T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANO KALSİYUM KARBONAT ELDESİ ve α-AMİLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI

SEVDA BURCU GÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN

İSTANBUL, 2011

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANO KALSİYUM KARBONAT ELDESİ ve α-AMİLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI

SEVDA BURCU GÖK
(520808013)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN

İSTANBUL, 2011

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL ve ONAY BELGESİ

Sevda Burcu GÖK'ün Nano Kalsiyum Karbonat Eldesi ve Alfa Amilaz Enziminin İmmobilizasyonunda Kullanılması başlıklı Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında YÜKSEK LİSANS/DOKTORA Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Danışman	: Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN, Marmara Üniversitesi
1. Üye	: Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN, Marmara Üniversitesi
2. Üye	: Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN, Marmara Üniversitesi
3. Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hatice Kübra ELÇİOĞLU, Marmara Üniversitesi

Tezin Savunulduğu Tarih: 18.03.2011

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile Sevda Burcu GÖK'ün Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Y.Lisans (MSc.) / Doktora (Dr, PhD.) derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans çalışmamda bana sabırla yol gösteren ve aktarmış olduğu bilgilerle beni geliştiren tez danışmanım Doç. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN'a, çalışmalarımın bir kısmını yapmam için imkânlarını kullanmama izin veren Biyokimya Programı Başkanı Prof. Dr. Ayşe OGAN'a ve başta Araştırma Görevlisi Serap GÜRBÜZ ve Emrah ÇAKMAKÇI'ya, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Yusuf MÜLAZİM'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yükseköğretim ve yüksek lisans eğitimlerimi tamamlamam için bana destek veren Prof.Dr. Canan ERZEN ile her zaman yanımda olan tüm mesai arkadaşlarıma;

Çalışmam boyunca bana her zaman destek ve moral veren tüm çalışma arkadaşlarıma;

Tüm yaşantım boyunca yanımda olan, beni sabırla destekleyen başta canım annem olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞUBAT, 2011 **SEVDA BURCU GÖK**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR ..... **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 **3**

BÖLÜM II GENEL BİLGİLER 4

II.1. ENZİMLER **4**

II.1.1. Enzimlerin Yapısı 5

II.1.2. Enzimlerin Etkisi 8

II.1.2.1. Aktivasyon Enerjisi 8

II.1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler 8

II.1.2.1. pH 9

II.1.2.2. Isı 9

II.1.2.3. Zaman 10

II.1.2.4. Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 10

II.1.2.5. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 11

II.1.3. Enzimlerin Kinetik Özellikleri İçin Michaelis-Menten Hipotezi .. 13

II.2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU 13
II.2.1. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi 16
II.3. α- AMİLAZLAR VE ETKİ MEKANİZMALARI 16
II.3.1. Nişastanın Yapısı 18
II.3.2. α-Amilaz Enziminin Kullanıldığı Alanlar 19
II.3.3. Mikrobiyal Kökenli α-amilaz Aktivitesine Etkili Faktörler 22
II.4. ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN TAŞIYICILAR 24
II.4.1. Morfolojik Yapıya Göre Sınıflama 25
II.4.2. Kimyasal Yapıya Göre Sınıflama 26
II.4.2.1. Doğal Polimerler 27
II.4.2.2. Sentetik Polimerler 32
II.5. ENZİM İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILAN BAŞLICA YÖNTEMLER 33
II.5.1. Çapraz Bağlama Yöntemi 33
II.5.2. Taşıyıca Bağlama 35
II.5.2.1. Kovalent Bağlama 36
II.5.2.2. İyonik Bağlama İle İmmobilizasyon 41
II.5.2.3. Adsorbsiyon İle İmmobilizasyon 42
II.5.3. Tutuklama 43
II.5.3.1. Mikrokapsül İle Hapsetme Metodu 43
II.5.3.2. Kafes Tipi Hapsetme Metodu 44
BÖLÜM III ÇALIŞMALAR 46
III.1. KULLANILAN KİMYASALLAR 46
III.1.1. Diğer Kimyasallar 46
III.2. KULLANILAN CİHAZLAR 47
III.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 47
III.2.2. Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi 47
III.2.3. UV Spektrometre Cihazı 47
III.2.4. Ultrasonik Banyo 47
III.2.5. Hassas Terazi 47
III.2.6. Vakum Etüvü 47
III.2.7. Distile Su Cihazı 47

III.2.8. pH Metre 47
III.2.9. Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı 48
III.2.10. Otomatik Pipetler 48
III.2.11. Su Banyosu 48
III.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 48
III.3.1. Nano $CaCO_3$ Sentezi 49
III.3.2. Sol-jel tekniğiyle $CaCO_3$ Modifikasyonu 49
III.3.3. Enzim İmmobilizasyonu 50
III.3.4. Protein Tayini 51
III.3.4.1. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması 52
III.3.4.2. Bağlanan Enzim Miktarının Belirlenmesi 52
III.3.5. pH 6.9 Sodyum Fosfat Tamponun Hazırlanması 53
III.3.6. Nişasta Çözeltisinin Hazırlanması 53
III.3.7. 3,5-Dinitrosalisilik Asit Renk Reaktifinin Hazırlanması 53
III.3.8. Serbest ve İmmobilize Olmuş α-Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümleri 53
III.3.8. Serbest ve İmmobilize Olmuş α-Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümleri 54
III.3.8.1. Serbest α-Amilaz'ın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi 54
III.3.8.2. Serbest α-Amilaz'ın Aktivitesine pH'ın Etkisi 55
III.3.8.3. Serbest α-Amilaz'ın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi 56
III.3.8.4. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi 57
III.3.8.5. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktivitesine pH'nın Etkisi 58
III.3.8.6. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi 58
III.3.8.7. İmmobilize Edilen α-Amilazın Tekrar Kullanılabilirliği 60
III.3.9. Kinetik Çalışmalar 62
III.3.9.1. Ekstinksiyon Sabitinin (ε) Bulunması 62
III.3.9.2. Serbest Ve İmmobilize α-Amilazın Kinetiği 63

BÖLÜM IV SONUÇLAR..... 66
IV.1. KARAKTERİZASYON **66**
IV.2. NANO KALSİYUM KARBONATIN SEM GÖRÜNTÜLERİ **67**
IV.3. İMMOBİLİZASYON VERİMİ **67**
IV.4. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ **68**
IV.5. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE pH'IN ETKİSİ..... **69**
IV.6. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE DEPOLAMA SÜRESİNİN ETKİSİ **71**
IV.7. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ **72**
IV.8. İMMOBİLİZE EDİLEN ENZİMİN KİNETİK PARAMETRELERİ . **72**
BÖLÜM V SON DEĞERLENDİRMELER..... 74
REFERANSLAR..... 75
EKLER..... 80
ÖZGEÇMİŞ..... 82

ÖZET

NANO KALSİYUM KARBONAT ELDESİ ve α–AMİLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI

Bu çalışmada, nano boyutta kalsiyum karbonat elde edilerek α-amilaz enzimine kovalent bağlanma ile immobilizasyonu incelendi.

Sentezlenen nano kalsiyum karbonat partiküllerinin sol-jel yöntemiyle modifikasyonu gerçekleştirilerek amin fonksiyonel grubu kazandırıldı. Daha sonra glutaraldehit ile partiküller aktifleştirilerek α-amilaz enziminin kovalent bağlanma ile immobilizasyonu gerçekleştirildi.

İmmobilizasyon ile 199.43 mg enzim/1 g silanlanmış nano kalsiyum karbonata bağlandı. İmmobilize enzimin optimum pH'ı 6.5 ta bulundu. Bu değer serbest enziminki ile aynı olmasına rağmen immobilize enzimin daha yüksek aktivite gösterdiği gözlemlendi. Aynı şekilde immobilize enzimin optimum sıcaklığı serbest enziminki ile aynı değer olan 30^{o}C'de bulundu. Yine immobilize enzimin bu sıcaklıkta serbest enzime göre daha yüksek sıcaklıkta aktivite gösterdiği gözlemlendi. Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilirken, immobilize enzim 25. kullanımında başlangıç akivitesinin hala % 18'ini koruduğu belirlendi. Serbest enzim 15 gün içinde aktivitesini kaybetmiştir. İmmobilize enzim ise 40 gün içinde aktivitesinin sadece % 29'unu kaybetmiştir.

ŞUBAT, 2011 **SEVDA BURCU GÖK**

ABSTRACT

PREPARATION OF NANO CALCIUM CARBONATE FOR α-AMYLASE ENZYME IMMOBILIZATION

In this study nano-sized calcium carbonate was produced and α-amylase enzyme was immobilized covalently.

The modification of the synthesized nano calcium carbonate particles was performed by sol-gel method and amine functionality was introduced. The nano particles were activated by glutaraldehyde and α-amylase enzyme was immobilized covalently.

By immobilization, 199.43 miligrams of enzyme was attached to 1 gram of silane modified nano calcium carbonate. The optimum pH for the immobilized enzyme was found as 6.5. Although this value was same as the pH of the free enzyme, it was seen that the immobilized enzyme showed higher activity than the free enzyme. Likewise, the optimum temperature of the free enzyme and the immobilized enzyme was same and found as 30 ^{o}C. Again in this temperature, the immobilized enzyme showed higher activity than the free enzyme. While the free enzyme can be used once, it was shown that the immobilized enzyme retained 18% of its initial activity after 25 cycles. The free enzyme lost its activity within 15 days. On the other hand the immobilized enzyme lost only 29% of its initial activity after 40 days.

ŞUBAT, 2011 **SEVDA BURCU GÖK**

SEMBOLLER

A : Absorbsiyon değeri

C : Örneğin konsantrasyonu (µmol/ml)

EA : Aktivasyon enerjisi

IU : Glukoamilaz aktivite birimi (µmol/dakika)

Km : Michaelis-Menten sabiti (mg/mL)

l : Işığın aldığı yol (cm)

m : Doğrunun eğimi

pH : Ortamın asitliği (0-14)

S : Nişasta Konsantrasyonu (mg/mL)

Vmax : Maksimum reaksiyon hızı (mg/dakika×mL)

ΔA : En büyük absorbsiyon değeri ile en küçük absorbsiyon değeri arasındaki fark

ΔG : Serbest enerji

Δt : En büyük absorbsiyon değerinin meydana geldiği zaman ile en küçük absorbsiyon değerinin meydana geldiği zaman arasındaki fark

α : Alfa

ε : Ekstinksiyon sabiti (mL/mg×cm)

λ- : Lambda

KISALTMALAR

PEG **:** Poli (etilen glikol)

(ES) **:** Enzim-substrat kompleksi

FTIR **:** Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi

GA **:** Glukoamilaz

NMR **:** Nükleer Magnetik Rezonans

SEM **:** Taramalı Elektron Mikroskobu

TGA **:** Termogravimetrik Analiz Cihazı

UV **:** Ultraviole

ŞEKİLLER

SAYFA NO

Şekil II.1. Enzim-substrat ilişkisi 8

Şekil II.2. Enzimin aktifliğine pH'ın etkisi 9

Şekil II.3. Enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi 10

Şekil II.4. Enzimin aktifliğine konsantrasyonun etkisi 10

Şekil II.5. Enzimin aktifliğine substrat konsantrasyonun etkisi 11

Şekil II.6. Michaelis-Menten eğrisi 13

Şekil II.7. Enzim immobilizasyonu yöntemleri 15

Şekil II.8. Amilaz birimleri 17

Şekil II.9. Amiloz molekülünde tekrarlanan glukoz birimleri 18

Şekil II.10. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi 19

Şekil II.11. Amiloz ve Amilopektinin yapısı ve glikoza parçalanması 20

Şekil II.12. Selülozun yapısı 27

Şekil II.13. Dekstranın yapısı 28

Şekil II.14. Agarozun yapısı 29

Şekil II.15. Poligluteraldehit kullanarak enzim immobilizasyonu 33

Şekil II.16. Glutaraldehit ile moleküller arası çapraz bağlanma 34

Şekil II.17. Enzimdeki -NH2 gruplarının oligomerlerle konjugasyon reaksiyonu 35

Şekil II.18. Tipik Sol-Jel Oluşum Basamaklarının Şematik Görünüşü 39

Şekil III.1. Sol-jel tekniğiyle $CaCO_3$ Modifikasyonu 50

Şekil III.2. Enzim immobilizasyonu 51

Şekil III.3. BSA'nın kalibrasyon eğrisi 52

Şekil III.4. Maltozun kalibrasyon grafiği 53

Şekil III.5. Serbest α-Amilazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi 55

Şekil.III.6. Serbest α-Amilaz'ın pH –(%)Aktivite grafiği 56
Şekil III.7. α-Amilaz'ın Depolama süresi (gün)-(%) aktivite grafiği 57
Şekil III.8. İmmobilize α-Amilaz'ın sıcaklık(^{o}C)- % Aktivite grafiği 57
Şekil III.9. İmmobilize Enzimin pH –(%)Aktivite grafiği 58
Şekil III.10. İmmobilize enzimin zaman (gün)-(%) aktivite grafiği 60
Şekil III.11. İmmobilize enzimin kullanım sayısı-(%) aktivite grafiği 62
Şekil III.12. Nişasta konsantrasyonu (mg/mL)–absorbans grafiği 63
Şekil III.13. Serbest ve immobilize enzimin Linewear-Burke eğrisi 65
Şekil III.14. Linewear-Burke Grafiği 65
Şekil IV.1. Modifiye edilmiş nano kalsiyum karbonat partiküllerinin FTIR spekturumu 66
Şekil IV.2. Nano kalsiyum karbonatın SEM görüntüsü 67
Şekil IV.3. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine sıcaklığın etkisi 69
Şekil IV.4. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine pH'nın etkisi 71
Şekil IV.5. Bir enzim tepkimesinde substrat (S) konsatrasyonu ile hız (v) arasındaki ilişkiyi gösteren doyma eğrisi 72

TABLOLAR

SAYFA NO

Tablo II.1. Elde edildikleri kaynaklara göre α-amilaz enziminin bazı özellikleri . 20

Tablo II.2. Hamur fermantasyonunda rol oynayan başlıca enzimler 21

Tablo III.1. İmmobilize Enzimin Depolama Süresince Absorbans ve Aktivite Değerleri..... 59

Tablo III.2. "Devam" İmmobilize Enzimin Depolama Süresince Absorbans ve Aktivite Değerleri 60

Tablo III.3. Tekrar Tekrar Kullanılan İmmobilize Enzimin Absorbans ve Aktivite Değerleri 61

Tablo III.4. Nişasta konsantrasyonu, immobilize enzimin maltozu açığa çıkarma hızı ve absorbans değerleri..... 64

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerde sentezler, parçalamalar ve değişik bileşiklerin kısmi dönüşümleri gibi reaksiyonları katalizlerler ve genellikle protein yapıdadırlar. Endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimlerin kullanımı pek çok avantaj sağlamaktadır. İlk öne çıkan avantajları yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları özgüllükleridir. Enzimler sadece reaksiyonlara karşı değil substratlara karşı da yüksek özgüllük sergilediklerinden istenilen tek bir son ürünün oluşumunu sağlamakta ve gereksiz yan ürünlerin oluşmasını engellemektedirler. Bu da yüksek reaksiyon verimini sağladığından dolayı maliyeti düşürmektedir. Bunlara ek olarak enzimler diğer katalizörlere kıyasla daha ılıman şartlarda çalıştıklarından enerji sarfiyatını dolayısıyla işletme maliyetini düşürmektedirler. Çevre boyutu ele alındığında enzimlerin protein yapıda olmaları biyolojik olarak bozundurulabilmelerine olanak tanır ve atık yönetimini kolaylaştırır. Tüm bu özelliklerinden dolayı 1960'lardan bu yana enzimlerin endüstriyel kataliz olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır**.** Önemli avantajlarının yanında enzimlerin pratik kullanımında bazı sorunlarla karşılaşılmaktadır. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinin yüksek maliyete neden olması, doğadaki ortamlarından izole edildikleri takdirde proses koşullarına olan duyarlılıkları, enzimlerin katalitik aktiviteleri için önemli olan moleküler yapılarının yüksek sıcaklık, düşük ya da yüksek basınç, organik çözücülerin varlığında hatta diğer katalizörler için elverişli olan ortamlarda bozunmaya yatkınlık göstermeleri, kısa kullanım zamanları, diğer konvansiyonel heterojen katalizörlerin aksine çoğu enzimin suda çözünmüş olarak, homojen katalizör sistemlerinde işlev göstermeleri dolayısıyla ürüne kontamine olmaları ve reaksiyon karışımından aktif formda yeniden kullanım için geri elde edilememeleri serbest enzimlerin endüstriyel kullanımında karşılaşılan problemlerdendir. Serbest enzimlerde görülen bu dezavantajları ortadan kaldırmak

için pek çok metot denenmektedir. İmmobilizasyon bu amaçla kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir. İmmobilize enzimler, "fiziksel olarak hapsedilmiş veya kesin olarak tanımlanmış bir bölgeye, sahip oldukları katalitik aktiviteyi koruyarak yerleştirilmiş, tekrarlı ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler" olarak tanımlanırlar. Suda çözünmeyen destek malzemelere immobilize edilen enzimler serbest olanlara oranla çok daha avantajlıdırlar. Öncelikle serbest enzimlere oranla çok daha güçlü, ortam koşullarına karşı çok daha dirençlidirler. Ayrıca meydana getirdikleri heterojen sistem sayesinde hem enzimin hem de ürünün ortamdan uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadırlar. Kesikli proseslerde tekrar kullanım, sürekli proseslerde de uzun süreli kullanım sağlaması da bir diğer önemli avantajlarıdır**.**

İmmobilizasyon fikri 1970'lerde geliştirilmiştir ve bu yöntemi ticari amaçla kullanan ilk şirket Japonya'da kurulan Tanaka Seiyako Şirketi'dir**.** Bununla beraber immobilizasyon prensipte, şu durumlar için kazançlıdır:

- Pahalı enzimler için (penisilin ve açilaz gibi)
- Düşük molekül ağırlıklı substratlar için (şeker ve aminoasit gibi)
- Mikrobiyal kontaminasyonların meydana gelebileceği proseslerin kontrolü için (Bu koşulda steril substrat ya da 60^{o}C'den daha yüksek bir reaksiyon sıcaklığı yardımcı olacaktır.)
- Ürünün enzimden tamamıyla arındırılmış olması gereken durumlar için (*allergen-free diets* gibi) **[1].** İmmobilize enzimlerin çözünür enzimlere olan üstünlükleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:
- Enzimler tekrar tekrar kullanılabilir,
- Katalitik prosesin sürekli bir şekilde çalıştırılması, kolaylıkla kontrol edilmesi mümkün olur,
- Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilebilir,
- Ürünler kolaylıkla ortamdan ayrılabilir,
- 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 **[2]**.

Birçok endüstüriyel alanda kullanılmakta olan immobilize enzimler, serbest formlarına göre çeşitli avantajlar sağlarlar **[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 Nigerden elde edilen GAI enziminin molekül ağırlığı 82500'dür ve 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 **[3,4]**.

I.2 AMAÇ

Bu çalışmada α-amilaz enzimini immobilize etmek için öncelikle nano kalsiyum karbonat partikülleri sentezlenerek, enzimle kovalent bağlanması sağlanacaktır. Nano kalsiyum karbonat partikülleri aminoalkoksisilan ve glutaraldehit ile aktifleştirilerek α-amilaz enzimi kovalent olarak immobilize edilecektir. İmmobilize edilen enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri, tekrar kullanılabilirlik, raf ömrü gibi özellikleri immobilize olmayan α-amilaz enzimiyle karşılaştırılacaktır. Elde edilecek sonuçlara göre immobilize olan enzimin kullanılabilirliği tartışılacaktır. Enzimlerin pahalı oluşu, geri kazanılmasının zor olması, fazla enzimin giderilmesi için ekstra kimyasal kullanılması gerekliliği, enzimin dayanım şartları, iyileştirilmesi vb. gibi sebeplerden dolayı enzim immobilizasyonu sürekli çalışılan dinamik bir konudur. Elde edilecek sonuçlara göre immobilize olan enzimin endüstride rutin işlemlerde kullanılabilirliği tartışılacaktır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. ENZİMLER

Enzimler, canlı organizmada oluşan tüm reaksiyonların hızlı bir şekilde koordine edilmesini sağlayan protein ana yapılı spesifik biyokatalizörlerdir. Tüm canlılarda bulunan bu enzimler hücrelerde gerçekleşen birçok biyokimyasal reaksiyonun katalizini canlı hücreye zarar vermeden ve hızlı bir şekilde gerçekleştirir. Enzimler metabolizmada yapım, yıkım, hidroliz, elektron aktarımı gibi olaylarda görev alırlar. Kimyasal katalizörlere kıyasla sahip oldukları katalitik güç, spesifiklik ve düzenlenebilirlik özelliklerinden dolayı da avantajlı moleküllerdir. Uygun koşulların sağlanması durumunda da enzimler *in vitro* olarak da katalitik etki gösterebildikleri için pek çok alanda da kullanılabilmektedirler.

Enzimler binlerce yıl öncesinden bu yana insanlığa hizmet etmiş olup ilk biyoteknolojik işlemler olarak kabul edilen ekmek, yoğurt, bira, şarap, peynir gibi ürünlerin hazırlanmasında bilinmeden kullanılmışlardır. Geçtiğimiz yüzyıldan itibaren ise enzim alanında yapılan çalışmalar arttırılmıştır. Spallanzani (1783) tarafından atmaca mide suyunun eti yumuşattığının bulunması, Kirchoff (1811)'un buğday nişastasının zamanla dekstirn ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, Robiquet, Boutron ve Chaland (1830)'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmeleri, Payen ve Persoz (1833)'un nişastayı şekere dönüştüren bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri ve hücre dışı enzimatik aktivitenin varlığının anlaşılması enzimoloji alanında yapılan ilk temel çalışmalar olmuştur. Enzimler keşfedildikleri ilk yıllarda ferment olarak adlandırılmış olsa da ilk kez Berzelius (1838) enzimler için katalizör (biyokatalizör) ifadesini kullanmış ve ardından Künhe (1878) enzim terimini kullanan ilk kişi olmuştur. 1800'lü yılların sonuna doğru Emil Fischer enzimlerin substratlarına olan özgünlüklerini ortaya koyarak anahtar-kilit modelini tanımlamış ve bazı temel kavramların enzimoloji

alanına girmesini sağlamıştır. Summer (1926)'ın kristalize formda üreaz enzimini ilk olarak elde etmesiyle enzim saflaştırma ve kristallendirme çalışmaları hız kazanmıştır. 1950 yılına dek pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi proteolitik enzimlerin bulunduğu pek çok enzim saflaştırılırak kristalize edilmiştir. Svedberg tarafından gerçekleştirilen ultrasantrifüj tekniği ile enzimlerin molekül kütlelerine göre ayrımının yapılabileceğinin belirtilmesi, 1960 yılında ribonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması, 1965 yılında lizozimin 3 boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar olmuştur. 1950-1960 yılları arasında yapılan enzimolojik çalışmalardan enzimlerin yapısal esnekliği ile ilgili bilgiler ortaya çıkmış ve 1958 yılında Koshland, enzimlerin katalitik gücü ve özgünlüğünü açıklamak üzere indüklenmiş uyum (induced fit) modelini önermiştir. Aminoasit prekürsörlerinden ribonükleaz enziminin kimyasal olarak sentezi ilk kez Merrifield ve ark. (1969) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu alanda yapılan önemli bir gelişme olmamasına rağmen hazırlanan preparatın katalitik aktivitesi ve kimyasal saflığı oldukça düşük olmuştur.Enzimler kullanım amaçlarına göre 3 grupta toplanabilir:

1. Üretime yönelik çeşitli reaksiyonların katalizinde kullanılan saflık dereceleri düşük olan *endüstriyel enzimler,*
2. Bilimsel araştırma ve analitik amaçla kullanılan saflık dereceleri yüksek *analitik enzimler,*
3. Çeşitli fizyolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve saflık derecesi oldukça yüksek *klinik enzimler* **[5].**

II.1.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler polipepdit zincirler halinde sentezlenmektedir. Ancak,enzimin aktivite kazanabilmesi için polipeptidin sekonder, tersiyer ve bazı hallerde de kuarterner yapı kazanması gerekmektedir. Enzimi oluşturan polipepdit zincirinin primer yapısı, bu enzimin sentezinden sorumlu olan genler tarafından tayin edilmektedir. Eğer enzim tek polipeptit zincirden meydana gelmiş ve bir tek monomerden oluşmuş ise tersiyer yapıdan sonra enzim tamamen aktiftir. İki veya daha fazla monomerden veya subüniteden meydana gelmiş olan enzim moleküllerinin alt birimleri aktivite gösterebilmek için daha üst yapılar meydana getirmek üzere belli bir düzen dahilinde bir araya gelmek zorundadır. Bu yapı şekli

kuarterner yapıdır. Enzim molekülleri genellikle iki yada daha fazla monomerden oluştukları için kuarterner yapıdadırlar. Ribonükleaz 1, hekzokinaz 2, adenilat kinaz 3, laktat dehidrogenaz 4, glutamin sentetaz 12 ve piruvat dehidrogenaz kompleksinde 72 subünite bulunmaktadır. Enzim proteinindeki amino asitlerin özel dizilişi enzimin özel bir konformasyon ve kuarterner yapıyı kazanmasında en önemli rolü oynamaktadır.

Bazı enzimler (pepsin, tripsin, kimotripsin) yalnız aminoasitlerin birbirlerine eklenmesi ile meydana gelen proteinlerden oluşmuştur. Bunlarda aminoasitler dışında başka yapıtaşı bulunmaz. Diğer bazı enzimler ise aminoasitlerden başka grupları da ihtiva etmektedirler. Enzimlerin yapısında yer alan ve aktivite göstermeleri için mutlaka gerekli olan, ancak protein yapısında bulunmayan, genellikle metal iyonlarından oluşan yan gruplara 'Kofaktör' adı verilmektedir. Sitokrom oksidaz Cu^{2+}, DNA-polimeraz Zn^{2+}, Üreaz Ni^{2+}'e kofaktör olarak ihtiyaç duymaktadır.

Çoğu enzim kendi substratlarını ancak özgül, ısıya dayanıklı, düşük molekül ağırlıklı bir organik molekülün varlığında etkileyebilirler. Enzimlerin aktivite göstermek için ihtiyaç duydukları kompleks organik moleküllere de 'Koenzim' denilmektedir. Örneğin; Süksinik dehidrogenaz FAD'e, piruvat karboksilaz biyotin'e, GOT pridoksal fosfata itiyaç duymaktadır. B grubu vitaminler koenzim olarak rol oynamaktadır. Bu nedenle vitaminler organizmada son derece önemli maddelerdir. Koenzimler, fonksiyonlarına göre genellikle üç grupta incelenebilirler:

1. Hidrojen ve elektron transfer eden koenzimler
2. Fonksiyonel grup transfer eden koenzimler.
3. Liyaz, izomeraz ve ligazların koenzimleri

Koenzimler spesifik atomların veya fonksiyonel grupların transfer edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Koenzimler, çoğu zaman ikinci bir substrat gibi davranırlar. Bu nedenle, bu tür koenzimlere Kosubstrat da denir. Örneğin, oksidoredüksiyon reaksiyonlarında (dehidrogenaz reaksiyonlarında) yer alan NAD ve NADP kosubstrat olarak davranır. Bir molekül substrat oksitlenirken bir molekül koenzim redüklenir.

Bazı hallerde enzim aktivitesi için hem kofaktöre ve hem de koenzime ihtiyaç duyulabilir. Kofaktörler genellikle ısıya dayanıklıdır. Kofaktör ve koenzimler

enzimlere kovalent ya da kovalent olmayan şekilde bağlanabilirler. Bunlar enzime kovalent bir şekilde bağlanmışlar ise genellikle diyalizle bunları enzimden ayırmak mümkün olmaz. Enzime kovalent olarak bağlanan ve protein yapısında olmayan bu gruplar prostetik grup olarak adlandırılmıştır.

Kofaktör yada koenzimin bağlanmadığı enzime 'Apoenzim' denir. Apoenzim kendi başına katalitik aktivite gösteremez. Ancak kofaktör, koenzim ya da her ikisi ile birleştiğinde katalitik aktivite gösterebilir. Kofaktör ve/veya koenzimle birleşmiş halde olan, yani katalitik aktivitesi tam olan enzime 'holoenzim' denir. Enzimin özelliği ve özgüllüğü (spesifikliği) apoenzime bağlı olduğundan koenzimi aynı olan fakat etkileri farklı olan pek çok enzim vardır.

Enzim üzerinde, apoenzimi oluşturan aminoasitlerin özel gruplaşmaları ile oluşan, substratın bağlanması için gerekli üç boyutlu bölgeye enzimin 'aktif yeri', 'aktif merkezi' denir. Aktif merkezde sadece aminoasitler değil çeşitli kofaktör ve koenzimler de yer almaktadır. Örneğin katalaz enziminin aktif merkezinde demir bulunmaktadır.

Enzimlerin bir kısmı inaktif prekürsörler olarak sentezlenirler. Daha sonra bu proteinde bir veya birkaç pepdit bağının koparılması ile enzim aktif hale dönüşmektedir. Bu inaktif enzimlere 'zimojen' (proenzim) denir. Zimojenleri aktifleştiren enzimler kinaz'lardır.

Aynı substrata etkili olan fakat birden fazla şekilde bulunan enzimlere 'izoenzim' denir. Bu farklı enzim formalarının tümüde aynı reaksiyonu kataliz ederler ve bu nedenle de aynı enzim gibi sınıflandırılırlar. Bunlar değişik şartlarda bile (pH, ısı, ışık) aynı etkiyi gösterirler. İzoenzimlerin protein yapısı birbirlerinden küçük farklar gösterir, dolayısıyla bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri de farklıdır. Ancak elektroforezde birbirlerinden ayrılabilirler.

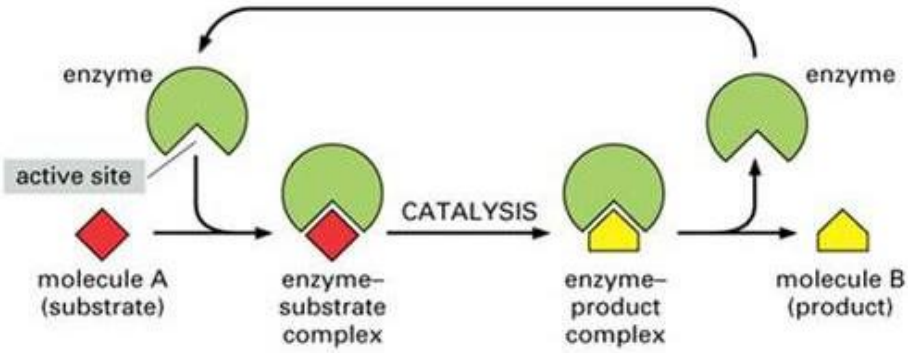
Başta laktat dehidrogenaz (LDH) olmak üzere kreatininkinaz (CK), hekzokinaz, aldolaz, alkali fosfataz vb enzimlerin izoenzimleri saptanmıştır. Klinik kimyada en çok çalışılmış olan izoenzimler LDH ve CK izoenzimleridir. Izoenzimler elektroforezle, absorbtif özelliklerindeki farklarla (kolon kromatografisi) yada özgül antikorlarla birbirlerinden ayrılırlar.

II.1.2. Enzimlerin Etkisi

Enzimlerin etki mekanizması iki farklı açıdan ele alınabilmektedir. Bunlardan birincisi tepkime süresince gerçekleşen enerji değişikliklerinin, diğeri ise kataliz sırasında aktif bölgedeki yapısal değişikliklerin incelenmesi ile ilişkilidir.

II.1.2.1. Aktivasyon Enerjisi

Moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerede aktivasyon enerjisi olarak adlandırılan bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Enerji engeli ne kadar yüksek olursa birim zaman içerisinde bu engeli aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır. Reaksiyon hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda katalizör substrat ile (ES) kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir.



Şekil II.1. Enzim-substrat ilişkisi

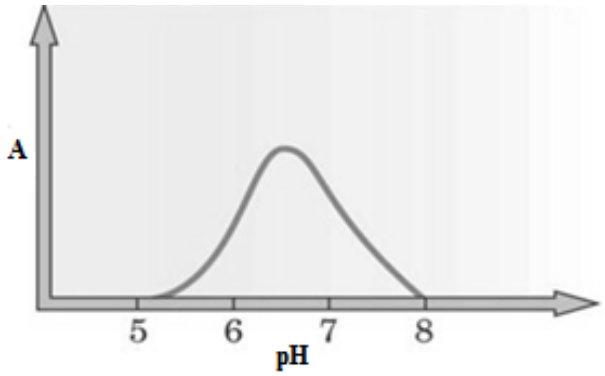
Hidrojen peroksidi ele alalım. H_2O_2'nin su ve oksijene yıkılması bir mol hidrojen peroksit için 18 kcal aktivasyon enerjisi gerektirir. Katalist olarak kimyasal bir katalizör; demir kullanılırsa bu değer 13 kcal, platin kullanırsa 12 kcal'e iner. Bir karaciğer enzimi olan katalaz ise aktivasyon enerjisini 2 kcal'e düşürür.

II.1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını etkileyen faktörler arasında pH, ısı, ışık ve diğer fiziksel faktörler, enzim konsatrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman, reakasiyon ürünleri, ortamda çeşitli iyonların varlığı, hormonların ve diğer biyokimyasal faktörlerin etkisi sayılabilir.

II.1.2.1. pH

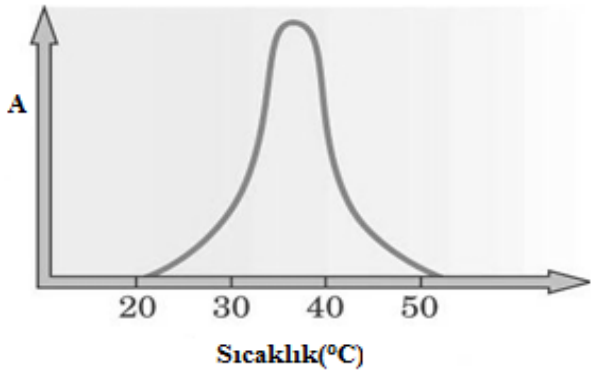
Enzimin reaksiyon hızı, ortamın pH'ına da bağlıdır. Belirli bir pH alanında enzimin etkisi daha fazladır. Bir enzimin reaksiyonu en fazla hızlandırdığı pH'ya enzimin optimum pH'sı denir. Örneğin pH yaklaşık 1-2 arasında en kuvvetli etki gösteren pepsin nötral ve alkali ortamda hiç etkili değildir. Optimum pH'sı 8 olan tripsin ise asidik pH da etkili değildir. Alkalen fosfataz pH 10'da en aktiftir. Optimum pH'nın aşağısında ve yukarısında reaksiyon hızı azdır.Belirli bir pH da enzim tamamen etkisiz kalır ve çok defa tahrip olur. Enzimlerin çoğunun optimum pH'sı 4-11 arasında olmakla beraber, istisnalar da mevcuttur**.**



Şekil II.2. Enzimin aktifliğine pH'ın etkisi

II.1.2.2. Isı

Enzimatik reaksiyonun hızı ısı ile de artar. Isının başlangıçta her 10^{o}C artışı enzim aktivitesinin %100 artmasına neden olur. Her 10^{o}C'lik ısı artışı için reaksiyon hızında meydana gelen artışa "o reaksiyonun ısı katsayısı" denir ve Q10 ile gösterilir. Fakat belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra enzimler de diğer proteinler gibi denatüre olurlar ve etkilerini kaybederler. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir ısı vardır. Bu ısıya o enzimin optimum ısısı denir. Hayvansal enzimlerin çoğunun optimum ısısı 40-50^{o}C arasındadır.Bitkisel kaynaklı enzimler daha yüksek sıcaklığa dayanıklıdır, optimum ısıları 50-60^{o}C arasındadır.



Şekil II.3. Enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisi

II.1.2.3. Zaman

Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10'unun sarfedildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

II.1.2.4. Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

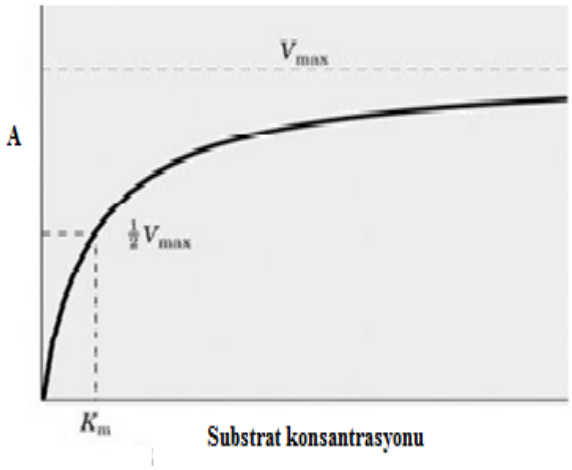
Enzim reaksiyonunun hızı enzimin substrata doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusal olarak artmaktadır. Ortamda ne kadar çok enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, yeterli substrat olduğu sürece reaksiyon da hızla sürecektir. *invivo* koşullarda enzimin lokalize olduğu yerde herzaman yeterince substrat bulunmadığından dolayı enzim miktarının yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen reaksiyon hızı yukarıda anlatıldığı şekilde olmaz.



Şekil II.4. Enzimin aktifliğine konsantrasyonun etkisi

II.1.2.5. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Enzim konsantrasyonu sabit tutularak substrat konsantrasyonuna bağlı olarak ulaşılan maksimum hız noktası Vmax adını alır. İşte ideal enzim aktivite ölçümü, hız sabitleştiğinde yapılmalıdır. İlk hızın sabit olabilmesi için substrat konsantrasyonunun yüksek olması gerekir. Reaksiyon hızının sabit olması gerekir. Reaksiyon hızının sabit olduğu ve substrat konsantrasyonunda etkilenmediği bu noktada sıfır derece kinetiği söz konusudur. Çoğu kez hız eğrisinden Vmax'ın ulaşıldığı noktayı tespit etmek hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle Vmax'ın yarısına denk gelecek ölçümler yapılır. Reaksiyon hızının 1/2 Vmax ulaştığı zamanki substrat değerine de Michaelis Konstantı denir ve Km ile gösterilir.



Şekil II.5. Enzimin aktifliğine substrat konsantrasyonun etkisi

Substrat konsantrasyonu Km'e eşit olduğu zaman reaksiyon hızı maksimal hızın yarısına ve reaksiyon hızı da kendi maksimal hızının yarısına eşit olduğu zaman Km substrat konsantrasyonuna eşittir. Yukarıdaki şekilde bir eğri elde edildiğinde maksimum hızın yarısına karşılık düşen substrat konsantrasyonu enzimin söz konusu substrat için Michaelis sabitini (Km) verir. Km değerinin 10 katı, hatta daha da iyisi 100 katı substrat konsantrasyonlarında maksimum hızı (Vmax) büyük ölçüde ulaşılır ve reaksiyonun sıfır derece kinetiğine uyması sağlanır. Km'in 10 katı konsantrasyonda substrat kullanıldığında teorik maksimum hızın yaklaşık % 91'ine u Bazı enzimler bu şekilde hiperbolik bir Michaelis-Menten eğrisi vermezler, signoid (S Şeklinde) bir eğri verirler. Bunun nedeni, enzimin birden fazla substrat molekülünü bağlayabilmesidir. Bu tür enzimlere allosterik enzimler denir. Allosterik

enzimler genellikle polimer yapıda moleküllerdir. Organizmadaki biyokimyasal reaksiyonlarda hız belirleyici (hız sınırlayıcı) basamakların enzimleri, genellikle allosteriktir. Çünkü, substrat konsantrasyonu belirli bir düzeye yükselmeden reaksiyon hızlanmaz.

Substrat konsantrasyonu açısından bir önemli durum da, aşırı miktarda ortamda var olan substratın enzimi inhibe etmesidir. Ortamda çok fazla miktarlarda substrat bulması, substrat moleküllerinin enzime bağlanmasını zorlaştırır. Buna aşırı substrat inhibisyonu denir. Enzim analizlerinde substrat konsantrasyonu belirlenirken, buna dikkat edilmelidir.

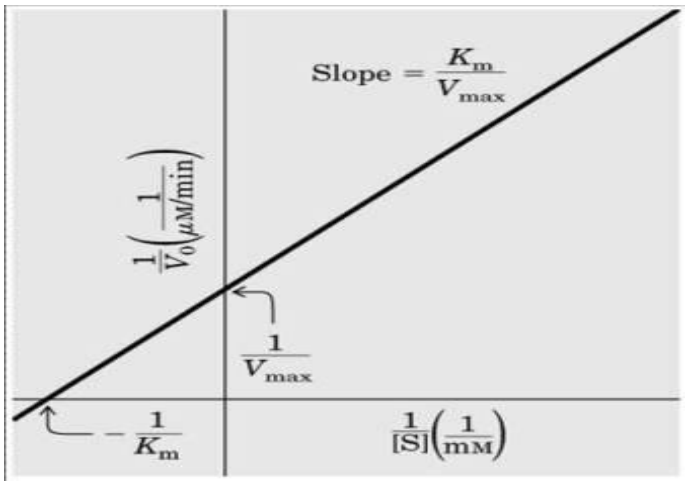
Değişen substrat konsantrasyonu aracılığı ile maksimal hız ve Km tayin edilebilir. Enzimlerin Km değerleri çok değişiktir. Bir enzimin Km değeri özel substrat/substratlarına bağlı olabildiği gibi, ısı, pH, ortamdaki iyonların etkileri gibi çevre şartlarına da tabiidir.

Km nedir?

V max/2 olduğu zaman substrat konsantrasyonunu gösteren Km;

1. Km enzimin bir karekteristiğidir. Bir sıvının kaynama noktası gibi. Ancak birden fazla enzim aynı Km' e sahip olabilir,
2. Km bize substrat için enzim afinitesi hakkında fikir verir. Bir enzim düşük Km' e sahip ise substrat için yüksek afiiniteye sahiptir. Çünkü düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşılmış yani doymuştur.
3. Metabolizmada düşük Km' e sahip (yüksek afinitedeki) enzimler büyük önem taşır. Düşük Km değerleri (1/1.000.000) 10^{-6} M olarak verilir. Veya hatta daha da küçü 10^{-7},10^{-8} M olabilir. Düşük affinitedeki yüksek Km' e sahip enzimler ise metabolizma için az önemlidir. Bu Km değerleri 10^{-2} veya 10^{-1} M olarak verilir.
4. Enzim üzerine bir inhibitör etki ediyorsa Km etki tarzı hakkında bilgi verir. Km Michaelis-Menten hız konstantıdır. Km'in anlamı enzimin aktif yerinin yarısının dolu olduğu substrat konsantrasyonunun ifadesidir.

II.1.3. Enzimlerin Kinetik Özellikleri İçin Michaelis-Menten Hipotezi



[6]

Şekil II.6. Michaelis-Menten eğrisi

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

II.2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak yada küçük moleküllü bir veya çok fonksiyonlu reaktiflerle enzim molekülleri arasında bağ yaparak yani çapraz bağlanarak veya polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketin sınırlandırılması olayına immobilizasyon denir. Bağlama derecesi, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime bağımlıdır **[7].**

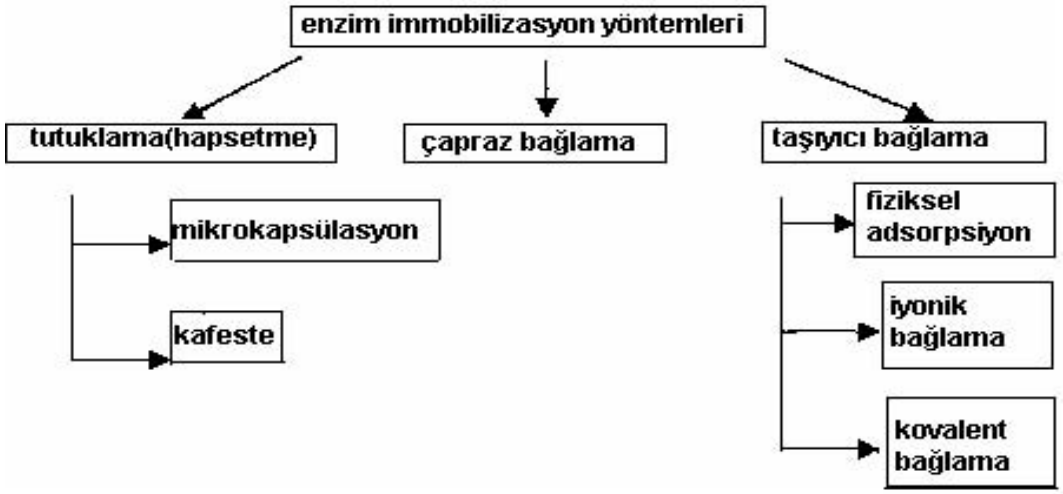
Enzimler, suda çözünen katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiği için serbest enzimlerin katalizör olarak kullanımları önemli sorunlara yol açabilir. Serbest enzim ile gerçekleştirilen bir tepkime durdurulmak istendiğinde, enzim istenilen anda ortamdan uzaklaştırılamadığı için, ancak spesifik inhibitör kullanılarak bu yapılabilir. Bu durumda reaksiyon ürünleri kirletilmiş olur. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması maliyeti yüksek bir işlem gerektirir ve zordur. Ayrıca enzimatik reaksiyonun inhibitör katılarak durdurulması enzimden tam olarak yararlanılmasını engeller. Tepkime sonunda kullanılan serbest çözünür enzimin, aktivitesini yitirmeden geri kazanılması genellikle olanak dışıdır. Bu durum

enzimlerin pahalı olmaları nedeniyle ürün maliyetinin yükselmesine yol açmaktadır. Ayrıca serbest enzimlerin kısmen kararsız olmaları, sürekli sistemlere uygulanamamaları, mekanik dayanıksızlıkları, ürün oluşumunun kontrol zorluğu gibi etkenler enzim immobilizasyonu çalışmalarının artışına neden olmuştur. Enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden, istenilen anda ve kolay bir işlemle uzaklaştırmaya olanak sağlayan çözüm yolu enzimlerin immobilizasyonu yöntemidir. **[7].** Enzimlerin kullanımını sınırlayan en önemli faktör, enzimlerin uygun mikroorganizmalardan elde edilme maliyetinin yüksek olmasıdır. Hücre dışı enzimlerin eldesi, saflaştırılmaları ve aktivitelerini kaybetmeden uygun bir matriks üzerine immobilizasyonları, bu enzimlerin kullanımının en önemli basamağını teşkil eder. **[8].**

İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir**:**

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, sanrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz**.**
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir**.**
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- Mekanistik çarpışmalar için uygundur. Özellikle üretimi zor ve pahalı enzimler için bu önemlidir.
- Matriks enzimi fiziksel bir bariyer olarak koruduğundan, enzim ekstrem pH ve temparatür gibi etkilere dayanıklı hale gelir.
- Sürekli fermentasyonlar için enzimi daha kullanışlı hale getirir.
- İmmobilize enzimler çok daha doğru bir şekilde kontrol edilirler.
- İmmobilize hücrelerle bir çok enzim de immobilize olacağından aynı anda birden fazla reaksiyon gerçekleşebilir.
- Enzimin katalitik gücü kaydadeğer ölçüde stabilize edilmiş olur.
- Üretim maliyeti düşer.

Enzim immobilizasyon yöntemlerini değişik biçimlerde sınıflandırmak mümkündür. Böyle bir sınıflandırma Şekil II.9.'da gösterilmiştir **[7]**



Şekil II.7. Enzim immobilizasyonu yöntemleri

Enzim immobilizasyonu çalışmalarının çeyrek asırlık bir geçmişi vardır. **[9].** Daha 1916 yılında NELSON ve GRİFFEN intervazı aktif kömürde adsorblayarak immobilize etmişler ise de bu çalışmanın amacı enzimi immobilize etmek değil saflaştırmaktı. 1961 yılına dek yapılan çalışmalar sayılı olmakla birlikte özellikle ZİTTLE, MCLAREN, MANECKE, KATHAESKİ ve MİTZ bu araştırma alanına önemli katkılarda bulunmuşlardır **[9].** 1961 yılından sonra enzim immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin uygulamaları üzerindeki çalışmalar giderek yoğunluk kazanmış ve günümüzde ilginç araştırma konularından biri durumuna gelmiştir. 2006 yılında cam küre üzerine α-amilaz enziminin kovalent olarak immobilizesi, 2008 yılında da α-amilaz enziminin fotoimmobilizasyonu, 2009 yılında α-amilazın manyetik özelliğe sahip aljinat küreler içerisine immobilizasyonu gerçekleştirilerek bu enzimin çalıştığı optimum pH, sıcaklık gibi değerleri değiştirilmiş ve bu enzimin kararlılığı artırılmıştır. Son yıllarda enzimler kimya, biyoteknoloji ve diğer endüstri alanlarında çok çeşitli amaçlar için kulanılmaya başlanmıştır.Bu enzimlerin pahalı ve ortem koşullarına dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale 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 uygulanamazlar**[1].** Bu gibi sakıncaları gidermenin en iyi yolu enzim molekülünü bir katı matrikse bağlayarak ya da matris içinde tutuklayarak gerçekleştirilen immobilizasyon işlemidir. Böylelikle enzim molekülü reaksiyon ortamında çözünmez hale getirilerek katalitik proses sonunda kolaylıkla geri kazanabilir ve daha sonraki proseslerde kullanılabilir. Bu nedenlerden dolayı enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için immobilizasyon tekniklerini uygulanması bu problem için çözüm olmaktadır**[10].** Enzim kaynağı ister bitkisel, ister hayvansal isterse mikrobiyal olsun bu biyokatalizörlerin potansiyellerinden yaralanmak gereklidir.

II.2.1. İmmobilizasyon Yönteminin Seçimi

En eski immobilizasyon yöntemi ise enzimin taşıyıcı katı desteğe bağlanmasıdır. Enzimin cinsine göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Bağlanmış enzim miktarı ve enzim immobilizasyonundan sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır **[7].** İmmobilizasyon yönteminin seçiminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır: Kullanım güvenliği, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık. Özellikle enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılan bazı reaktifler zehirli yan ürünlerin oluşmasına da sebep olabilir. Bu durumda hazırlanan biyokatalizörün kullanım güvenliği yoktur. Gıda ya da ilaç sanayinde bu tür immobilize enzimlerin kullanılması mümkün olmaz. Laboratuvarda gerçekleşen birçok immobilizasyon tekniği endüstride büyük miktarlarda üretim için uygun olmayabilir ya maliyeti çok yüksektir ya da immobilizasyon yöntemi birçok işlem gerektirmektedir. Bir enzimin immobilizasyonu için kullanılacak yöntemin seçiminde en önemli kriter, yeterince enzimin immobilize edilmesi ve enzim aktivitesinin korunmasıdır. Genel olarak hem enzimin aktivitesini uzun zaman korumak amacıyla immobilizasyon hem de reaksiyon sırasında aktivitenin çok fazla kaybedilmesi göz önüne alınmalıdır.

II.3. α- AMİLAZLAR VE ETKİ MEKANİZMALARI

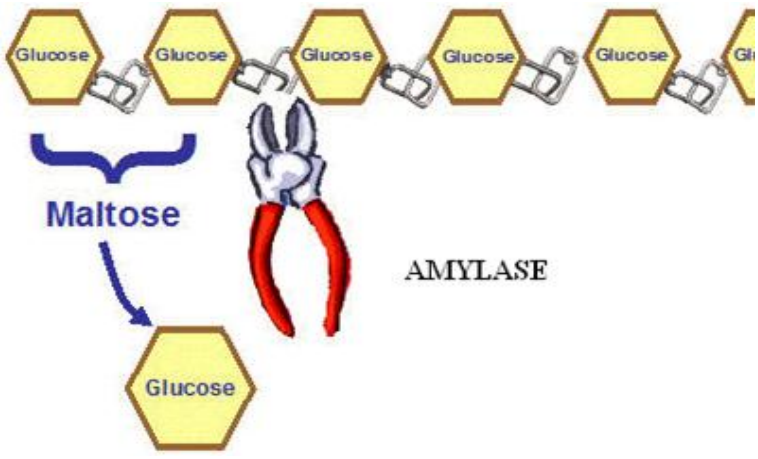
Bu enzimler, bağlı polizomlar üzerinde sinyal peptid adı verilen öncül bir protein ile birlikte sentezlenir. Hidrofobik karakterli olan bu sinyal peptidler α-amilaz enziminin nereye yönlendirileceğini belirlemektedir. α-Amilaz ilgili bölgeye geldikten sonra söz konusu sinyal peptidler proteazlar vasıtasıyla enzim bünyesinden

ayrılır ve serbest kalan enzim de dışarı salgılanır. Ancak enzimin hücre duvarı boyunca mı yoksa spesifik kanallar vasıtasıyla mı salgılandığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. α-Amilaz enzimlerinin sentezi nişasta ya da daha düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritler varlığında uyarılır. α–Amilazlar nişasta moleküllerindeki amiloz zincirlerinin 1,4 bağlarına gelişi güzel etki ederler. İlk etkinin helozonlar arasına düşen 1,4 glikozidik bağlara olduğu kabul edilmektedir. Böylece zincir parçalar ayrılır ve bu kısalmış parçalar yeniden enzim tarafından etkilenir. Son ürün olarak 1/10'u glukoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışım meydana gelir. Enzim amilopektin molekülünün hidrolizinde 1,6 glikozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki gösterememektedir. Amilopektin hidrolizi sonucunda glukoz ve maltoza ilave olarak bir seri dallı sınır dekstrinler oluşmaktadır. Dört veya daha fazla glukoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glukoz bağlarının tümünü içermektedir**[13].** Belli sayıda glukoz ünitesi kalınca dallanma noktasına amilazlar etki edemediğinden bu dekstrinlere sınır dekstrin denmektedir. Ancak bu noktada etkili enzim amiloglukozidazdır.

Çözünür Nişasta + nH2O ------- G1+G2+G3+G4+G5+G6

(Farklı dallanmış oligosakkaritler)

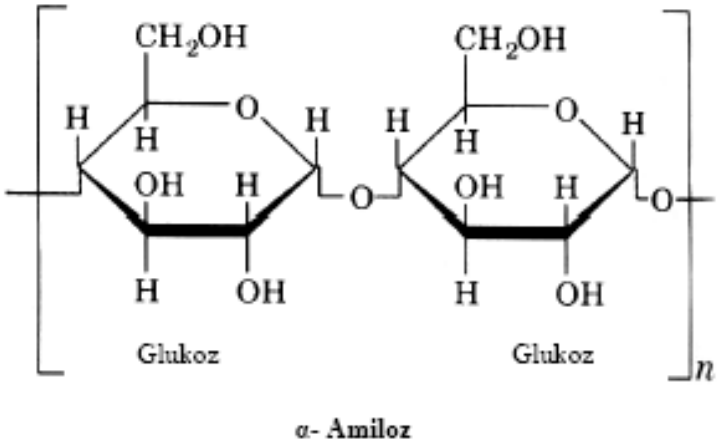
Nişastanın hidrolizi sonucunda ortaya çıkan ürünler α–optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere alfa- amilazlar adı verilmiştir. Bu enzimler substratlarının iç kısımlarındaki α– 1,4 bağlarına atak yaptıkları için bunlara endoamilazlar da denir **[10]** .



Şekil II.8. Amilaz birimleri

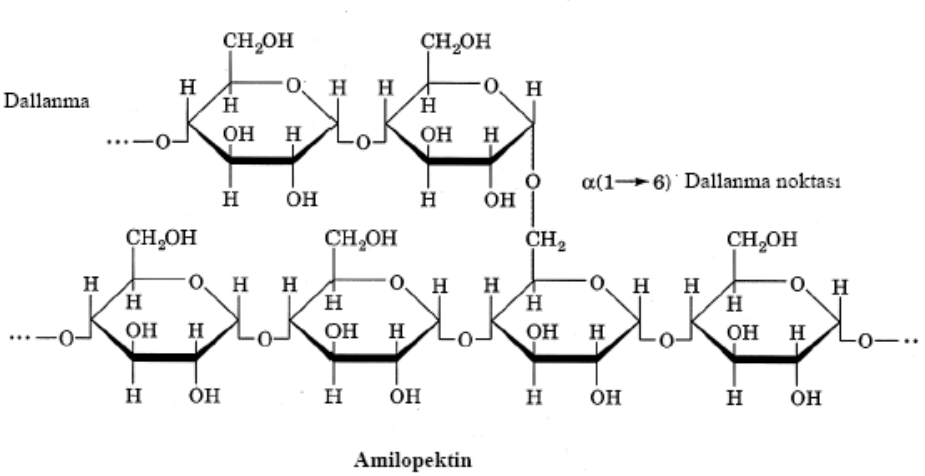
II.3.1. Nişastanın Yapısı

Amilazların substratı olan nişasta, bitkilerin bir depo karbonhidratı olup, D-glukoz birimlerinden oluşan ve ($C_6H_{10}O_5$) kapalı formülü ile gösterilen bir moleküldür. Amiloz ve amilopektin denen 2 farklı yapıdaki polisakkaritten oluşmuştur, dolayısıyla heterojen yapıdadır. Amiloz**,** glukoz moleküllerinin α-1,4 glikozidik bağ ile bağlanmasından oluşur ve dallanmış düz biryapıdadır. 100-700 glukoz biriminden oluşan zincir helezon şekilde kıvrılmış olup her kıvrım 4-6 adet glukoz içermektedir. Amiloz aynı zamanda soğuk suda çözünmez formdadır ve molekül ağırlığı 69000-1000000 dalton arasında değişmektedir. Nişasta molekülünün iç kısımında bulunur ve nişasta moleküllerinin % 15-20'sini oluşturur. Şekil 2.9.' da amiloz molekülünde tekrarlanan glukoz birimleri gösterilmektedir.



Şekil II.9. Amiloz molekülünde tekrarlanan glukoz birimleri

Amilopektin ise dallı bir yapı göstermekte olup glukoz birimlerinin arasındaki 1, 4 glikozidik bağa ilaveten her 24. veya 30. glukoz biriminin 1. ve 6. karbon atomları arasında da yan zincir halinde alfa glikozidik bağlantı içermektedir. Şekil 2.10.' da amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi verilmiştir.



Şekil II.10. Amilopektin molekülündeki dallanma bölgesi

Amilopektindeki düz veya yan zincirler amilozdaki gibi helezonlaşmıştır. 50-2000 veya daha fazla glukoz birimi içermekte olup, dallı yapılar 15 glukoz biriminden oluşmaktadır. Molekül suda kolay çözünür ve molekül ağırlığı 300000-birkaç milyon arasındadır **[10].**

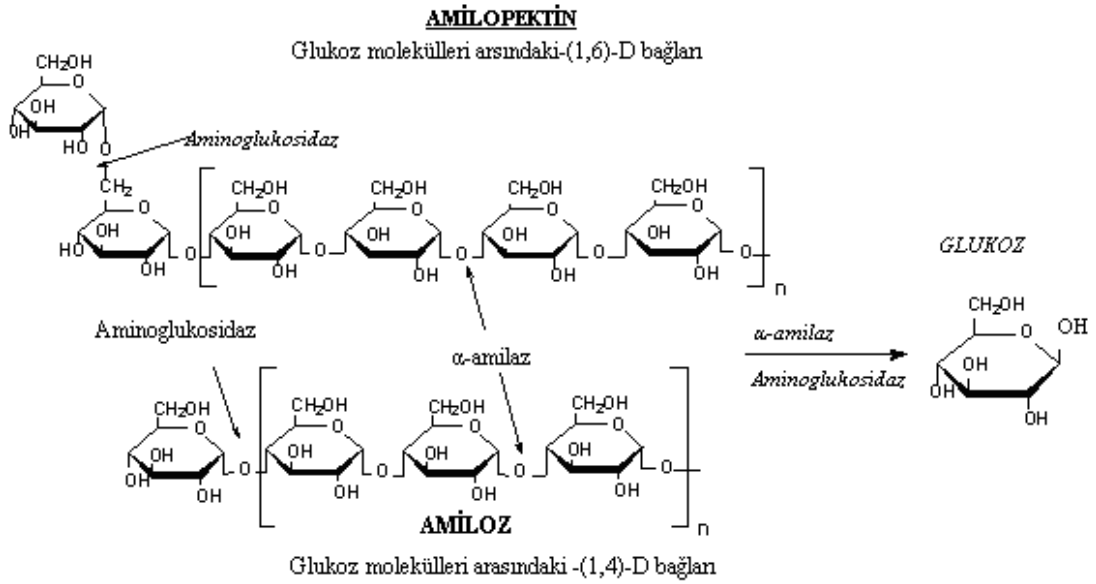
II.3.2. α-Amilaz Enziminin Kullanıldığı Alanlar

α-Amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşıl alma işlemi için ticari amaçla üretilmiştir. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilir. Bu işleme haşıllama (sizing) denmektedir. Kumaş dokunduktan sonra kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması işlemine ise haşıl alma (desizing) denmektedir. Bu amaçla yaygın olarak α-amilaz enzimi kullanılmaktadır. Bu amaçla pankreas amilazı, bakteri amilazı ve malt amilazı kullanılmaktadır. Haşıl alma işleminde bakteriyal kaynaklı α- amilaz kullanımı tercih edilmektedir. Tablo II.1' de elde edildikleri kaynaklara göre α-amilaz enziminin bazı özellikleri verilmiştir**.**

Tablo II.1. Elde edildikleri kaynaklara göre α-amilaz enziminin bazı özellikleri

α-Amilazın cinsi	En uygun pH	En uygun sıcaklık (°C)	Etkili olduğu pH bölgesi	Etkili olduğu sınır sıcaklık (°C)
Pankreas	6.8	50-55	4.5-9.0	60-65
Malt	4.6-5.2	60-65	2.1-8.1	85
Bakteri	5.4-7.0	60-65	2.0-9.0	90 ve üstü

Bu çizelgeden yararlanılarak bakteri kaynaklı amilazların kullanılma nedenleri; sıcağa dayanıklı olmaları, geniş pH aralığında çalışabilmeleri ve haşıl alma işlemini çok kısa sürede tamamlayabilmeleridir. Daha sonraki yıllarda α-amilaz enzimi nişasta işleme endüstrisinde nişasta sıvılaştırma ajanı olarak kullanılmıştır. 1959 yılında ise α-amilaz ve amiloglukozidaz kullanılarak nişastadan toz ve kristal dekstrozun endüstriyel üretimine başlanmıştır.



Şekil II.11. Amiloz ve Amilopektinin yapısı ve glikoza parçalanması

α-Amilaz enziminin diğer bir kullanım alanı ise fırıncılık ürünleridir.Ekmek yapımında gerek fermantasyon gerekse pişirme sırasında ekmeğin kabarmasını, hacim kazanmasını sağlayan CO_2 gazıdır. Maya fermantasyonunun

gerçekleştirilmesi her şeyden önce ortamda yeterli miktarda fermente olabilir şekerin varlığına bağlıdır. Ancak unlarda maya faaliyeti için gerekli fermente olabilir şeker miktarı çok düşük (% 0.1-0.5), nişasta miktarı ise çok yüksektir. Amilaz enzimleri unda mevcut bulunan nişastayı (% 4-10) ve jelatinize olmuş nişastayı parçalayarak fermente olabilir şekerleri oluşturmaktadırlar. Ancak α-amilaz sağlam buğdaydan çekilen unda çok az miktarda bulunmaktadır. Yine unda bulunabilecek α-amilaz miktarı un verimine bağlı olarak değişmektedir. Ülkemizde buğday, özellikle Orta Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde kurak şartlarda yetiştirilmektedir. Buğdayların olgunlaşma devresinin sıcak ve kurak geçmesi ve bu şartlarda hasat edilmesi, protein miktar ve kalitesini artırırken α-amilaz aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla hasat mevsiminde yağmur altında kalmamış silolama şartlarında çimlenmeye yüz tutmamış buğday örnekleri, normal öğütme işlemiyle düşük ve yetersiz α-amilaz aktivitesi göstermektedir. Bu durum ekmeklik unlarda önemli bir problem teşkil etmektedir. Kaliteli ekmek üretimi için optimum α-amilaz aktivitesi düşme sayısı (falling number) olarak 220 (200-250) amilograf pik viskositesi olarak 500 B.U.'dur. halbuki Türkiye buğdaylarında çeşitli araştırma sonucuna göre tespit edilen α-amilaz aktivitesi düşme sayısı olarak 320-350, 315-449, 193-448 olarak tespit edilmiştir. Dekstrojenik bir enzim olan α-amilazların filizlenmemiş sağlam buğdaylarda yeterli miktarda olmaması unların mayalı fermantasyon ürünlerinin imalinde kullanılması halinde α-amilaz takviyesini zorunlu kılmaktadır**.** Tablo II.2.' de hamur fermantasyonunda yer alan enzimler verilmektedir.

Tablo II.2. Hamur fermantasyonunda rol oynayan başlıca enzimler

Enzim	Kaynak	Substrat	Oluşan ürünler
Alfa Amilaz	Un Malt Fungal Bakteriyal	Nişasta	Çözünür nişasta ve Dekstrinler
Beta Amilaz	Un Malt	Dekstrinler	Maltoz
İnvertaz	Maya	Sakkaroz	İnvert şeker (glikoz+ fruktoz)
Maltaz Maya	Maltoz	Glikoz	
Zimaz Maya	İnvert Şeker	CO_2, Glikoz	Alkol Aromatik Bileşikler
Proteaz	Un Fungal Bakteriyal (gluten)	Proteinler	Küçük Protein Zincirleri Aminoasitler

İspirto üretiminde de yine aynı amaçla α-amilaz enzimi kullanılmaktadır**.** Alkol üretiminde hammadde olarak kullanılan nişastalı materyaller α-amilaz enzimi ve amiloglukozoksidaz enzimleri ile muamele edilmektedir**.**

Meyve suyu endüstrisinde de özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında α-amilaz kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyve halen nişasta içermektedir. Bu durum ise meyve sularında bulanıklığa yol açmaktadır. Bu sorun ortama α-amilaz ilave edilerek giderilebilmektedir**.**

α-Amilazların diğer bir kullanım alanı ise deterjan üretimidir. Enzimler deterjan katkısı olarak ilk kez 1913 yılında Alman kimyacı Otto Röhm tarafından kullanılmıştır. Bu amaçla günümüzde enzim üreticileri sıvı ve toz her tip deterjan için farklı formüllendirilmiş proteazlar üretmektedirler. Porteazlara ek olarak α-amilaz, selülaz ve lipaz gibi enzimler de deterjanlara katılmaktadır. Ayrıca proteazlar dışında lipazlar, selülazlar ve α-amilazların da yaygın kullanılmasının desteklenmesi deterjan sektöründeki enzimlerin farklı bakış açıları kazanmasına neden olacaktır.

II.3.3. Mikrobiyal Kökenli α-amilaz Aktivitesine Etkili Faktörler

Amilazlar nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden ekstraselüler enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger, A.oryzae, A.candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas, Saccharophila,* bazı *Clostridium* ve *Bacillus* türleri ve alt türleri gelmektedir. Fungal α-amilazlar sıcaklığa bakteriyel α-amilazlara göre daha çok duyarlı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel α-amilazlar oluşturmaktadır**.** Ancak miksobakteri α-amilazları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, *Myxococcus coralloides* D α-amilaz enzimi üretimi ve özellikleri açısından incelenmiştir).

Enzim protein yapısında olduğundan enzim aktivitesi pH, sıcaklık gibi bazı faktörlerden etkilenmektedir. α-Amilazların optimum pH aralığı enzimin elde edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir. Örneğin *Myxococcus coralloides* D' nin ürettiği α-amilazın optimum pH değeri 6.5' dur**.** *Bacillus* α-amilazları ise genel olarak 5.5-8.0 Ph aralığında stabil olup, optimum aktivite gösterdikleri pH 4.8-6.5 arasında bulunmaktadır.

α-amilazı pH 5.5-7.0 arasında , *B. amyloliquefaciens* α-amilazı pH 5.9' da, *B. coagulans* α-amilazı pH 7.5-8.5 arasında optimum aktivite göstermektedir. Bazı *Bacillus* türlerinin ise alkalik ortamda asidik α-amilaz ürettiği saptanmıştır. *B. alkolophilis* subsp. *halodurans* için optimum pH 9.2 ve *B. coagulans R3* için bu değer 10.5 olarak belirlenirken, *B. acidocalderus* 104-Ia için 4.0-5.0 arasında olduğu saptanmıştır .Optimum pH değeri *Aspergillus oryzea* için ise 4.8-5.0 arasındadır. *Thermococcale* α-amilazlarının optimum pH aralığı 3.5-9 arasında değişmektedir**.** *Clostridium thermosulfurogenes* SV 9 için bu değer 6.5-7.5 arasındadır**.** Farklı kaynaklardan elde edilen α-amilazların en iyi aktivite gösterdikleri sıcaklık derecelerinde de farklılık bulunmaktadır. *Myxococcus coralloides D*' den elde edilen α-amilazının en iyi aktivite gösterdiği optimum sıcaklık derecesi 28-45°C (*B. acidocaldarius* α-amilazı için bu değer 30-600°C, *B. subtilis* α-amilazı için 40-65°C , *Bacillus* sp. JF suşu için 85-950°C, *B. amyloliquefaciens* α-amilazı için 30-370°C' dir. α-Amilaz kullanılarak nişasta işlenirken, sıcaklık 105°C ve üzerine çıkmaktadır. Bu gibi işlemler sonucunda enzim geri dönüşsüz olarak termal inaktivasyona uğradığından enzimde aktivite kaybı olmaktadır. *B. licheniformis* α-amilazının ise 100°C üzerinde bile aktivite gösterdiğinden endüstride sık sık kullanılmaktadır.

Sıcaklık, pH gibi enzim aktivitesine etkili faktörlerin yanı sıra çeşitli metal iyonlarının da aktiviteyi etkilediği araştırmalarla belirlenmiştir. Enzim aktivite gösterebilmek için Ca^{++} iyonlarına ihtiyaç duyan bir metallo proteindir. Kalsiyum, ekstrem pH ve sıcaklıklarda pepsin, tripsin ve papain gibi proteazlara karşı enzimi dayanıklı kılmaktadır. α-amilazın katalitik aktivitesi için gerekli olan bu metalin enzime bağlanma gücü enzim kaynağına bağlıdır. Klor iyonu da enzim stablizasyonu için gereklidir. Ayrıca Cl^- iyonu enzim aktivatörüdür. Enzim aktivitesini artıran bu gibi iyonların yanı sıra bazı iyonlar ve maddeler enzim aktivitesini olumsuz etkilemektedir. Örneğin; Cu, Hg ve Pb gibi ağır metaller enzimi inhibe etmektedir.

Bunun yanı sıra üre ve diğer amid ayraçları α-amilazı inhibe etmektedir *M. coralloides* D suşunun ürettiği α-amilaz ise Hg^{+2}, Zn^{+2}, Cu^{+2}, Ag^{+2}, Pb^{+2}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, EDTA ve glutaraldehit tarafından güçlü şekilde inhibe edilirken, Ni^{+2} ve Cd^{+2} enzime daha az etki etmektedir. Ci^+, Mg^{+2}, Ba^{+2}, Ca^{+2}, N-etilmaleimid, karboidiimid ve fenilmetilsülfonilflorid etki etmemektedir.

α-Amilaz enzimlerinin çoğunun molekül ağırlığı yaklaşık olarak 45000-60000 dalton arasındadır ve genellikle enzim proteinin amino asit kompozisyonunda büyük farklılık yoktur. Örneğin; *Bacillus stearothermophilus* α-amilazlarının molekül

ağırlığı 48000 dalton iken *Bacillus subtilis* α-amilazlarının moleküllerinin ağırlığı 50000 daltondur. Bunun yanı sıra Kochhar ve Dua' nın (1990) *B. amyloliquefaciens*' ten elde ettikleri α-amilazın molekül ağırlığının 68000, Farez- Vidal ve arkadaşlarının *Myxococcus coralloides* D' den elde ettikleri α-amilazın molekül ağırlığının ise 22500 olduğu görülmüştür **[10]**.

II.4. ENZİM İMMOBİLİZASYONU İÇİN TAŞIYICILAR

Her enzim için ideal taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçiminde bilimsel standartların oluştuğu söylemek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilirken hem immobilize enzimin karakteristikleri ve kullanacağı alan hem de seçilen yöntem ile taşıyıcı kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliklerinin uyumuna dikkat edilmelidir.

İmmobilizasyon (tutuklama), enzimlerin katalitik aktifliklerini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır **[11]**. 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 taşyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır **[12]**. Uygun olarak seçilen destek materyali, üzerine immobilize edilen enzimin aktifliğini korumasını sağlar ve işlemsel kararlılığını arttırır **[13].** İyi bir destek materyali büyük yüzeysel alan, geçirgenlik (permeability), çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, uygun biçim ve partikül büyüklüğü, mikrobiyal etkilere dayanıklılık, yüksek tutuculuk, yüksek rijidite (sertlik ve sağlamlık), rejenere gibi özelliklere sahip olmalıdır.

İmmobilizasyonda kullanılan matriksler morfolojik yapılarına göre gözenekli ve gözeneksiz **[2]**, bileşimlerine göre doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır**[14]**.Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda bazı özellikler bulunmalıdır:

1. suda çözünmeme,
2. hidrofilik karakter,
3. gözenekli yapı,
4. mekanik stabilite ve uygun partikül formu,
5. kimyasal ve termal stabilite,
6. mikroorganizmaya karşı direnç,
7. ucuzluk,
8. rejenere olabilme.

II.4.1. 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.

Hücre İmmobilizasyon tekniklerinden biriside poröz biyokütle destek partikülleridir (BSPs). Bu partiküller Atkison ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Yüzey ve iç kısımları hücre ile kaplı bu partiküllerin çok sayıda avantajları vardır. Yapılan çalışmalarda poliüretan köpüklerde *R. oryzae* hücrelerinin kolayca immobilize olduğu görülmüş ve bu hücre dolu partiküllerin reaksiyon ortamına ilave edilmesi ile %10-20 sulu ortamda metanolle yapılan transesterifikasyon çalışmalarında %80-90 verime ulaşılmıştır**[15].**

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 taktirde difüzyon güçlükleri ortaya çıkar. İç yüzeyler enzimi türbülanstan 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. Karıştırmalı tank reaktörlerinde rijit yapıdaki jellere kıyasla daha az deformasyona uğrarlar **[2].**

II.4.2. 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 **[2].** Fakat organik desteklere oldukça fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak mevcut olan birçok immobilize enzim sistemi organik taşıyıcılarda immobilize edilmişlerdir **[16].** Organik taşıyıcılarda hidrofilik ya da hidrofobik karakteristikleri içeren doğal makromoleküller (polimerler) ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilirler.

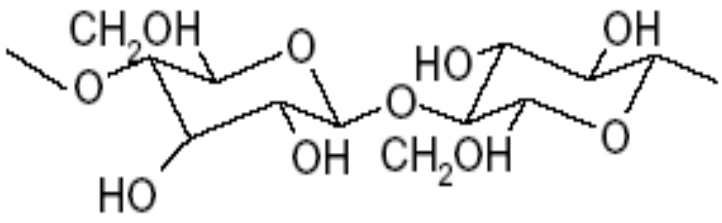
İnorganik destekler üzerinde fiziksel ya da kimyasal yöntem ile enzimlerin immobilizasyonu yüksek mekaniksel dirence sahip olması, pH, sıcaklık ve basınca bağlı yapısal değişmeler göstermemesi, mikrobial saldırıya karşı koyması ve rejenerasyon kabiliyetinin olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. İnorganik taşıyıcıların çoğunun yüzeyi camdaki silanol grupları gibi oksit ve hidroksil gruplarından oluşmuştur. Bunlar aktivasyon ve enzim bağlanması için ılımlı reaktif bir yüzey sağlar**.** 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**.** İnorganik destekler üzerinde fiziksel ya da kimyasal yöntem ile enzimlerin immobilizasyonu yüksek mekaniksel dirence sahip olması, pH, sıcaklık ve basınca bağlı yapısal değişmeler göstermemesi, mikrobial saldırıya karşı koyması ve rejenerasyon kabiliyetinin olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. İnorganik taşıyıcıların çoğunun yüzeyi camdaki silanol grupları gibi oksit ve hidroksil gruplarından oluşmuştur. Bunlar aktivasyon ve enzim bağlanması için ılımlı reaktif bir yüzey sağlar **[2].** 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**[16].**

II.4.2.1. Doğal Polimerler

Polisakkaritler, polisakkarit omurgası içeren ve en geniş olarak kullanılan taşıyıcılar alglerden ve selülozdan elde edilirler **[2].** Polisakkarit desteklerinden olan agaroz, dextran, selüloz türevleri enzimleri bağlamada ve alijnat ile karregenen ise hapsetme amacıyla kullanılır **[16].**

Polisakkarit olarak selüloz, enzimlerin kovalent bağlanması için taşıyıcı olarak kullanılabilen ilk malzemelerden biridir. Şekil II.12'de 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.

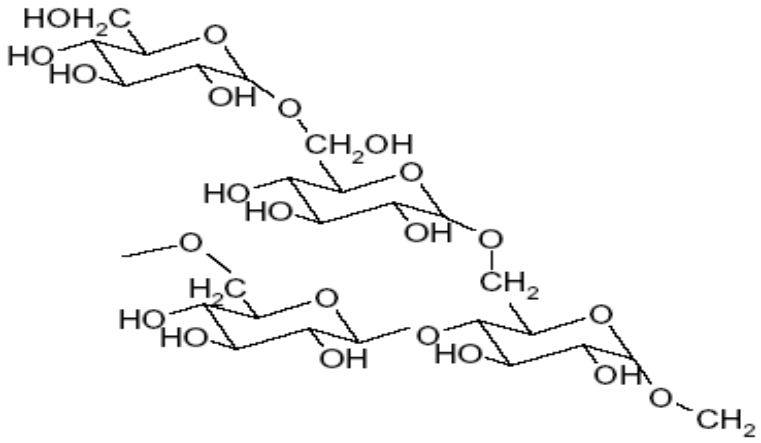


Şekil II.12. Selülozun yapısı

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-), epiklorohidrintrietanolamin-(ECTEOLA-), oksi-, fosfo-, sülfoetil-, 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, bromoacetil-selüloz, selüloztrans-2,3-karbonat, selüloz imidokarbonat, selüloz azid, selüloz karbonil, diazoselüloz, izosiyanatoselüloz'dur.

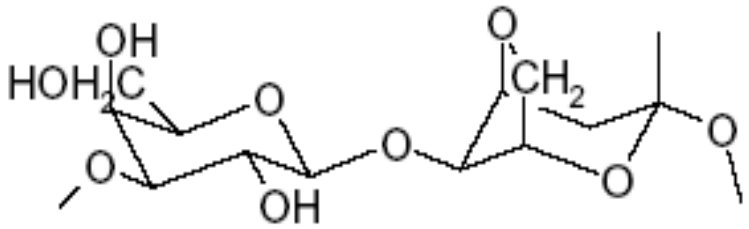
Çapraz bağlı dekstran esaslı çözünmeyen gözenekli taşıyıcılar moleküler elek özelliğine sahip olup jel filtrasyon kromatografisi için taşıyıcı olarak geliştirilmişlerdir ve ticari olarak mevcutturlar (SephadexR). Şekil 2.13.'de dekstranın yapısı gösterilmiştir. İnklüzyon sınırları ve su tutma kapasiteleri ile karakterize edilirler. Bu özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda kabul gören materyaller sınıfında yer almışlardır.



Şekil II.13. 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.2.14'de agarozun yapısı gösterilmiştir. Arabinoz (1→3) bağlı β-D-galaktopiranoz ve (1→4) bağlı 3,6-anhidro-α-2-galaktopiranozstrüktüründen ibarettir.



Şekil II.14. 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 alkalen çözeltilerde ve organik çözücüler varlığında parçalanırlar, nötral pH'da bile çözünür hale geçme özellikleri vardır, ıslak halde saklanmalıdırlar. Zira kurudukları zaman irreversibl olarak kırışmaya uğrarlar. Bu yetersizliklerin birçoğu epiklorhidrin, 2,3-dibromopropanol ya da divinilsülfon gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak azaltılabilir ve jellerin mekanik özellikleri ve kimyasal dirençliliği arttırılabilir. Agar ve Agaroz enzimlerin tutuklanması yöntemlerinde kullanılmakla birlikte çapraz bağlı agaroz (SephadexR) 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 thioller gibi redoks sistemleriyle degradasyonlara uğrarlar **[5].** 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 aliginat 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**.** 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 **[5].** 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**.** Farklı seviyelerde de olsa, bütün aljinat moleküllerinde her iki homopolimerik sıra birlikte bulunur **[25].** 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. Ayrıca aljinatın iki değerlikli metal çözeltileri içerisine damlatılmasıyla meydana getirilen alijinat bilyeleri, ağır metal içeren atık suların arıtılması çalışmalarında kullanılmakta olan dolgulu kolon reaktör tasarımında da önem taşımaktadır.

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

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**.**

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 çözünebilmektedir. 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.

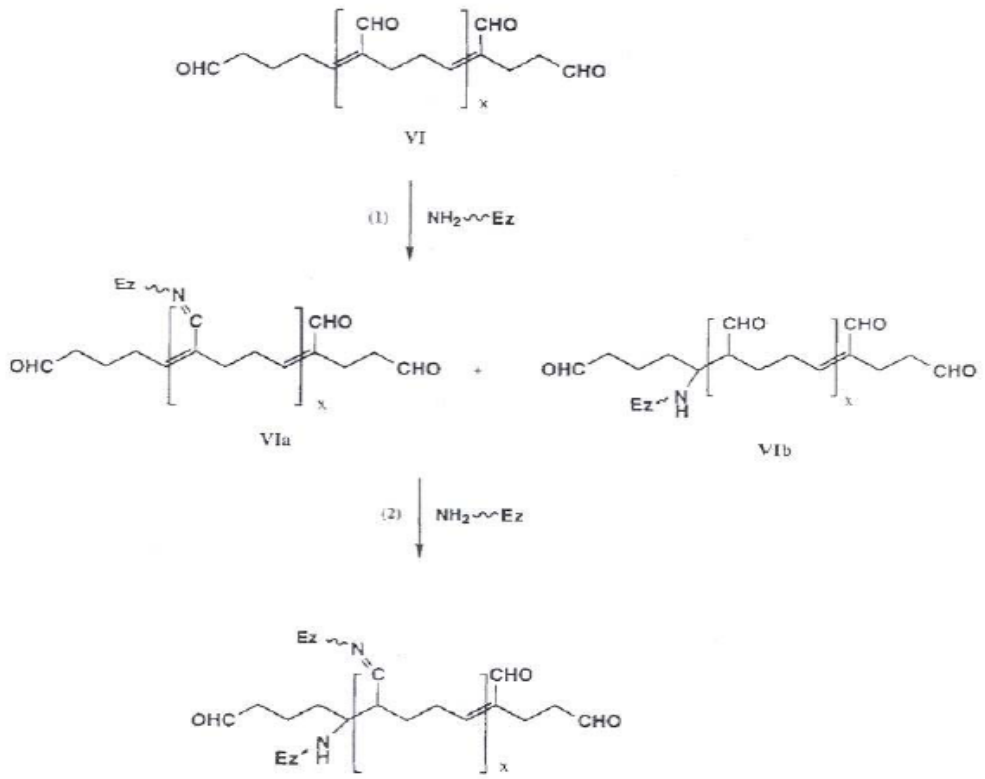
Çözünmeyen karragenan lifleri ılıman koşullarda sol jel arasındaki iyon değişimi sayesinde kalsiyum iyonlarının bağlanması ile kolayca üretilebilir. Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı bağlanan enzimi koruyan ve hidrofilik karakter sağlayan aktive olmadan 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 thiol grupları gibi fonksiyonel grupların matrikse sokulması gerekli olabilir (indirekt bağlanma). 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.

κ-karragenan ile, maya hücreleri propiyonik asit bakterileri**,** N-karbamil-β-alanin üretiminde bakteriyal hidantoinaz**,** nişasta dönüşümünde termofilik bakterileri**,** Ca-alginat ile immobilize edilmişlerdir.

II.4.2.2. 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, polimetekrilatlar 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 polimerizasyonuyla elde edilir. Akrilatlar esas olarak daha hidrofobik veya negatif yüklü matriksler hazırlanmasında diğer organik bileşiklerle kopolimer oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Polihidroksialkil 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 hidroksialkil metakrilatın radikalik süspansiyon kopolimerleşmesi ile küresel formda hazırlanırlar**[16].**

İmmobilizasyonda kullanılan bir diğer matriks ise poliglutaraldehittir. Bu polimer glutaraldehitin bazik ortamda polimerleşmesiyle elde edilir. Karbonil gruplarına sahip poligluteraldehit, amin grubu bulunduran bileşiklerle schiff bazı reaksiyonuyla geri dönüşümsüz kovalent olarak bağlanır (Şekil 2.15.). Gluteraldehit kullanılarak yapılan immobilizasyonlarda ise oluşan bağlar geri dönüşümlüdür ve indirgenme reaksiyonu ile ancak kararlı hale getirilebilir. Bu işlem hem maliyetli hem de enzim veya diğer biyolojik materyaller için olumsuz etkiye sahiptir.



Şekil II.15. Poligluteraldehit kullanarak enzim immobilizasyonu.[15]

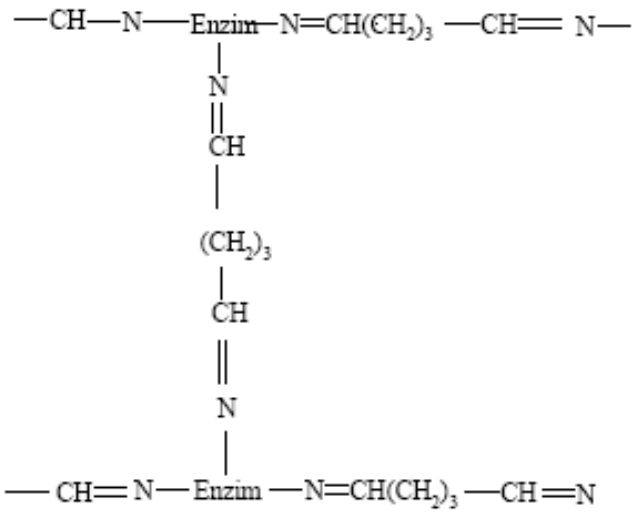
II.5. ENZİM İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILAN BAŞLICA YÖNTEMLER

II.5.1. 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. 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.

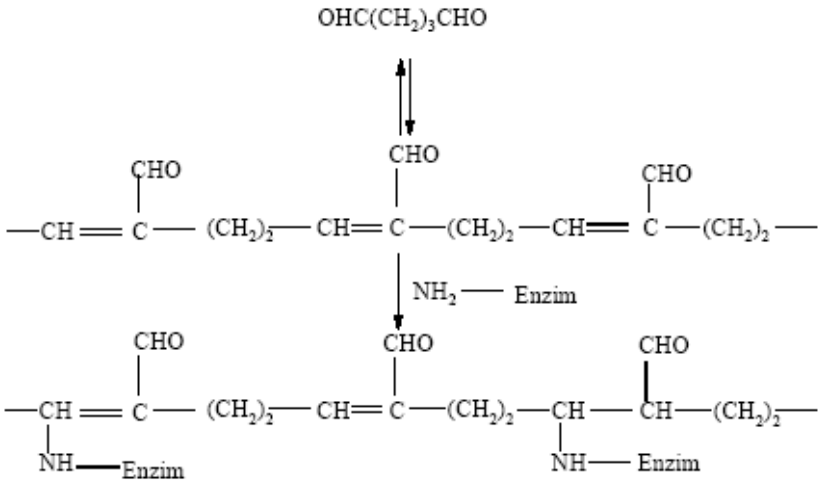
Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan çok fonksiyonlu maddeler; glutaraldehit, diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitrobenzen,triklor-s-triazin, hekzametilen diizosiyanat, klorformat ve karbodiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, tranzisyon metal iyonları ve epiklohidrinlerdir**.** 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 alkiller. Glutaraldehit ile moleküller arası çapraz bağlama Şekil II.16'da gösterilmiştir.



Şekil II.16. 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.17'de enzimdeki NH_2 gruplarının oligomerlerle konjugasyon reaksiyonu gösterilmiştir.



Şekil II.17. Enzimdeki -NH_2 gruplarının oligomerlerle konjugasyon reaksiyonu [2]

Proteinlerin en fazla çözünmesi izoelektrik noktalarına yakın pH değerlerinde meydana gelir. Çözünmezleştirme derecesi iyonik gücün artmasıyla azalır **[16].**

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 **[17]**. 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 **[2, 18]**. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnız immunolojik testlerde kullanılmışlardır **[16]**.

II.5.2. Taşıyıca Bağlama

Taşıyıcıya bağlama en eski enzim immobilizasyon yöntemidir. Taşıyıcıya bağlama kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel biçimde gerçekleşir. Enzime göre taşıyıcı seçimi önemlidir. Taşıyıcı seçiminde, partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik gurubların hidrofilik grublara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi kriterler esas alınır. Bağlanmış enzim miktarı ve enzim immobilizasyonundan

sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına çok bağımlıdır. Genel olarak taşıyıcının hidrofil karakteri ve birim kütle yüzeyi arttıkça bağlı enzim miktarıda artar. Bu tip enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar doğal vaya sentetik olabilir. En çok kulanılan sentetik taşıyıcılar; polistiren, poliakrilamid, polimaleik anhidrit, polimetakrilat, poilpeptidler ve iyon değiştirici reçinlerdir. Doğal taşıyıcılar ise; selüloz, nişasta, dekstan agaroz, diatome toprağı aktif karbon ve camdır. Ayrıca ticari amaçla sunulmuş maddeler (sephorese, sephadex, Bio-gel) de enzim için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır.

Taşıyıcı bağlama yöntemi 3 alt gurubta toplayabiliriz:

II.5.2.1.Kovalent Bağlama

Enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla selüloz, sefadeks, agaroz, poliakrilamid, porlu seramik gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanırlar. Yöntemin gerçekleştirilmesi zordur. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma yüksek olduğundan bazen enzimatik aktivitenin arttığı da görülmektedir. Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genelde protein kimyasında bilinen yöntemlerle sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu grublar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasında sterik engellemeler nedeni ile bu grubların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlama enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı reaktif grublar üzerinden gerçekleşir. Protein zincirinde bulunan reaktif gruplar;

Amino asit aralığı	Reaktif grub
• Lizin, N-terminal	Amino
• Sistein	Sülfhidril
• Glutamikasit, Aspartikasit	Karboksil
• Trizon	Fenolik hidroksil
• Serin, treonin	Alkol(primer)
• Arginin	Guanidino
• Histidin	imidazol
• Sistin	Disülfit
• Metiyonin	Tiyoeter
• Triptofan	indol

Enzim immobilizasyonuda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse bir reaktif ile aktivite edilmeleri gerekir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterde olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcı seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu grupla rüzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözgenlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir**.**

Kimyasal kovalent bağlama yöntemi ile enzim immoblizasyonuna ilişkin birçok derleme yapılmıştır.

A) Açilleme reaksiyonlari:

Enzim proteini üzerinde kovalent bağlama ile immobilizasyon için en sık kullanilan fonksiyonel grup lizinin $–NH_2$ grubudur. Bu grup; asit azidi veya anhidridi taşıyan polimerler ile aktif ester grubu taşıyan polimerler, karboksi ve sülfonilklorür içeren taşıyıcılar ve N-alkil-5-fenil oksazosyum ve karbodiimidazol gibi kondanse edici reaktiflerle aktivite edilen karboksilat ile kolayca reaksiyon vermektedir. Asit anhidridi ve azidleri proteinin serbest amino grublar ile reaksiyon verir. Suda çözünen karbodiimidler karboksil grubu taşıyan polimerlerin aktivasyonunda çok kullanışlıdır. Aktif karboksil grubları protein üzerindeki nükleofil grublar ile reaksiyona girmektedir. Ayrıca Woodward reaktifi ve EEDQ gibi kondanse edici reaktifler ile de karboksilat polimerleri aktivite edilebilirler.

B) Alkilasyon ve arilasyon reaksiyonları

Özellikle halojen-sübstitüe aromatik halkalar enzim molekülünü serbest-NH_2 grubu üzerinden bağlarlar. Benzen halkasının nitrolanması reaktiviteyi arttırmaktadır.

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 $–NH_2$ grubunun alkilasyonu sayesinde enzimleri bağlayabilmektedir.

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

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.

D) Karbamilasyon ve Tiyokarbamilasyon Reaksiyonları

İzosiyanat ve izotiyosiyanat grubu taşıyan birçok polimer enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılabilmektedir. 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. Daha kararlı olduklarından izotiyosiyanat türevlerine tercih edilirler.

E) CN-Br Yardımı ile Bağlama

Siyanojen 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.

F) İmidoesterler ile Reaksiyonlar

İmidoester fonksiyonel grubu taşıyan polimerler de protein immobilizasyonunda kullanılmaktadır. 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 . Çünkü, Schiff bazı oluşumu bir denge reaksiyonudur ve sulu çözeltide özellikle düşük pH değerlerinde aldimin oluşumu olasılığı azdır . 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.

H) SH-Disülfid Değişimi Reaksiyonları

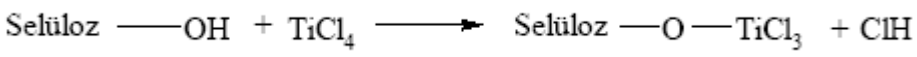
2,2-Dipiridildisülfid gibi proteinlerdeki sülfhidril gruplarının kantitatif tayininde kullanılan maddeler SH- disülfid değişimi reaksiyonlarında aracı görevi yapar.

I) Ugi Reaksiyonu

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

İ) Diğer Bağlanma Reaksiyonları

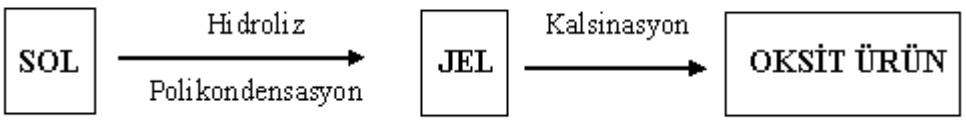
Transizyon elementlerinin tuzları selüloz, cam gibi taşıyıcıların aktivasyonunda kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan tuz $TiCl_4$’dür. Selülozun aktive olmuş yapısı gösterilmektedir. Bağlanma özellikle serin üzerinden gerçekleşmektedir. Şekil II.19’da $TiCl_4$ aktive edilmiş selüloza enzimin bağlanması gösterilmiştir.



Ayrıca nikeloksit ve alüminanın alkilamin ve alkil izotiyosiyanat türevleri de enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır.

Özellikle selüloz ve türevlerine protein bağlanmasında yaygın olarak kullanılabilecek yeni bir immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde selüloz önce periyodat ile kısmen oksitlenmekte ve ardından sırasıyla üre ve formaldehid ile muamele edilmektedir **[19].**

Bir diğer yöntem olan Sol-jel yöntemi, organik modifiye silisyum-alkoksitlerin kontrollü hidrolizi ve kondensasyonu ile organik ağın oluşturulması ve daha sonra inorganik ağ bağlanmış polimerize olabilen grupların termal veya UV başlatıcı sistemler ile aktive edilerek reaksiyon vermesi esasına dayanır**[20].** Sol-jel yönteminde metal alkoksitlerin (Si, Ti, Al, Zn, …) asidik ya da bazik ortamda hidrolizini takiben kondensasyonundan çeşitli inorganik ağ yapılar oluşturulmaktadır.



Şekil II.18. Tipik Sol-Jel Oluşum Basamaklarının Şematik Görünüşü

Metal alkoksitler, sol-jel hazırlamada en yaygın olarak kullanılan başlangıç maddeleridir.Bunun nedeni metal alkoksitlerin su ile kolayca reaksiyona girebilmelerinden kaynaklanmaktadır. Alkoksitlerin genel formülleri $M(OR)_x$'dir. Burada metal (M) olarak Al, Zr, Ti ya da Si, P vb. alkil grubu olarak (R) CH_3, C_2H_5, C_3H_7 vb. kullanılabilir. Burada x metalin valans değeridir.

En çok kullanılan alkoksitler tetrametoksisilan (TMOS) ve tetraetoksisilandır (TEOS). Ayrıca, çift alkoksit olarak bilinen sınırlı bir bileşik sınıfı da vardır. Bunlar, aynı bileşik içerisinde iki farklı metal içerirler.

Sol-jel işleminde 3 önemli reaksiyon vardır. Bunlar;

1. Hidroliz Reaksiyonu
2. Kondenzasyon reaksiyonu
3. Jelleşme reaksiyonlarıdır.

Metal alkoksitlerin hidroliz ve polikondensasyon reaksiyonları, sol-jel üretiminde temel kimyasal mekanizmayı oluşturur. Jelleşme noktasında hidroliz ve kondensasyon hızları, farklı polimer yapılarına sebep olmaktadır. Hidroliz ve kondensasyon hızları; su miktarı, katalizör türü, çözücü konsantrasyonu ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenir. Metal alkoksitlerin, hidrolitik polikondenzasyon reaksiyonları; kullanılan alkoksit bileşiklerin cinsine, bunların oranlarına, reaksiyon ortamında kullanılan katalizöre (pH), suya, reaksiyon süresine ve sıcaklığa bağlı olarak farklı dağılım gösterirler. Bu parametrelerden her biri, dallanmış yapılara sahip polimerik yapılar oluşturarak ağ yapısını önemli bir biçimde etkilerler.

TEOS'un hidroliz ve kondensasyon reaksiyonları aşağıdaki eşitliklerde gösterildiği gibidir:

$$Si(OC_2H_5)_4 + 4H_2O \rightarrow Si(OH)_4 + 4\ C_2H_5OH$$

$$Si(OH)_4 \rightarrow Si0_2 + 2H_20$$

Hidrolitik polikondensasyon reaksiyonlarında ilk aşama hidroliz olup TEOS ve su arasındadır. Su ile TEOS birbirleriyle iyi karışmadığı için alkol ilave edilerek bir çözelti hazırlanır. İkinci aşama kondensasyon olup reaksiyon hızı, alkol, su miktarı ve pH'a bağlıdır. pH < 7 ve su / TEOS mol oranı 2-4 olduğunda kondensasyon reaksiyonu yavaş ilerlerken hidroliz reaksiyonun önemli bir ısı çıkışıyla birkaç dakika içerisinde tamamlandığı gösterilmiştir. Bu oran 2-4 arasında ise her iki reaksiyonda aynı zamanda ilerlemektedir. Eğer oran < 2 ise hidroliz tamamlanamaz,

fakat jel kendi yapısı içerisinde hala hidrolize olmamış organik yapılar içerdiği için oluşabilir. Genelde pH < 7 olduğunda kondensasyon reaksiyonun hızı, mevcut hidroksil (OH) gruplarının eksikliğiyle sınırlandırılır ve yakınındaki boşluklarda bir su-alkol çözeltisi barındıran üç boyutlu bir ağın büyümesiyle polimerizasyon yavaş ilerler**[20].**

Kovalent bağlama yöntemlerini avantajları:

- Reaktif taşıyıca enzim bağlanmasının kolay olması ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilmesi,
- Katı taşıyıcıya bağlı katalizör kullanışlı olması(süzme veya santirfüjleme ile ayrılırlar, tekrar dağıtılabilirler),
- Reaksiyon ortamından istenilenler uzaklaştırılabilmesi,
- Ürünleri kirletmemesi,
- Taşıyıcının yapısına bağımlı olarak yeni spesifiklikler kazanması,
- Sürekli sistemlere uygundur olması,
- Değişik fiziksel formlarda (tabaka, partikül, fiber) imal edilebilmesidir.

Kovalent bağlama yöntemlerini dezavantajları:

- Enzim immobilizasyonun koşullarından etkilenmesi,
- Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit artıkları üzerinden gerçekleşmesi,
- Enzim taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı preparasyonları gerekli kılması,
- Polimer taşıyıcının sebep olduğu sterik engelleme nedeniyle aktivite azabilmesidir.

II.5.2.2. İyonik Bağlama İle İmmobilizasyon

Bu yöntem değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması yanında fiziksel adsorbsiyonda etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur. Bu yöntem iyon değiştirici kalıntı içeren destek katıları üzerine moleküllerinin iyonik bağla bağlanmaları esasına dayanır. Bu şekilde enzimin katıya bağlanması fiziksel

adsorbsiyondan daha güçlü bir bağlanmadır. Bu yöntemde dietilaminoetil(DEAE) türevleri, trimeteil(TEAE) türevleri, karboksimetil türevleri destek olarak kullanılabilir. Bu yöntemde enzimin konformasyonel değişimi çok azdır ve bu nedenle enzimin aktivitesi oldukça yüksektir **[21].**

II.5.2.3. Adsorbsiyon İle İmmobilizasyon

Enzim imobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Proteinler özellikle enzimlerin katı yüzeylerde adsorbsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Yöntem, yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzim taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. İyi bir adsorbsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar, aktif karbon, diatome toprağı, $CaCO_3$, Kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır. Son yıllarda hidrofobik assosiyasyondan da enzim immobilizasyonunda yararlanılmaya başlanmıştır **[2, 22]**. Ligand olarak tanen içeren adsorbanların birçok enzimin immobilizasyonunda kullanılacağı ve bu immobilizasyonda hidrofobik kuvvetlerin önemli bir rolü olduğu öne sürülmektedir**[23].**

Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorbsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere çok bağımlıdır. Bu etmenlerin araştırılması, adsorbsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorbsiyon işleminin mekanizması genellikle çok karışık olup birçok olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğinin önceden saptanması çok güçtür.

Prensip olarak bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda (örneğin; kaolenitte adsorplanmış üreaz) tersinir olmayan bir adsorbsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemler de kullanılabiliyorsa bu tür adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için ideal durumdur. Desorpsiyon, reaksiyon reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine ve aktivitede sürekli bir değişmeye neden olur. Tersinir adsorbsiyonlar enzim immoblizasyonu için pek uygun değildir. Daha öncede belirtildiği adsorbanların çoğu enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu saflaştırma işlemi immobilizasyonda gerçekleşir.

Bazı adsorbanlar bir enzimin farklı biçimlerini, aktif veya inaktif biçimlerinden birini adsorbe ederken diğerini desorbe etmektedir. Eğer enzimin aktif şekli adsorbe edilirse, bazı durumlarda ise bağıl aktivite sıfır olmakta yani immobilzasyon ürünü hiç aktivite göstermemektedir.

Adsorbsiyon yönteminin avantajları:

- Enzim immobilizasyonun basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olasılığı vermesi,
- Bir yandan immoblizasyon gerçekleştirilirken, diğer yandan enzimin saflaştırılmasına olanak sağlaması,
- İşlem çok kolay olduğu gibi çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesi ve önemli ölçüde enzim inaktivasyonuna da neden olmasıdır**.**

Adsorbsiyon yönteminin dezavantajları;

Her ne kadar immobilizasyon işlemi kolay olsa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorbsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır. Enzim desorpsiyonu özellkle substra konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda hiç istenmeyen durumdur.

Hidrofobik assosiyasyondan enzim immobilizasyonunda yararlanılmaktadır. Ligand olarak tane içeren adsorbların birçok enzimin immobilizasyonunda kullanılacağı ve bu immobilizasyonda hidrofobik kuvvetlerin önemli bir rolü olduğu öne sürülmektedir**[13].**

II.5.3.Tutuklama

II.5.3.1. Mikrokapsül İle Hapsetme Metodu

Bu metodda 10-1000 μm çaplı küçük yarı geçirgen membranlar içine enzim molekülleri hapsedilmektir. 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**[24].** 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 metodda (ara yüzey polimerizasyon metodu) ise enzimin sulu bir çözeltisi, suyla

karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikrodamlalarının 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**[26].**

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 azalmasıdır.

II.5. 3.2. 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 değiim 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 :

- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkilemesi,
- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretilebilmesi,
- Polimerleşme genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi, **[14, 27, 28, 29]**.

Bu yöntemin dezavantajları:

- Çapraz bağlı polimer şebekesinden enzimin sızması,
- Yalnızca küçük hacimli substratlar için sınırlı olması makromoleküler substratlar için çok düşük aktiflik göstermesidir.

BÖLÜM III

ÇALIŞMALAR

III.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

Deneylerde kullanılan başlıca kimyasallar ve malzemeler:

- Kalsiyum Klorür Dihidrat, (Merck).
- Potasyum Karbonat, (Merck).
- 3-Aminoalkoksisilan ,(Aldrich).
- %25'lik Glutaraldehit,(Merck).
- α–Amilaz (1,4-α-D-Glukan-glukanohidrolaz), (Merck).
- Poli (Etilen Glikol) MA= 6000g/mol, (Aldrich).
- Nişasta, (Merck).
- Sodyum Hidroksit, (Merck).
- 3,5-Dinitrosalisilik Asit, (Merck).
- Monosodyum fosfat monohidrat,(Merck).
- Disodyum fosfat heptahidrat,(Merck).
- Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat, (Merck).
- Oval albumin, (BIO-RAD)
- Bradford reaktifi, (BIO-RAD).
- Maltoz (Merck).

III.1.1. Diğer Kimyasallar

Deneysel çalışmalar sırasında çeşitli amaçlarla; Metanol (Merck), Etanol (Merck), Aseton (Merck), gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır.

III.2. KULLANILAN CİHAZLAR

III.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

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

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

Sentezlenen nano kalsiyum karbonat ve silanlanmış nano kalsiyum karbonatın yapısı FT-IR ile incelenmiştir. Perkin Elmer Spectrum 100 marka FT-IR spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

III.2.3. UV Spektrometre Cihazı

Shimadzu 1601 marka UV-Visible Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

III.2.4. Ultrasonik Banyo

Bandelin Sonorex markalı ultrasonik banyo kullanılarak SEM görüntüsü alınmadan önce nano kalsiyum karbonatın etanol içinde dağılması sağlanmıştır.

III.2.5. Hassas Terazi

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

III.2.6. Vakum Etüvü

Nüve EV018 marka etüv kullanılmıştır.

III.2.7. Distile Su Cihazı

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

III.2.8. pH Metre

LCS LD 108 Dijital pH Metre kullanıldı.

III.2.9. Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı

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

III.2.10. Otomatik Pipetler

Gilson marka otomatik pipetler kullanıldı.

III.2.11. Su Banyosu

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

III.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan deneysel çalışmaların ana basamakları şu şekilde sıralanabilir:

- Nano kalsiyum karbonat sentezi,

$$CaCl_{2\ (sulu)} \rightarrow Ca^{+2}{}_{(sulu)} + 2Cl^{-}{}_{(sulu)}$$

$$K_2CO_{3(sulu)} \longrightarrow 2K^{+}{}_{(sulu)} + CO_{3(sulu)}$$

$$CO_{3\ (sulu)} + Ca^{+2}{}_{(sulu)} \longrightarrow CaCO_{3(katı)}$$

- Sentezlenen nano kalsiyum karbonat partiküllerinin sol-jel yöntemiyle modifikasyonu ve amin fonksiyonel grubunun kazandırılması,
- Glutaraldehit ile partiküllerin aktifleştirilerek α-amilaz enziminin kovalent immobilizasyonu,
- İmmobilize olmuş enzimin miktar tayini,
- Nano boyuttaki $CaCO_3$ kullanılarak 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. Nano $CaCO_3$ Sentezi

Nano $CaCO_3$ iki aşamada sentezlendi. Birinci aşama da 93g PEG 6000, 100 mL su ile üç boyunlu balon içerisinde ısıtılarak çözüldü. 36.76g $CaCl_2.2H_2O$ 100 mL su içerisinde çözülerek PEG 6000 çözeltisine mekanik karıştırıcı eşliğinde yavaşca eklendi ve toplam hacim destile su ile 300 ml 'ye tamamlandı. Bu çözelti magnetik karıştırıcı ile 12 saat boyunca karıştırıldı.

İkinci aşamada ise 35.70 g K_2CO_3 50mL suda çözüldü ve bu çözelti birinci aşmadaki karışmakta olan çözeltiye damla damla eklendi. Ekleme işlemi bittikten sonra yarım saat daha mekanik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edildi. Elde edilen nano partiküllerin iyice çökmesi için bir gece bekletildi. Nano partiküller mavi band süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve destile su ile yıkandı. Partiküllerin nemden uzaklaştırılması için 250^oC' de fırında kurutuldu. Elde edilen partiküller 22.60g olarak tartıldı **[43].**

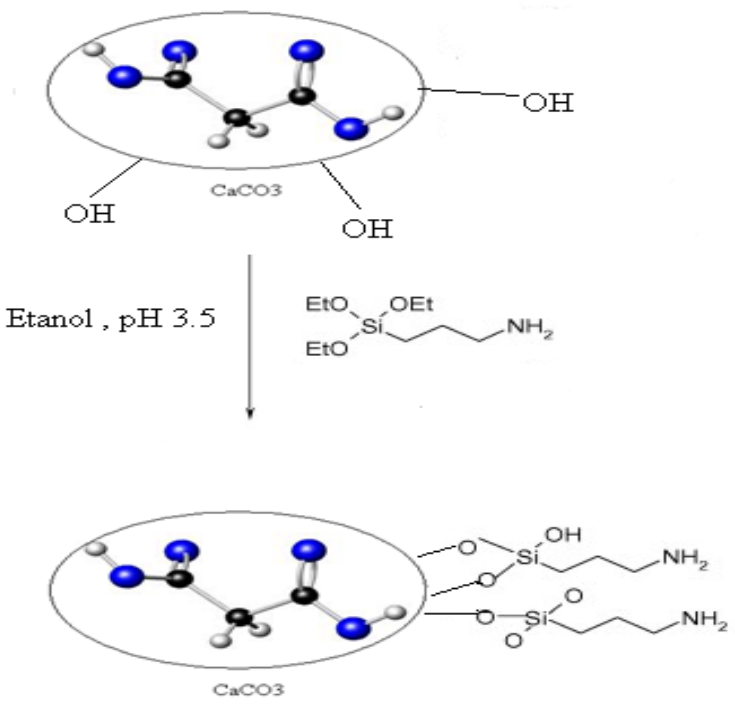
$$CaCl_{2\ (sulu)} \longrightarrow Ca^{+2}{}_{(sulu)} + 2Cl^-{}_{(sulu)}$$

$$K_2CO_{3(sulu)} \longrightarrow 2K^+{}_{(sulu)} + CO_3^{2-}{}_{(sulu)}$$

$$CO_3^{2-}{}_{(sulu)} + Ca^{+2}{}_{(sulu)} \longrightarrow CaCO_{3(katı)}$$

III.3.2.Sol-jel tekniğiyle $CaCO_3$ Modifikasyonu

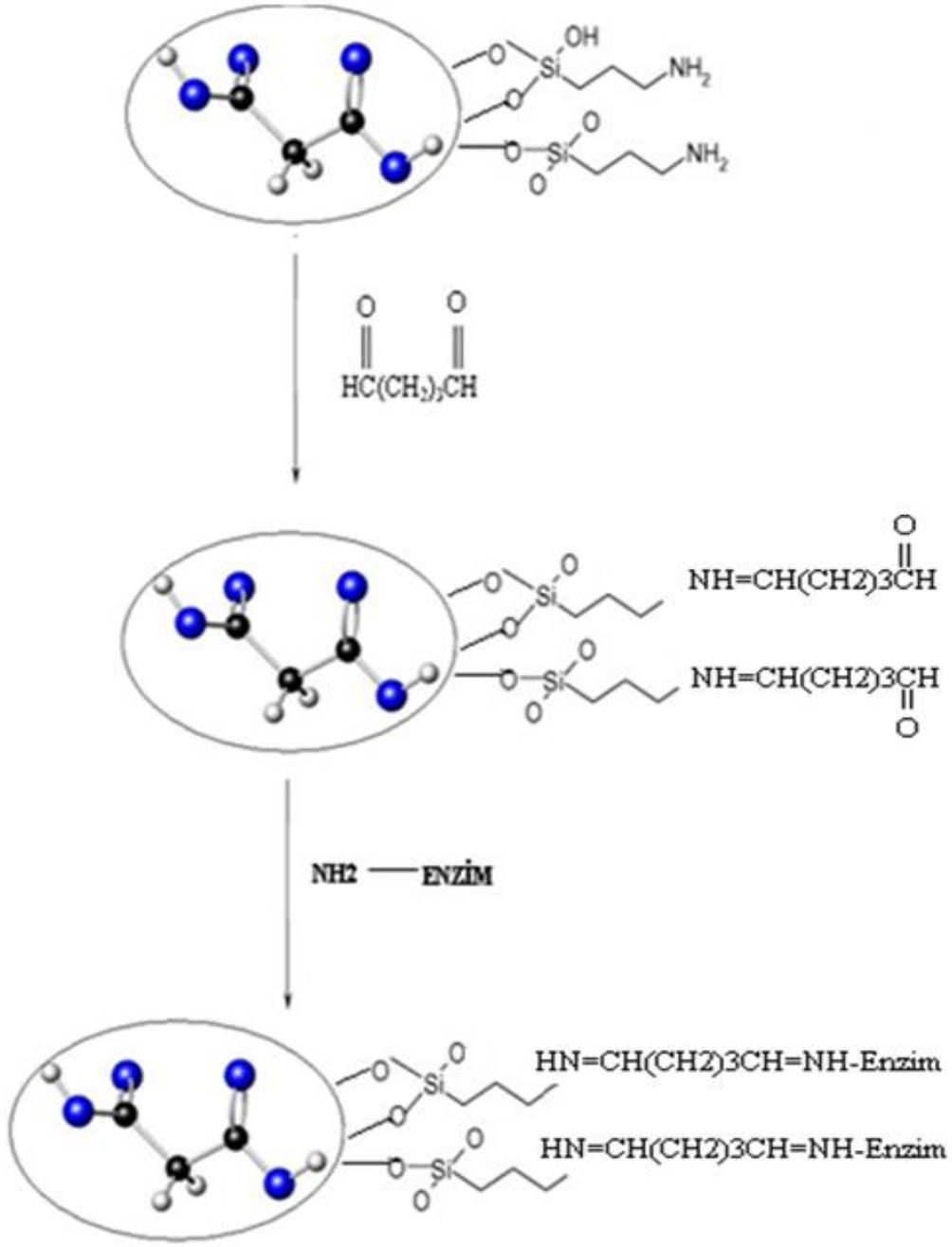
0,12g (3-aminopropyl)triethoxysilan bileşiği ile 5.5g % 95'lik etanol çözeltisi karıştırıldı. Karışımın pH'ı asetik asit çözeltisi kullanılarak 3.5 yapıldı. 12.00g $CaCO_3$ yaklaşık 200mL %95'lik etanol çözeltisinde çözülerek birinci karışıma eklendi ve 0.1M NaOH çözeltisi ile pH 3.5 yapılarak mekanik karıştırıcı ile 12 saat boyunca karıştırıldı ve daha sonra çözelti vakum altında süzüldü oluşan beyaz renkli partiküller 80^oC 'de vakum etüvünde kurutularak kondense edildi. Elde edilen partiküller 10.15 g olarak tartıldı **[44].**



Şekil III.1. Sol-jel tekniğiyle $CaCO_3$ Modifikasyonu

III.3.3.Enzim İmmobilizasyonu

10.00g modifiye $CaCO_3$ 250mL %25'lik glutaraldehid ile mekanik karıştırıcı eşliğinde 1 saat boyunca karıştırıldı. Oluşan partiküller süzüldü ve 200 mL suya 2.00 g α- amilaz enziminin eklenmesiyle hazırlanan karışıma eklenerek mekanik karıştırıcı ile 12 saat boyunca karıştırıldı. Partiküllerin çökmesi için yarım saat kadar dinlenmeye bırakıldı. Karışım vakum altında süzülerek, süzüntü bağlananan enzim miktarı tayini için buzdolabında +4 derecede saklandı. Katı kısım ise 25^{o}C' de vakum etüvünde kurutulup sonrasında buzdolabında +4 derecede saklandı.



Şekil III.2. Enzim immobilizasyonu

III.3.4. Protein Tayini

İmmobilizasyon işleminden sonra bağlanmamış enzim miktarı süzüntüden Bradford yöntemiyle tayin edildi **[31]**.

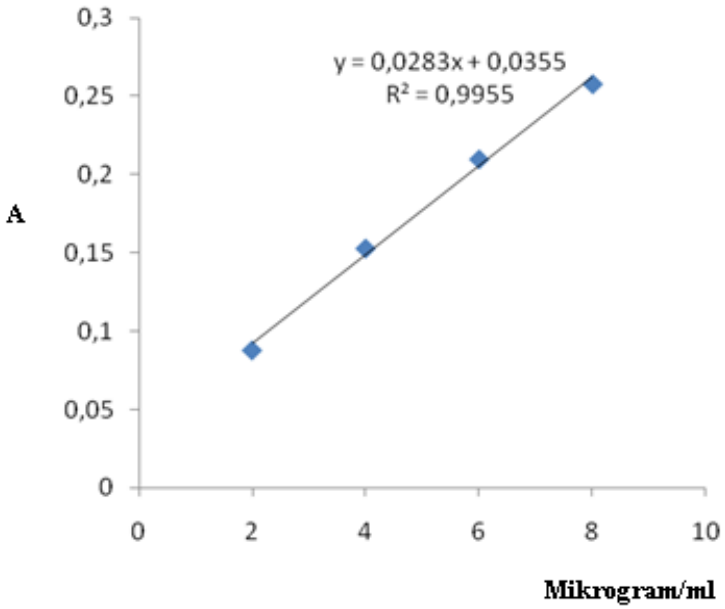
III.3.4.1. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

Protein standart grafiği 0,1mg/ml oval albumin çözeltisi kullanılarak aşağıdaki gibi hazırlandı:

1. 20 µl (2 µg protein) ovalbumin çözeltisi,
2. 40 µl (4 µg protein) ovalbumin çözeltisi,
3. 60 µl (6 µg protein) ovalbumin çözeltisi,
4. 80 µl (8 µg protein) ovalbumin çözeltisi,

Örnekten 500 µl alındı. Örnek ve standartların son hacmi 800 µl'ye destile su ile tamamlandı.

5.Standart ve örnek çözeltilerinin üzerine 200 µl Bradford reaktifinden konuldu ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Köre karşı (800 µl distile su ve 200 µl Bradford reaktif karışımı) 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil III.3. BSA'nın kalibrasyon eğrisi

III.3.4.2. Bağlanan Enzim Miktarının Belirlenmesi

Elde ettiğimiz kalibrasyon eğrisinden yararlanarak sulu fazın 190 ml'sindeki enzim miktarı 5.66 mg ve enzim bağlı kalsiyum karbonat miktarı 1994.34 mg olarak bulundu. Buna bağlı olarak da 199.43 mg enzim/1 g nano kalsiyum karbonata bağlandığı hesaplandı.

III.3.5. pH 6.9 Sodyum Fosfat Tamponun Hazırlanması

Monosodyum fosfat monohidrat bileşiğinden 0.2429 g, disodyum fosfat heptahidrat bileşiğinden 0.0644 g tartılarak 100 ml suda çözüldü.

III.3.6. Nişasta Çözeltisinin Hazırlanması

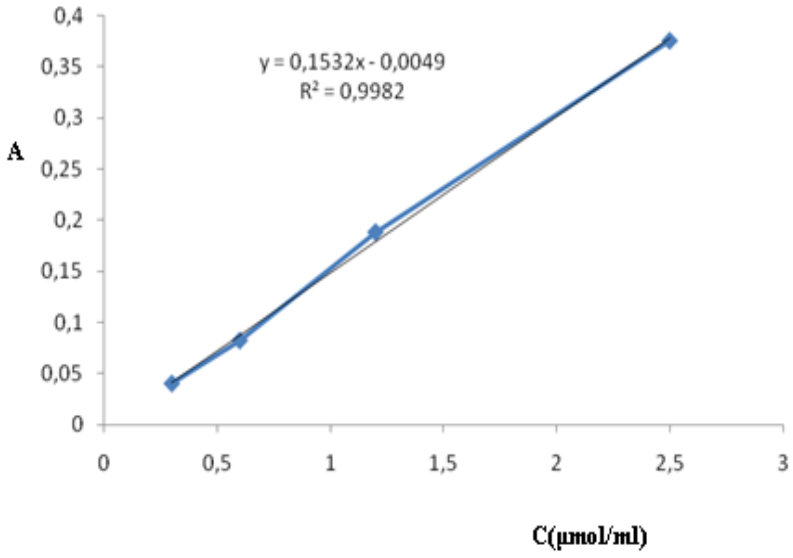
0.25 g çözünür nişasta, 25 ml pH 6.9 sodyum fosfat tamponunda önce çözündü. Çözünmesi için 80-90°C'ye kadar ısıtıldı Sonra soğutularak, son hacmi pH 6.9 sodyum fosfat tamponu ile 25 ml'ye tamamlandı.

III.3.7. 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 çözündükten sonra çözelti 100 mL'ye tamamlandı **[32].**

III.3.8. Serbest ve İmmobilize Olmuş α-Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümleri

Maltoz kalibrasyon eğrisinin hazırlanması



Şekil III.4. Maltozun kalibrasyon grafiği

0.3, 0.6, 1.2, 2.5 μmol/ml olmak üzere dört farklı konsantrasyonda hazırlanan maltoz çözeltileri ile standart eğrisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyon ve 540 nm'deki absorbsiyon değerleri ile çizilen kalibrasyon grafiği Şekil III.4.'de gösterilmektedir. Kullanılan partiküllerin kütlesinden, içerdiği enzim miktarı bulunur. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak her bir örneğin içerdiği enzim konsantrasyonu eğim denkleminden hesaplandı.

Enzimin aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

Aktivite (IU mg^{-1}) = serbest kalan maltoz (μ mol)/α-amilaz miktarı (mg)×5 dakika**[42]**.

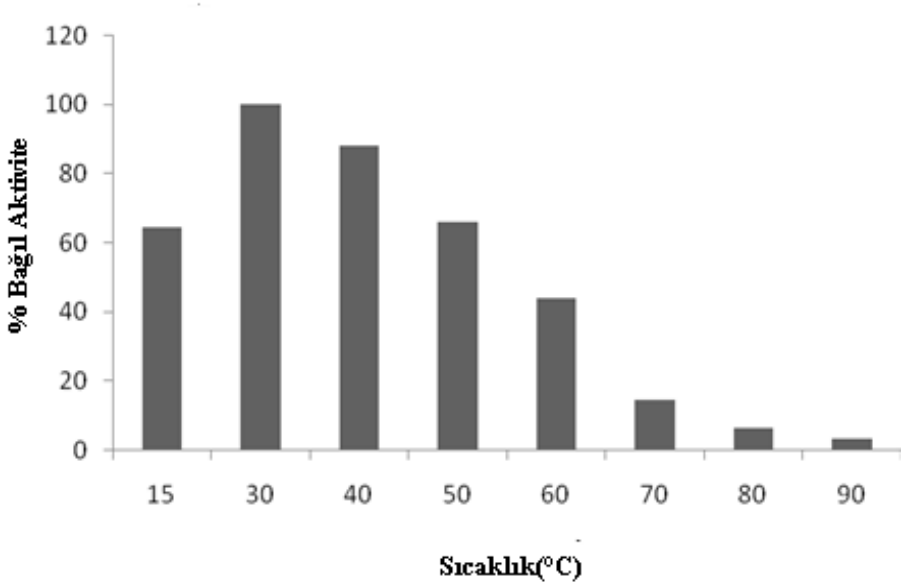
III.3.8. Serbest ve İmmobilize Olmuş α-Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümleri

α–Amilaz enziminin aktivitesi Bernfield Yöntemi kullanılarak ölçüldü **[30]**. 0.006 M NaCl ile hazırlanmış 100 mL 0.02 M sodyum fosfat tamponunda 1 g nişasta çözüldü. Tartımı alınan immobilize α–amilaz partikülleri test tüplerine konuldu. Daha sonra test tüplerinin üzerine 1 mL nişasta çözeltisi eklenerek 100 rpm çalkalama hızında, 30°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 5. dakika sonunda 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika bekletildi. Su banyosundan tüpler çıkarıldı, soğuduktan sonra, 3500 rpm'de santrifüj edilerek üst faz alındı. Hidroliz olan şeker (maltoz) miktarı 540 nm'de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülen absorbsiyon değerlerinden yola çıkılarak hesaplandı **[33].**

III.3.8.1. Serbest α-Amilaz'ın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Bölüm III.3.6 'daki gibi nişasta çözeltisi hazırlandı. %0.5'lik α-amilaz çözeltisi hazırlanarak 8 farklı sıcaklıkta , üçer örnekli olmak üzere toplamda 24 adet deney tüpü numaralandırıldı. Her bir tüpe,hazırlanan α-amilaz çözeltisinden 0.5 mL konuldu. Hazırlanan nişasta çözeltisinden 1 mL alınarak, sırasıyla her tüpe ilave edildikten sonra 100 rpm çalkalama hızında, sırasıyla 15 ,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Reaksiyon, 5. dakika sonunda 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu ve ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika bekletildi. Su banyosundan tüpler çıkarıldı, soğuduktan sonra, 3500 rpm'de santrifüj edilerek üst faz alındı. Hidroliz olan şeker (maltoz) miktarı 540 nm'de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede

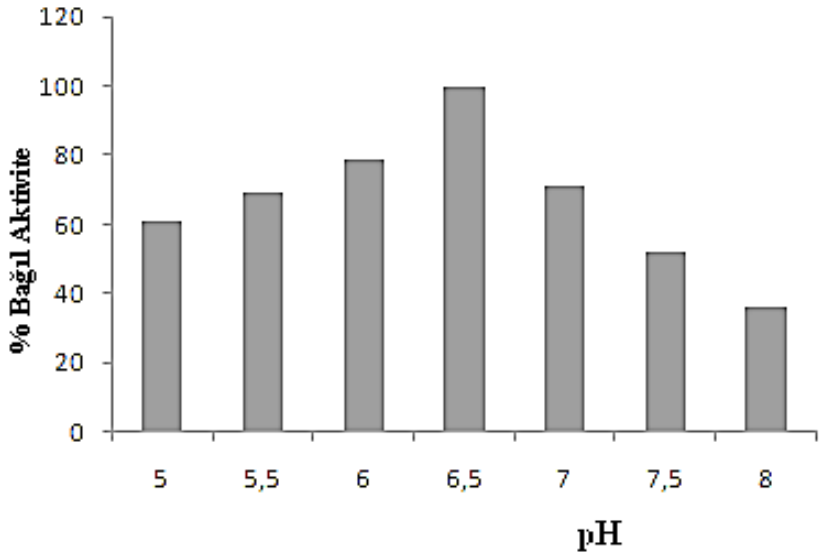
ölçülen absorpsiyon değerlerinden yola çıkılarak hesaplandı **[33]**. 15–90 °C aralığındaki sıcaklık (°C) - (%) bağıl aktivite grafiği Şekil III.5'teki gibidir.



Şekil III.5. Serbest α-Amilazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

III.3.8.2. Serbest α-Amilaz'ın Aktivitesine pH'ın Etkisi

1 g nişasta, pH 5.5-8 aralığındaki 100 mL 0.02 M sodyum fosfat tamponlarında çözüldü. % 0.5'lik α-amilaz çözeltisinden tüplere 0.5 mL konarak numaralandırıldı. Her bir tüpe farklı pH'larda hazırlanan nişasta çözeltisinden 1 mL konuldu. Tüpler 30°C'ye ayarlanmış su banyosunda 100 rpm hızında çalkalanarak 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 5. dakika sonunda 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu. Ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika bekletildi. Su banyosundan tüpler çıkarıldı, soğuduktan sonra, 3500 rpm'de santrifüj edilerek üst faz alındı. Hidroliz olan şeker (maltoz) miktarı 540 nm'de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülen absorpsiyon değerlerinden yola çıkılarak hesaplandı. pH 5-8 aralığındaki pH-(%) bağıl aktivite grafiği Şekil III.6'da gösterilmektedir.



Şekil.III.6. Serbest α-Amilaz'ın pH –(%)Aktivite grafiği

III.3.8.3. Serbest α-Amilaz'ın Aktivitesine 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-(%) bağıl aktivite grafiği Şekil III.6'da verilmiştir.

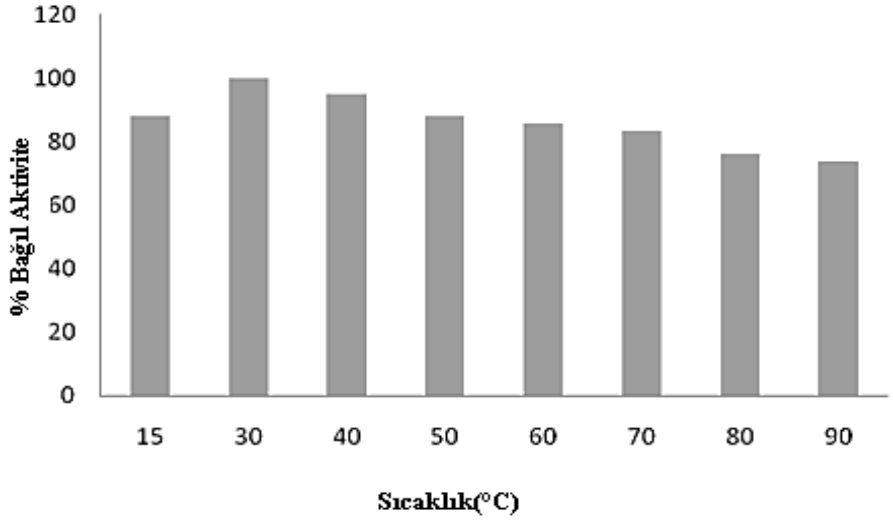
1 g nişasta, 0.006 M NaCl ile ayarlanmış pH 6.9 100 mL 0.02 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü. Daha sonra % 0.5'lik α-amilaz çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti tekrar yapılacak denemelerde kullanılmak üzere buzdolabında saklandı. Deney tüpüne, hazırlanan α-amilaz çözeltisinden 1 mL konuldu. Akabinde 100 rpm çalkalama hızında, 30°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika çalkalandı. Reaksiyon 5. dakika sonunda 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu. Ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika bekletildi. 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. Aynı işlemler her gün aynı enzim çözeltisiyle tekrarlanarak serbest enzimin aktivitesine depolama süresinin etkisi belirlenmiştir. Depolama süresi (gün)-(%) bağıl aktivite grafiği Şekil III.7'de gösterilmektedir.



Şekil III.7. α-Amilaz'ın Depolama süresi (gün)-(%) aktivite grafiği

III.3.8.4. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

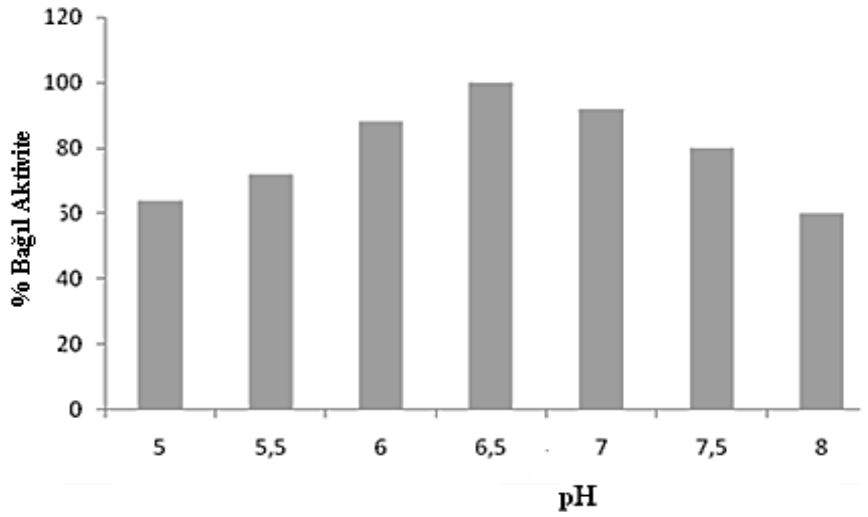
Nano kalsiyum karbonat üzerine kovalent olarak immobilize edilen α-amilaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini ölçmek için 8 farklı sıcaklıkta üçer örnekli toplamda 24 tane deney tüpü numaralandırıldı. Bu tüplere immobilize enzim örnekleri tartılarak konuldu. Tartılan örneklerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.8.'deki gibi Bernfield yöntemi kullanılarak farklı sıcaklıklarda 100 rpm çalkalama hızında çalışılarak yapıldı **[34].** Şekil III.8'de 15-90°C aralığındaki (%) bağıl aktivite grafiği gösterilmektedir.



Şekil III.8. İmmobilize α-Amilaz'ın sıcaklık(^{o}C)- % Aktivite grafiği

III.3.8.5. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktivitesine pH'nın Etkisi

pH 5-8 aralığında 0,02 M sodyum fosfat tamponlarıyla Bölüm III.3.6.'daki gibi nişasta çözeltileri hazırlandı Nano kalsiyum karbonat üzerine kovalent olarak immobilize edilen α-amilaz enziminin aktifliğine pH etkisini ölçmek için 7 farklı pH'ta üçer örnekli toplam 21 tane deney tüpü numaralandırıldı. Bu tüplere immobilize enzim örnekleri tartılarak konuldu. Tartılan örneklerin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.8.'de bahsedilen Bernfield yöntemiyle 30 °C'de (immobilize enzimin en yüksek absorbansı verdiği sıcaklık değeri),100 rpm çalkalama hızında yapıldı **[34]**. Şekil III.9'da pH 5-8 aralığındaki (%) bağıl aktivite grafiği gösterilmektedir.



Şekil III.9. İmmobilize Enzimin pH –(%)Aktivite grafiği

III.3.8.6. İmmobilize Edilen α-Amilazın Aktivitesine Depolama Süresinin Etkisi

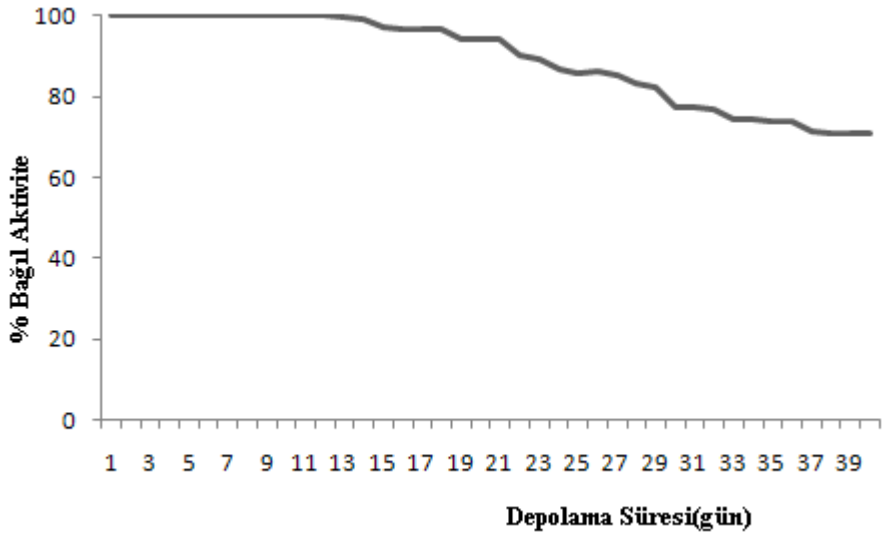
Nano kalsiyum karbonat üzerine kovalent olarak immobilize α-amilazın hazırlandığı tarihten itibaren belirli zaman aralıklarında aktivasyon ölçümleri yapıldı. Aktivasyon ölçümü yapılacak örnek ölçüm öncesi tartıldı. Tartılan örneğin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.8.'de bahsedilen Bernfield yöntemiyle 30 °C'de, 100 rpm çalkalama hızında çalışılarak yapıldı **[31, 32]**. TabloIII.1 'de immobilize enzimin depolam süresince absorbans ve aktivite değerleri ile şekil III.10'da 1.–40. gün aralığındaki (%) bağıl aktivite grafiği gösterilmektedir.

Tablo III.1. İmmobilize Enzimin Depolama Süresince Absorbans ve Aktivite Değerleri

Gün	Tartım (g)	Enzim Miktarı (mg)	Absorbans	Maltoz Miktarı (mg)	Aktivite	% Bağıl Aktivite
1	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100
2	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100
3	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100
4	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100
5	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100
6	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
7	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
8	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
9	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
10	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
11	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
12	0,00983	1,96	0,629	4,13	0,42	100,0
13	0,00975	1,94	0,621	4,08	0,42	99,5
14	0,00954	1,90	0,607	3,99	0,419	99,2
15	0,00989	1,97	0,617	4,05	0,41	97,3
19	0,0954	1,90	0,590	3,88	0,40	96,6
20	0,00975	1,94	0,589	3,87	0,39	94,3
21	0,00954	1,90	0,576	3,79	0,39	94,3
22	0,00976	1,94	0,564	3,71	0,38	90,2
23	0,00976	1,94	0,557	3,66	0,37	89,0
24	0,0098	1,95	0,545	3,58	0,36	86,9
25	0,00978	1,95	0,536	3,53	0,36	85,7
26	0,00954	1,90	0,527	3,47	0,36	86,2
27	0,00947	1,88	0,518	3,41	0,36	85,5
28	0,00960	1,91	0,511	3,36	0,35	83,1
29	0,00945	1,88	0,498	3,28	0,34	82,4

Tablo III.2. "Devam" İmmobilize Enzimin Depolama Süresince Absorbans ve Aktivite Değerleri

Gün	Tartım (g)	Enzim Miktarı (mg)	Absorbans	Maltoz Miktarı (mg)	Aktivite	% Bağıl Aktivite
30	0,00987	1,96	0,487	3,21	0,32	77,2
31	0,00967	1,92	0,477	3,14	0,32	77,2
32	0,00954	1,902	0,469	3,09	0,32	77,0
33	0,00978	1,95	0,462	3,04	0,31	74,6
34	0,00965	1,92	0,458	3,021	0,31	74,4
35	0,00956	1,90	0,452	2,98	0,31	73,9
36	0,00954	1,90	0,450	2,96	0,31	73,9
37	0,00987	1,96	0,448	2,95	0,30	71,5
38	0,00976	1,94	0,446	2,94	0,30	71,0
39	0,00978	1,95	0,444	2,93	0,30	71,0
40	0,00976	1,94	0,443	2,923	0,30	71,0



Şekil III.10. İmmobilize enzimin zaman (gün)-(%) aktivite grafiği

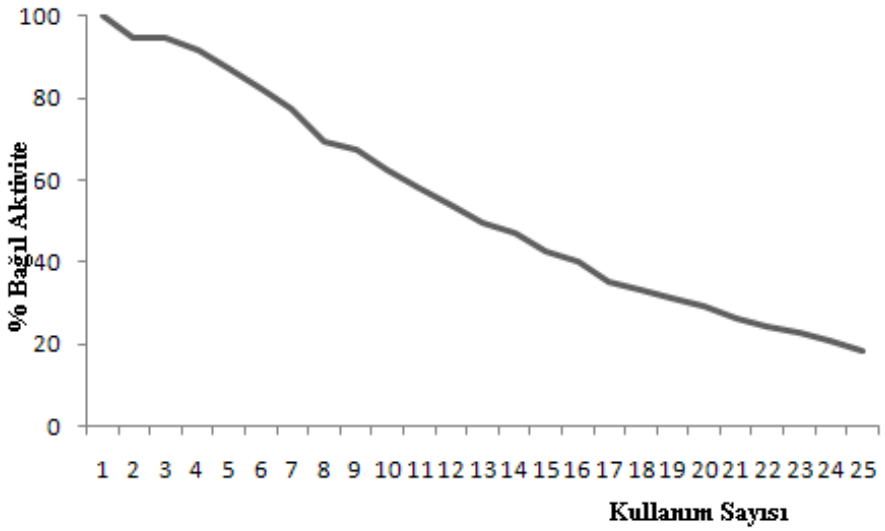
III.3.8.7. İmmobilize Edilen α-Amilazın Tekrar Kullanılabilirliği

Bu denemede aynı immobilize enzim örneği tekrar tekrar kullanılarak aktivasyon değerleri kaydedildi. Örneğin ağırlığı ölçüldü. Tartılan örneğin aktivasyon ölçümü Bölüm III.3.8.'de bahsedilen Bernfield yöntemiyle 30°C'de, pH 6.5'da (immobilize enzimin maksimum aktiviteyi verdiği sıcaklık ve pH ölçümleri) 100 rpm çalkalama hızında çalışılarak yapıldı. Tablo III.2.'de tekrar tekrar kullanılan

immobilize enzimin absorbans ve aktivite değerleri ile şekil III.11'de 1. ve 25. kullanım aralığındaki (%) bağıl aktivite grafiği gösterilmiştir.

Tablo III.3. Tekrar Tekrar Kullanılan İmmobilize Enzimin Absorbans ve Aktivite Değerleri

Tartım (g)	Enzim miktarı (mg)	Absorbans	Maltoz miktarı (mg)	Aktivite	Kullanım sayısı	% Bağıl Aktivite
0,01241	2,475	0,443	2,92	0,24	1	100,0
	2,475	0,42	2,77	0,22	2	94,9
	2,475	0,41	2,71	0,22	3	94,7
	2,475	0,406	2,68	0,22	4	91,5
	2,475	0,387	2,56	0,21	5	87,2
	2,475	0,363	2,40	0,19	6	82,2
	2,475	0,343	2,27	0,18	7	77,5
	2,475	0,307	2,04	0,16	8	69,5
	2,475	0,298	1,98	0,16	9	67,3
	2,475	0,276	1,83	0,14	10	62,7
	2,475	0,256	1,70	0,13	11	58,0
	2,475	0,238	1,58	0,12	12	54,2
	2,475	0,217	1,44	0,11	13	49,5
	2,475	0,207	1,38	0,11	14	47,0
	2,475	0,186	1,24	0,10	15	42,4
	2,475	0,178	1,19	0,09	16	40,0
	2,475	0,154	1,04	0,08	17	35,1
	2,475	0,143	0,96	0,08	18	33,0
	2,475	0,138	0,93	0,07	19	31,1
	2,475	0,126	0,85	0,06	20	29,2
	2,475	0,114	0,78	0,06	21	26,2
	2,475	0,104	0,71	0,06	22	24,1
	2,475	0,098	0,67	0,05	23	22,8
	2,475	0,088	0,60	0,05	24	20,7
	2,475	0,078	0,54	0,04	25	18,2



Şekil III.11. İmmobilize enzimin kullanım sayısı-(%) aktivite grafiği

III.3.9.Kinetik Çalışmalar

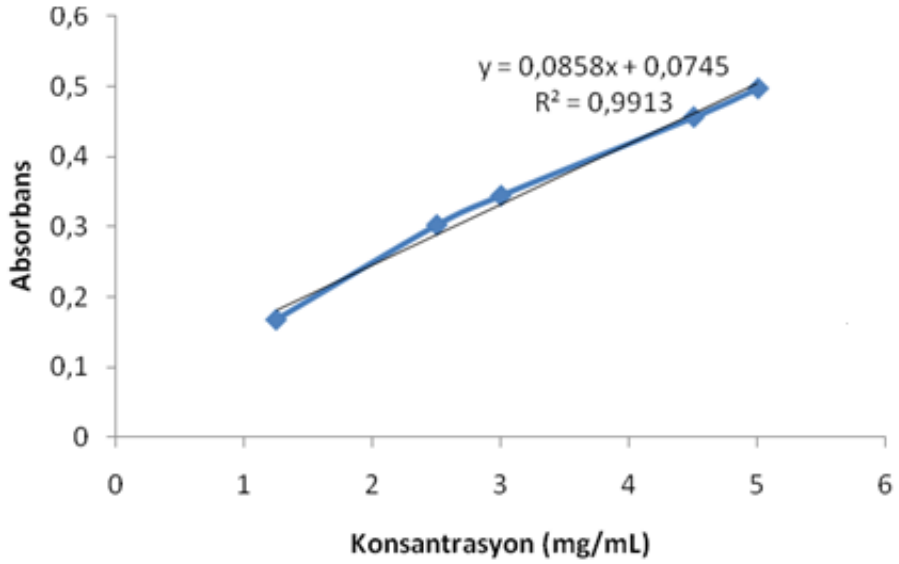
III.3.9.1. Ekstinksiyon Sabitinin (ε) Bulunması

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

Ekstinksiyon sabitini (ε) belirlemek için, çeşitli konsantrasyonlarda (1.0, 2.0, 2.4, 3.6, 4.0 mg/ml) nişasta çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin absorbsiyonu 540 nm'de, UV-Visible Spektrofotometre suya karşı sıfırlandıktan sonra ölçüldü.

Lambert Beer eşitliği aşağıda gösterilmiştir:

$A=\varepsilon \times C \times l$ **(III.1)**



Şekil III.12. Nişasta konsantrasyonu (mg/mL)–absorbans grafiği

Bu grafiğin eğimini bize ekstinksiyon sabitini (ε) verir. Buna göre ekstinksiyon sabiti 0.0858'tir **[35]**.

III.3.9.2. Serbest Ve İmmobilize α-Amilazın Kinetiği

Yaklaşık aynı enzim içeriğine sahip immobilize enzim nano partiküllerinden alındı. Farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 2, 2.5 g/100 mL) hazırlanan nişasta çözeltilerinden immobilize enzim nano partikülleri üzerine 1 mL konuldu. Tüpler 30°C'ye ayarlanmış su banyosunda 100 rpm hızında çalkalanarak 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 5. dakika sonunda 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit ilave edilerek durduruldu. Ardından kaynar su banyosuna konularak 5 dakika inkübe edildi. Su banyosundan tüpler çıkarıldı, soğuduktan sonra, 3500 rpm'de santrifüj edilerek üst faz alındı. Hidroliz olan şeker (maltoz) miktarı 540 nm'de Shimadzu 1601 model UV/Visible Spektrometrede ölçülen absorpsiyon değerlerinden yola çıkılarak hesaplandı **[31]**. Aynı deneme kinetik çalışmada kullanılan immobilize enzim içeriğine eşit alınarak serbest enzim için de gerçekleştirildi.

A= ε×C×l

A **:** aborbsiyon

ε **:** ekstinksiyon sabiti (mL/mg×cm)

C **:** konsantrasyon (mg/mL)

l **:** ışığın aldığı yol (1 cm)

m= ΔA/Δt (III.2)

ΔA **:** En büyük absorbsiyon değeri ile en küçük absorbsiyon değeri arasındaki fark;

Δt **:** Nişasta ile amilaz enziminin temas süresi (inkübasyon süresi)

V= M/ε×l (III.3)

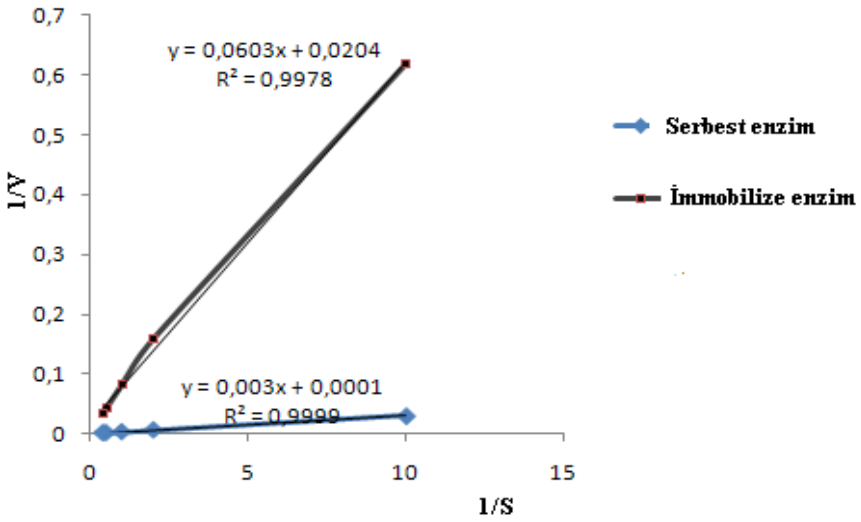
V **:** hız (mg/dakika×mL)

M **:** Maltoz miktarı

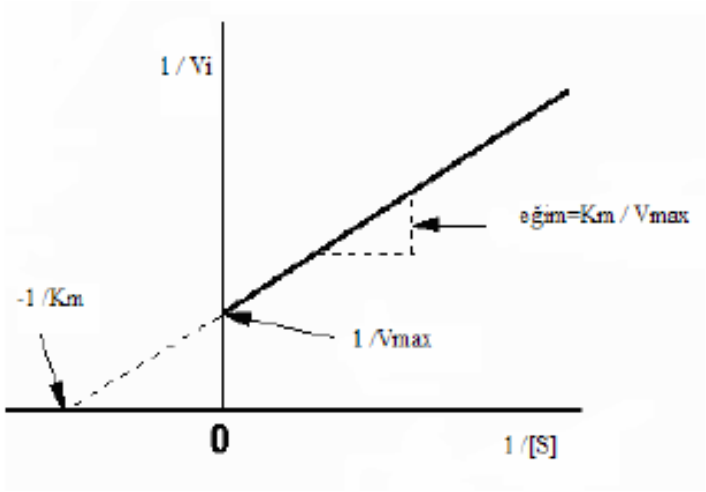
Bu eşitliklere göre serbest ve immobilize enzim için elde edilen nişasta konsantrasyonu (mg/mL)–hız (mg/dakika×mL) değerleri Tablo III.3 'de verilmiştir. Şekil III.3'de Tablo III.3. bulunan nişasta konsantrasyon (mg/mL)–hız (mg/dakika×mL) değerlerle çizilen Michaelis – Menten eğrileri gösterilmektedir.

Tablo III.4. Nişasta konsantrasyonu, immobilize enzimin maltozu açığa çıkarma hızı ve absorbans değerleri

[S] (mg/ml)	1/[S]	Absorbans	Maltoz miktarı (mg)	V	1/Vi
0	0	0	0	0	0
0,1	10	0,016	0,13	1,59	0,620
0,5	2	0,077	0,53	6,23	0,160
1,0	1	0,153	1,03	12,01	0,083
2,0	0,5	0,300	1,99	23,19	0,043
2,5	0,4	0,380	2,51	29,28	0,034



Şekil III.13. Serbest ve immobilize enzimin Linewear-Burke eğrisi



Şekil III.14. Linewear-Burke Grafiği

İmmobilize α-amilazın Linewear-Burke grafiklerinin eğiminden Km ve Vmax değerleri aşağıdaki gibi hesaplandı:

İmmobilize α-amilaz için elde ettiğimiz y = 0.0603x +0.0204 doğru denklemine göre, Linewear-Burke eğrisinin eğimi 0.0603'tür.

x = 0 iken y= 0.0204 olur.

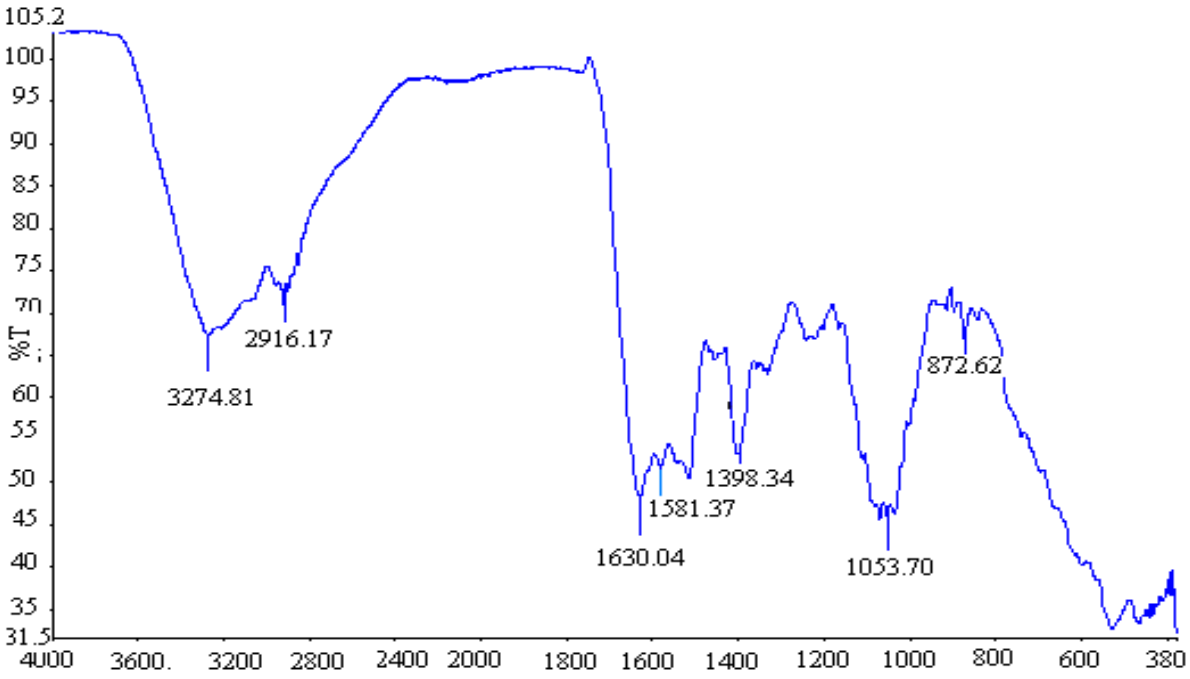
x = 0 iken; y =1/Vmax olduna göre 1/Vmax = 0.0204'tür. Buna göre; Vmax = 1/0.0204= 49.02 (mg/dakika×mL) olarak hesaplandı. Eğim = Km/ Vmax= 1/ Vmax × Km ise; Km = 2.96 (mg/mL)'dır. **[47-50]**

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

IV.1. KARAKTERİZASYON

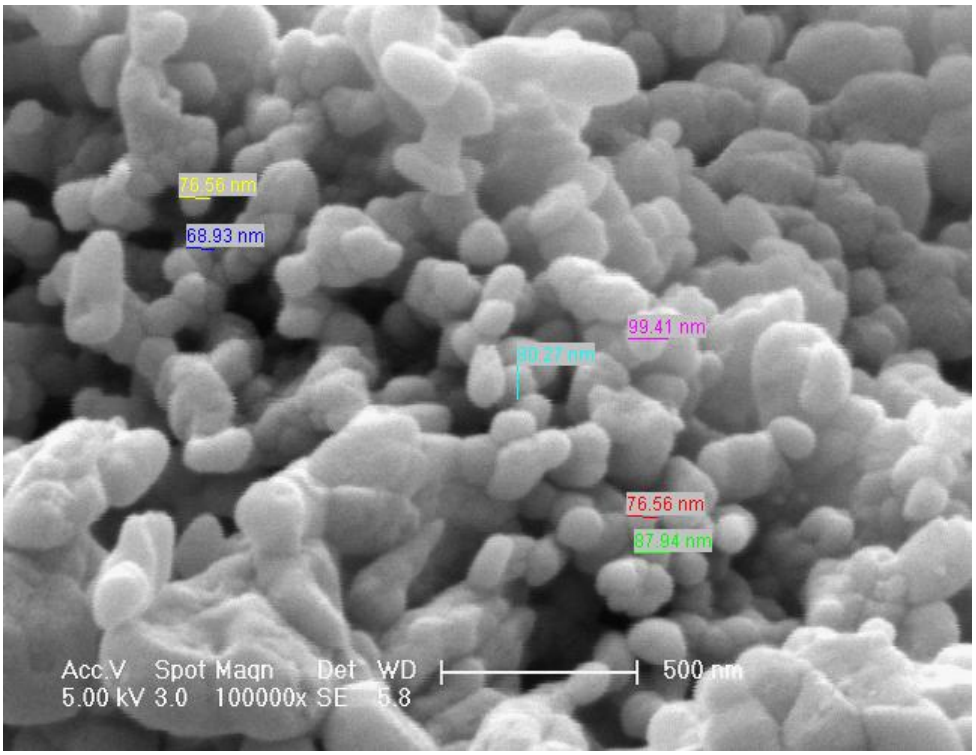
Yapılan bu çalışmada nano kalsiyum karbonat partikülleri (3-aminopropyl) triethoxysilan bileşiği kullanılarak modifiye edildi ve amin grubu kazandırıldı. Şekil IV.1 ‘de (3-aminopropyl)triethoxysilan bileşiği ile modifiye edilmiş nano kalsiyum karbonat partikülerinin FTIR spektrumu gösterilmektedir. Şekil IV.1.’deki spekturuma göre 3274 cm^{-1} deki pik N-H ve OH bağlarının ve 1630 cm^{-1} deki pik de -C=N- bağının verdiği piklerdir. 2916 cm^{-1} deki pik C-H bağının, 1581 ve 1398 cm^{-1} deki pikler C-N- bağının , 1053 cm^{-1} ve 872 cm^{-1} civarındaki pikler ise Si-O-Si bağının verdikleri piklerdir.



Şekil IV.1. Modifiye edilmiş nano kalsiyum karbonat partiküllerinin FTIR spekturumu

IV.2. NANO KALSİYUM KARBONATIN SEM GÖRÜNTÜLERİ

Nano kalsiyum karbonat partiküllerinin yapısı şekil IV.2'de gösterilmiştir. Partikül çaplarının yaklaşık 100 nm'den küçük ve homojen büyüklükte olduğu görülmüştür.



Şekil IV.2. Nano kalsiyum karbonatın SEM görüntüsü

IV.3. İMMOBİLİZASYON VERİMİ

Yapılan bazı çalışmalar gösterir ki; α-amilazın immobilizasyonunda bağlanma kapasitesi kullanılan destek materyallerin spesifik özelliklerinden dolayı değişiklik gösterir **[2].** 2008 yılında yapılan bir çalışmada α-amilazın, manyetik aljinat küreler içerisine immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, serbest ve immobilize α -amilaz için, optimum pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir Serbest ve immobilize α -amilazın, pH<5.0 ve pH >8.0 değerlerinde enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklık serbest enzim için 60^{o}C, immobilize enzim için 80^{o}C olarak bulunmuştur. **[7]** Yine başka bir çalışmada ,fonksiyonel amin gruplu cam küreler üzerine immobilize edilmiş ve 25.2 mg enzimin 1 g cam küreye bağlandığı

rapor edilmiştir **[42]**. Bu çalışmada ise 199.43 mg enzim/1 g silanlanmış nano kalsiyum karbonata bağlanmıştır.

IV.4. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ

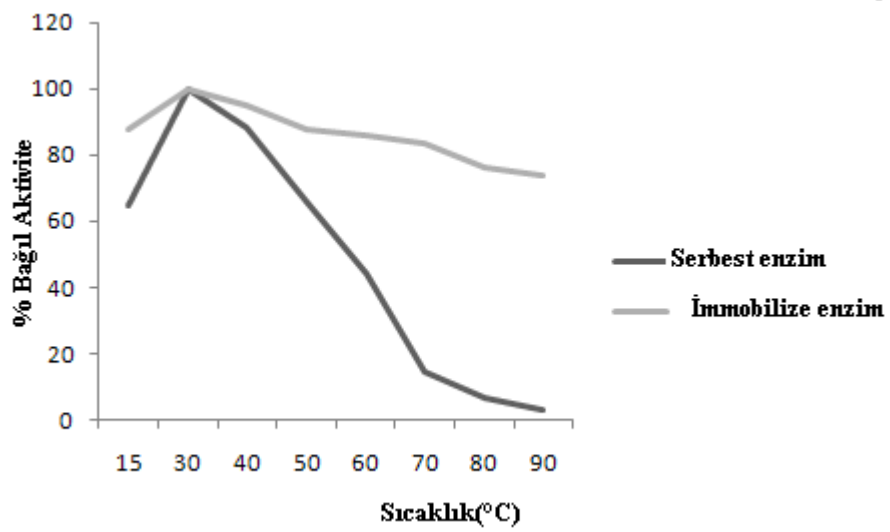
Serbest enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla Bölüm III.3.8.1.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest enzim için optimum sıcaklık 30°C olarak bulundu ve maksimum aktivitenin sıcaklık ile değişimi Şekil III.5'de gösterildi. Bu sıcaklıkta bulunan aktivite değeri, maksimum aktivite % 100 olarak kabul edilmiş ve bu değer esas alınarak diğer sıcaklıklarda elde edilen maksimum aktivite hesaplanmıştır. 30°C'nin üzerinde sıcaklık artışıyla enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir.

İmmobilize enzimlerin sıcaklık kararlılığı uygulanmalarının en önemli nedenlerinden biridir. Özellikle kovalent bağlanmayla immobilize edilen enzimler sıcaklığa karşı serbest enzimlerden daha dirençlidirler. Bu da immobilize enzimlerin belirli bir zaman aralığındaki kullanımlarında sabit seviyede aktivite göstermelerini sağlar ve prosesin kontrolü kolaylaşır. Enzimlerin biçimsel esnekliği immobilizasyon ile etkilenir. İmmobilizasyon enzimin esnekliğini bozarak sertliğini artırır. Bu da çoğu zaman yükselen ısıya karşı kararlılığın artması halinde kendini gösterir. Çoğu araştırmayla desteklenmiştir ki immobilizasyon neticesinde biçimsel esnekliği azalan immobilize enzimlerin sıcaklık kararlılığı serbest enziminkinden daha yüksektir **[1].**

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 **[40]**. 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 **[41]**. α-Amilazın aktivitesinde de 30 °C'nin üzerinde hızlı bir azalma gözlenmiştir.

İmmobilize α–amilazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için Bölüm III.3.8.4'te anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen verilere göre oluşturulan grafik III.8'te verildi. Nano kalsiyum karbonat bileşiği üzerine kovalent olarak immobilize edilen α–amilaz için optimum sıcaklık 30°C olarak bulundu.

Serbest α–amilaz için optimum sıcaklık 30°C iken , immobilizasyonla bu değer değişmemiştir. Fakat doğru eğiminin immobilize enzimle daha yavaş azalması kararlılığını daha uzun süre koruduğunu gösterir. Şekil IV.3'de serbest ve immobilize enzimin 15-90 °C sıcaklık aralığındaki % bağıl aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.



Şekil IV.3. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine sıcaklığın etkisi

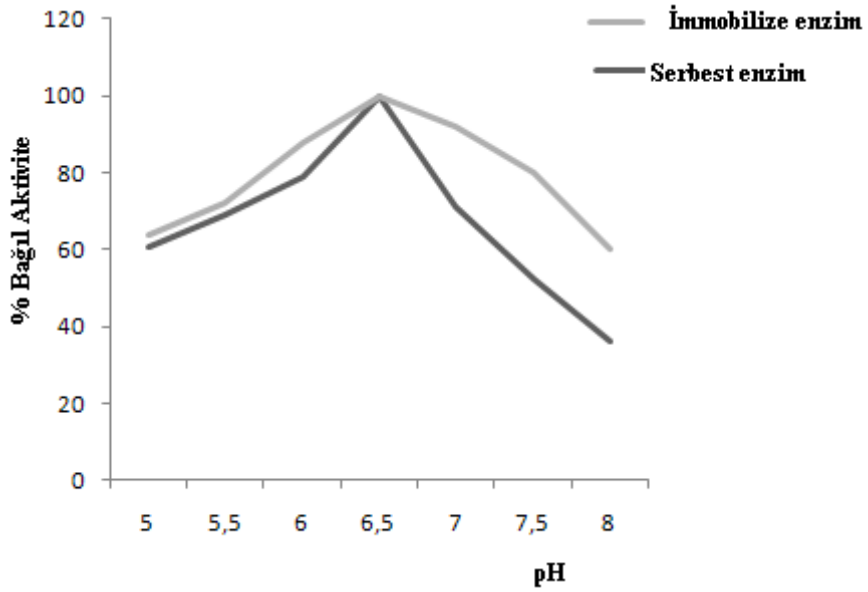
IV.5. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE pH'IN ETKİSİ

Serbest α-amilaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için farklı pH'larda Bölüm III.3.8.2.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest α-amilaz enzimi için optimum pH 6.5'da bulundu ve maksimum aktivitenin pH ile değişimi Şekil III.6'da gösterildi ve bu şekilde görüldüğü gibi asidik ve bazik bölgelerde maksimum aktivitede bir azalma gözlenmiştir. Bu pH'da bulunan maksimum aktivite değeri % 100 olarak kabul edilmiştir ve bu değer baz alınarak diğer pH'larda elde edilen maksimum aktivite hesaplanmıştır.

Ortam pH'sı enzimatik reaksiyonların pek çoğunda hızı etkileyen önemli bir faktördür. Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir **[33]**. 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. Enzimin en fazla aktivite

gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'sı adı verilir. Enzimlerin tipik pH eğrileri çan şeklindedir ve enzim hızı optimum pH'nın her iki yanında giderek azalmaktadır. Bu eğride enzimin tersinir olarak inaktive olduğu veya yıkıldığı uç pH değerleri vardır. 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. Enzimlerin optimum pH'ları 2-10 arasında değişmektedir. Enzimlerin optimum pH'sı çeşitli koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Optimum pH'da değişikliğe neden olan faktörler; enzimin elde edildiği kaynak, enzimin kullanıldığı substratın tipi ve konsantrasyonu, sıcaklık, kofaktör tipi ve süresi olarak sıralanabilir. Enzimler bütün pH değerlerinde kararlı değildirler. Her enzimin kararlı kaldığı bir pH aralığı vardır**[36].** Diğer taraftan, enzim ile polimerik destek maddesi arasında oluşabilecek farklı etkileşim kuvvetlerininde (hidrojen bağı oluşumu, dipol-dipol etkileşimi gibi) pH'yı etkilediği bilinmektedir [**37, 38,39].**

Nano kalsiyum karbonat üzerine kovalent olarak immobilize edilen α-amilaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Bölüm III.3.8.5.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı ve optimum pH 6.5 bulundu ve maksimum aktivitesinin pH ile değişimi Şekil III.9'da gösterildi. Serbest α–amilaz ve immobilize α–amilaz için optimum pH değeri değişmezken immobilizasyonla pH 6.5-8.0 aralığında aynı pH aralığındaki serbest enzime göre daha yüksek aktivite göstermiştir.Şekil IV.4'te serbest ve immobilize enzimin pH 5.0-8.0 aralığındaki (%) bağıl aktivite değerleri karşılaştırılmıştır.



Şekil IV.4. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine pH'nın etkisi

IV.6. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN AKTİFLİĞİNE DEPOLAMA SÜRESİNİN ETKİSİ

Serbest α-amilaz aktivitesine depolama süresinin etkisini incelemek amacıyla Bölüm III.3.8.3.'te anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest α-amilaz enziminin aktivitesine depolama süresinin etkisi Şekil III.7'de 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 aktivitesi hesaplanmıştır.

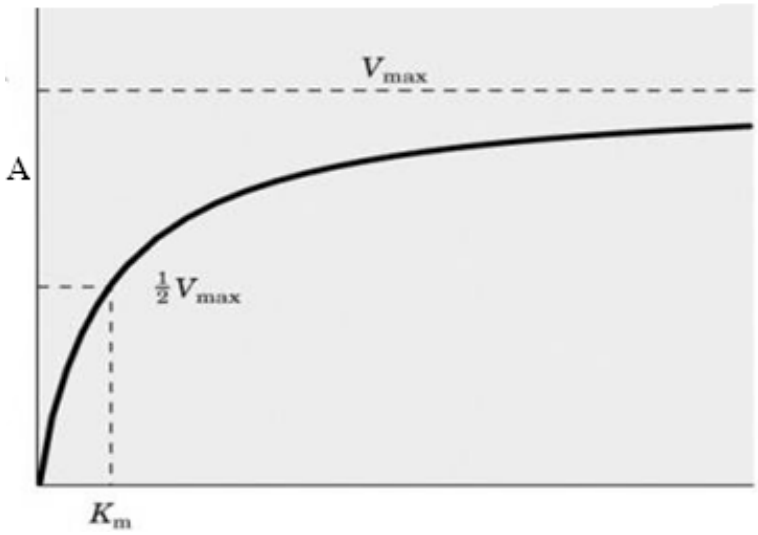
Nano kalsiyum karbonat üzerine kovalent olarak immobilize edilen α-amilazın aktivitesine depolama süresinin etkisini incelemek için Bölüm III.3.8.6.'da anlatılan yöntem ile aktiviteleri tayin edildi, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Tablo III.1'de verildi. Buna göre immobilize edilen α-amilazın maksimum aktivitesinin depolama süresiyle değişimi Şekil III.10'da gösterildi. İmmobilize enzimin 4 °C depolamada 40 günde başlangıç aktivitesinin % 71'ini koruduğu gözlendi.

IV.7. SERBEST ve İMMOBİLİZE ENZİMİN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ

Serbest α-amilaz bir kez, immobilize enzim ise aktivitesini koruduğu sürece pek çok kez kullanılabilir. Nano kalsiyum karbonat üzerine kovalent olarak immobilize edilen α-amilaz 1 gün boyunca 25 kez kullanılarak Bölüm III.3.8.7'de anlatıldığı gibi aktivitesi tayin edildi, elde edilen absorbans değişimleri ve aktivite değerleri Tablo III.2'de verildi. İmmobilize edilen α-amilazın maksimum aktivitenin kullanım sayısı ile değişimi Şekil III.11'de gösterildi. İmmobilize enzimin 25 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktivitesinin % 18 'sini koruduğu gözlendi.

IV.8. İMMOBİLİZE EDİLEN ENZİMİN KİNETİK PARAMETRELERİ

Enzim tepkimelerini iki aşamalı olarak yürüdüğü düşünülürse birinci aşamada substrat enzimi tersinir olarak bağlanıp enzim-substrat kompleksini oluşturur. Bu bazen Michaelis kompleksi olarak adlandırılır. Enzim sonra tepkimenin kimyasal adımını katalizler ve ürünü salar.



Şekil IV.5. Bir enzim tepkimesinde substrat (S) konsatrasyonu ile hız (v) arasındaki ilişkiyi gösteren doyma eğrisi

Enzimlerin saniyede katalizlediği tepkime sayısı birkaç milyonu bulabilir. Enzim hızları solüsyon şartlarına ve substrat konsantrasyonuna bağlıdır. Proteini denatüre eden şartlar, yüksek sıcaklık, aşırı pH veya tuz konsantrasyonu gibi, enzim aktivitesini ortadan kaldırır, substrat konsantrasyonunu artırmak ise aktiviteyi artırır.

Bir enzimatik tepkimenin en yüksek hızını bulmak için, sabit bir ürün oluşum hızına varılana kadar substrat konsantrasyonu artırılır. Bu, yukarıdaki doyma eğrisinde görülebilir. Doyma olmasının nedeni, substrat konsantrasyonu arttıkça, gittikçe artan sayıda enzim molekülünün substrata bağlı ES biçimine dönüşmesidir. Enzimin maksimum hızında (V_{max}), tüm enzim aktif merkezleri substrat tarafından bağlı durumdadır ve ES kompleksinin miktarı toplam enzim miktarına eşittir. Ancak, V_{max} enzimlerin kinetik sabitlerinden sadece biridir. Belli bir tepkime hızı için gereken substrat miktarı da önemlidir.Enzimin maksimum hızının yarısına ulaşması için gereken substrat konsantrasyonudur,Michaelis-Menten (K_m) olarak tanımlanır. Her enzimin belli bir substrat için karakteristik bir K_m değeri vardır, bu değer substratın enzime ne derece sıkıca bağlandığını gösterir. **[43]** Michaelis sabiti, Km'nin değeri enzim ile substratı karakterize eden önemli bir parametredir. Enzim ve substrat derişiminden bağımsızdır ve enzimin substrata karşı ilgisinin göstergesidir. Km değeri ne kadar küçükse enzim substrata o kadar fazla ilgi gösterir. Vm değeri ise substrat derişimine bağlı bir niceliktir. Hem Km hem de Vm enzimin ve substratın yük dağılımına, konformasyonuna ve reaksiyon sıcaklığına bağımlı parametrelerdir **[44]**. Elde edilen değerlere göre immobilize edilen α-amilazın Km değeri 2.96 (mg/mL) olarak hesaplandı.

BÖLÜM V

SON DEĞERLENDİRMELER

Nano boyutta kalsiyum karbonat elde edildi. Kovalent immobilizasyon sol-jel tekniği ile gerçekleştirildi. İmmobilize enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinde bir değişme gözlenmezken daha yüksek aktivite gösterdiği ve yüksek sıcaklıkta serbest enzime göre daha kararlı olduğu belirlendi. Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilirken, immobilize enzim 25. kullanımında başlangıç akivitesinin hala %18'ini koruduğu belirlendi. Serbest enzim 15 gün içinde aktivitesini kaybederken, immobilize enzim ise 40 gün içinde aktivitesinin sadece % 29'unu kaybetmiştir. Kinetik çalışmalar ve hesaplamalar sonucunda immobilize enzimin Km değeri serbest enzimin Km değerinden küçük bulunmuştur. Yani immobilize enzim substrata serbest enzimden daha fazla ilgi göstermiştir.

REFERANSLAR

[1] Özçömlekçi, E.; "Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma İle İmmobilazasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi", *Yüksek Lisans Tezi,* İstanbul Teknik Üniversetesi Fen Bilimleri Enstitüsü,İstanbul,Türkiye, **(2006)**

[2] Yarar, Ü.; **"**α- Amilaz Enziminin Fotoimmobilizasyonu**"** *Yüksek Lisans Tezi,* Marmara Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, **(2008)**

[3] 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).**

[4] Bayramoğlu, G.; Akgöl, S.; Bulut, A.; Denizli, A.; Arıca, MY. ;. "Covalent Immobilization Of Invertase Onto A Reactive Film Composed Of 2-hydroxyethylmethacrylate And Glycidyl Methacrylate: properties and application in a continuous flow system", *Biochemical Engineering Journal,* **(2003)**14 (2): 117-126.

[5] Bayramoğlu, G.; Yılmaz, M.; Arıca., MY. ; "Immobilization of a thermostable alpha-amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis", *Food Chemistry*, **(2004)** 591-599.

[6] Betancor, L.; Fuentes, M.; Dellamora-Ortiz, G.; Lopez-Gallego, F.; Hidalgo, A.;Aloso-Morales, N.; Mateo, C.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente ,R.; "Dextran Aldehyde Coating Of Glucose Oxidase Immobilized On Magnetic Nanoparticles Prevents Its Inactivation By Gas Bubbles", *Journal of Molecular Catalysis BEnzymatic***,(2005)**97-101.

[7] Şener, A.; Mısırlı, Y.; Çetin,B.; Denkbas, E.;Temiz,A.; "α-Amilazın Manyetik Özellige Sahip Aljinat Küreler içerisine İmmobilizasyonu", 10. Gıda Kongresi, Erzurum, Türkiye**,(2008)**.

[8] Dominiguez, E.; Nisson, M.; Hahn-Hagerdal, B.: "Carbodiimide coupling of β-galactosidase from Aspergillus oryzae to alginate", *Enzyme Microb. Technol*., 10 **(1998)** 606-610.

[9] Guzman-Maldonado, H.; Paresdes-Lopez, O.: "Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review", *Critival Reviews in Food Science and Nutrition,* 35(5) (**1995)** 373-403.

[10] Kuzu, S.; "Kitinaz Üreten Bacıllus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu", *Yüksek Lisans Tezi,* Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,İstanbul,Türkiye **(2008)**.

[11] Prof. Dr. Ulvi Reha Fidancı – biyokimya Ders Notları.url

[12] Telefoncu, A.: *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji* (Telefoncu, A. ed.) **(1986)**.

[13] Dizge,N.; Canlı,O.; Keskinler,B.;Tanrıseven,A.;"Mikro Poröz Polimerik Enzim Reaktörleri Kullanarak Ayçiçek Yağından Biyodizel Üretimi" Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çevre Mühendisliği, Kimya Bölümü,

[14] Zitle, C. A.: *Enzymology*, 14 **(1953)** 319.

[15] **www.biyotek.com.tr/makaleler/sayıo9/enzimler doc**

[16] Baran,M.;"Miksobakterilerden α-Amilaz Enziminin Ayırımı VeSaflaştırılması", *Yüksek Lisans Tezi* ,Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, Türkiye, **(2001)**

[17] Karadağ, H.: "Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu", *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, **(2001)** 26-28.

[18] Telefoncu, A.; Tarhan, L.; Pekin, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23 **(1981)** 1669.

[19] Carr, P. W.; Bowers, L. D.; "Support Considerations in Chemical Analysis", *Enzymes*, Academic Press, New York, 56 **(1980)** 167-170.

[20] Chen, S.; Liu, Y.; Yu, P.: "Study on Column Reactor of Chitosan Immobilized", *Chem. Abstr.*, 127 (4) **(1996)** 127-129.

[21] Dimitriu, S.; Popa, M.; Dimitriu, M.: "Polymeric Biomaterials as Enzyme and Drug Carriers", *J. Bioactive and Compatible* Polymers, 3 **(1998)** 243-312.

[22] Kaetsu, I.; Kamura, M.; Yoshida, M.: "Enzyme immobilization by radiation induced polymerization of HEMA at low Temperature", *Biotechnol. Bioeng.*, 21 **(1979)** 847-849.

[23] Mattaison,B(1983 İmmobilized Cells and Organnels vol. 1 and 2, crs Pres ,Boca Raton,Florida**.**

[24] Chen, S.; Liu, Y.; Yu, P.: "Study on Column Reactor of Chitosan Immobilized", *Chem. Abstr.*, 127 (4) **(1996)** 127-129.

[25] 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.

[26] Cabral, J. M. S.; Kennedy, J. F.; Kalogerakis, B.: "Covalent and coordination immobilization of proteins", *Bioprocess Technol.*, 14 **(1991)** 73-138.

[27] Salamone, J. C.: "*Polymeric Materials Encylopedia*", *CRC Pres*, New York, 1 **(1996)** 149-154.

[28] Kierstan, P. J.; Bucke, C.: "The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles and Enzymes in Calcium Alginate", *Biotechonology and Bioengineering*, 19 **(1977)** 87-397.

[29] Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B.: "Structural and Mechanical Properties of *BiopolymerGels*", In: H. Benoit (Editor), Biopolymers, Springer-Verlag, Berlin, **(1987)** 155.

[30] Saburo, F.; Atsuo, T: "Application of biocatalyst immobilized by polymer methods", *Enzyme Engineering*, Plenum Press, New York, **(1985)**.

[31] 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

[32] Stoscheck, C.: "Quantification of Protein", *Methods in Enzymology*, 182 **(1990)** 50-68.

[33] Robyt, J. F.; Whelan, W. J.: "Reducing value methods for maltodextrins: 1. Chain lenght dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-lenght indepence of alkaline copper.", *Analytical Biochemistry*, 45 **(1972)** 510-51

[34] Bernfield, P. Enzymes of starch degradation and synthesis in, Advances in Enzymology XII, F, Nord; Interscience Publication: NY, 1951, 379.

[35] 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.

[36] Şen, S.; Yüksek Lisans Tezi, " Enzim Tutuklanmış Polivinilferrosenyum Perklorat Modifiye Elektrodu İle Asetilkolin Tayini", Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Isparta, Türkiye, **(2002) 45,46.**

[37] Arıca, Y.M.; Hasırcı, V.N.: "Immobilization of Glucose Oxidase; a Comparation of Entraped and Covalent Bonding", *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* 58 **(1993)** 287-292.

[38] 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.

[39] Doonng, R.A.; Tsai, H. C.: "Immobilization and Characterization of Sol-Gel-Encapsulated Acetylcholinesterase Fiber Optic Biosensor", *Analytica Chimica Acta* 434 **(2001)** 239-246.

[40] Tekman, Ş.; Öner, N.: "Genel Biyokimya", *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*, İstanbul, **(1994)** 47-49.

[41] Lee, P. M.; Lee, K. H.; Siaw, S. Y.: "Covalent immobilization of aminoacrylase to alginate for 2-phenyl-alanine production", *J. Chem. Technol.,* 58 **(1993)** 65-70.

[42] Kahraman, M. V.; Bayramoğlu, G.; Apohan, N. K.; Güngör, A.: *Food Chemistry*, 104 **(2007)** 1385.

[43] http://www.wikipedia.org.

[44] Chaplin, M. F.; Bucke, C.; *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Great Britain, **(1990)**.

[45] 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.

[46] 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.

[47] 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.

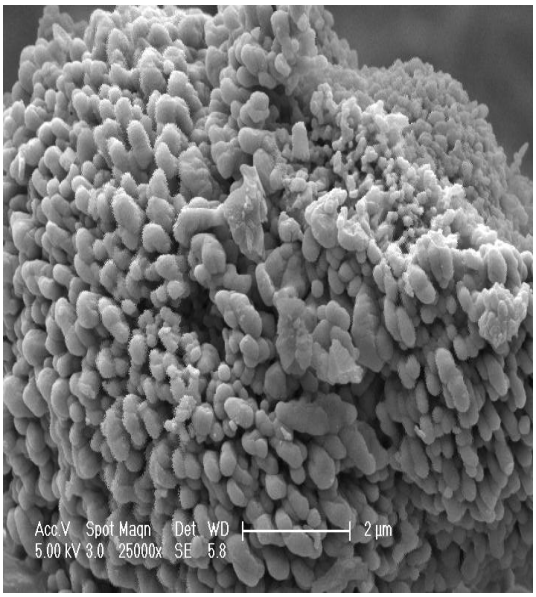
[48] Demircioğlu, H.; Beyenal, H.; Tanyolaç, A.; Hasırcı, N.: "Entrapment of Urease in Glycol Containing Polymeric Matrices and Estimation of Effective Diffusion Coefficients of Urea", *Polymer*, 36 **(1995)** 4091-4096.

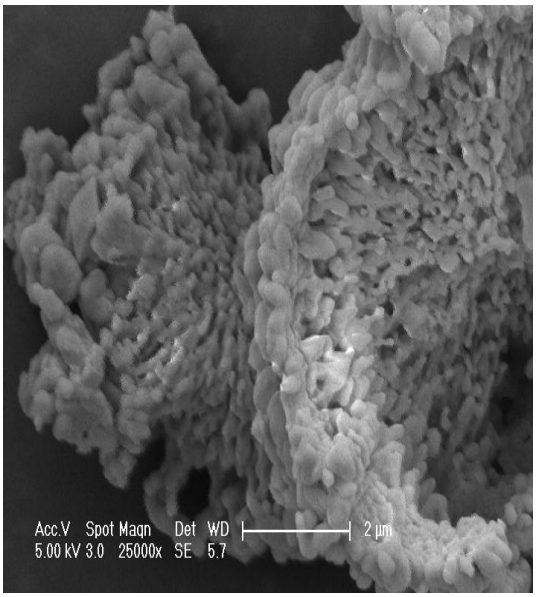
[49] Johanson, G.; Moore, S. W.: "Catalytic Antibodies with Acetylcholinesterase Activity", *Journal of Immunological Methods* 269 **(2002)** 13-28.

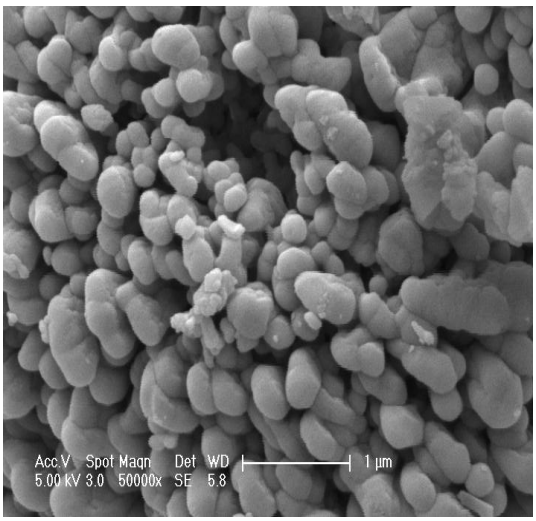
[50] Chiou, S.H.; Wu, W. T.: "Immobilization of Candida Rugosa Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups", *Biomaterials*, 25 **(2004)** 197-204.

EKLER

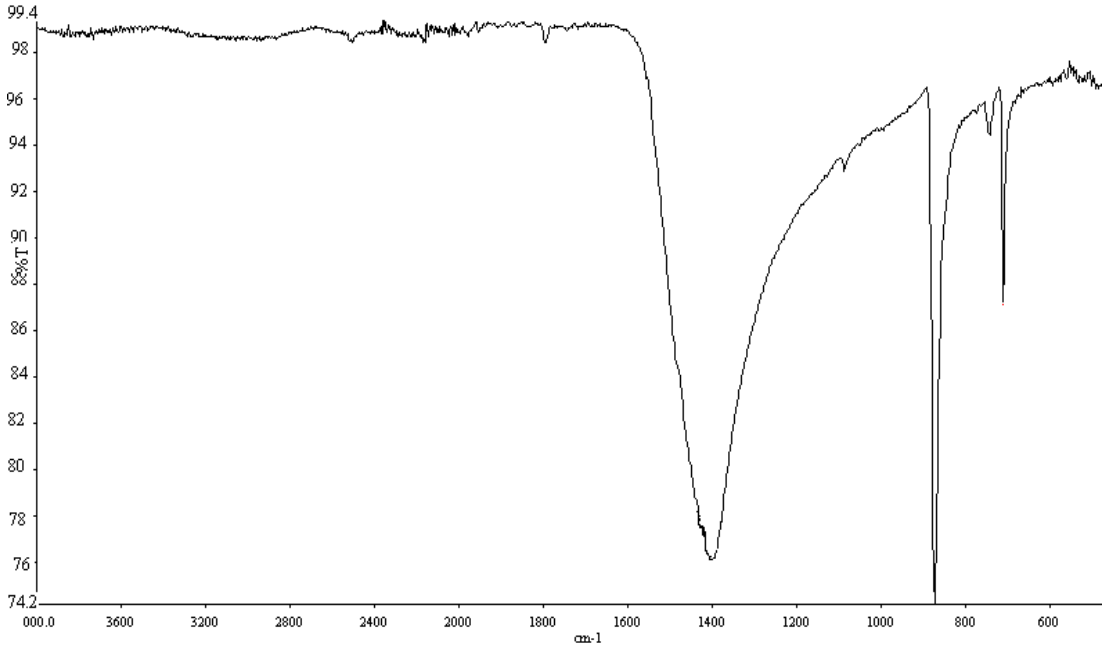
EK-1 NANO KALSİYUM KARBONATIN SEM GÖRÜNTÜLERİ



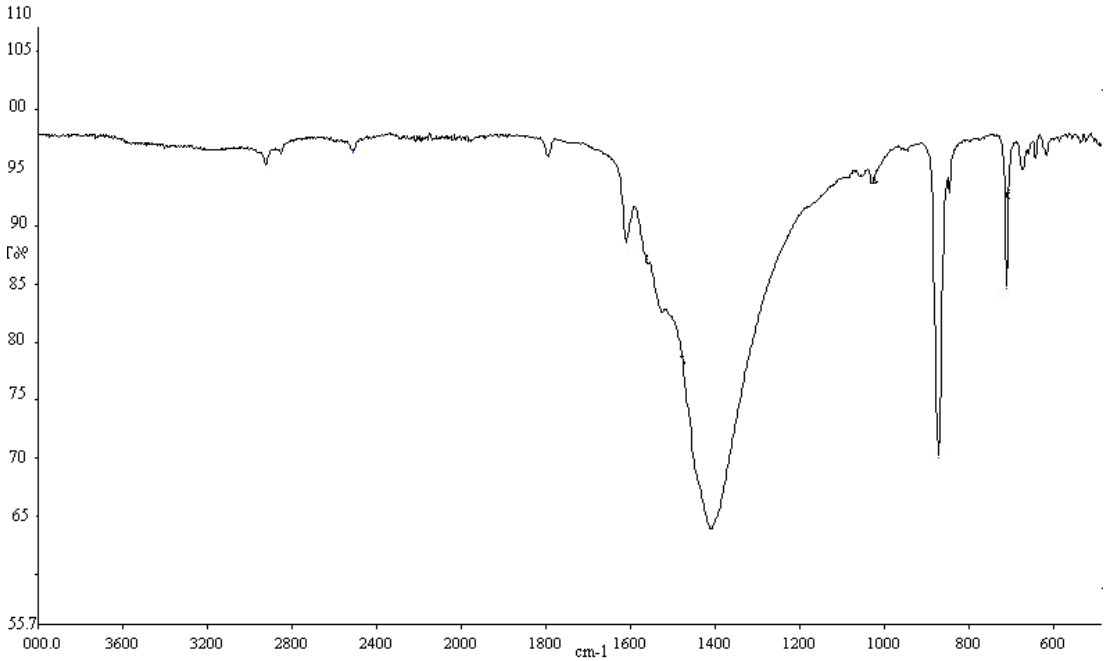




EK-2 IR SPEKTURUMLARI



ŞEKİL EK-2.1. Nano Kalsiyum Karbonatın IR Spekturumu



ŞEKİL EK-2.2. Silanlanmış Nano Kalsiyum Karbonatın IR Spekturumu

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Sivas'ta doğdum. İlk ve orta eğitimimi Sivas'ta tamamladım. 2008 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Programı'na Yüksek Lisans öğrencisi olarak kabul edildim.