimin 1 g cam küreye bağlandığı rapor edilmiştir [174]. Bir başka çalışmada farklı büyüklükte gözenekli olan silikalar içinde immobilize edilen α -amilazın aktivasyonu ve kararlılığı araştırılmış ve 1 g partiküle 0.5-0.75 mg enzim bağlandığı rapor edilmiştir [175]. Bu çalışmada 68,18 mg α -amilaz enzimi 1 g monomere kovalent olarak bağlanmıştır.

IV.3 İMMOBİLİZASYON ÜZERİNE BAĞLANMA ZAMANININ ETKİSİ

İmmobilizasyon üzerine bağlanma zamanının etkisi Şekil III.5'te gösterilmiştir.

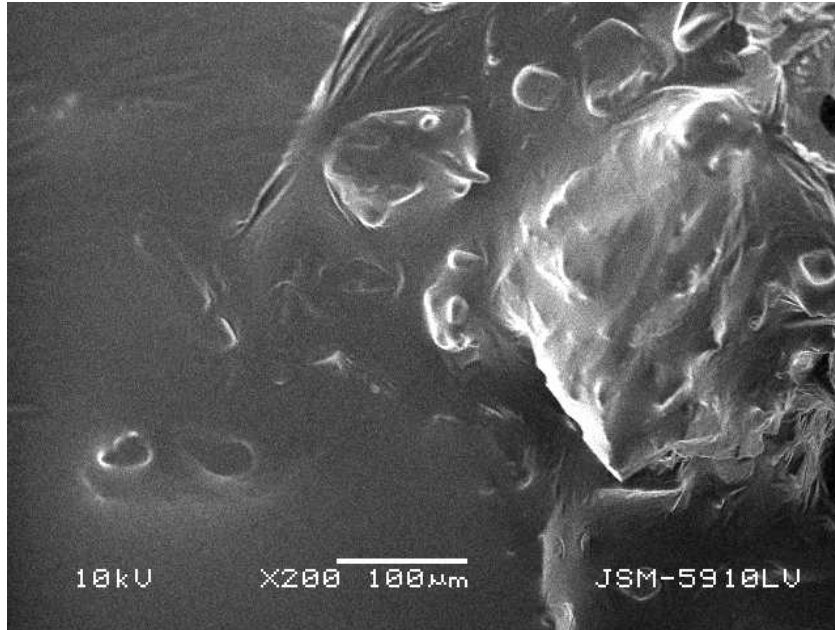
Bu denemede kullanılan enzimin %90'ının 8. dakikada kovalent bağlanmayla

immobilize olduğu gör÷lmektedir. Sentezlenen monomerin s÷lfonil brom÷r grubu ile enzimin fonksiyonel grubu olan amino grubu arasındaki kovalent bağlanmanın hızlı bir şekilde olduğu Şekil III.5'te gör÷lmektedir.

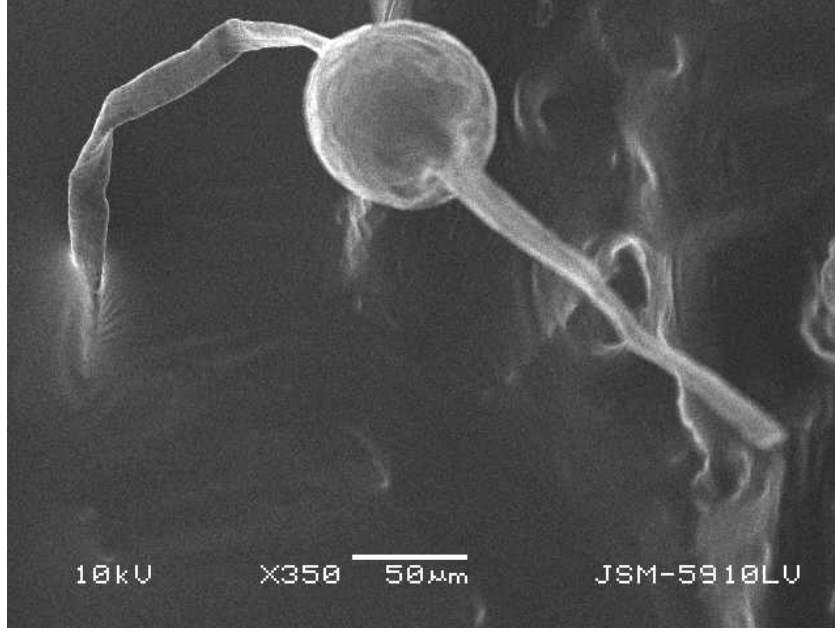
IV.4. ENZİM İMMOBİLİZE EDİLMİŞ POLİMERİK FİLMİN SEM GÖRÜNTÜLERİ

İmmobilize enzimin yüzey morfolojisi Şekil IV.4'te gösterilmiştir. Polimer yüzeyinin çok fazlı görüntüsü Şekil IV.4'te gösterilmiştir. Partiküllerin yüzeydeki varlığı gör÷lmektedir. Yaklaşık 50 µm büyüklüğündeki küresel parçacığın uzun kollarıyla polimere bağlandığı Şekil IV.5'te gösterilmiştir.

SEM-EDS analizi polimerik desteğin kırılma yüzeyinin elementel bileşiminin belirlenmesi için yapıldı. EDS analiziyle partiküllerin % 55 C, % 7 N ve % 38 O'den oluştuğu belirlenmiştir.



Şekil IV.4: Polimerik yüzeyin görüntüsü



Şekil IV.5: Polimere bağlanan küresel parçacığın görüntüsü

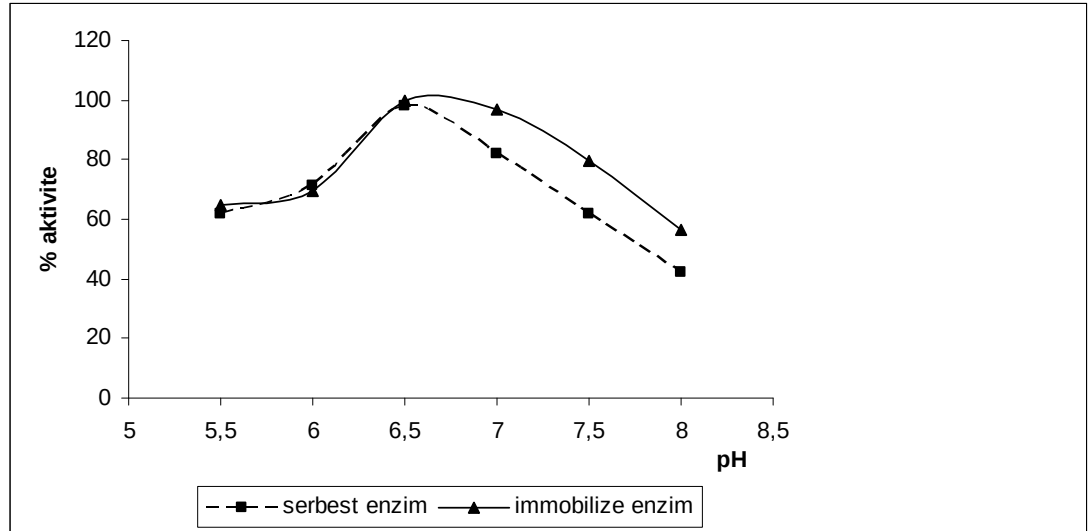
IV.5. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE pH'NIN ETKİSİ

Serbest α -amilaz aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH'larda Bölüm III.3.9.1.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest α -amilaz enzimi için optimum pH 6,5-7.0 arsında bulundu ve maksimum aktifliğin pH ile değişimi Şekil III.7'de gösterildi ve bu şekilde görüldüğü gibi asidik ve bazik bölgelerde maksimum aktiflikte bir azalma gözlenmiştir. Bu pH'da bulunan aktiflik değeri, maksimum aktiflikte % 100 olarak kabul edilmiştir ve bu değer baz alınarak diğer pH'larda elde edilen maksimum aktiflik hesaplanmıştır.

Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir [112]. Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda reaksiyon hızı maksimumdur. Bu nedenle serbest enzimler için reaksiyon hızının maksimum olduğu optimum pH değerleri belirlenir. Genellikle, enzimlerin, optimum pH'sı 3-8 arasındadır. Pekçok enzimin optimum pH değeri 7 civarındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir. Şekil III'de de görüldüğü gibi α -amilazın aktifliğinde asidik ve bazik bölgelerde bir azalma gözlenmiştir. Diğer taraftan, enzim ile polimerik destek maddesi arasında

oluşabilecek farklı etkileşim kuvvetlerinde (hidrojen bağı oluşumu, dipol-dipol etkileşimi gibi) pH'yı etkilediği bilinmektedir [157, 176,177].

N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilaz enziminin aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm III.3.9.4.'te anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Tablo III.4'de verildi. N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilaz için optimum pH 6,5-7,0 arasında bulundu ve maksimum aktifliklerin pH ile değişimi Şekil III.10'da gösterildi. Serbest α -amilaz ve immobilize α -amilaz için optimum pH aralığı değişmezken immobilizasyonla pH 6,5-8,0 aralığında daha yüksek aktiflik göstermiş ve daha yüksek pH değerlerinde kullanılabilir hale gelmiştir. Şekil IV.6'da serbest ve immobilize enzimin pH 5,5-8,0 aralığındaki aktiflik değerleri karşılaştırılmıştır.



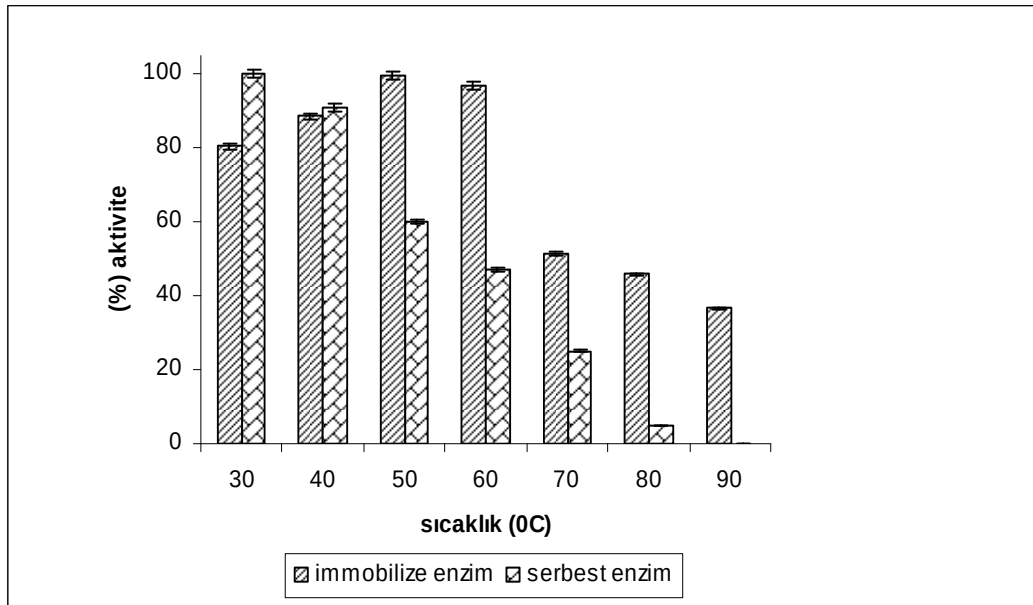
Şekil IV.6: Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine pH'nın etkisi

IV.6. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ

Serbest enzimin aktifliğinin üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla Bölüm III.9.2.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest enzim için optimum sıcaklık 30°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil III.8'de gösterildi. Bu sıcaklıkta bulunan aktiflik değeri, maksimum aktiflikte % 100 olarak kabul edilmiş ve bu değer esas alınarak diğer sıcaklıklarda elde edilen maksimum aktiflikler hesaplanmıştır. 30 °C'nin üzerinde sıcaklık artışıyla enzim aktifliğinin azaldığı gözlenmiştir. Sıcaklığın artması moleküllerin kinetik enerjisini

arttırdığından tüm kimyasal reaksiyonların, bu arada biyokimyasal reaksiyonların da hızlarını artırır. Genelde sıcaklığın 10 °C artmasıyla, reaksiyon hızları da yaklaşık olarak iki kat artar. Biyokimyasal reaksiyonlarda da aynı durum gözlenmekle birlikte protein yapısında bulunan enzimler, belirli bir sıcaklıktan sonra (50 °C'nin üzerinde) denatüre olmaya başlarlar [178]. Sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimin aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [179]. α -Amilazın aktifliğinde de 30 °C'nin üzerinde hızlı bir azalma göstermiştir.

İmmobilize α -amilazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm III.3.9.5'te anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Tablo III.5'te verildi. N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilaz için optimum sıcaklık 50 °C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil III.11'da gösterildi. Serbest α -amilaz için optimum sıcaklık 30 °C iken immobilizasyonla bu değer daha yüksek sıcaklığa kaymış ve daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilir hale gelmiştir. Şekil IV.7'de serbest ve immobilize enzimin 30-90 °C sıcaklık aralığındaki aktiflik değerleri karşılaştırılmıştır.



Şekil IV.7: Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

IV.7. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE DEPOLAMA SÜRESİNİN ETKİSİ

Serbest α -amilaz aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla Bölüm III.3.9.3.'te anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest α -amilaz enziminin aktifliğine depolama süresinin etkisi Şekil III.9'da gösterildi ve bu şekilde görüldüğü gibi serbest enzimin 15 gün içinde aktivitesini hızla yitirdiği görülmektedir. Bu zamanlarda bulunan aktiflik değeri, maksimum aktiflikte % 100 olarak kabul edilmiştir ve bu değer baz alınarak diğer zamanlarda elde edilen maksimum aktiflik hesaplanmıştır.

N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilazın aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemek için Bölüm III.3.9.6.'da anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Tablo III.6'da verildi. N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilazın maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Şekil III.12'de gösterildi. Immobilize enzimin 4 °C depolamada 44. günde başlangıç aktifliğinin % 66,8'ini koruduğu gözlemlendi.

IV.8. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ

Serbest α -amilaz bir kez, immobilize enzim ise aktifliğini koruduğu sürece pek çok kez kullanılabilir. N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilaz 1 gün boyunca 33 kez kullanılarak Bölüm III.3.9.7'de anlatıldığı gibi aktifliği tayin edildi, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Tablo III.7'de verildi. N-(4-sodyumsülfopenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Şekil III.13'te gösterildi. Immobilize enzimin 33 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktifliğinin % 74,68'ini koruduğu gözlemlendi.

IV.9. İMMOBİLİZE EDİLEN ENZİMİN KİNETİK PARAMETRELERİ

Michaelis sabiti, K_m 'nin değeri enzim ile substratı karakterize eden önemli bir parametredir. Enzim ve substrat derişiminden bağımsızdır ve enzimin substrata karşı ilgisinin göstergesidir. K_m değeri ne kadar küçükse enzim substrata o kadar fazla ilgi gösterir. V_m değeri ise substrat derişimine bağılı bir niceliktir. Hem K_m hem de V_m

enzimin ve substratın yük dağılımına, konformasyonuna ve reaksiyon sıcaklığına bağımlı parametrelerdir [26].

N-(4-sodyumsülfofenil)-maleimid monomerine immobilize edilen α -amilazın kinetik parametrelerini belirlemek için sırasıyla Bölüm III.3.10'da anlatılan yöntemlerle tayin edildi, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri sırasıyla Tablo III.8, Tablo III.9, Tablo III.10, Tablo III.11, Tablo III.12'de verildi. Elde edilen değerlere göre immobilize edilen α -amilazın K_m değeri 12,58 (mg/mL), V_{max} değeri 0,968 (mg/ dakika×mL) olarak hesaplandı. Serbest α -amilazın K_m değeri 15,8 (mg/mL) ve V_{max} değeri 58×10^{-3} (mg/mL)'dir [180, 181].

Enzim immobilizasyon çalışmalarında immobilize enzimi karakterize etmek amacıyla K_m ve V_m değerleri optimum koşullarda belirlenmesi ve serbest enzimin değerleri ile karşılaştırılması önemlidir. Gerek enzimin immobilizasyon işlemlerindeki konformasyonel değişiklikler, gerekse difüzyon kısıtlamaları nedeniyle genellikle immobilize enzimin görünür K_m değeri serbest enzime göre daha büyük olmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre immobilize enzimin K_m değeri serbest enzimin K_m değerinden küçüktür yani enzim substrata daha fazla ilgi göstermiştir. İmmobilize enzimin V_{max} değeri serbest enzimin V_{max} değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür.

BÖLÜM V

SON DEĞERLENDİRMELER

Polimerik destek UV-ışınları yardımıyla sertleştirme tekniğiyle hazırlandı. Kovalent immobilizasyon ılımlı koşullarda, hızlı bir şekilde gerçekleşti. İmmobilize enzimin, yüksek sıcaklıkta serbest enzime göre daha kararlı olduğu belirlendi. Yüksek sıcaklıkta optimum pH aralığı değişmedi. İmmobilize enzimin termal kararlılığının ve raf ömrünün serbest enzimden çok daha iyi olduğu belirlendi. Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilirken, immobilize enzim 44. kullanımında başlangıç aktivitesinin hala % 66,8'ni koruduğu belirlendi. Serbest enzim 15 gün içinde aktivitesini kaybetmiştir. Immobilize enzim ise 30 gün içinde aktivitesinin sadece % 30 kaybetmiştir. Bu çalışmada immobilize enzimin K_m değeri serbest enzimin K_m değerinden küçüktür yani enzim substrata daha fazla ilgi göstermiştir. İmmobilize enzimin V_{max} değeri serbest enzimin V_{max} değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür. Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüsü ve EDS analiziyle kovalent enzim immobilizasyonu oluşumu morfolojik olarak aydınlatılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Erarslan. A.; Kazan D.: “Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri”, *İmmobilize Enzimler ve Uygulamaları Lisansüstü Eğitim Kursu*, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermantasyon Teknolojisi Grubu, Kocaeli, Türkiye, **(1999)**.
- [2] Kvetsitadze, S. G. I.; Dvali, M. S.: *Biotechnology and Bioengineering*, 21 **(1982)** 1765-1772.
- [3] Kahraman, M. V.; Kayaman-Apohan, N.; Ogan, A.; Güngör, A.: “Soybean oil based resin: A new tool for improved immobilization of alpha-amylase”, *Journal Of Applied Polymer Science*, 100 **(2006)** 4757-4761.
- [4] Ulman, A.; “Formation and Structure of Self Assembled Monolayers”, *Chemical Reviews*, 96 (4) **(1996)** 1533-1553.
- [5] Zaborsky, O.R.; “*Immobilized Enzymes*”, CRC Pres, Cleveland, **(1973)**.
- [6] Messing, R.A.: “Immobilized Enzymes for Industrial Reactors”, *Academic Press*, New York, **(1975)**.
- [7] Trevan, M.D.: “Immobilized Enzymes”, An Introduction and Applications in *Biotechnology*, Wiley, New York, **1980**.
- [8] Carr, P.W.; Bowers, L.D.: *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry. Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **(1980)**.
- [9] Dominiguez, E.; Nisson, M.; Hahn-Hagerdal, B.: “Carbodiimide coupling of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate”, *Enzyme Microb. Technol.*, 10 **(1998)** 606-610.
- [10] Guzman-Maldonado, H.; Paresdes-Lopez, O.: “Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(5) **(1995)** 373-403.
- [11] Wiseman, A.: “The Application of Enzymes in Industry” *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. **(1987)** 274-373.
- [12] Bersin, Th.: *Kurzes Lehrbuch der Enzymologie*, p.1, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzing, **(1954)**.
- [13] Dixon, M.; Webb, E.C.: *Enzymes*, **(1979)** pp.1.

- [14] Spackman, D.H.; Stein, W.H.; Moore, W.H.: *Anal. Chem.* 30 (1958) 1190-1206.
- [15] Phillips, D.C.: *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 57 (1967) 484-495.
- [16] Telefoncu, A.: *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji* (Telefoncu, A. ed.) (1986).
- [17] Park. T.G.; Hoffmann, A.S.: "Thermal Cycling Effects on The Bioreactor Performances of Immobilized β -Galactosidase in Temperature Sensitive Hydrogel Beads." *Enzyme and Microbial Technology*. 15 (1556) (1993) 476.
- [18] [http://stu.inonu.edu.tr/~e0199160 \(04.11.05\)](http://stu.inonu.edu.tr/~e0199160 (04.11.05))
- [19] Özata, A.; Kutlu, M.: "Enzimoloji Ders Notları", T.C Anadolu Üniversitesi Yayınları, No: 1254, Fen Fakültesi Yayınları, No: 15, Eskişehir, (2000) 30-38.
- [20] Shuler, M. L.; Kargi, F.: *Bioprocess engineering: basic concepts*, Prentice-Hall international editions, second edition, pp.60-67.
- [21] Elzigna, M. (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, Humana Press, Clifton, New Jersey, (1982).
- [22] Hirs, C. H. W.; Timasheff (eds.): *Methods in Enzimology*, Academic Press, New York, 91 (1983).
- [23] Lehninger, A. L. "Enzymes Principles of Biochemistry" New York, *Worth Publishers Inc.*, (1982) 207-244.
- [24] Boyer, P.D. "The Enzymes Ed.3", New York, *Academic Press Inc.*, (1970).
- [25] Bailey, J.E.; Ollis, D. F.; *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw-Hill, Singapore, (1986).
- [26] Chaplin, M. F.; Bucke, C.; *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Great Britain, (1990).
- [27] Koç, L.: "Katı Yağların Serbest ve İmmobilize Lipazla Hidrolizi", *Yüksek Mühendislik Tezi*, Haccettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, (1994).
- [28] Nelson, J.M.; Griffen, E.G.: *J.Am.Chem.Soc.*, 38 (1916) 1109-1111.
- [29] Zitle, C. A.: *Enzymology*, 14 (1953) 319.
- [30] Bar-Eli, A.; Katchalski, E.: *Nature*, 188 (1960) 856.
- [31] Dimitriu, S.; Popa, M.; Dimitriu, M.: "Polymeric Biomaterials as Enzyme and Drug Carriers", *J. Bioactive and Compatible Polymers*, 3 (1998) 243-312.
- [32] D'Souza, S. F.; Godbole, S. S.: "Immobilization of Invertase on Rice Husk Using Polyethylenimine", *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 52 (2002) 59-62.

- [33] Mosbach, K.: "Methods in Enzimology", Enzmology, *Academic Press*, New York, (1976) 44-49.
- [34] Walsh, G.: "Proteins", *Biochemistry and Biotechnology*, Chichester, J. Wiley, (2002) 340.
- [35] Uludağ, Y. B.: "İmmobilize Glukoamilaz İle Maltodekstrinden Glukoz Üretimi", *Yüksek Lisans Tezi*, TC Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Gebze, (2000) 30,38,45.
- [36] Bahar, T.: "Enzim İmmobilizasyonu İçin Magnetik Polistiren Partiküllerinin Hazırlanması ve Bu Partiküllerde İmmobilize Edilmiş Glukoamilazın Magnetik Olarak Stabilize Edilmiş Akışkan Yatak Reaktör (MSAYR)'de Kullanılması", *Yüksek Mühendislik Tezi*, Haccettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1996) 4,18-21.
- [37] Radley, J.A.: "Production of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production Technology (L.A. Underkofler Editör)." *Applied Science Publisher Ld.*, England, Chapter 16, (1976) 295-309.
- [38] Lee, B.H.: *Fundamentals of Biotechnology*, VCH Publishers, USA, (1996) 431.
- [39] Matsuzaki, H.; Yamane, K.; Yamaguchi, K.; Nagata, K.; Marou, B.: "Hybrid α -Amylases Produced by Transformants of Extracellular α -Amylases Produced by the Parental Strains and Transformants", *Biochim. Biophys. Acta.*, (1974) 365, 235-247.
- [40] Borgia, P.T.; Campell. L.L.: " α -Amylases from Five Strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: Evidence for Identical Primary Structures.", *J. Bacteriol.*, 113(2) (1978) 389-393.
- [41] Grootegoed, J.E.; Lauvers, A.M.; Heinen, W.: "Seperation and Partial Purification of Extracellular Amylase and Protease from *Bacillus caldolyticus*.", *Arch. Microbiol.* 90 (1973) 223-232.
- [42] Bliesmer, B.O.; Hartman, P.A.: "Differential Heat Stabilities of *Bacillus subtilis* Amylases.", *J. Bacteriol.*, 113 (1973) 526-528.
- [43] Saito, N.: "A Thermophilic Extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis*.", *Arc. Biochem. Bioph.*, 155 (1993) 290-298.

- [44] Lane, A.G.; Pirt, S.J.: "Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase by Batch and Chemostat Cultures of *Bacillus macerans* in Chemically Defined Medium.", *J. Appl. Chem. Biotech.*, 23 **(1973)** 309-321.
- [45] Pitcher, W.H.: "Immobilized Enzymes for Food Processing.", *CRC Press. Boca. Raton.*, Florida, **(1980)**.
- [46] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153 **(1944)** 375.
- [47] Noelting, G.; Bernfeld, P. *Helv. Chim. Acta.*, 31 **(1948)** 286.
- [48] Bird, R.; Hopkins, R. H.: "The Action of Some α -Amylase on Amylose", *Biochem.*, 56 **(1954)** 86.
- [49] May, K.B.; Elliot, H.E.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 166 **(1968)** 532.
- [50] Street, H.V., 1965, "Amylase" in *methods of enzymatic analysis.*, New York, 854-858.
- [51] Bailey, J.E.; Ollis, D.F.: *Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition*, Chapter 1-7, **(1987)** 39-50.
- [52] Bajpai, P.; Bajpai, K.P.: High-Temperature Alkaline α -Amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*, 33 **(1987)** 72-78.
- [53] Igarashi, K.; Hatada, Y.; Hagihara, H.; Saeki, K.; Takaiwa, S.; Kobayashi, T.; Ito, S.: "Enzymatic Properties of a Novel Liquefying α -Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus* Isolate and Entire Nucleotide and Amino Acid Sequences.", *Applied and Environmental Microbiology.*, **(1998)** 3282-3289.
- [54] Demain, A.L.; Solomon, N.A.: "In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering", *Scientific American, Freeman & Comp.*, San Francisco, **(1981)** 3-14.
- [55] Tarakçioğlu, Y.: "An Amylase Producing Maltotriose from *Bacillus subtilis*.", *Agric. Biol. Chem.*, 49 (4) **(1979)** 1901-1907.
- [56] Keskin, H.: "*Besin Kimyası*", Fatih Yayınevi, Cilt II. İstanbul, **(1982)** 558.
- [57] Ekşi, A.: "*Meyve Suyu Durultma Tekniği*", Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, 9 **(1988)** 127.
- [58] Whelan, W.J.: "*Modern Methods of Plant Analysis*", Springer., Berlin, II **(1953)** 145.
- [59] Tavber, H.: "*Chemistry and Technology of Enzymes*", John Wiley and sons, Inc, **(1950)** 63-64.

- [60] Beutler, H.D.: Starch, *In Methods of Enzymatic Analysis*, Edition Verlog Chemie., 6 (1982) 2-10.
- [61] Rick, W.; Stegbauer, H.P.: *In methods of enzymatic analysis.*, Academic Press., New York, 2 (1974) 885-890.
- [62] Yoo, J.Y.; Hong, J.; Hatch, R.T.: “Comparison of α -Amylase Activities From Different Assay Methods”, *Biotechnol. Bioeng.*, 30 (1987) 147-157.
- [63] Karadağ, H.: “Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu”, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, (2001) 26-28.
- [64] Telefoncu, A.; Tarhan, L.; Pekin, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 1669.
- [65] Carr, P. W.; Bowers, L. D.: “Support Considerations in Chemical Analysis”, *Enzymes*, Academic Press, New York, 56 (1980) 167-170.
- [66] Chen, S.; Liu, Y.; Yu, P.: “Study on Column Reactor of Chitosan Immobilized”, *Chem. Abstr.*, 127 (4) (1996) 127-129.
- [67] Kaetsu, I.; Kamura, M.; Yoshida, M.: “Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low Temperature”, *Biotechnol. Bioeng.*, 21 (1979) 847-849.
- [68] Bachman S.; Gebicka, M.L.; Gasyna, Z.: “Some properties of whole-cell glucose isomerase immobilized in polyacrylamide gel by radiation”, *Inter Science*, 33 (11) (2006) 366-369.
- [69] Cabral, J. M. S.; Kennedy, J. F.; Kalogerakis, B.: “Covalent and coordination immobilization of proteins”, *Bioprocess Technol.*, 14 (1991) 73-138.
- [70] Salamone, J. C.: “*Polymeric Materials Encyclopedia*”, *CRC Pres*, New York, 1 (1996) 149-154.
- [71] Kierstan, M. P. J.; Bucke, C.: “The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate”, *Biotechnonology and Bioengineering*, 19 (1977) 87-397.
- [72] Rousseau, I.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Argillier, J. F.; Muller, G.: “Entrapment and Release of Sodium Polystyrene Sulfonate (SDS) From Calcium Alginate Gel Beads”, *Europen Polymer Journal*, 40 (2004) 2709-2715,
- [73] Chen, H.; Tendeyong, F.; Yiacoumi, S.: “Equilibrium and Studies of Copper Ion Uptake by Calcium Alginate”, *Environ. Science Technolgy*, 31 (1997) 1433-1439.

- [74] Chen, D.; Lewondowski, Z.; Roe, F.; Surapaneni, P.: “Diffusivity of Cu²⁺ in Calcium Alginate Gel Beads”, *Biotechnology and Bioengineering*, 41 (1993) 755-760.
- [75] Bülbül, G.: “Atık Sulardaki Fenol Kirliliğinin Serbest ve Kalsiyum Alijinat’a Tutuklanmış *P. Putida* ile Giderilmesinin Kesikli Karıştırmalı ve Dolgulu Kolon Reaktörlerde İncelenmesi”, H. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1995) 12-14.
- [76] Anderson, N.S.; Campbell, J.W.; Harding, M.M.; Rees, D.A.; Samuel, J.W.B.: “X-ray Diffraction Studies of Polysaccharide sulphates; Double Helix Model for κ -carrageenan and ι -carrageenans”, *Journal of Molecular Biology*, 45 (1969) 85-99.
- [77] Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B.: “Structural and Mechanical Properties of *BiopolymerGels*”, In: H. Benoit (Editor), *Biopolymers*, Springer-Verlag, Berlin, (1987) 155.
- [78] Meunier, V.; Nicola, T.; Durand, D.: “Structure and Kinetics of Aggregating κ -carrageenan Studied by Light Scattering”, *Macromolecules* 33 (2000) 2497-2504.
- [79] Nickerson, M. T.; Paulson, A. T.: “Rheological Properties of gellan, κ -carrageenan and alginate Polysaccharides: Effect of Potassium and Calcium ions on Macrostructure Assemblages”, *Carbohydrate Polymers* 58 (2004) 15-24.
- [80] Nickerson, M.T.; Paulson, A.T.; Hallent, F.R.: “Dilute solution Properties of κ -carrageenan Polysaccharides: Effect of Potassium and Calcium ions on Chain Comformation”, *Carbohydrate Polymers* 58 (2004) 25-33.
- [81] Kennedy, J.F.; Cabral, J. M. S.: “Immobilized Enzymes Cells”, Immobilization of enzyme, (Woodward, 2nd ed.), Oxford Press, U.K., (1985) 19-37.
- [82] Buitelaar, R. M.; Hulst, A. C.; Tramper, J.: “Immobilization of biocatalysts in thermogels using the resonance nozzle for rapid drop formation and an organic solvent for gelling”, *Biotechnol. Tech.*, 2 (2) (1988) 109-114.
- [83] Guo, Y.; Lou, F.; Peng, Z.; Yuan, Z.: “Kinetics of growth and α -amylase production of immobilized *Bacillus subtilis* in an airlift bioreactor”, *Biotechnol. Bioeng.*, 26 (1990) 771-774.

- [84] Gooijer, C. D. de; Wijffels, R.H.; Tramper, J.: "Growth and Substrate Consumption of Nitrobacter Agilis Cells Immobilized in Carrageenan", *Biotechnol. Bioeng.*, 38 (1991) 224-231.
- [85] Flink, J.M.; Johansen, A.: "A novel method for immobilization of yeast cells in alginate gels of various shapes by internal liberation of Ca-ions", *Biotechnol. Lett.*, 7 (10) (1985) 765-768.
- [86] Cavin, J.F.; Saint, C.; Divies, C.: "Continuous production of emmental cheese flavours and propionic acid starts by immobilized cells of a propionic acid bacterium", *Biotechnol. Lett.* 7 (11) (1985) 821-826.
- [87] Chevalier, P.; Roy, D.; Morin, A.: "Study of a bacterial hydantoinase activity using alginate beads and a cell recycle system", *Biotechnol. Tech.*, 3 (2) (1989) 135-138.
- [88] Lama, L.; Nicolaus, B.; Trincone, A.; Morzillo, P.; Rosa, M. de; Gambacorta, A.: "Starch conversion with immobilized thermophilic Archaeobacterium *Sulfolobus Solfataricus*", *Biotechnol. Lett.*, 12 (6) (1990) 431-432.
- [89] Tarhan, L.; Ardiç, Z.; Uslan, A.; "The Use of Perlite for Catalase Immobilization", *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi A Serisi*, (1989).
- [90] Sinha, P. R.; Dutta, S. M.: "Hydrolysis of lactose in aqueous solution and in milk by beta-galactosidase immobilized on porous glass beads", *Bio-Chem.*, 4 (1985) 177-9.
- [91] Saburo, F.; Atsuo, T.: "Application of biocatalyst immobilized by polymer methods", *Enzyme Engineering*, Plenum Press, New York, 56 (1980) 167-170.
- [92] Carr, P. W. and Bowers, L. D., "Support considerations in chemical analysis", *Enzymes*, Academic Press, New York, 25: 135-201 (1979).
- [93] Zaborsky, O.: Adsorption Immobilized Enzyme, Ed. by. Weast, R. C., *CRC Press.*, Ohio, (1973) 75-78.
- [94] Matura, H.; Sato, Y.; Sawaguchi, T.; Mizutani, F.: "Rapid and highly-sensitive determination of acetylcholinesterase activity based on the potential-dependent adsorption of thiocholine on silver electrodes", *Sensor and Actuators B*, 91 (2003) 148-151.
- [95] Bonnet, C.; Andreescu, S.; Marty, J. L.: "Adsorption: an Easy and Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase on Screen-printed Electrodes", *Analytica Chimica Acta*, 481 (2003) 209-211.

- [96] Chibata, I.: *Immobilized Enzymes, Research and Development*, Kodansa, Tokyo, (1978).
- [97] Wong, S. S.: *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press Inc., Boca, Raton, (1993).
- [98] Telefoncu, A.; Pekin, B.; Aslan, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 1907.
- [99] Sanjay, G.; Sugunan, S.: "Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10", *Food Chem.*, 94 (2006) 573-579.
- [100] Gürsel, A.; Alkan, S.; Toppare, L.; Yağcı, Y.; "Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers", *React. Funct. Polym.*, 57 (2003) 57-65.
- [101] Jansen, E. F.; Tomimatsu, Y.; Olsan, A. C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 144 (1979) 394.
- [102] Telefoncu, A.: *Doğa*, 3 (1979) 6,25.
- [103] Telefoncu, A.: "*Enzimoloji*", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, (1997) 1-305.
- [104] Srere, P. A.; Uyeda, K.: "Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices", *Methods in Enzymology*. (Edited by Mosbach, K.), Academic Press, Inc., New York, 44 (1976) 11-19.
- [105] Glick, D.: *Methods of Biochemical Analysis.*, New York, 25 (1979) 135-201.
- [106] Demain, A. L.; Solomon, N. A.: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, USA., (1986).
- [107] Isao, K.: "Immobilization of biofunctional substances", *Radiat. Phy. Chem.*, 18 (1980) 343.
- [108] Allan S. F.; "A review of the use of radiation", *Radiat. Phys. Chem.*, 18 (1985) 323.
- [109] Zaborsky, O.: "*Immobilized enzyme*", I. Ed. By. W. East, R.C., *CRC Press* Ohio, (1975).
- [110] Jiri, E. P.: "Application of enzyme", *Biotechnology.*, 489. Ed by Rehm, H. J.; Reed, G.; Weinheim, Germany, (1987).
- [111] Trevan, M.D.; "Techniques of immobilization", *In immobilized Enzyme*, John Wiley and sons, New York, (1980) 1-11.
- [112] Michael, D.T.: "*Immobilized Enzyme*", John Wiley and Sons, New York, 9 (1980).

- [113] John, E. S.: *Biotechnology Principle*, I. Van Nostran Reinhold (UK) Co. Ltd. (1985).
- [114] Mosbach, K.: “*Immobilized Enzymes*”, Academic Press, New York, 44 (1976).
- [115] Mosbach, K.: “*Immobilized Enzymes and Cells*”, Part B., *Methods in Enzymology*, Academic Press, Orlando, 135 (1987).
- [116] Telefoncu, A.: “*Temel ve Uygulamalı enzimoloji*”, (Telefoncu, A. Ed.), Ege Üniversitesi, İzmir, (1986) 126-159.
- [117] Scouten, W. H.; Mosbach, K.: “*Methods in Enzymology*”, Academic Press, Orlando, 135 (1987) 30-65.
- [118] Goldstein, L.: *Biochemistry*, 11 (1972) 4072.
- [119] Lilly, M.; Money, C.; Hornby, W.; Crook, E. M.: *Biochem. J.*, 95 (1965) 45.
- [120] Johanson, A. C.; Mosbach, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 370 (1974) 339.
- [121] Demers, A. G.; Wong, S. S.: *J. Appl. Biochem.*, 7 (1985) 122.
- [122] Cuatrecasos, P.; Parikh, I.: *Biochemistry*, 1 (1972) 2291.
- [123] Patel, R. P.; Price, S.: *Biopolymers*, 5 (1967) 583.
- [124] Sundaram, P. V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61 (1974) 717.
- [125] İbrahim, M.; Hubert, P.; Siest, G.: *Biotechnol. Lett.*, 6 (1984) 771.
- [126] Goldstein, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 315 (1973) 1.
- [127] Arriro-Dupont, M.; Coulet, P. R.; Gautheron, D. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 829 (1985) 58.
- [128] Stark, G. R.: *Adv. Protein Chem.*, 24 (1970) 261.
- [129] Manecke, G.: *Proc. Int. Symp. Macromol.* Rio de Janeiro, 1974 (1975) 397.
- [130] Maede, H.; Suzuki, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 36 (1972) 1581.
- [131] Wilchek, M.; Miron, T.: *Mol. Cell. Biochem.*, 4 (1974) 181.
- [132] Manecke, G.; Vogt, H.; Polakowski, D.: *Macromol. Chem. Suppl.*, 3 (1979) 107.
- [133] Manecke, G.; Günzel, G.: *Naturwiss*, 54 (1967) 531.
- [134] Horvath, C.; Soloman, B. A.: *Biotechnol., Bioeng.*, 14 (1972) 885.
- [135] Means, G. E.; Feeney, R. E.: *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day San Francisco, California, (1971).
- [136] Axen, R.; Porath, J.; Ernbacka, S.: *Nature (London)*, 214 (1967) 1302.
- [137] Lijnen, H. R.; Zamarron, C.; Collen, D. Y.: *Eur. J. Biochem.*, 150 (1985) 141.
- [138] Morris, D. L.; Campbell, J.; Hornby, W. E.: *Biochem. J.*, 147 (1975) 593.

- [139] Epton, R.; Mc Laren, J. V.; Thomas, T. H.: *Carbohydrate Res.*, 22 (1972) 301.
- [140] Van Leemputlen E.; Horisberger, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16 (1974) 997.
- [141] Jencks, W. P.: *Prog. Phys. Org. Chem.*, 2 (1964) 63.
- [142] Royer, G. P.; Liberatore, F. A.; Green, G. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64 (1975) 478.
- [143] Brocklehurst, K.; Crook, E. M.: *Biochem. J.*, 133 (1973) 573.
- [144] Carlson, J.; Axen, R.; Crook, E. M.: *Eur. J. Biochem.*, 44 (1974) 189.
- [145] Ugi, I.: *Isonitrile Chemistry Academic Press.*, New York, (1971).
- [146] Axen, R.; Vredblad, P.: *Acta Chem. Scand.*, 25 (1971) 2711.
- [147] Vredblad, P.; Axen, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15 (1973) 783.
- [148] Hider, S.; Marchessault, R. H.: *J. Polymer Sci. Part C*, 11 (1965) 97.
- [149] Weetall, H. H.; Hers, L. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 206 (1970) 54.
- [150] Messing, R. A.; Weetall, H. H.: *U. S. Pat.*, 3 (1970) 519,538.
- [151] Krystera, M. A.; Blagow, S. R.; Sokolov, T.T.: *J. Appl. Biochem.*, 6 (1984) 367.
- [152] Yildiz, H. B.; Kiralp, S.; Toppare, L.; Yağcı, Y.: "Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/PMMA-co-PMTM graft copolymers", *J. Appl. Polym. Sci.*, 96 (2005) 502-507.
- [153] Flor, P. Q.; Hayashida, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25 (1983) 1923.
- [154] Cabral, J. M.; Kennedy, J. F.: "Covalent and Coordination Immobilization of Proteins", in *Immobilized Proteins*, New York, (1991) pp. 30.
- [155] Messing, R. A.: in Moo-Young, M (ed.) *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, Oxford, Vol. II, (1985) pp, 191-201.
- [156] Soloman, B.; Levin, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16 (1974) 1161.
- [157] Arıca, Y.M.; Hasırcı, V.N.: "Immobilization of Glucose Oxidase; a Comparison of Entrapped and Covalent Bonding", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 58 (1993) 287-292.
- [158] Chang, T.M.S.: "Microencapsulation of Enzyme and Biological Methods in Enzymology", Ed. by Mosback, K., *Academic Press Inc.*, New York, 44 (1976) 201.
- [159] Saburo, F.; Atsuo, T.: "Application of biocatalyst immobilized by polymer methods", *Enzyme Engineering*, Plenum Press, New York, (1985).

- [160] Arica Y. M.; Hasirci, V. N.: "Immobilization for the production of membrans", *Biomaterials.*, 8 (1987) 489.
- [161] United States Patent, Patent Number: 4,540,762. Date of Patent: 10.09.1985
- [162] Kataoka, T.; Iwama, T.; Setta, T.; Takagi, A.: "Preparation of Sulfonamides from Sodium Sulfonates: $\text{Ph}_3\text{P} \cdot \text{Br}_2$ and $\text{Ph}_3\text{P} \cdot \text{Cl}_2$ as a Mild Halogenating Reagent for Sulfonyl Bromides and Sulfonyl Chlorides", *Gifu Pharmaceutical University*, 6-1, Mitahora-higashi 5-chome, Gifu 502, Japan, (1997) 423-426.
- [163] Bradford, M.: "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [164] Stoscheck, C.: "Quantification of Protein", *Methods in Enzymology*, 182 (1990) 50-68.
- [165] Bernfield, P. Enzymes of starch degradation and synthesis in, *Advances in Enzymology XII*, F, Nord; Interscience Publication: NY, 1951, 379.
- [166] Robyt, J. F.; Whelan, W. J.: "Reducing value methods for maltodextrins: 1. Chain lenght dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-lenght indepenence of alkaline copper.", *Analytical Biochemistry*, 45 (1972) 510-516.
- [167] Yim, S. K.; Yun, S. J.; Yun, C. H.: "A Continuous Spectrophotometric Assay for NADPH-cytochrome P450 Reductase activity Using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl.", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 37, 5 (2004) 629-633.
- [168] Demircioğlu, H.; Beyenal, H.; Tanyolaç, A.; Hasirci, N.: "Entrapment of Urease in Glycol Containing Polymeric Matrices and Estimation of Effective Diffusion Coefficients of Urea", *Polymer*, 36 (1995) 4091-4096.
- [169] Johanson, G.; Moore, S. W.: "Catalytic Antibodies with Acetylcholinesterase Activity", *Journal of Immunological Methods* 269 (2002) 13-28.
- [170] Chiou, S.H.; Wu, W. T.: "Immobilization of Candida Rugosa Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups", *Biomaterials*, 25 (2004) 197-204.
- [171] Park, J. O.; Jang, S. H.: *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, 30 (1992) 723.
- [172] Oishi, T.; Fujimato, M.: *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, 30 (1992) 1821.

- [173] Hocking, M. B.; Syme, D. T.; Axelson, D. E.: *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, 30 (1992) 1821.
- [174] Kahraman, M. V.; Bayramoğlu, G.; Apohan, N. K.; Güngör, A.: *Food Chemistry*, 104 (2007) 1385.
- [175] Pandya, P. H.; Jasra, R. V.; Newalkar, B. L.; Bhatt, P. N.: *Microporous and Mesoporous Mat.*, 77 (2005) 67.
- [176] Liu, B.; Yang, Y. H.; Wu, Z. Y.; Wang, H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q.: “A Potentiometric Acetylcholinesterase Biosensor Based on Plasma-Polymerized Film”, *Sensors and Actuators B*. 104 (2005) 186-190.
- [177] Doonng, R.A.; Tsai, H. C.: “Immobilization and Characterization of Sol-Gel-Encapsulated Acetylcholinesterase Fiber Optic Biosensor”, *Analytica Chimica Acta* 434 (2001) 239-246.
- [178] Tekman, Ş.; Öner, N.: “Genel Biyokimya”, *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*, İstanbul, (1994) 47-49.
- [179] Lee, P. M.; Lee, K. H.; Siaw, S. Y.: “Covalent immobilization of aminoacrylate to alginate for 2-phenyl-alanine production”, *J. Chem. Technol.*, 58 (1993) 65-70.
- [180] Park, D.; Haam, S.; Jang, K.; Ahn, I.-S.; Kim, W.-S.: “Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis”, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 53–61.
- [181] Cosulich, M. E.; Russo, S.; Pasquale, S.; Mariani, A.: “Performance evaluation of hyperbranched aramids as potential supports for protein immobilization.”, *Polymer*, 41 (2000) 4951–4956.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Diyarbakır’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Mersin’de tamamladı. 2006 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Programı’na Yüksek Lisans öğrencisi olarak kabul edildi.