

**POLİ(METİLMETAKRİLAT-ko-GLİSİDİLMETAKRİLAT) HİDROJELİ
KULLANILARAK β -GALAKTOSİDAZİN KOVALENT BAĞLANMA
YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU**

GÜL TUNÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2006
ANKARA**

**POLİ(METİLMETAKRİLAT-ko-GLİSİDİLMETAKRİLAT) HİDROJELİ
KULLANILARAK β -GALAKTOSİDAZİN KOVALENT BAĞLANMA
YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU**

GÜL TUNÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2006
ANKARA**

Gül TUNÇ tarafından hazırlanan Poli(Metilmetakrilat-ko-Glisidilmetakrilat) Hidrojelleri Kullanılarak β -Galaktosidazın Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilizasyonu adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

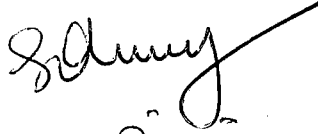
Yrd.Doç.Hayrettin TÜMTÜRK

Tez Yöneticisi



Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Serpil AKSOY



Üye : Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL



Üye : Doç. Dr. Meral KARAKIŞLA ŞAHİN



Üye : Doç. Dr. Kezban ULUBAYRAM



Üye : Yrd.Doç.Hayrettin TÜMTÜRK



Tarih : 11 / 05/ 2006



Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



GÜL TUNÇ

**POLİ(METİLMETAKRİLAT-KO-GLİSİDİLMETAKRİLAT) HİDROJELİ
KULLANILARAK β -GALAKTOSİDAZIN KOVALENT BAĞLANMA
YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

GÜL TUNÇ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mayıs 2006**

ÖZET

Bu çalışmada, β -galaktosidaz enzimi (EC.3.2.1.23), epiklorhidrin (ECH) ile aktifleştirilen poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) (P(MMA-ko-GMA)) desteği kullanılarak kovalent olarak immobilize edilmiştir. Serbest enzim için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{mak}) değerleri sırası ile 0,343 mM, 0,0259 Mm.dak⁻¹ ve kovalent olarak immobilize edilen enzimler için ise 1. ve 2. bileşim için sırası ile K_m değerleri, 0,0625 mM, 1,907 mM, V_{mak} değerleri ise 0,0502 mM.dak⁻¹, 0,274 mM.dak⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri 5,0 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık ise sırası ile 30 ve 35 °C olarak bulunmuştur. 35 °C ve 45 °C'de inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla serbest enzim için 0,0144 dak⁻¹ ve 0,0198 dak⁻¹, 1.bileşim için 0,0401 dak⁻¹ ve 0,0477 dak⁻¹, 2.bileşim için 0,0422 dak⁻¹ ve 0,0503 dak⁻¹ ve 3.bileşim için 0,0446 dak⁻¹ ve 0,0559 dak⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest enzim 30 gün sonunda aktivitesinin % 10' unu korurken, ECH kullanılarak aktifleştirilen immobilize enzimlerde sırasıyla % 80, % 73, % 70 oranında aktivite korunmuştur. ECH kullanılarak aktifleştirilen immobilize enzimlerin 20 kez kullanımı sonunda aktiviteleri sırasıyla % 50, % 37, % 26 olarak bulunmuştur.

Enzimin tekrar kullanım sayısı, depolama ve termal kararlılığı immobilizasyon işlemi ile arttırılmıştır.

Bilim kodu	: 201.1.117
Anahtar Kelimeler	: β-Galaktosidaz, poli (metilmetakrilat-koglisidilmetakrilat), immobilizasyon, kovalent bağlanma
Sayfa Adedi	: 78
Tez Yöneticisi	: Yrd.Doç.Dr.Hayrettin TÜMTÜRK

**COVALENT IMMOBILIZATION OF β -GALACTOSIDASE BY USING
POLY(METHYLMETHACRYLATE-co-GLYCIDYLMETHACRYLATE)
HYDROGEL**

(M. Sc. Thesis)

Gül TUNÇ

**UNIVERSITY OF GAZI
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

May 2006

ABSTRACT

In this study, β -galactosidase (E.C 3.2.1.23) was covalently immobilized on poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) (P(MMA-co-GMA)) which was activated by using epichlorohydrin (ECH). Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) values were found as 0.343 mM and 0.0259 mM.min⁻¹, respectively for free enzyme. These values for immobilized enzyme (for 1st and 2nd compositions) were found as 0.0625 mM, 1.907 mM and 0.502 mM.min⁻¹, 0.274 mM.min⁻¹, respectively. The optimum pH value for free and immobilized enzyme was found as 5,0 and optimum temperature for free and immobilized enzyme were 30°C and 35°C, respectively. Inactivation constants of free and ECH activated enzymes (in order of first, second and third compositions) were calculated as 0.0144, 0.0401, 0.0422, 0.0446 min⁻¹ for 35°C and they were also calculated as 0.0198, 0.0477, 0.0503, 0.0559 min⁻¹, respectively for 45°C. After 30 days, it was observed that the enzyme activities were % 80, % 73 and % 70 of the initial values for ECH activated matrices, respectively. On the other hand, that of free enzyme was % 10.

Enzyme activities were found as % 50, % 37 and % 26 after 20 batch experiments for ECH-activated P(MMA-co-GMA) immobilized enzymes. Reuseability, storage time and thermal stability of free enzyme were increased by immobilization.

Science code : 201.1.117
Key Words : β -Galactosidase, Immobilization, Covalent Bonding, poly (methylmetacrylate–co-glycydylmethacrylate)
of pages : 78
Supervisor : Asst.Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgisi ve tecrübesi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e, yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan değerli dostlarım Berrin AKKAYA, Nagihan KARACA' ya, çalışmalarım boyunca yardımları için Ayşe YAHŞİ, Filiz KARA, Uzman Ferhat ŞAHİN ve Araş. Gör. Gökhan DEMİREL'e, her zaman yanımda olduğunu bildiğim benden sevgilerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen ÇELİKEL ve AYDIN ailesine, benim kaprislerimi çeken ve her zaman için yanımda olan, kardeşim gibi sevdiğim Tuğçe AYDIN'a ve manevi olarak benden yardımını esirgemeyen Engin BAĞLAN'a, yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, anlayış ve destekleri ile beni yalnız bırakmayan, her şeyim olan sevgili anneme, babama ve çok değerli kardeşim Gökhan TUNÇ'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler.....	3
2.1.1. Enzimlerin etkisi	4
2.1.2. Enzimlerin uygulama alanları	6
2.2. Galaktosidazlar.....	7
2.2.1. β -Galaktosidaz enzimi ve özellikleri	8
2.3. Enzim İmmobilizasyonu	21
2.3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler	24
2.3.2. Polimerler.....	26
2.3.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri	32
2.3.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	41
3. DENEYSEL KISIM	43
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43

Sayfa

3.2. Kullanılan Aletler	46
3.3. Kullanılan Çözeltiler	46
3.4. Enzim İmmobilizasyonu	47
3.4.1. P (MMA-ko-GMA) hidrojenleri kullanılarak enzim immobilizasyonu	47
3.5. p-Nitrofenil- β -D-Galaktopironosit kalibrasyon grafiği	50
3.6. Aktivite Tayini	51
3.6.1. Serbest β -galaktosidazın aktivite tayini	51
3.6.2. İmmobilize β -galaktosidazın aktivite tayini	52
3.7. Aktiviteye pH'nın Etkisi	52
3.7.1. Serbest β -galaktosidazın aktiviteye pH'nın etkisi	52
3.7.2. İmmobilize β -galaktosidazın aktiviteye pH'nın etkisi	52
3.8. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisi	53
3.8.1. Serbest β -galaktosidazın aktiviteye sıcaklığın etkisi	53
3.8.2. İmmobilize β -galaktosidazın aktiviteye sıcaklığın etkisi	53
3.9. Aktiviteye Substrat Değişiminin Etkisi	53
3.9.1. Serbest β -galaktosidazın aktiviteye substrat değişiminin etkisi	53
3.9.2. İmmobilize β -galaktosidazın aktiviteye substrat değişiminin etkisi	53
3.10. Depolanma Kararlılığı	54
3.10.1. Serbest β -galaktosidazın depolanma kararlılığı	54
3.10.2. İmmobilize β -galaktosidazın depolanma kararlılığı	54
3.11. Termal İnaktivasyon	54

	Sayfa
3.11.1. Serbest β -galaktosidazın termal inaktivasyonu	54
3.11.2. İmmobilize β -galaktosidazın termal inaktivasyonu	54
3.12. İmmobilize β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayısı	55
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	56
4.1. Aktiviteye pH nın Etkisi	56
4.2. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisi	58
4.3. Aktiviteye Substrat Derişiminin Etkisi	60
4.4. Serbest ve İmmobilize β -Galaktosidazın Depolama Kararlılığı	63
4.5. İmmobilize β -Galaktosidazın Tekrar Kullanılabilirliği	65
4.6. Termal İnaktivasyon.....	66
5. SONUÇLAR.....	69
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. β -galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar	14
Çizelge 2.2. Bazı mikrobiyal β -Galaktosidazların karakteristikleri	15
Çizelge 2.3. Substrat spesifikliğı	18
Çizelge 2.4. İmmobilize β -Galaktosidaz sistemleri	21
Çizelge 2.5. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler	25
Çizelge 2.6. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak destekte arana nitelikler	42
Çizelge 2.7. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	47
Çizelge 4.1. Serbest ve kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidazın kinetik parametreleri	62
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize β -galaktosidazın farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon sabitleri.....	68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli	6
Şekil 2.2. β -Galaktosidazın üç boyutlu yapısı	10
Şekil 2.3. β -Galaktosidaz enziminin üç boyutlu yapısında Na^+ ve Mg^{+2} iyonlarının gösterimi	11
Şekil 2.4. Endüstride β -galaktosidaz (laktazın) enziminin uygulanması	18
Şekil 2.5. Enzim bozukluğu	20
Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	33
Şekil 2.7. Enzim tutuklu bir partikülde kütle aktarımı ve kimyasal reaksiyon etkileşimleri	39
Şekil 3.1. p-Nitrofenil β -D-galaktosit kalibrasyon grafiği	51
Şekil 4.1. Serbest ve immobilize edilen β -galaktosidazın bağlı aktivitesinin pH ile değişimi	57
Şekil 4.2. Serbest ve immobilize edilen β -galaktosidazın bağlı aktivitesinin pH ile değişimi	59
Şekil 4.3. Serbest ve immobilize edilen β -galaktosidazın bağlı aktifliğinin substrat derişimi ile değişimi	62
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize edilen β -galaktosidazın depolama kararlılığı	64
Şekil 4.5. Immobilize enzimlerin tekrar kullanım sayıları	65
Şekil 4.6. Serbest ve β -galaktosidazın bağlı aktivitesinin zamanla	67
değişimi	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

β	Beta
μm	Mikrometre
K_m	Michaelis sabiti
UV	Ultraviyole
V_{mak}	Maksimum hız

Kısaltmalar

Açıklama

APS	Amonyum persülfat
BRT	Britton ve Robinson tamponu
ECH	Epiklorhidrin
GMA	Glisidilmetakrilat
MMA	Metilmetakrilat
P	Poli
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin

1. GİRİŞ

İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilir. 1783 yılında Spallanzani'nin atmaca mide suyunun eti eritebileceğini bulması, 1811 yılında Kirchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstirin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalon'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi enzim hakkındaki ilk çalışmaları göstermiştir. Ayrıca canlı organizmadaki tüm maddelerin katalizörlerin etkisi altında sentezlendiğini ifade etmesi ve biyolojik reaksiyonları kimyasal reaksiyonlar arasına katması, enzimler üzerinde sistematik çalışmaların başlangıcı olmuştur. Enzim teknolojisi olarak adlandırılan yeni bir araştırma ve çalışma alanı ortaya çıkmıştır [1].

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanır. Katalitik etkileri kimyasal katalizörlerinkinden çok fazladır ve bu etkinlik sabit olmayıp metabolizmanın gidişine göre azalabilmekte veya çoğalabilmektedir. Enzim reaksiyonlarında yan ürün meydana gelmez, verim %100'dür. Enzimlerin en önemli karakteristiği çok spesifik olmalarıdır, etki yaptıkları maddeler tek ve belirlidir. Enzimler sabit bir sıcaklık ve sabit bir pH'da maksimum hızla çalışırlar. Enzimler katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek hızı, kimyasal reaksiyonlara göre 10^8 - 10^{10} kat artırılar [2,3].

Enzimlerin bu özellikleri, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizikokimya, bakteriyoloji, mikrobiyoloji, genetik, botanik, tarım, farmakoloji, toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik ve biyoteknoloji gibi bilim dalları ile onların endüstriyel, analitik ve biyokimyasal alanlarda uygulamalarına yol açmıştır [1].

Bir çok avantaja sahip olmalarına karşın endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler sınırlıdır. Çünkü enzimlerin pek çoğu kararsızdır. Enzimlerin izolasyonu ve arıtılması ekonomik değildir. Bu nedenle enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrarlanabilir kullanımları ekonomik açıdan büyük önem taşır.

Bu çalışma da, P(MMA-ko-GMA) hidrojelinin epiklorhidrin ile aktifleştirilmesi, aktifleştirilmiş bu hidrojele β -galaktosidaz enziminin kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmesi ve çeşitli parametrelerin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Katalizörler kendileri tepkimeye girmedikleri halde aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını artıran maddeler olarak tanımlanır. Enzimler genellikle 15 000 ile birkaç milyon arasında değişen yüksek mol kütlesine sahip protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Enzimler tepkimenin kinetiğini etkiler. Buna karşılık tepkimenin termodinamiği üzerinde etkisi yoktur. Enzimler diğer katalizörler gibi katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini (E_a) düşürürler [4].

Enzimi oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken, bazıları protein yanında protein olmayan bir Kısım içerirler. Bu tip enzimlerde, enzimin protein kısmına “apoenzim”, protein olmayan kısmına, enzimden kolayca ayrılabiliyorsa “koenzim” veya “kofaktör”, sıkıca bağlı ise “prostetik grup” adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri, organik moleküller ve inorganik metal anyon veya katyonlardan oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte “haloenzim” diye adlandırılır. Haloenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite gösteremez. Enzime katalitik özelliğini veren koenzim, tek başına gerçek enzime göre çok daha düşük aktivite gösterir. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir [5,6].

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “aktif bölge” olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim bu merkeze, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve / veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşüme katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitler de aktif merkezden sayılırlar [1,7,8].

2.1.1. Enzimlerin etkisi

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

Aktivasyon enerjisi

Moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebilmeleri için dışarıdan enerji almaları gereklidir. Bütün kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi olarak bir enerji engelinin aşılması gerekmektedir. Reaksiyonun hızını belirleyen en önemli faktör aktivasyon enerjisi (E_a) denilen bu enerji ihtiyacının büyüklüğüdür. 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.

ES kompleksinin oluşması ile daha çok substrat aktivasyon enerji engelini aşabilmekte, reaksiyon hızı artmakta ve birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Reaksiyon sonunda serbest kalan enzim ortamdaki diğer substrat moleküllerine bağlanarak onların da aktivasyon enerjisini düşürecek ve onların da ürüne dönüşümünü hızlandıracaktır. Genel olarak aktivasyon enerjisi düşük olan tepkimelerin hızları yüksek olmaktadır.

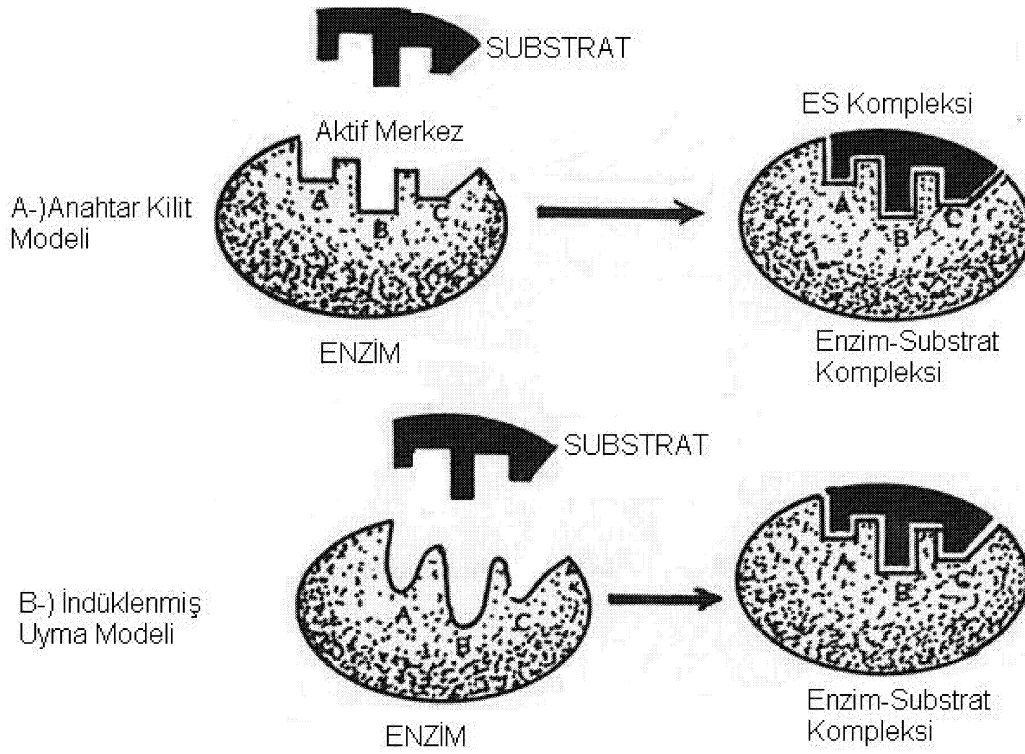
Hücrel koşullarda enzimler daha düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak tepkimelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^3 ile 10^8 kere daha hızlı olarak gerçekleşir. Tipik olarak bir enzim molekülü saniyede 100-1 000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne dönüştürülmüş substrat molekülü sayısına "Turnover sayısı" denir [6,7].

Aktif bölgedeki değişiklikler

Aktif yerler bir şerit yarık, çatlak, oyuklardır ve kataliz için gerekli temel polar artıklarda ihtiva ederler. Yapıları bilinen enzimlerin hepsi de substrat moleküllerinin çoğunlukla suyun ayrılması ile yarık veya çatlaklara bağlanırlar. Aktif yerler bir enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını teşkil eder.

Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge, bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Bir enzimin yapısındaki amino asit artıklarının çoğu substratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik yerde serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur.

Aktif merkez ile substrat, bir anahtar ile kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. Bu şekil Emil-Fischer'in tarif ettiği "anahtar ve kilit" durumuna uyar. Ancak substrat ile buluştuktan sonra enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu dinamik tanıma olayına "indüklenmiş uyum" veya "sonradan olma uyum" denir [4,5,7].



Şekil 2.1. Substratın enzime bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezinin şematik modeli

2.1.2. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimlerin endüstriyel analitik ve tıbbi uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Enzimlerin katalitik potansiyelleri yalnız analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu çerçevede başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimler geniş uygulama alanları bulmuşlardır.

Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yaralanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır.

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35'i deterjan sanayinde, % 20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20'si süt ve süt ürünleri sanayinde

kullanılmaktadır. Bira, meyve ve şarap, unlu mamuller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayiinde kullanılan enzimler için her alanın yaklaşık % 1-5 arasında bir payı bulunmaktadır [1].

2.2. Galaktosidazlar

Galaktosidazlar glikozidazların bir alt sınıfı olan hidrolitik enzimlerdir. Glikozidazlar da glikozil bileşikleri üzerinde etkili olan oldukça geniş ve önemli bir enzim grubudur. Basit glikozidler ile kompleks oligo- ve polisakkaritlerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizler. Glikozidazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunurlar. Yaklaşık 150 yıldan bu yana araştırmacılar glikozidazlarla ilgili farklı çalışmalar yapmışlardır. Uzun zamandan beri biyokimyanın en ilginç konularından olmasına rağmen glikozidazların moleküler özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında çok az bilgi edinilebilmiş ve sadece birkaçı kristalize edilebilmiştir.

Glikozidazların bir kısmı glikozil artıklarını oligosakkaritlere, polisakkaritlere ve diğer alkolik reseptörlere transfer ettikleri halde hidrolaz sınıfına dahil edilirler. Glikozidazlar, O-glikozil, N-glikozil ve S-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler (EC 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3) olarak üç gruba ayrılırlar ve çok çeşitli glikozidik bağlar üzerinde etkilidirler. Temel olarak yüklü grup içermeyen substratlarla ilgilidirler. Tüm belirleyici gruplar ya hidroksil grupları ya da hidrojen atomlarıdır. Bu nedenle de spesifiklikleri bir model ile belirlenmelidir. Glikosidazlar özellikle şeker halkasının konfigürasyonuna spesifiktirler. Örneğin; α -galaktosidazlar monosakkarit, oligosakkarit, glikopeptit ve fenole α -bağlı terminal galaktoz artıklarını, β -galaktosidazlar ise 1,6-, β -1,4- veya β -1,3- bağli terminal galaktoz artıklarını hidrolizleyebilirler [9].

Glikozidazlar, genel olarak endo- ve ekzo- glikozidazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Glikoproteinler üzerinde etkili olan endoglikozidazlar; örneğin, endo-

β -galaktosidaz (EC 3.2.1.103), endo glikozidaz D (EC 3.2.1.96) dir. Ekzoglikozidazlar ise sadece terminal artıklar üzerinde etkilidirler. Bunlar; α -galaktosidaz (EC 3.2.1.22), β -galaktosidaz (EC 3.2.1.23) örnek olarak verilebilir.

Galaktosidazlar, ekzoglikozidazların en iyi bilinen sınıfındandır. Ekzoglikozidazlar, glikoprotein ve glikolipidlerdeki karbonhidrat yapısını değiştirirler. Bu enzimler O-glikozil bileşiklerini hidrolizleyen enzimler olup α -ve β -galaktosidazlar olarak iki gruptan oluşurlar. α -Galaktosidazlar (α -D-galaktosid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22), galaktoz oligasakkaritleri, galaktolipitleri içeren α -D-galaktosidlerdeki, indirgen olmayan α -D-galaktoz artıklarının hidrolizler. β -Galaktosidazlar (β -D-galaktosid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23), β -D-galaktosidlerdeki terminal indirgen olmayan β -D-galaktoz artıklarını hidrolizler. Bu gruptaki enzimlerden bazıları α -L-arabinoziti de hidrolizlemektedir [10-14].

2.2.1. β -Galaktosidaz enzimi ve özellikleri

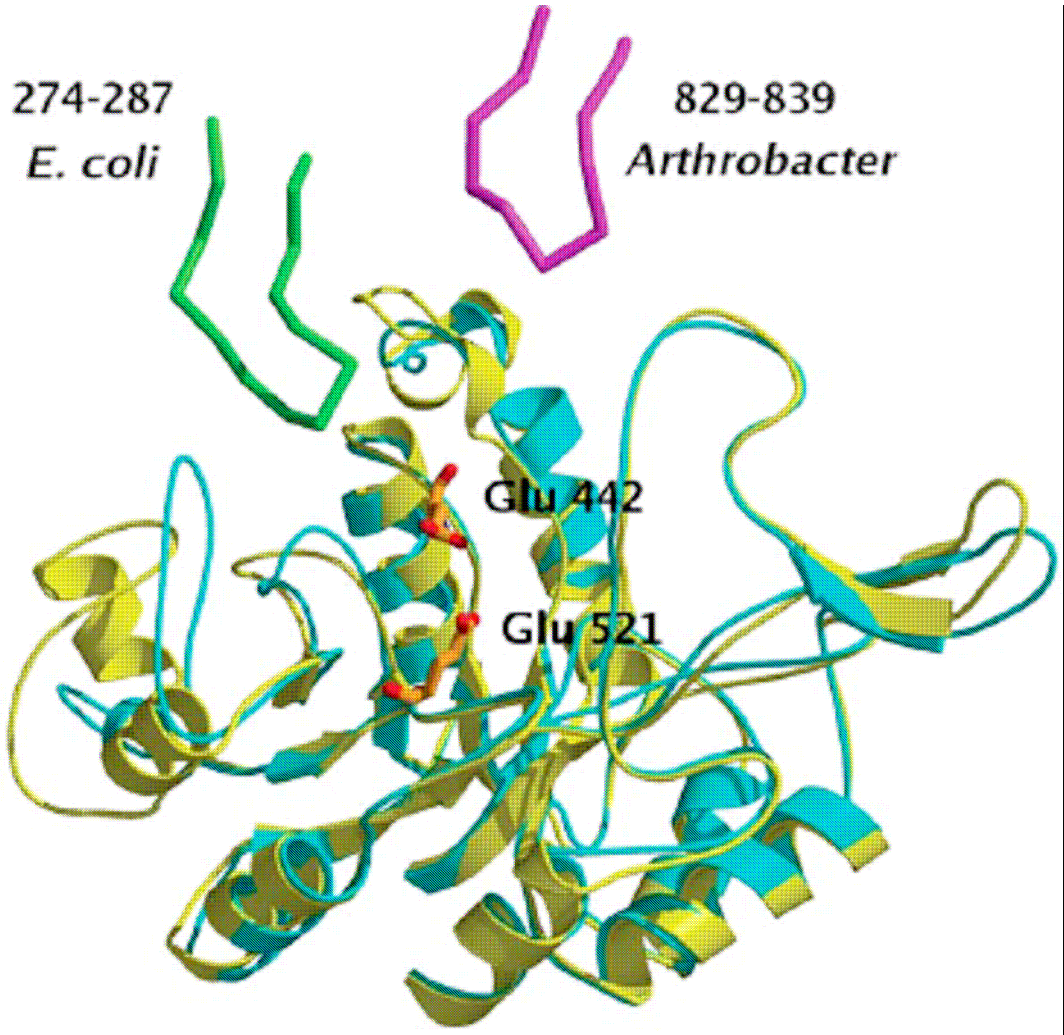
1960'lı yıllardan bu yana β -galaktosidaz enzimi kullanılarak sütün laktoz içeriğinin hidrolizi gerçekleştirilmektedir. β -galaktosidaz (β -D-galaktosid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23) enzimi hidrolazlar sınıfındandır. Hidrolazlar ester, eter, glikozil, asid anhidrit, C-N, C-C, C-O, P-N bağlarının hidrolitik koparılmasını hidroliz eden enzimlerdir [15,16].

β -Galaktosidaz dışındaki tüm disakkaridazların miktarı ortamda bulunan disakkarit miktarının artması ile artış göstermekte, β -galaktosidaz ise artan laktoz miktarına karşılık artış göstermemektedir. β -Galaktosidaz enziminin ticari ismi ise laktazdır [4].

Kofaktör içermezler. Metal ile aktive olan bir enzimdir. Metalle aktive olan enzimler, çözeltideki alkali ya da toprak alkali iyonları zayıfca bağlayan enzimlerdir. Bu iyonlar substratla birlikte çözeltiden alınırlar. Enzimin aktif

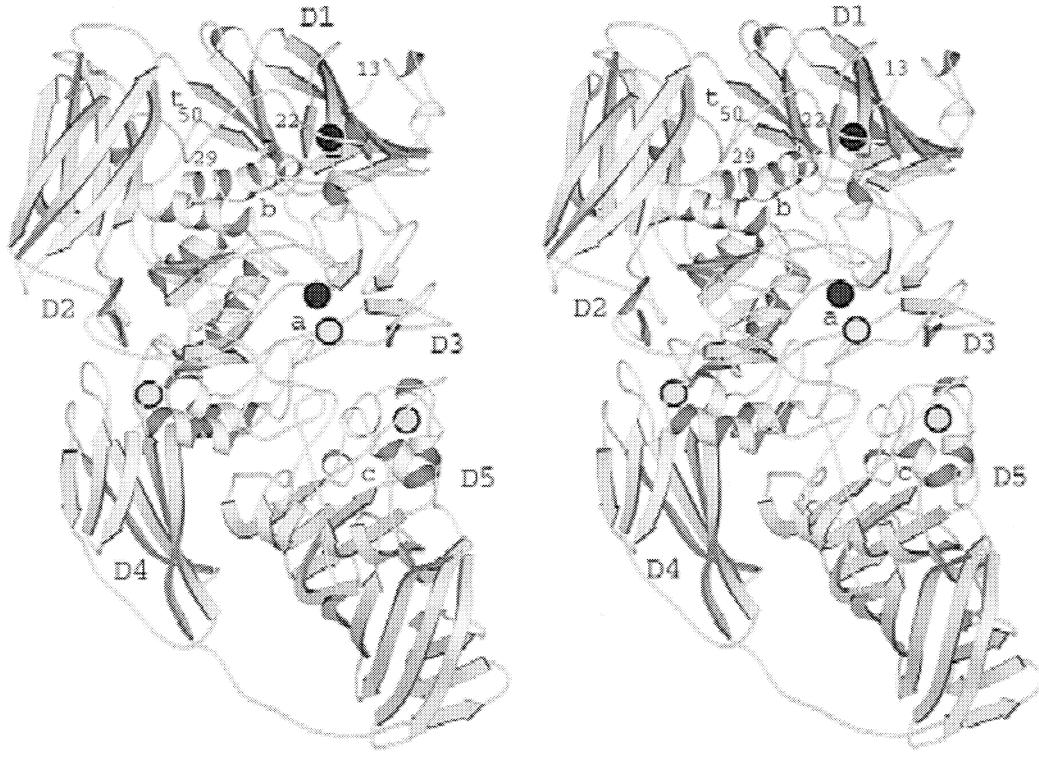
merkezindeki enzimin maksimum aktivite göstereceği pH değerini değiştirerek enzimin aktivitesini artırırlar [17].

Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmektedir. Şekil 2.2 de β -galaktosidazın üç boyutlu yapısı gösterilmiştir. *Arthrobacter sp.C2-2* β -galaktosidazı için sarı renk ile TIM alanları, kırmızı renk ile F zincirinin 829-839 kalıntıları gösterilmiştir. *E.coli* β -galaktosidazı için ise TIM alanları mavi ile D 274-287 zincirinin kalıntılarıda yeşil ile gösterilmiştir. Glu 442 ve C221- β -Gal'ın Glu 521 katalitik kalıntıları ise kavun içi renk ile gösterilmiştir. Her iki türde β -galaktosidazın TIM alanına yüklenmiştir. Her iki β -galaktosidazdaki farklı hekzamerik ve tetramerik oligomerizasyon, TIM alanına ve β -galaktosidazın aktif merkezine yakın olacak şekilde, komşu monomerlerin farklı parçalarını meydana getirir [18].



Şekil 2.2. β -Galaktosidazın üç boyutlu yapısı

β -Galaktosidaz enzimi bir metalo enzim olduğu için Na^+ ve Mg^{+2} iyonlarıyla aktive edilir. Şekil 2.3 de β -galaktosidaz enziminin üç boyutlu yapısında Na^+ ve Mg^{+2} iyonları gösterilmiştir. Na^+ iyonları olarak tanımlanan çözücü moleküller açık gri renkteki daire ile gösterilmiştir. Aktif merkezde tanımlanan magnezyum iyonu ise (a ile gösterilen) koyu renkteki daire ile olarak gösterilmiştir. D1-D5 olarak beş farklı alan gösterilmiştir. Başlangıçtaki amino grupları, elektron yoğunluklu olan 13. kalıntıdan başlar. Ayrıca bu amino asit birimi 50'ye kadar uzayan α -tamalayıcı peptite karşılık gelir. Bu peptitin bulunduğu alan t ile gösterilmiştir. Dört heliks yapısının yarısını oluşturan heliks çifti (aktif alanın ara yüzeyinde) b ile gösterilmiştir. D5 alanının merkezi c ile gösterilmiştir [19].



Şekil 2.3. β -Galaktosidaz enziminin üç boyutlu yapısında Na^+ ve Mg^{+2} iyonlarının gösterimi

β -Galaktosidaz, β -glikozidik bağ içeren oligo ve polisakkaritlerin hidrolizinde görev alır. β -Galaktosidaz enzimi bir disakkarit olan laktozu onun bileşenleri olan monosakkaritlere glukoz ve galaktoza hidroliz eder. Yani, süt şekerini üzüm şekerine çeviren bağırsak enzimi olarak da tanımlanabilir. Laktozun glukoz ve galaktoza dönüşümü, gıda teknolojisi ve beslenme açısından önemlidir. Çünkü hidrolizin temel ürünleri daha tatlı, daha çözünebilir, daha kolay fermente edilebilir ve ince bağırsak tarafından direkt absorbe edilebilir niteliktedir [20-22].

β -Galaktosidaz enzimi, Kalifornia deniz arslanı hariç bütün memelilerde mevcuttur. İnsan ince bağırsağında üç değişik β -galaktosidaz vardır.

1. Laktaz (laktaz 1): İnce bağırsak epitel hücresinin kenar membranında bulunur. Gıdalarla alınan laktozu glukoz ve galaktoza hidroliz eder. Bu

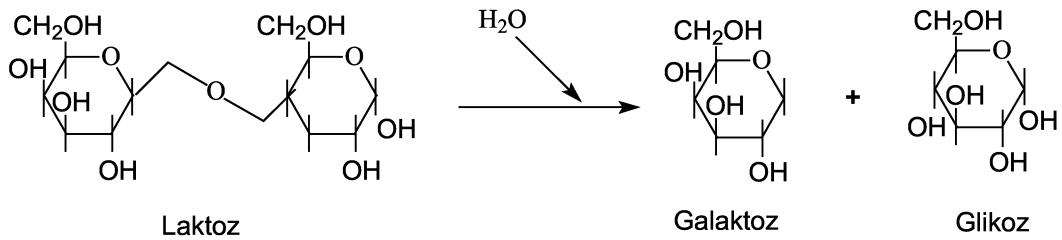
hidroliz ürünleri Na^{+} 'a bağımlı ve aktif olarak bağırsak epitel hücresi içine taşınırlar.

2. Asit β -Galaktosidaz (laktaz 2): İnce bağırsak epitel hücre lizozomlarında bulunur.

3. Hetero- β -Galaktosidaz : İnce bağırsak epitel hücre stoplazmasında bulunur.

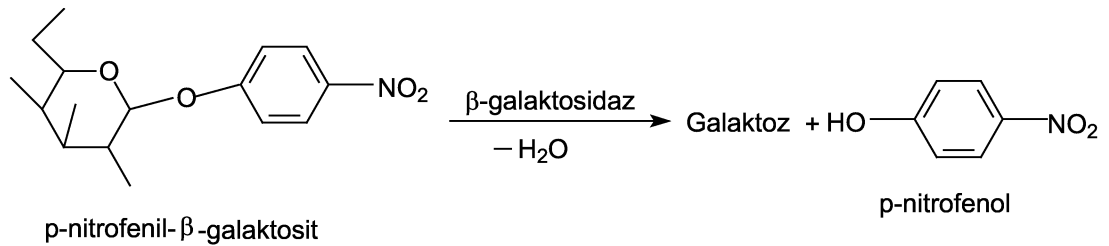
Asit ve hetero β -galaktosidaz'ın gıdalarla alınan laktozun sindiriminde rolü görülmemektedir [23].

β -Galaktosidaz, substrat olarak laktoz kullandığında, α -laktozdaki β -1,4 bağıni kırarak eş moleküler glukoz ve galaktoz karışımı oluşturmaktadır.



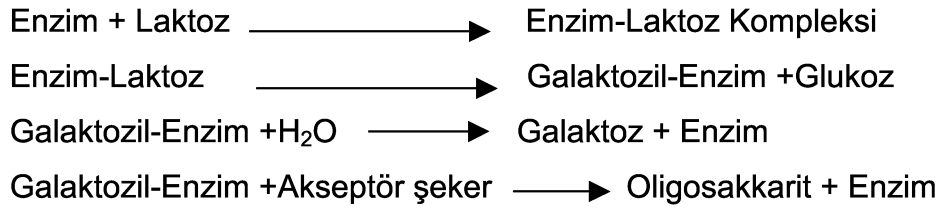
Laktozun hidroliz reaksiyonu

β -Galaktosidaz, substrat olarak p-nitrofenil- β -galaktosit kullandığında ise ortamdan su ayrılarak ürün olarak galaktoz ve p-nitrofenolü oluşturur.

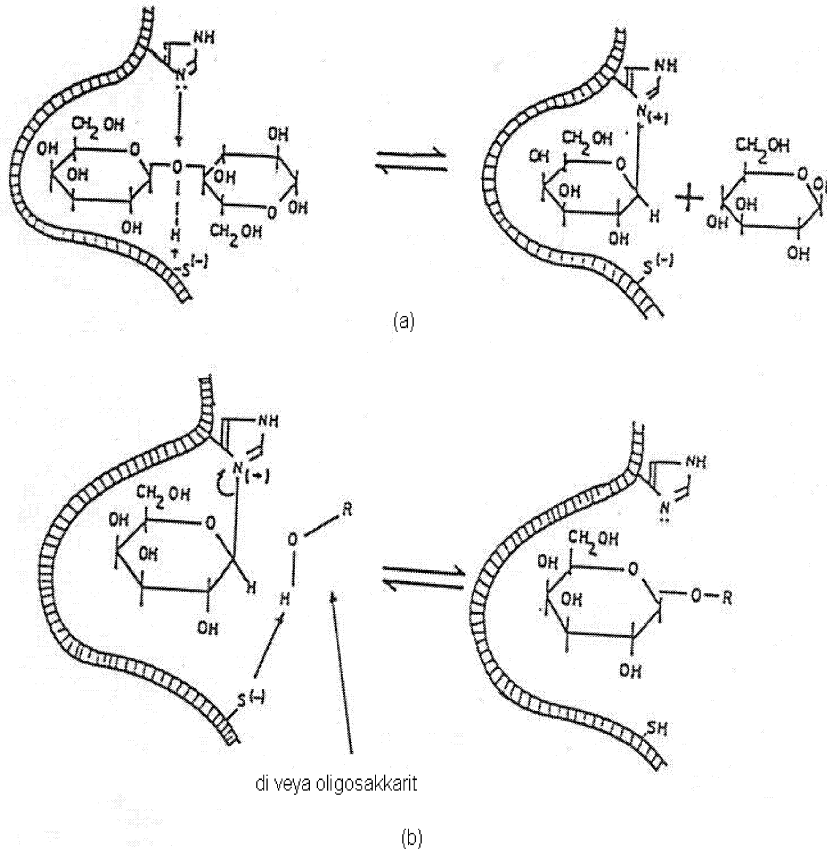


β -Galaktosidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Ancak ortamda akseptör şeker varlığında aşağıdaki reaksiyonlar önerilmektedir.



β -Galaktosidaz mekanizmasında galaktoz, hidroksil grubu içeren herhangi akseptöre transfer olmaktadır. Akseptör su ise serbest galaktoz oluşmaktadır. Ancak ortamda başka şeker varsa oligosakkaritler meydana gelmektedir. Bu olaya “transferaz aktivitesi” denmektedir [24].



Laktozun β -galaktosidaz enzimiyle hidrolizi a) β -galaktosidaz enzimi ile laktozun etkileşmesi b) β -galaktosidaz enziminden galaktozun transferi

β -Galaktosidazın doğada bulunuşu

β -galaktosidaz doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkilerde, hayvan dokularında ve mikroorganizmalarda bulunabilmektedir. Çizelge 2.1'de β -galaktosidaz enziminin kaynakları verilmektedir.

Çizelge 2.1. β -galaktosidaz enziminin bulunduğu kaynaklar

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü, kahve
Hayvan organları	İnce bağırsak, beyin ve deri dokusu
Mayalar	<i>Kluyveromyces-(Saccharomyces) lactis</i> <i>Kluyveromyces-(Saccharomyces) fragilis</i> <i>Candida pseudotropical</i> <i>Brettanomyces anomolus</i> <i>Wingea robersii</i>
Bakteri	<i>Escherichia coli</i> , <i>Thermus aquaticis</i> , <i>acillus sp.</i> <i>Bacillismegaterium-streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus-bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helvenous</i> , <i>Bacillus-circulans</i> , - <i>Bacillus steorotherphilus</i> <i>Lactobacillus sporogenes</i>
Mantar	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Mucor pucillus</i> , <i>Alternaria palmi</i> <i>Asperigillus foetudut</i> , <i>Mucor miehieii</i> , <i>Curvularia inoegualli</i> <i>Asperigillus.niger</i> , <i>Fusorium moniliforme</i> <i>Asperigillus.flovus</i> , <i>Alternaria alternara</i> <i>Asperigillus oryzae</i> <i>Asperigillus phoenicis</i>

Diğer kaynaklar ile karşılaştırıldığında mikrobiyal β -galaktosidazların ticari önemi daha fazladır. Bakteri, maya ve mantar kaynakları β -galaktosidaz için çok iyi kaynaklardır. Mikrobiyal β -galaktosidazlar farklı özellikler gösterirler, bundan dolayı proseslerde enzim kaynağı iyi seçilmelidir [25].

Çizelge 2.2. Bazı mikrobiyal β -Galaktosidazların karakteristikleri

Kaynak	Molekül Kütlesi (kda)	Opt pH	Opt. T (°C)	Aktivatör	İyonik İnhibitör	K _m Laktoz (mμ)	K _i Galaktoz (mμ)	K _m /K _i
<i>A.niger</i>	124	3,0-4,0	55-60	İhtiyaç yok	yok	20-85	4	5-20
<i>A.oryzae</i>	90	5,0	50-55	İhtiyaç yok	yok	50	57	0,88
<i>K.lactis</i>	135	6,5-7,3	35	K ⁺ , Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺	12-17	42	0,38
<i>K.fragilis</i>	201	6,6	37	K ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺	14	28	0,5
<i>E.coli</i>	540	7,2	40	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺	-	2	21	0,1
<i>B.subtilis</i>	-	6,5	50	İhtiyaç yok	-	700	40	17
<i>B.stearothermophilus</i>	215-230	5,8-6,4	65	Mg ²⁺	-	2	20	0,1
<i>S.thermophilus</i>	530	7,1	55	K ⁺ , Mg ²⁺ , Mg ⁺	Ca ²⁺	7	60	0,11

Uygulamalarda en önemli nokta β -galaktosidazın çalıştığı pH aralığıdır. Buna dayanarak küflerden elde edilenlere asit-pH enzimi, maya ve bakterilerden elde edilenlere nötral-pH enzimi olarak adlandırılır. Asit-pH enzimi için optimum pH aralığı 3-5 olup bu tür β -galaktosidazlar peynir suyu prosesine uygundur. Bu grubun en önemli kaynakları; *A.niger* ve *A.oryzae*'dir. Bu kaynaklardan elde edilen enzimlerin avantajları; ısıl kararlı olmaları ve düşük pH' da aktivite göstermeleridir. Dezavantajları ise *A.oryzae*'nin intraselüler

enzim üretmesi, bu enzimlerinde K_m / K_i oranlarının (galaktoz ile kuvvetli inhibe olma eğilimlerinin) büyük olmasıdır. Mayalardan elde edilen β -galaktosidazlar nötral pH da çalıştıkları için laktozun hidrolizine daha uygundur. Enzim aktivitesi ortamdaki K^+ ve Mg^{+2} iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek orandaki Na^+ ve Ca^{+2} iyonları ise enzim inhibisyonuna yol açmaktadır. Bu grup için tipik kaynaklar *K.fragilis* ve *K.lactis*'tir. Maya enzimleri, peynir fermentasyonu ile yüksek oranda elde edilmektedir. Bu nedenle pahalı değildirler. Sadece optimum sıcaklıklarında her türlü mikrobiyal gelişmeye açık olmaları en büyük dezavantajlarıdır. Bu nedenle kullanımlarında kısa hidroliz süresi ve yüksek enzim dozajı önerilmektedir [26,27].

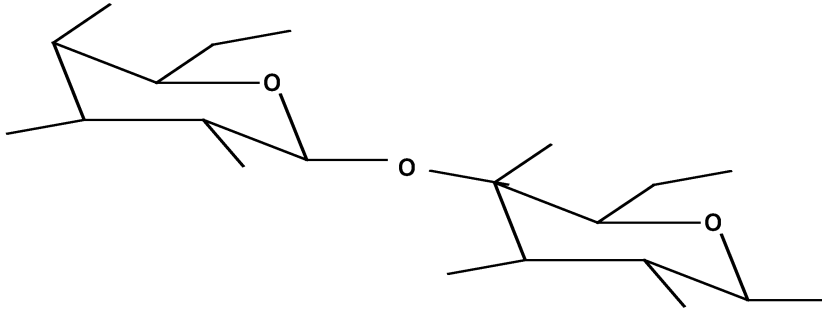
β -Galaktosidazın substrat spesifikliğı

Laktoz

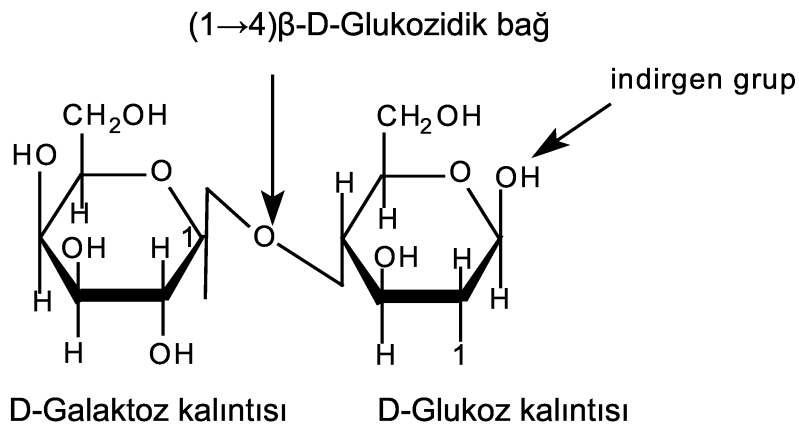
Süt şekeri olarak bilinen laktoz, 1 mol D-glukoz ile 1 mol D-galaktozun β (1→4) galaktozidik (glikozidik) bağ ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Yapısında yer alan glukozun serbest aldehit grubundan ötürü laktoz indirgendir. Laktoz, sütte ve peynir altı suyunda bulunmaktadır. Sadece süt şekeri olarak bulunan laktozun tatlılığı düşüktür. Glikoz ve galaktozdan oluşan bu disakkarit başka isimlerle de adlandırılmaktadır; β -D-galaktopiranozil- β -glikopiranoz veya glikoz- β -D-galaktosit [4,28,29].

İnsan sütündeki laktoz konsantrasyonu sığır sütünün hemen hemen iki katıdır. Laktoz sütü oluşturan 3 temel bileşenden birisidir. Sütteki diğer katı bileşenler yağ ve proteindir [30-32].

Sadece laktasyon sırasında meme bezi tarafından sentez edilen laktoz, özellikle süt çocuklarında aktif olan laktaz enzimi tarafından bağırsak mukoza hücrelerinde glukoz ile galaktoza ayrılmaktadır. Laktaz eksikliği bazı kişilerde laktoz intoleransına neden olmaktadır [33].



Laktozun yapısı

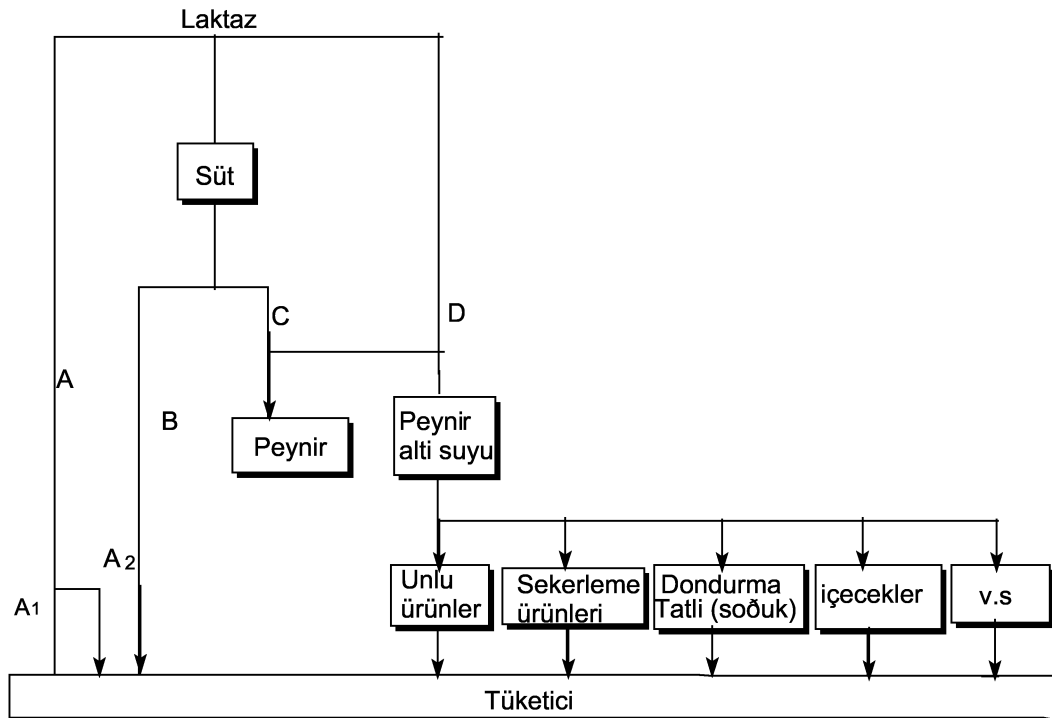


Laktoz yapısındaki β-D-glikozidik bağ

β-Galaktosidaz ile hidrolizi sonucu laktozun bazı istenmeyen özellikleri giderilebilmektedir. Laktozun istenmeyen özellikleri ise sakkarozdan % 60 oranında daha az tatlılık, düşük çözünürlük, yüksek derişimde yer aldığı üründe ağızda kumlu yapı hissi, zayıf sindirilebilirlik ve laktoz intoleransıdır.

Çizelge 2.3. Substrat spesifikliği

Substrat	K_m (mol / L)	V_{mak} (μ mol/dak / mg enzim)	$V_{mak} / K_m (x10^{-4})$
α -Niropenil- β -D-galaktosik	$1,61 \times 10^{-4}$	178	110
P-Nitrophenil- β -D-galaktosid	$5,31 \times 10^{-5}$	22,4	44
Metilsalisilik- β -D-galaktosid	$2,50 \times 10^{-3}$	4,2	0,17
Fenil- β -D-galaktosit	$1,47 \times 10^{-3}$	10,4	0,71
α -Laktoz	$1,90 \times 10^{-3}$	6,55	0,35
β -Laktoz	$8,32 \times 10^{-3}$	12,8	0,15
(o-nitrophenil) - β -D – galaktosit	$1,20 \times 10^{-4}$	0,00	0

 β -Galaktosidazın uygulama alanlarıŞekil 2.4. Endüstride β -galaktosidaz (laktazın) enziminin uygulanması

A_1 (Farmasotik uygulamalar) : Laktazın ağız yoluyla alınması; asitli laktaz direkt olarak sindirilirken, nötral laktazise direkt olarak sindirilemez.

A_2, B :Tüketici tarafından direkt olarak süte laktazın uygulanması; nötral laktaz tüketici tarafından süte eklenmektedir. Buzdolabında bir gece bekletildikten sonra kullanılan laktaz miktarına bağlı olarak süt kısmen veya tamamen hidrolizlenir.

C, D : Gıda endüstrisinde uygulamaları

β -galaktosidaz kullanılarak geliştirilmiş bazı süt ürünlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

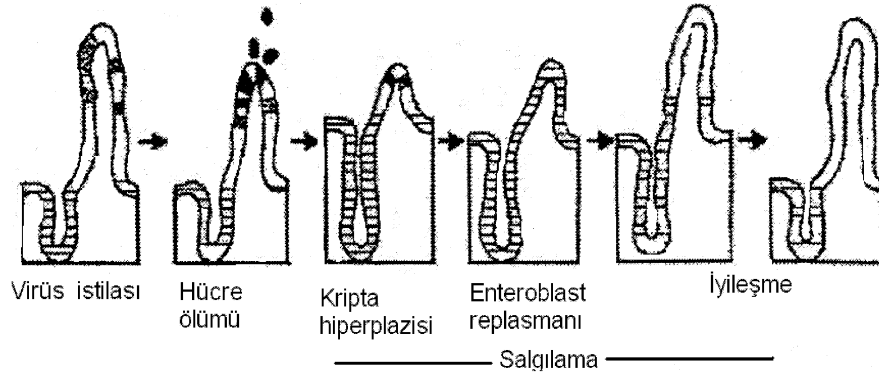
- Düşük laktozlu süt
- Laktozu hidrolizlenmiş süttten yoğurt üretimi
- Laktozu hidrolizlenmiş süttten peynir üretimi
- Düşük laktozlu konsantre dondurma
- Peynir altı suyu laktozundan tatlı şurup üretimi

β -Galaktosidazın fizyolojik önemi ve eksikliği

β -galaktosidaz enzimi, vücutta ince bağırsak hücreleri tarafından salgılanır, laktozun ince bağırsakta bu enzimle hidrolizlenmesi sonucunda oluşan glikoz ve galaktoz yine ince bağırsaktan absorblanarak kan dolaşımına geçer ve karaciğerde metabolize edilir. Enzimin ince bağırsakta üretimi yeni doğan bir bebek için çok önemlidir. Sindirilmemiş laktoz çocuklarda ve yetişkinlerde hiçbir işe yaramadığı gibi çocuklukta büyümeyi engellemektedir.

β -galaktosidaz enziminin yetersizliği veya tamamen eksikliğinde laktoz intoleransı meydana gelmektedir. Laktoz intoleransı olan kişilerde ince bağırsak duvarından çok az miktarda laktoz molekülü hücre içerisine

geçebilir ve geride kalan büyük miktardaki laktoz vücut tarafından kullanılamaz. Sindirilemeyen laktoz ince bağırsaklardan kalın bağırsağa hareket eder. Burada iki olay meydana gelmektedir; bunlardan birincisi fiziksel diğeri ise biyokimyasal bir işlemdir. Fiziksel proseste, ince bağırsak sıvısındaki laktoz moleküllerinin tanecik sayısının artması sonucunda oluşan osmotik etki ile dokulardaki sıvı ince bağırsağa çekilir. Biyokimyasal proseste ise, laktoz kolonda bakteriler tarafından fermente edilerek organik asitler ve CO₂'e dönüştürülür. Bu maddeler şişlik hissi, gazlı geğirme, karın bölgesinde kramplar ve sulu patlayan ishalleri içeren birçok fermantatif ishal semptomlarına yol açmaktadır [34-44].



Şekil 2.5. Enzim bozukluğu

Çizelge 2.4. İmmobilize β -Galaktosidaz sistemleri

Kaynak	Destek	İmmobilizasyon metodu	Substrat
<i>S.lactis</i>	Benzenmenkaptan içeren poli-akrilamit yatakları	Hidrofobik bağların oluşumuyla adsorbsiyon	ONPG peynir altı suyu
<i>S.lactis</i>	Aminoetil sepharose	Diazo metoduyla kovalent eşleşme	Süt
<i>S.lactis</i> <i>S.fragillis</i>	Oksiran poliakrilamit yatakları	Oksiranaktif gruplarıyla kovalent eşleşme	ONPG
<i>S.fragillis</i>	Polietilenimin Jelatinle kaplanmış polietilenimin	Glutaraldehit kovalent bağlanma	Laktoz
<i>S.lactis</i> (Gist-Brocodes)	Selüloz triasetat	Fibrehapsetme, ıslak bükülme metodu, cam kolona sarılarak paketlenmiş enzim	Kaymaksız steril süt(25° C)
<i>S.lactis</i> (Gist-Brocodes)	Polivinil alkol jel	Hapsetme	Süt
<i>K.fragillis</i>	Lifli kolojen	Bütün hücre hapsediliyor	Laktoz çözeltisi Peynir altı suyu Kaymaksız süt Süt

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin en eski ve en pratik tekniklerinden birisidir. İmmobilizasyon, biyolojik olarak aktif maddelerin (enzim, hücre, hormon) katalitik aktivitelerini kaybetmeksizin defalarca ve sürekli kullanılması amacı ile çeşitli desteklere yerleştirilmesidir.

Enzimler, suda çözünmeyen bir desteğe fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir ürün veren bir kopolimerizasyona enzim

molekölünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

İmmobilizasyon sırasında enzim moleküllerinde yapısal değişiklikler olabilir. İmmobilize enzimin hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar, enzimin, destek, aktifleştirici ve çapraz bağlayıcı ile etkileşmesi olarak belirtilebilir.

İmmobilize enzimler ve bunların uygulamaları ile ilgili çalışmalar sürekli olarak gelişmeye devam etmektedir. İmmobilize enzimler, gıda sanayinde, klinikte ve endüstriyel alanda pek çok uygulama alanı bulurlar. Gerçek anlamda ilk enzim immobilizasyon denemelerinin sonuçları 1950'li yıllarda birçok çalışma grubu tarafından popülerite kazanmış olup enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir. Daha sonra, enzim immobilizasyonu 1961 yılında Nelson ve Griffen tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk ticari proses ise 1967 yılında immobilize amino asitler kullanılarak D ve L amino asitlerin aydınlatıldığı prosesidir.

Son yıllarda enzim immobilizasyonunun yanında mikroorganizma immobilizasyonu da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden biri için özgül ise saf bir enzim immobilizasyonu yerine bunu içeren mikroorganizmanın immobilizasyonu ve saflaştırılmasına gerek kalmayacağından ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle son ürün elde edebilmek için birden fazla enzimden yararlanıyor ve problem yaratmıyor ise enzim yerine mikroorganizma immobilizasyonu çok ekonomiktir [45,46].

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere karşı avantaj ve dezavantajlarını şu şekilde özetleyebiliriz;

Serbest enzimin dezavantajları;

- ❖ Enzimin üründen ayrılmasının zorluğu
- ❖ Enzimin tekrar kullanım imkanının olmaması
- ❖ Ürün inhibisyonu ile reaksiyonun sınırlanması
- ❖ Reaksiyonun kontrol zorluğu
- ❖ Reaksiyonun durdurulmasındaki güçlükler, gıda endüstrisinde yüksek sıcaklık uygulanarak enzimatik reaksiyonun durdurulması güçlükleri
- ❖ Proseslerde kısıtlı uygulanabilirlik; genellikle kesikli işlemler.

İmmobilize enzimin avantajları;

- ❖ Enzimin tekrar kullanılabilirliği
- ❖ Enzimin ortamdan kolayca ayrılabilmesi ile reaksiyonun sonlandırılabilmesi
- ❖ Reaksiyon kontrolünün mümkün olması
- ❖ Ürün inhibisyonunun az olması
- ❖ Yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığın daha fazla olması
- ❖ Desteğin yük özelliklerinin değiştirilerek daha geniş bir pH aralığında yüksek potansiyel
- ❖ Sürekli ve kesikli sistemlere uygulanabilirlik
- ❖ Reaktör tasarım imkanının fazla olması [47,48].

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir [49].

- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim desteklerinin maliyeti yüksektir.

Ayrıca immobilize enzimlerden ilaç ve kimya endüstrisinde yararlanılır. Yarı sentetik penisilinlerin üretimi; α -amino asit ester hidrolaz, amino veya hidrazin içeren ilaçların n-oksidasyonu, flovaprotein oksidaz, akrilamit; nitrilaz, insan insülinin, biyolojik aktif peptitlerin yarı sentezi ise proteaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir. Asparaginaz; löseminin tedavisinde, katalaz; perboratın uzaklaştırılmasında, deoksiribonükleaz; otoimmün dokular, sistemik kiritromatosus deri veremi tedavisinde, difteritoksin (tonslokaz); kanser tedavisinde, fibrinolizin; periferel trombozun çözülmesinde; invertaz; ilaç dağılım sisteminin gözlenmesinde ve üreaz; ürenin uzaklaştırılması için kullanılır [50,51,1].

2.3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler

Bir immobilize enzim sisteminin en önemli üç bileşeni; enzim, destek ve immobilizasyonda kullanılan yöntemdir. Destek materyal bir membran, suda çözünür bir katı ya da polimer bir matriks olabilir [52].

İyi bir destek materyalinde geniş yüzeysel alan, geçirgenlik, hidrofilik karakter, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve termal kararlılık, yüksek tutuculuk, uygun biçim ve parça büyüklüğü, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özellikler aranır. Bu özellikler enzim aktifliğinin korunmasını ve işlem kararlılığını artırır [53].

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Organik destekler doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmalarıdır. Destek materyaldeki bu hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonunu sağlarlar. Buna ilaveten polisakkarit desteklerinin zayıf nükleofilik özellikleri ile aktivasyonu alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları kullanılarak gerçekleştirilebilir [54,55].

Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler morfolojilerine göre (gözenekli, gözenekli olmayan ya da jel tipi) ya da kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılır. En yaygın olarak kullanılan destekler Çizelge 2.5 'de verilmektedir. Enzim immobilizasyonunda destek olarak sentetik polimerlerin kullanılması, mikrobiyal ataklara karşı inert olması, yüksek kimyasal kararlılığa sahip olması ve kompleks tampon bileşenlerinin kullanılmasında çeşitli seçenekler olması gibi bazı avantajlar sağlamaktadır [56,57].

Çizelge 2.5. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler

Anorganik Polimerler	Doğal Polimerler	Sentetik
Kil	Selüloz	Polistiren türevleri
Cam	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dekstran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil alil polimerleri
Titandioksit	Karajenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollojen	Metakrilat
Nikel oksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleik-anhidrit polimerleri
Aktif karbon	Albumin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler		

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak desteklerin seçiminde bazı kriterlere dikkat edilmelidir. Bunlar; immobilizasyon yöntemi, substratın yapısı ve mekanik özellikleridir. İmmobilizasyon iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilecekse desteğin fonksiyonel gruplar içermesi gerekir. Substrat büyük molekülü ise özellikle tutuklama yöntemleri ve gözenekli destekler difüzyon ve sterik engellemeden dolayı pek uygun değildirler [58].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak destekte aranan nitelikler :

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı
- Mekanik ısı kararlılığı ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal ısı kararlılığı,
- Kovalent bağlamada kullanılacak destekler yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımali,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik.

2.3.2. Polimerler

Polimerler çevremizdeki canlı ve cansız doğada çok yaygın olarak bulunan maddelerdir. Polimerler, günlük yaşantımızın her alanında yaygın olarak kullanılan plastikler, kauçuklar, lifler, boyalar, yapıştırıcılar türü malzemelerin üretiminde yararlanılan temel girdilerdir.

1930'lardan başlamak üzere, özellikle II.Dünya Savaşı'ndan sonra, insanlar tarafından yapılmış ürünlerin çeşitliliğinde belirgin bir artış gözlenir. Bunun nedeni, polimer kimyasındaki gelişmelere bağlı olarak değişik plastik, lif, elastomer türlerin sentetik yöntemlerle üretilmesi ve kullanıma sunulmasıdır. Temel yapıları polimer olan bu malzemelerin, insanların yaşamlarını kolaylaştırıcı etkileri günümüzde de hızla sürmektedir. Örneğin; Kevlar ve Nomex karışımından kurşun geçirmez yelekler yapılmaktadır. Bu üstün özelliklerinden dolayı, yalnız kimyacıların değil; makina, kimya, tekstil, endüstri ve fizik mühendisliği gibi alanlarda çalışanların da ilgisini çeken materyallerdir.

Polimerler büyük moleküllerden oluşan maddelerdir. Herhangi bir maddenin molekülü de bir veya birkaç atomdan meydana geldiğine göre, polimer kimyasında bu anlam, polimer moleküllerinin belli atom gruplarından oluşan birimlerden meydana geldiğine işaret etmektedir. Polimerlere bazen “yüksek moleküllü bileşikler” yada “makromoleküller” de denir. Bu polimerlerin molekül kütlelerinin çok büyük olmasıyla ilgilidir. Polimerlerin molekül kütleleri on ve yüz binlerle hatta bazı hallerde milyonlarla ifade edilebilir. Gerçekten de polimer molekülleri bileşim ve yapı bakımından birbirlerinin aynı olan çok sayıda grupların kendi aralarında kovalent bağlarla bağlanması ile meydana gelirler. Kovalent bağlarla bağlanarak polimeri oluşturan bu küçük moleküllere “monomer” adı verilir. Monomer birimlerinden başlayarak dev polimer moleküllerinin oluşmasına yol açan tepkimelerin tümüne ise “polimerleşme tepkimesi” yada sadece “polimerleşme” denir. Bir polimer molekülü binlerce monomer biriminden oluşan tek bir zincir içeriyorsa böyle polimerlere “doğrusal polimer” denir. Diğer bir polimer şekli ise dallanmış yapıdır. Polimerler tek tür bir yapıdan oluşursa “homopolimer”, birden fazla sayıda farklı birimlerden oluşursa “kopolimer” adını alır [59-61].

Polimerlerin bir takım tipik özellikleri vardır.

- ✓ Molekül kütleleri genellikle birkaç bin ile birkaç milyon arasında değişir.
- ✓ Belirli tekrarlanır birimlerden oluşurlar.
- ✓ Polimer sentez reaksiyonları çok fazla sayıda basamaklardan oluşur.
- ✓ Polimerler genel olarak polidisperstir; yani belirli bir polimer örneğinde çeşitli zincir uzunluğunda polimer molekülleri vardır.

Hidrojeller

Hidrojeller sulu ortamda şişebilen ağ yapılı polimerik maddelerdir. Yapılarına çözücü alma kapasitesi kendi kütlelerinin en az % 20'si olan çapraz bağlı polimerler kserojel olarak tanımlanır. Çözücü olarak su kullanıldığında kserojel hidrojel olarak adlandırılır.

Hidrojeller, üç boyutlu çapraz bağlı hidrofilik özellikte ağ yapılı polimerlerdir. Hidrojeli oluşturan ağ yapı çapraz bağlarla birbirine bağlanmış polielektrolit zincirlerden oluşur. Bu zincirlerde substitue grup olarak genellikle karboksilik asit grupları bulunur. Polimer zincirleri üzerindeki negatif yükler birbirlerini iterler ve genişlerler. Çapraz bağların varlığı polimer zincirlerinin çözünmeksizin jel halinde şişmesini sağlar [62-64].

Hidrojellerin sınıflandırılması

Hidrojelleri, hazırlama yöntemi, iyonik yük ve fiziksel yapılarına bağlı olarak sınıflandırabiliriz. Hazırlama yöntemlerine göre 4 tür hidrojel bulunmaktadır;

- Homopolimerik hidrojeller
- Kopolimerik hidrojeller
- Çoklu polimerik hidrojeller
- İççe geçmiş ağ yapılı hidrojeller (IPN, interpenetrating network)

Homopolimerik hidrojeller, tek bir hidrofilik monomerin çapraz bağlanması ile oluşurlar. Kopolimerik hidrojeller ise iki komonomerin çapraz bağlanması ile hazırlanır, ancak monomerlerden biri hidrofilik yapıda olmalıdır. Çoklu polimerik hidrojeller, iki ya da daha fazla komonomerin reaksiyonu ile oluşurlar. IPN hidrojeller ise çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak karışması ile oluşturulur [65].

Hidrojellerin şişmeleri

Şişme, polimerik ağ yapılarının karakteristik bir özelliğidir. Çapraz bağlanma miktarına bağlı olarak polimerik ağlar çözünmeden çok yüksek miktarda sıvı absorplayabilirler. Şişme, normal bir polimer çözeltisindeki lineer polimer zincirleri ile çözücü karışımı arasındaki etkileşim ile gerçekleşen bir olgudur.

Bu yüzden, çözücü yardımı ile polimerlerin hacminin artması polimerin entropisinde de bir artışa neden olur .

Hidrojellerin duyarlılığı

Hidrojellerin en önemli özelliklerinden birisi sulu ortamda şişebilmesi, susuz ortamda ise büzüşmesidir. Bu özellik, bütün hidrojeller için ortaktır. Fakat sadece şişme ve büzülme davranışı, hidrojellerle ilgilenmek için yeterli değildir.

Son zamanlarda bir çok araştırmacı hidrojellere bazı fonksiyonlu gruplar takarak bir sinyale cevap verebilen (şişen, büzülen, bozulan) yeni hidrojeller hazırlamıştır. Takılan fonksiyonel gruplarla birlikte bu hidrojeller, akıllı jeller olarak adlandırılmaktadır.

Hidrojellerin hacim değişmesine sebep olan çevresel faktörler; pH, sıcaklık, elektrik alanı, iyonik şiddet, çözücüler, elektromanyetik ısıma (UV), basınçtır.

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller

Polimer zincirlerinin en önemli özellikleri dış etkiendeki çok az bir değişiklik ile, örneğin ortam sıcaklığının çok az değişmesi ile aniden çok büyük boyut değişikliği göstermeleridir. 0,1°C'lik bir sıcaklık değişimi ile çözelti içerisinde boyutları 100 misli değişebilen sıcaklığa duyarlı polimer zincirleri örnek olarak verilebilir. Bu ani hacim değişikliği birinci dereceden bir faz geçişinin sonucudur. Polimer jellerin sıcaklık duyarlılığı, hidrojen bağlanması ve hidrofobik etkileşimlerin sıcaklığa bağlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Düşük sıcaklıklarda, polimer zincirinin hidrofilik grupları ile su molekülleri arasındaki hidrojen bağlarından dolayı hidrojeller şişer. Daha yüksek sıcaklıklarda, hidrojen bağları zayıflar hidrofobik etkileşimlerin artışından dolayı hidrojel büzülür. Bir jelin ısıtılmasından dolayı, kritik bir sıcaklıkta şişmeden büzülmeye doğru bir geçiş olur [66].

Çözücü duyarlı hidrojeller

Jellerin sıcaklıkla şişme-büzülme davranışlarının yanında çözücü içindeki şişme davranışları da çok büyük ilgi çekmektedir. Polimer jellerinde ani hacim değişimi ilk olarak 1978 yılında Tanaka tarafından gözlenmiş olmasına rağmen Tanaka'dan 10 yıl önce Dusek ve Patterson böyle ani bir değişim olacağını teorik olarak göstermişlerdi.

Polimer jellerinde dış etkene bağlı bu tip 1. Dereceden (süreksiz) bir faz geçişi gazların sıvılaşmasına benzer. Bilindiği gibi ideal gazlar olarak tanımlanan gazlar, gaz molekülleri arasında bir etkileşim olmadığı için sıvılaşamazlar. Yani ideal gazlarda bir faz geçişi gözlenemez. Ancak gerçek gazlarda moleküller arası kuvvetler söz konusudur. Kritik sıcaklığının altında gaz sıkıştırıldığında hacmi basıncın fonksiyonu olarak küçülür. Bu faz geçişi sırasında gaz ile sıvı fazlar karşılıklı denge halinde bulunurlar. Benzer şekilde jellerin dış etkenlere bağlı faz geçişleri sırasında şişmiş jel büzülmüş jel ile bir arada bulunur. Dolayısıyla şişmiş durumdaki jeli “gaz”, büzülmüş jeli ise “sıvı” hale benzetebiliriz. Polimer çözeltilerinin en önemli özelliği çözücüler içerisinde şişip büzülmeleridir. Kuru haldeki bir polimer ağ yapısı iyi bir çözücü içine koyulduğunda ağ yapısını oluşturan polimer zincirlerinin çözücüyle arasındaki etkileşimine göre genişler, çözücü bu ağ yapısını doldurur ve şişme gözlenir. Bu esnada çözücü molekülleri polimer zincirleri arasına girip onları genişletirken, polimer zincirlerini bir arada tutan çapraz bağlar bir yay vazifesi görerek zincirlerin dağılmalarını engeller [67].

Hidrojellerin kullanım alanları

Hidrojeller biyotıp alanında, kaplama uygulamalarında dikiş işlemleri için, elektrot yapımında ve elektroforez hücre yapımında kullanılmaktadır. Yine hidrojellerin, yapay organ yapımı, kornea, doğuştan gelen kemik hastalıklarının tedavisinde, homojen materyal olarak kulak zarı tıkacı,

sentetik kıkırdak, safra ve yemek borusu yapımı gibi biyotıp alanında çok yararlı uygulamaları vardır

Hidrojeller yüksek oranda su tutucu olmaları nedeniyle tarımsal alanda, gübrelerin ve tarımsal ilaçların denetimli salımlarında, endüstride yağ ve petrol içerikli sulu atıklardan saflaştırma işlemlerinde kullanılabilir. Ayrıca suyun uzaklaştırılması işlemlerinde su tutucu olarak ve hastane atıklarından suda çözünebilen ya da hidrojel ile uyumlu olarak soğurabileceği bazı fizyolojik (kan, üre vb.) sıvıların soğurulması gibi çok yararlı uygulamaları bulunmaktadır.

Çevresel uyarılara hızlı cevap veren jeller, robotlar ve diğer mekanik aygıtlarda veya insan protezlerinde kas olarak kullanılması için çalışılmaktadır [68].

Sentetik polimerler

Sentetik polimerler ilk kez 19.yy. başlarında elde edilmişlerdir. Sentetik polimerler uygun monomer veya çıkış maddeleri kullanılarak hazırlanır. İçinde bulunduğumuz yüzyılın başlarında, bu tür maddeler, çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere endüstriyel ölçülerde yapılmıştır. Ancak, sentetik yüksek polimerlerin oluşmasını düzenleyen temel bilimsel ilkeler 1925-1935 yıllarında bulunmuştur.

Bazı durumlarda, uygun işlemlerle doğal polimerlerin kimyasal yapıları değiştirilir ve başka özelliklere sahip polimerler hazırlanır. Örneğin, çözünmez karakterdeki selülozun hidroksil gruplarının tamamına yakınının asetillenmesiyle, çözünebilen selüloz triasetat elde edilir. Doğal polimerlerden çıkılarak yapılarının değiştirilmesi ile elde edilen bu tür polimerlere yarı-sentetik polimerler adı verilir.

Sentetik polimerler olarak bilinen sentetik lifler (fiberler), plastikler ve sentetik kauçuklar (elastomerler) endüstride çok çeşitli ve geniş uygulama alanı bulunan maddelerdir [59,60].

Glisidilmetakrilat

Glisidilmetakrilat (GMA), molekülünde epoksi grubu olan bileşiktir. Epoksi grubunun yüksek reaksiyon kabiliyetinden dolayı, kolayca birleşme reaksiyonları verirler. Bu reaksiyonlar, epoksi halkasının açılması ve hidroksil grubunun meydana gelmesiyle gerçekleşir.

Glisidilmetakrilat monomeri, akrilat ve metakrilat monomerleri yanına eklendiğinde farklı özelliklere sahip kopolimerler elde edilmektedir. Epoksi grubu içeren polimerler doku ve idrarda çözünme özellikleri nedeniyle biyolojik aktif madde olarak kullanılır.

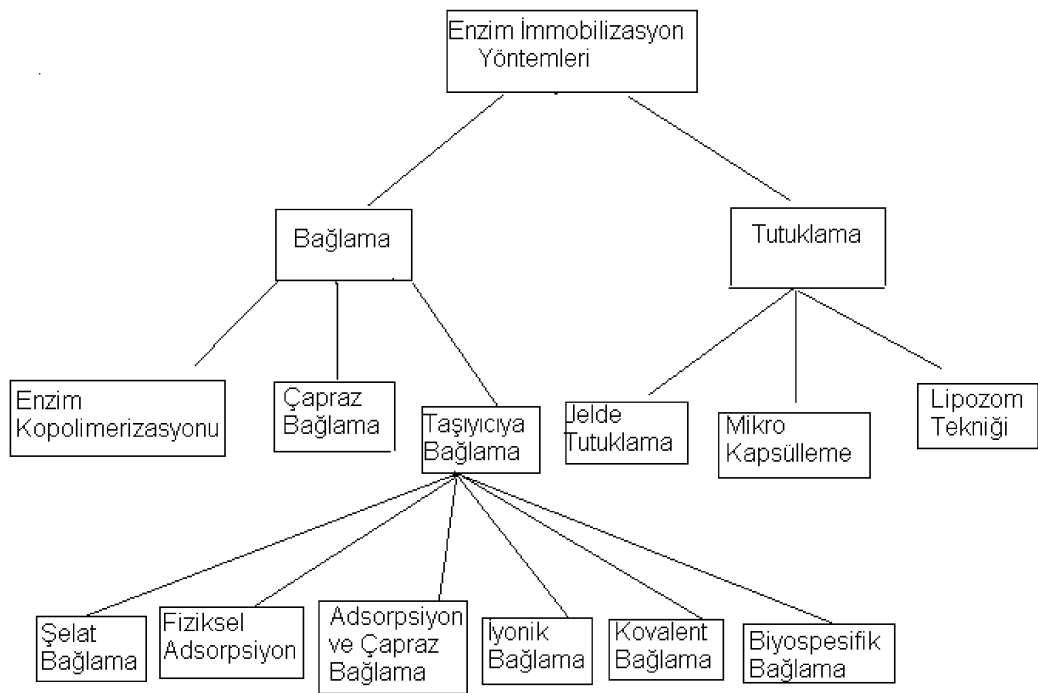
Metakrilat grubu monomerlerin en önemli özelliği optik berraklığıdır. Yüksek ışık geçirgenliği, iyi mekanik ve termal dayanıklılıklarından dolayı oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler [69].

2.3.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1960'lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonları için bir çok immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Uygun immobilizasyon yönteminin seçiminde dört ana kriter göz önüne alınmalıdır: güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık. Bir

enzimin immobilizasyonunda ayrıca enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir [1].

Enzim immobilizasyonunda kullanılan bu yöntemlerin sınıflandırılması için bir çok şema hazırlanmıştır. Genel olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler Şekil 2.6' da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Kimyasal temele dayalı immobilizasyon yöntemleri

- a-) Enzimin, suda çözünmeyen fonksiyonlu polimerlere bağlanması,
- b-) Büyümekte olan polimer zincirine enzimin dahil edilmesi,
- c-) Çok fonksiyonlu, düşük molekül kütleli bir reaktif ile enzimin, molekül içi çapraz bağ yapması şeklinde sınıflandırılabilir.

Kimyasal yöntemlerde, immobilizasyonla birlikte enzimin kimyasal ve fiziksel özellikleri de değişebilir. Bazı organik fonksiyonel gruplar çıkarılarak, farklı

yapıda ve reaktivitede gruplar elde edilebilir. Böylece immobilize enzimler de, serbest enzimlerin özelliklerine göre değişmeler gözlenebilir. Karalılık ve dayanıklılık açısından pek çok üstünlükler ortaya çıkarken, kinetik özelliklerde de farklılıklar görülür.

Kimyasal olarak immobilizasyon yönteminde, suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile bir veya daha çok enzim molekülü arasında en az bir kovalent veya kısmen kovalent bağın meydana gelmesi gerekmektedir.

İmmobilizasyon sırasında yürüyen kimyasal reaksiyonların tabiatına bağlı olarak kimyasal, yöntemler genellikle tersinmez olup, enzimin geri kazanılması mümkün olmayabilir.

Kimyasal olarak immobilize edilmiş enzimin, serbest enzime göre farklı aktiviteye sahip olmasında, seçilen enzim ve destek maddesinden başka spesifik birleşme şartları da önem taşır. Bir enzimin desteğine başarılı bir şekilde bağlanabilmesi ve aktivasyonunun sağlanabilmesi için enzim ile desteğin çok özel uygulamalardan geçmesi gereklidir. Elde edilen enzim-destek sistemi, serbest enzime göre daha düşük katalitik etkinlik gösterebilmektedir. Bu durumun, büyük molekül ağırlıklı substratların ve makromoleküllerin sterik engellemesinden ileri geldiği öne sürülmüştür [70].

Kovalent bağlama

Kovalent bağlanma yoluyla enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar uzun yıllardan beri devam etmektedir. Bu çalışmalarda çok çeşitli destek matrisler ve reaktif gruplar kullanılmıştır. Özellikle endüstriyel uygulamalar için, kovalent olmayan enzim immobilizasyon yöntemlerinin de son yıllarda çok tercih edildiği bilinmektedir [71].

Enzimler reaktif desteklere kovalent bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemler ile sulu ortamda gerçekleşir. Kovalent bağlanmaya, glutaraldehid

ile aktive edilmiş poliakrilamidde bulunan aldehid grubuna, lipoksijenazın lizin ve N-terminalinde bulunan NH_2 grubu üzerinden bağlanması örnek verilebilir.

Enzimin desteğe kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Desteğe kovalent bağlanma, enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak destekler reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Immobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH v.b) gerçekleştirilmelidir. Destek suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterliden olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür desteklerin seçiminde enzim destek bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında desteğin enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir.

Desteğe bağlanmanın avantajları:

- Reaktif desteğe enzim bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir.
- Katı desteğe bağlı katalizör kullanışlıdır. Süzme ve santrifüjleme ile ayrılabilir.
- Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir.
- Ürünleri kirletmez.
- Desteğin yapısına bağlı olarak yeni spesifikler kazanabilir.
- Sürekli sistemlere uygundur. Değişik fiziksel formlarda (tabaka, partikül, fiber v.b) imal edilebilirler.

Desteğe bağlanmanın dezavantajları:

- Enzimler immobilizasyon koşullarından etkilenirler.
- Bağlama aktivite için zorunlu aminoasit artıkları üzerinden gerçekleşebilir.
- Enzimin desteğe bağlanması özel ve masraflı preparasyonları gerektirebilir.
- Polimer desteğinin sebep olduğu sterik engelleme nedeniyle aktivite azalabilir [72].

Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yöntemi ile enzimlerin immobilizasyonu; tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde gerçekleşir. Bu yöntem iki veya daha fazla fonksiyonel grup taşıyan enzim moleküllerinin birbirlerine çapraz bağlanması ve bu şekilde suda çözünmeyen bir kompleks oluşturması temeline dayanır.

Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime bağlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur

En çok kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri; glutaraldehid, klorformat ve karbonildiimidazol, hetereosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinil sülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur [73].

İyonik bağlanma

iyonik bağlanma metodu iyon değişim grupları içeren suda çözünmeye destek materyali üzerine enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. İyonik değişim merkezine sahip polisakkaritler ve sentetik polimerler destek olarak yaygın biçimde kullanılırlar. Enzimin destek materyali üzerinde immobilizasyonu kolayca gerçekleştirilebilir ve kovalent bağlanma metoduna göre daha ılımlı şartlarda oluşturulabilir. Bundan dolayı iyonik bağlanma metodu enzimin aktif bölgesinde küçük miktarda değişikliklere neden olur. Dahası bu metod bir çok durumda yüksek aktiviteye sahip immobilize enzimler oluşturur. Destek materyalinden enzimlerin ayrılması yüksek iyonik şiddete sahip substrat çözeltisi ya da pH'nın etkisi ile meydana gelebilir [73].

Fiziksel temele dayalı immobilizasyon yöntemi

Fiziksel yöntem, enzimin kovalent bağlanmasına dayanmayan bir yöntemdir. Bu yöntemde, enzimlerin immobilizasyonu elektrostatik etkileşme, iyonik bağ oluşumu, proteinler arası etkileşme gibi belirli fiziksel kuvvetlere bağlı kalmaktadır. Mikrokapsülleme ve özel membrana bağlı yapılan immobilizasyon da bu sınıfa girer. Genel olarak fiziksel immobilizasyon yöntemleri tamamen tersinir olmakla birlikte, pek çok özel yöntemde, beklenen ideal davranışlar görülmez ve önemli ölçüde tersinmez bağ oluşumu gözlenir. Bu arada çok değişkenli ve kesin bir şekilde sınıflandırılması mümkün olmayan immobilizasyon türleri de mevcuttur [1].

- a-) Adsorpsiyon (suda çözünmeyen destek yüzeyine enzimin adsorplanması),
- b-) Kafes tutulması (suda çözünmeyen jel destek içine enzimin hapsedilmesi),
- c-) Mikrokapsülleme (yarı geçirgen mikrokapsüller içinde enzimin, sürekli veya süreksiz olarak immobilizasyonu) şeklinde sınıflandırılabilir.

Adsorpsiyon

İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir(yasem,in doktora). Yöntem;yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin yaşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir(hasan karadğ). Genelde enzim çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış olan materyel daldırılır ve belirli bir süre beklenir. Membran veya film immobilize edilecek biyokimyasal aktif materyale göre hidrofilik veya hidrofobik karakterde seçilebilir. Enzimler için genellikle hidrofilik membranlar kullanılır. Adsorbsiyon verimi, pH, sıcaklık, çözücünün türü, iyonik güç ve adsorbanın konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [74].

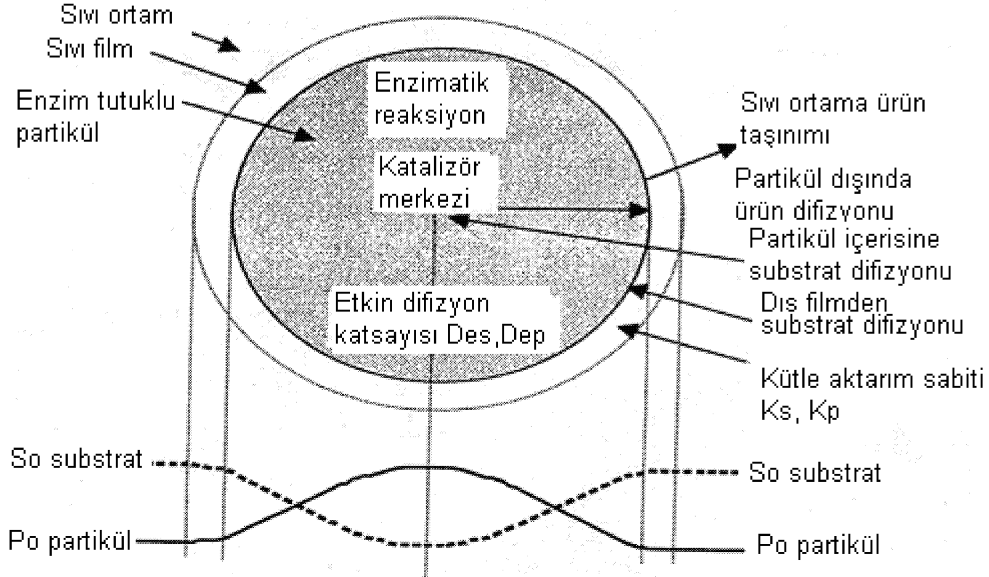
Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorbsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar, aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kollodyum, silika jel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Adsorsiyon yönteminin yararları; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki destekleri seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır.

Yöntemin sakıncaları ise şöyle sıralanabilir; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile destek arasında kuvvetli bir çekim yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine yol açmaktadır [75].

Hapsetme ile immobilizasyon

Bu yöntem, polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır . Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeterli derecede sıkı olması gerekir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir [69]. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir desteğe bağlanmamış olmasıdır [65]. Bu işlem, enzimin polimer örgüsü veya yarı geçirgen zarlar içerisine hapsedilmesidir. Bunlardan birisi mikrokapsülleme diğeri de kafes olmak üzere tutuklanmasıdır [70].



Şekil 2.7. Enzim tutuklu bir partikülde kütle aktarımı ve kimyasal reaksiyon etkileşimleri

Substrat çözeltisi içerisinde bulunan enzim tutuklu partikülün kesiti incelendiğinde, partikül içerisinde substrat tüketildiği ve ürün üretildiği için substrat çözeltisinden partikül merkezine doğru substrat ve ürün için bir

derişim gradiyenti oluşmaktadır. Partikül yüzeyinde substrat derişimi, merkezinde ise ürün derişimi yüksektir. Enzimatik reaksiyonun gerçekteşebilmesi için öncelikle substrat çözeltiden film tabakasını aşarak partikül yüzeyine ulaşmalı ve sonrasında katalitik partikülün içersine difüzlenmelidir. Karıştırma veya akış yoluyla substrat yığın taşınımı ile partikül yüzeyine taşınmaktadır. Eğer substrat partikül içersine difüzlenmiyor ise veya partikülün sadece yüzeyinde enzim bulunması durumunda sadece yüzeysel kütle aktarımı söz konusudur. Genellikle enzim partikül içersinde tutuklandığı için substrat mutlaka partikül içersine, enzimin bulunduğu bölgeye taşınmalıdır. Ürün için tam tersi taşınım söz konusu olup partikül merkezinden çözelti ortamına doğru taşınım geçerlidir.

Partikül içersine doğru substrat derişiminin azalması ve ürün derişiminin artması nedeniyle partikülün merkezine doğru enzimatik reaksiyon hızı değişmektedir.

Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

Bu yöntem enzimlerin yarı geçirgen zarlar içersinde tutuklanması ile gerçekteştirilir. Özel olan bu zarlardan enzimler dışarı çıkamazken substrat ve ürünün hareketi serbesttir. Kapsül zarının kalınlığı ve geçirgenliği kapsülün oluşum zamanına, organik çözücünün kompozisyonuna, konsantrasyonuna ve kullanılan bileşiklerin doğasına bağlıdır [61].

Kafes tipi hapsetme yöntemi

Enzimler, organeller, hücreler ve antikorlar için uygulanabilen bir yöntemdir. Bu yöntem, biyokimyasal materyallerin suda çözünmeyen çapraz bağlı polimer örgüsü içersinde tutuklanması şeklinde gerçekteştirilir. Bu şekilde biyomoleküller polimerlerin örgü yapısı içinde fiziksel olarak tutuklanmakta ve dışarı çıkamamaktadır. Substrat yapının içine girebilmekte ve katalitik

reaksiyon sonucunda oluşan ürün yine örgü yapısının dışına difüzlenebilmektedir.

Yöntemin avantajı, diğer fiziksel tutuklama yöntemlerinde olduğu gibi enzimde herhangi bir kimyasal değişiklik meydana gelmez, buna bağlı bir aktivite azalması olmaz.

Yöntemin dezavantajları ise, substrat ve ürünün serbest olarak geçişinin mümkün olabilmesi için sadece düşük molekül ağırlıklı substratların katalitik reaksiyonlarında bu yöntemin kullanılabilmesi ve çapraz bağlı polimer örgüsü arasından enzimin sızma ihtimalinin olmasıdır.

2.3.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Günümüze kadar birçok enzim için birçok farklı immobilizasyon yöntemi uygulanmış ve önerilmiştir. Ancak enzimlerin birbirlerinden çok farklı kimyasal karakteristikleri ve bileşenleri olması, ayrıca kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal özellikleri olması nedeniyle bütün enzimler için ve bütün şartlarda uygulanabilecek kesin bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Ayrıca her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle immobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir [76].

Çizelge 2.6. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

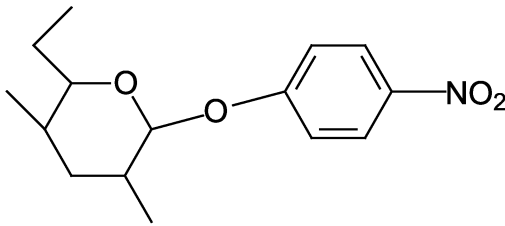
Karakteristik	Kovalent Bağlama	Adsorbsiyon	Çapraz Bağlama	Tutuklama
Matriks Maddesi	Agaroz Selüloz PVC İyon değiştirici reçine Gözenekli cam	İyon değiştirici reçine Aktif kömür Slika jel Kil Gözenekli cam	Fonksiyonel olarak inert proteinler	Aljinat Karageenan Kolojen Poliakrilamit Jelatin Silikon kauçuk poliüretan
Bağlanmanın Doğası	Kimyasal bağlanma	Tersinir, pH'a göre değişken, iyonik şiddetin yüksek olması ile enzim ayrılabilir	Gluteraldehit Bisizosiyanat Bisdiazobenzidin İle çapraz bağlanma	Fiziksel hapsetme
Hazırlama	Zor	Kolay	Orta	Zor
Enzim Aktivitesi	Yüksek	Orta	Düşük	Düşük
Substrat Spesifikliği	Değişebilir	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	Nadiren	Mümkün	İmkansız	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Yüksek	Düşük	Orta	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Düşük	Yüksek

3. DENEYSEL KISIM

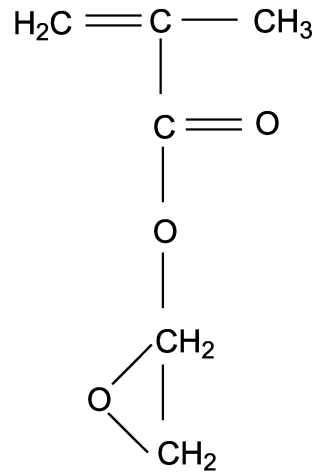
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

E.Coli bakterisinden elde edilen β -galaktosidaz (β -D-galaktosidaz galaktohidrolaz, EC.3.2.1.23 10.4 ünit),

p-nitrofenil- β -D-galaktopironosit: Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



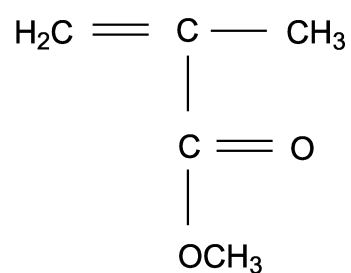
Glisidil metakrilat (GMA),



Molekül kütlesi: 142,16 g/mol

Yoğunluğu: 1,075 g/mL

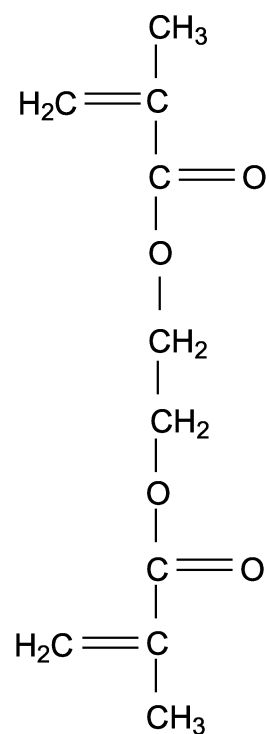
Metil metakrilat (MMA),



Molekül kütlesi: 100,12 g/mol

Yoğunluğu: 0,936 g/mL

1-2-Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA),

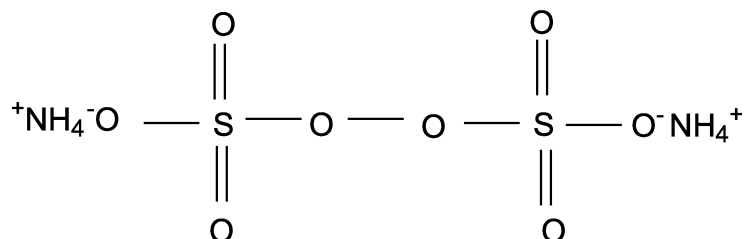


Molekül kütlesi: 198,22 g/mol

Yoğunluğu: 1,051 g/mL

Aldrich firmasından temin edildi.

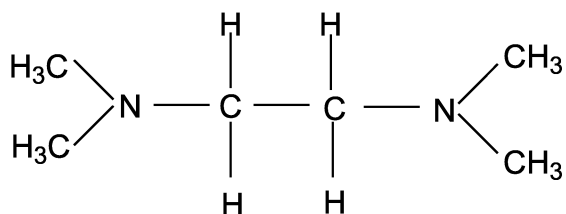
Amonyum persülfat (APS),



Molekül kütlesi: 228 g/mol

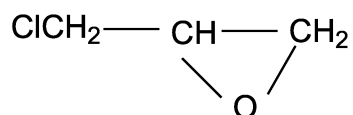
Yoğunluğu: 1,98 g/mL

N,N,N',N'-tetraetilendiamin (TEMED),



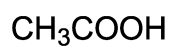
Molekül kütlesi: 116,2 g/mol

Epiklorhidrin,



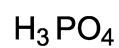
Molekül kütlesi: 92,53 g/mol

Asetik asit,



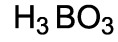
Molekül kütlesi: 60 g/mol

Fosforik asit,



Molekül kütlesi: 97,99 g/mol

Borik asit,



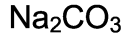
Molekül kütlesi: 61,83 g/mol

Sodyum hidroksit,



Molekül kütlesi: 40 g/mol

Sodyum karbonat



Molekül kütlesi: 118 g/mol

Merck firmasından elde edildi.

3.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre : UNICAM U.V / Vis Spektrofotometre

pH metre : Orion pH metre 420 A

Çalkalamalı su banyosu : ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu

3.3. Kullanılan Çözeltiler

1. NaOH çözeltisi: 2 M 50 mL NaOH çözeltisi hazırlamak için 3,84 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

2. Na_2CO_3 çözeltisi: 0,1 M 50 mL Na_2CO_3 çözeltisi hazırlamak için 0,53 g Na_2CO_3 bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

3. BR tamponu çözeltisi: 2,3 mL asetik asit, 2,7 mL fosforik asit, 2,5 g borik asit, bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL ye tamamlandı.

4. p-Nitrofenil- β -D-galaktopironosit substrat çözeltisi: 5mM p-nitrofenil- β -D-galaktopironosit substarat çözeltisi hazırlamak için 0,0015 mg p-nitrofenil- β -D-galaktopironosit bir miktar BR tamponunda çözüldükten sonra hacmi tampon çözeltisi ile 10 mL ye tamamlandı.

3.4. Enzim İmmobilizasyonu

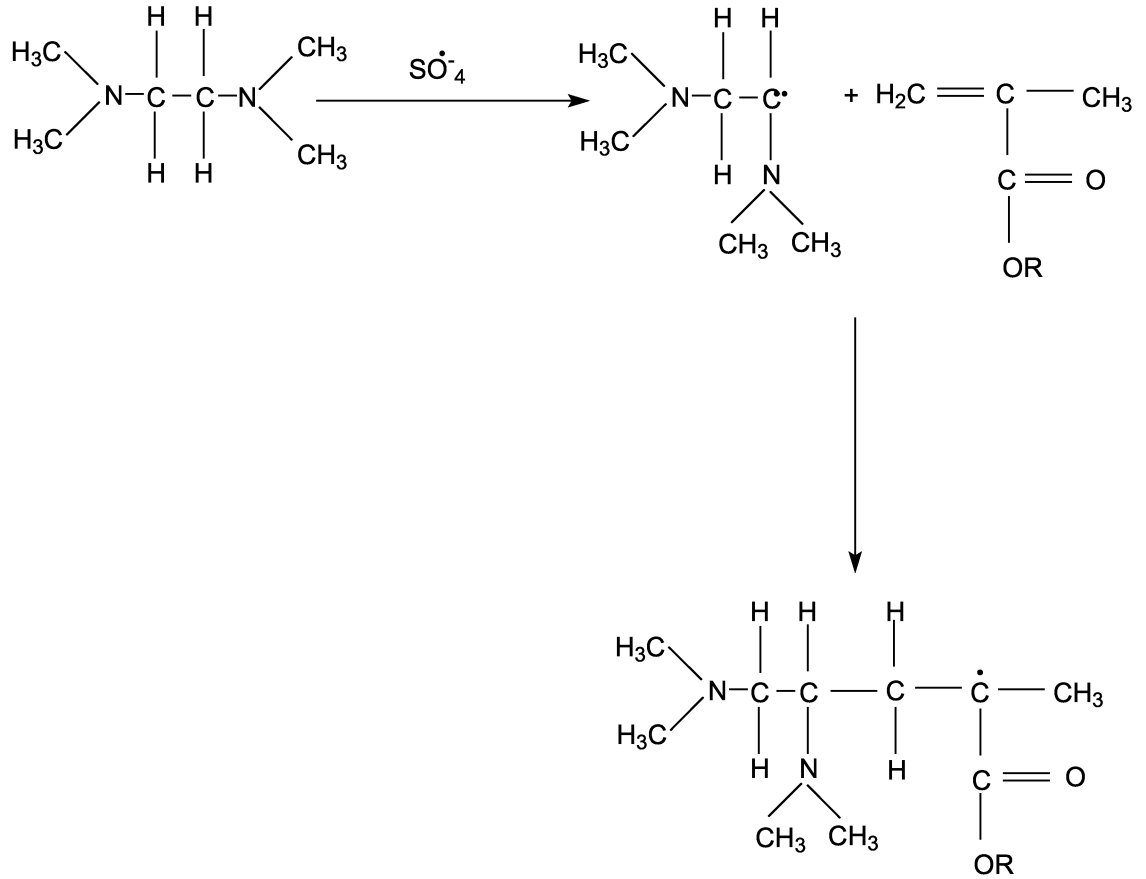
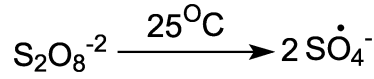
3.4.1. Poli (MMA-ko-GMA) hidrojelleri kullanılarak enzim immobilizasyonu

Poli (MMA-ko-GMA) hidrojelleri; MMA ve GMA monomerleri ile EGDMA çapraz bağlayıcının serbest radikal kopolimerizasyon reaksiyonuyla sentezlendi. Hidrojellerin sentezinde 1.bileşim için 0,0031 mol MMA, 0,0051 mol GMA, 2.bileşim için 0,0037 mol MMA, 0,0045 mol GMA, 3.bileşim için ise 0,0047 mol MMA, 0.0040 mol GMA monomerleri kullanıldı. Bu monomerler, 1.,2. ve 3. bileşim için sırasıyla 0,00041 mol, 0,00050 mol, 0,00058 mol çapraz bağlayıcı EGDMA kullanılarak ile 3 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltilere 2 mL APS ve 4 mL TEMED stok çözeltilerinden ilave edildikten sonra 4 mm çaplı PVC plastik pipetlere konuldu. Polimerleşmenin tamamlanması için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra plastik pipetlerden çıkarılan jeller polimerleşmeden kalan monomerlerin ve safsızlıkların uzaklaşması için 3 gün saf su içerisinde bekletildi. Bu jeller ~ 1 cm uzunluğunda kesilerek 50 °C' da vakum etüvünde kurutuldu.

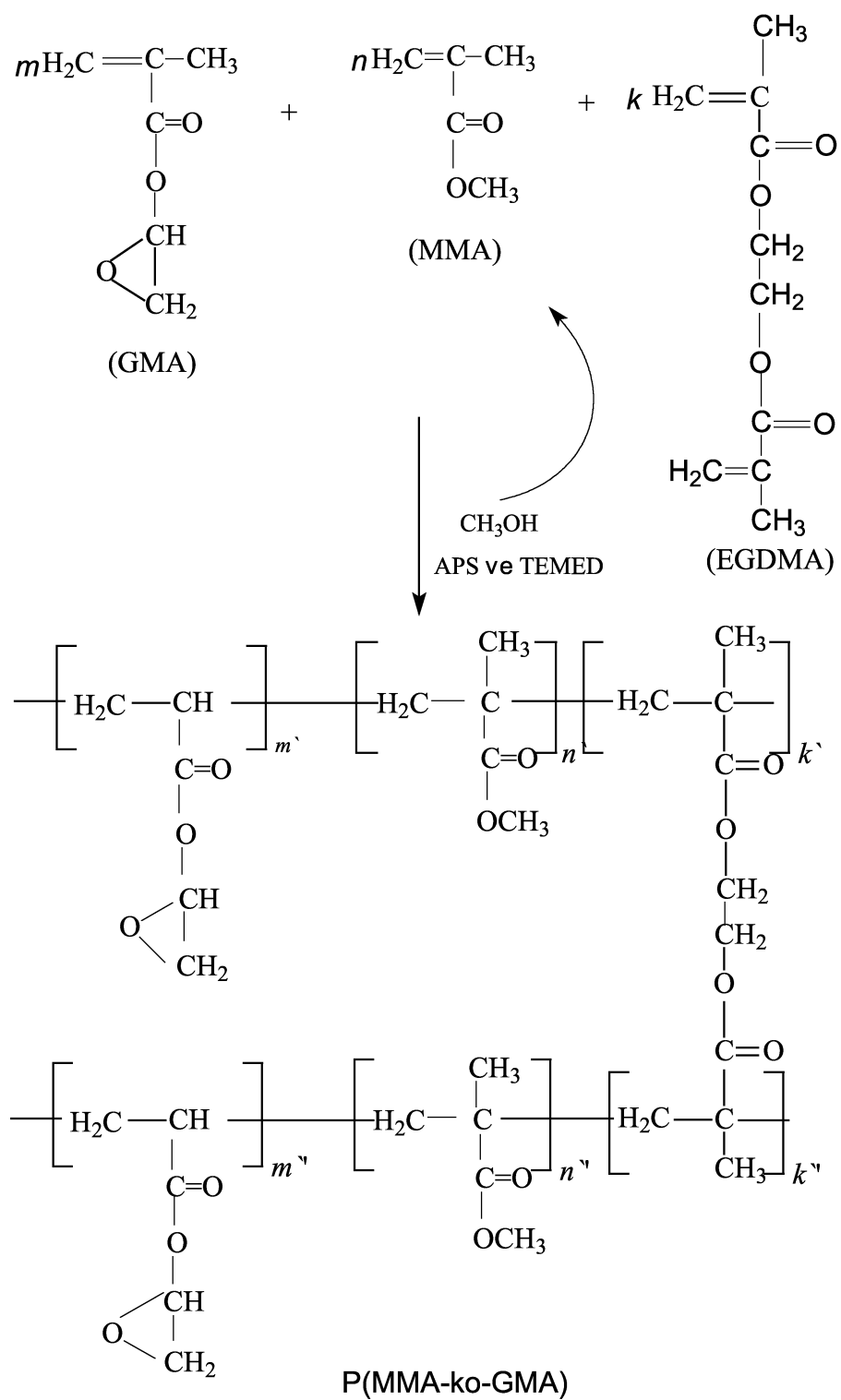
Çizelge 2.7. Polimerlerin hazırlanışı

Polimer	MMA	GMA	EGDMA
1. Bileşim	0,0031 mol	0,0051 mol	0,00041 mol
2. Bileşim	0,0037 mol	0,0045 mol	0,00050 mol
3. Bileşim	0,0047 mol	0.0040 mol	0,00058 mol

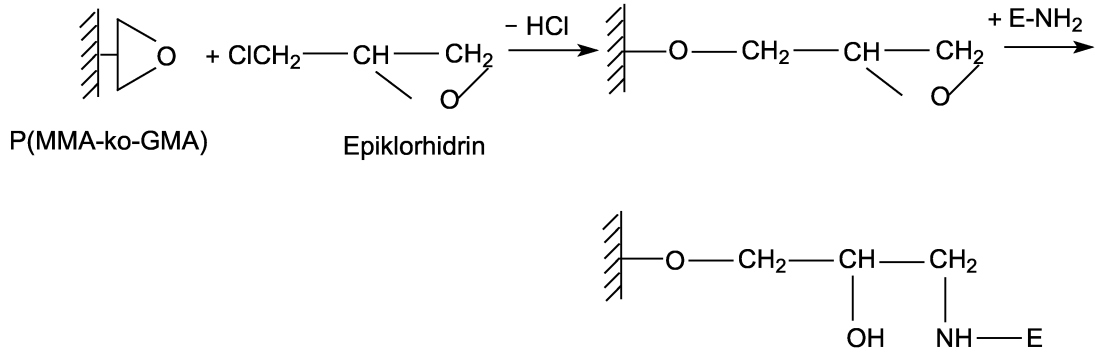
Hazırlanan hidrojellere 25 mL epiklorhidrin ilave edildikten sonra 30 °C de 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde aktifleştirildi. Aktifleştirilmiş hidrojeller süzülerek ayrıldıktan sonra sırasıyla saf su ve BR tamponu ile üçer kez yıkandı. Hidrojeller üzerine 25 mL enzim çözeltisi (0,2 mg) ilave edildi. 30 °C de 4 saat manyetik karıştırıcı üzerinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında + 4 °C de saklandı.



APS ile TEMED reaksiyonu sonucunda oluşan ortaklanmamış tek elektron içeren aktif TEMED molekülünün monomere katılması sonucu oluşan radikal



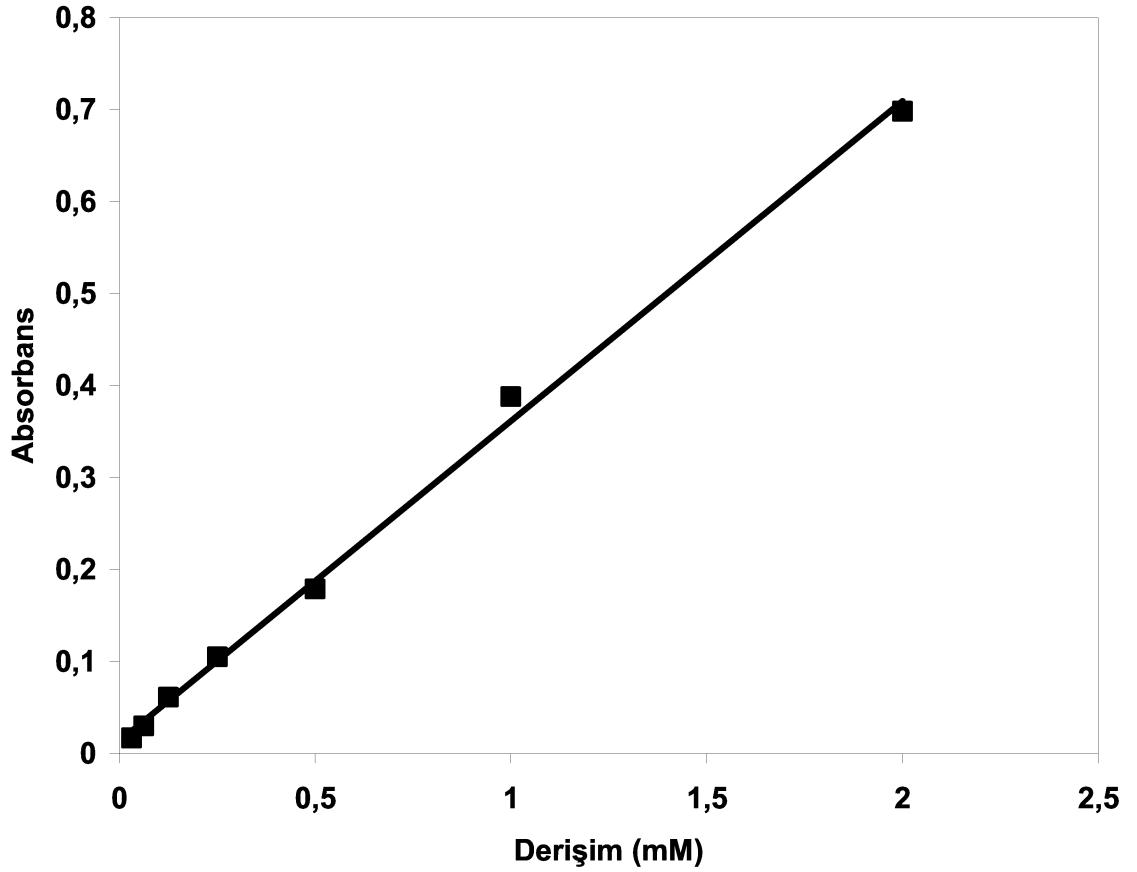
Poli (MMA-ko-GMA) hidrojelleri



Poli (MMA-ko-GMA) hidrojenlerinin epiklorhidrin ile reaksiyonu

3.5. p-Nitrofenil-β-D-Galaktopironosit kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla çeşitli derişimlerde (2-0,03125 mM) p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 200 µL alınıp içersine 20 µL enzim çözeltisi ilave edildi. Daha sonra çalkalamalı su banyosunda 30°C de 10 dakika karıştırıldıktan sonra içersine 3,9 mL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi ve 398 nm de U.V spektrofotometresi kullanılarak absorbens değeri ölçüldü. p-Nitrofenil-β-D-galaktopironosit derişimlerine karşı gelen absorbens değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. p-Nitrofenil β-D-galaktosid kalibrasyon grafiğı

3.6. AktiviteTayini

3.6.1. Serbest β-galaktosidazın aktivite tayini

β-Galaktosidazın aktivitesi Hernaiz ve Crout tarafından tanımlanan metoda göre tayin edildi [77]. Bunun için reaksiyon balonuna 200 µL p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit (5 mM) ve 20 µL enzim çözeltisi koyuldu ve 30 °C de 10 dakika su banyosunda çalkalandı. Su banyosundan alınıp balon içerisine 3,9 mL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildikten sonra U.V. spektrofotometresi yardımı ile 398 nm de BR tamponuna (pH :5) karşı absorbansı ölçüldü. Aktivite , zamana karşı ölçülen absorbans değerlerinden ve p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplandı.

$$HIZ(v) = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{398}}{\Delta t} \times \frac{\Delta c}{\Delta A_{398}} \quad [3.1]$$

Bu eşitlikte c, g/ mL olarak p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit derişimindeki değışimi gösterir.

β-Galaktosidaz için 1 enzim ünitesi veya birim aktivite, pH 5 de 10 dakikada ve 30°C de 1 μmol p-nitrofenil-β-D-galaktopironosidi parçalayan enzim miktarıdır.

3.6.2. İmmobilize β-galaktosidazın aktivite tayini

İmmobilize β-galaktosidazın aktivitesi Bölüm 3.6.1 de açıklandığı gibi tayin edildi.

3.7. Enzim Aktivitesine pH Etkisi

3.7.1. Serbest β-galaktosidazın aktivitesine pH ın etkisi

Serbest β-galaktosidazın aktivitesine pH etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH larda (3,5-7,0) BR tamponu ile hazırlanan enzim ve p-nitrofenil-β-D-galaktopironosit (200 μL, 5 mM) çözeltileriyle Bölüm 3.6.1 de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirildi ve enzim aktiviteleri tayin edildi.

3.7.2. İmmobilize β-galaktosidazın aktivitesine pH ın etkisi

Poli (MMA-ko-GMA) kullanılarak immobilize edilen β-galaktosidazın aktivitesine poli (MMA-ko-GMA) pH ın etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH larda (3,5-7,0) Bölüm 3.6.1 de belirtilen yöntemle aktiviteleri tayin edildi.

3.8. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

3.8.1. Serbest β -galaktosidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi

Serbest β -galaktosidazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklıklarda (20°C-45°C) Bölüm 3.6.1 de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirildi ve enzim aktiviteleri tayin edildi.

3.8.2. İmmobilize β -galaktosidazın aktivitesine sıcaklığın etkisi

Poli (MMA-ko-GMA) kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklıklarda (20°C-50°C) Bölüm 3.6.1 de belirtilen yöntemle aktiviteler tayin edildi.

3.9. Enzim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

3.9.1. Serbest β -galaktosidazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi

Serbest β -galaktosidazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile çeşitli derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 3.6.1 de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirildi ve enzim aktiviteleri tayin edildi.

3.9.2. İmmobilize β -galaktosidazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi

Poli (GMA-ko- MMA) kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile çeşitli derişimlerde (2,000-0,031 mM) hazırlanan substrat çözeltileri ile Bölüm 3.6.1 de belirtilen yöntemle aktiviteler tayin edildi.

3.10. Depolanma Kararlılığı

3.10.1. Serbest β -galaktosidazın depolanma kararlılığı

Serbest β -galaktosidazın depolanma kararlılığı incelemek amacı ile BR tamponunda (pH:5) hazırlanan enzim çözeltisi buzdolabında 4°C de saklandı. Enzim çözeltisinden belirli aralıklarda alınan örneklerle Bölüm 3.6.1 de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirildi ve enzim aktiviteleri tayin edildi.

3.10.2. İmmobilize β -galaktosidazın depolanma kararlılığı

Poli (GMA-ko-MMA) kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidazın depolanma kararlılığını incelemek amacı ile buzdolabında 4 °C de saklandı. Belirli aralıklarda alınan örnekler kullanılarak Bölüm 3.6.1 de belirtilen yöntemle aktiviteler tayin edildi.

3.11. Termal İnaktivasyon

3.11.1. Serbest β -galaktosidazın termal inaktivasyonu

Serbest β -galaktosidazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda (35°C-45°C) ve farklı zaman aralıklarında (10-60 dakika) tutulan enzim çözeltilerinin aktiviteleri Bölüm 3.6.1 de belirtilen reaksiyonlar gerçekleştirilerek enzim aktiviteleri tayin edildi.

3.11.2. İmmobilize β -galaktosidazın termal inaktivasyonu

Poli (GMA-ko- MMA) kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda (35°C-45°C) ve farklı zaman aralıklarında (10-60 dakika) tutulan örnekler kullanılarak Bölüm 3.6.1 de belirtilen yöntemle aktiviteler tayin edildi.

3.12. İmmobilize β -Galaktosidazın tekrar kullanım sayısı

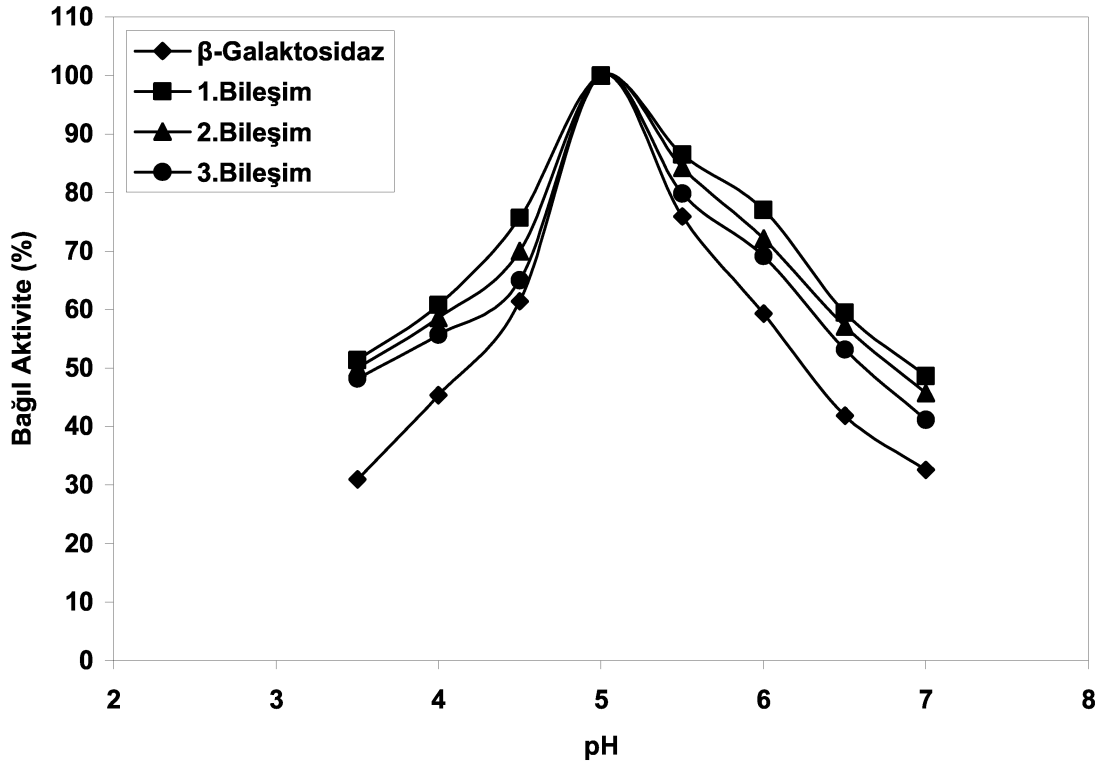
Poli (GMA-ko-MMA) kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile belirli aralıklarda alınan örnekler kullanılarak Bölüm 3.6.1 de belirtilen yöntemle aktiviteler tayin edildi.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Enzim Aktivitesine pH nın Etkisi

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktivitesine pH etkisini incelemek amacı ile Bölüm 3.6.1 de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlara ait bağıl aktivite değerlerinin pH ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 de verilmiştir. Serbest β -galaktosidaz ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidaz için optimum pH 5 olarak bulunmuştur.

Enzim reaksiyon hızı farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Optimum pH çeşitli koşullara bağlıdır. Bu koşulları, kullanılan tamponun cinsi, özel substratın yapısı ve enzimin elde edildiği kaynak olarak sıralamak mümkündür. Enzimler elektrolit karakterli olduğundan enzim aktivitesi pH ile değişme gösterir. Enzim-substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Reaksiyon hızı maksimum olduğunda kararlı ES kompleksi oluşur. Bu nedenle serbest enzimler için reaksiyon hızının maksimum olduğu optimum pH değerleri belirlenir.



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize β -galaktosidazın bağıl aktivitesinin pH ile değişimi

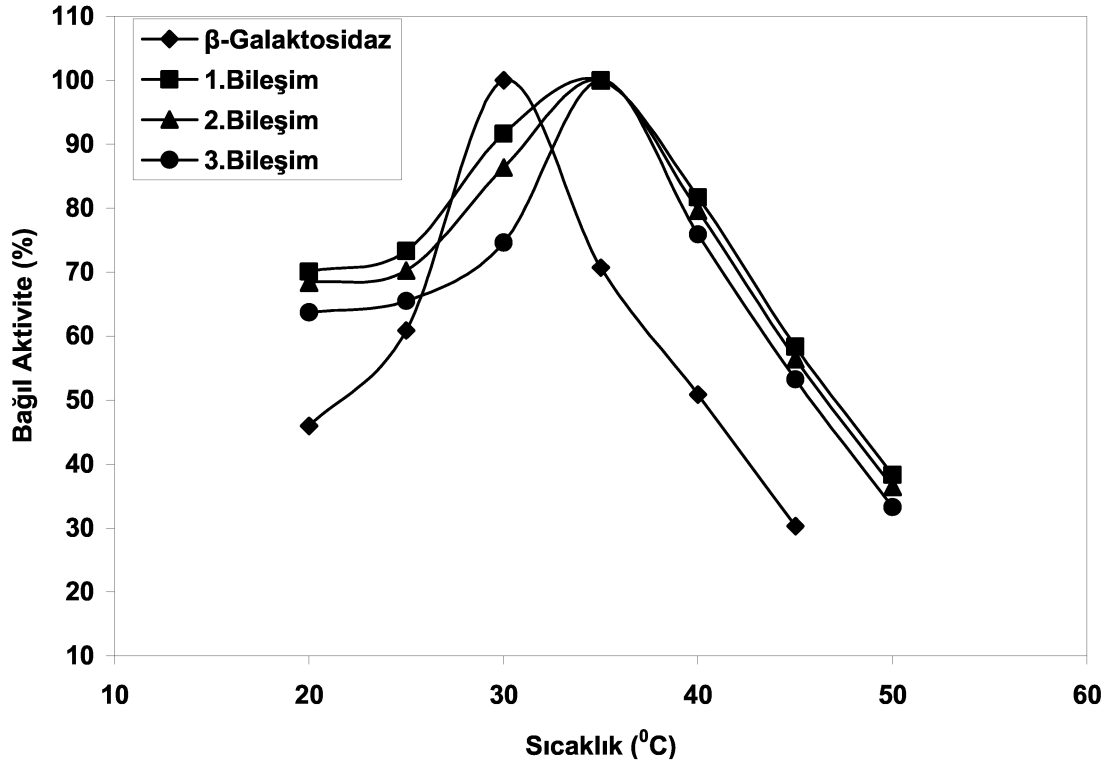
Grafikten de görüldüğü gibi immobilizasyon ile pH değerinde bir değişiklik gözlenmiştir. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzim, destek ile herhangi bir etkileşime girmediği için optimum pH da herhangi bir değişimin olmaması beklenen bir durumdur. Immobilizasyon sonucunda sterik ve difüzyonel etkiler ve enzimin konformasyonel yapısında değişimler meydana gelebilir. Bu durum optimum pH'ın değişimine neden olur.

Yapılan bir çalışmada, *Aspergillus niger* mantarından elde edilen β -galaktosidaz aljinat üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri değişmemiş ve 4,5 olarak bulunmuştur [78]. Başka bir çalışmada ise *Kluyveromyces lactis* mayasından elde edilen β -galaktosidaz glutaraldehit üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest enzim için optimum pH değeri 5,5 iken immobilize enzim için optimum pH değeri 7,7 olarak bulunmuştur [79]. *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı jelatin-glutaraldehit

üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri değişmemiş ve 4,5 olarak bulunmuştur [80]. *Escherichia coli* β -galaktosidazı silika alümina üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum pH değeri serbest enzim için 7,5, bu değer immobilize enzim için 8 olarak bulunmuştur [81]. *Cicer arietinum* β -galaktosidazı glutaraldehit üzerine immobilize edildiğinde optimum pH değeri serbest enzim için 5, bu değer immobilize enzim için 6 olarak bulunmuştur [82]. *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı kobalt aljinat küreleri içerisinde hapsetme yöntemiyle immobilize edildiğinde optimum pH değeri serbest enzim için 4,0, immobilize enzim için ise bu değer 4,9 olarak bulunmuştur [83].

4.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β -galaktosidazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.6.1 de anlatılan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonlara ait bağıl aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişiminden elde edilen sonuçlar Şekil 4.2 de verilmiştir. Serbest β -galaktosidaz için optimum sıcaklık 30°C bulunmuştur. 30°C nin altında ve 30°C nin üzerinde enzim aktifliğinde azalma gözlenmiştir. Poli (MMA-ko-GMA)-ECH kullanılarak immobilize edilen β -galaktosidazın optimum sıcaklığı ise kovalent bağlanma sırasında enzim molekülünün kimyasal modifikasyonu ve ikincil etkileşimler sonucu 35°C ye kaymıştır. Sıcaklığın artması moleküllerin kinetik enerjisini artırdığından tüm kimyasal reaksiyonların, bu arada biyokimyasal reaksiyonların da hızlarını artırır. Optimum sıcaklığın üzerinde, sıcaklık arttıkça enzim molekülünün önce tersiyer yapısı, sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapısı) bozulur. Bu olaylardan enzimi aktif merkezi de etkilenir ve enzim aktivitesini kaybeder.



Şekil 4.2. Serbest ve immobilize β -galaktosidazın bağıl aktivitesinin sıcaklıkla değişimi

Enzim ile polimerik destek arasında kovalent bağların oluşması difüzyonel ve sterik etkilerden dolayı enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasını neden olabilir ve optimum sıcaklıkta bir artış gözlenebilir. Dolayısıyla enzim katalitik aktivitesini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine ihtiyaç duyar.

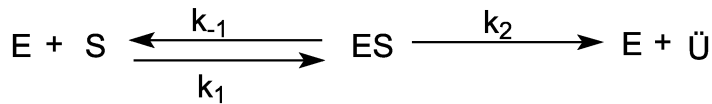
Yapılan bir çalışmada, *Kluyveromyces lactis* mayasından elde edilen β -galaktosidaz selüloz jelatin üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak bulunmuştur [84]. Başka bir çalışmada ise *Kluyveromyces lactis* β -galaktosidazı glutaraldehit üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 35°C iken immobilize enzim için bu değer 55°C olarak bulunmuştur [79]. *Aspergillus niger* β -galaktosidazı aljinat üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde ise serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri

değişmemiş ve 50°C olarak bulunmuştur [78]. *Aspergillus oryzae* β-galaktosidazı poli(glisidilmetakrilat) üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde ise optimum sıcaklık serbest enzim için 50°C, immobilize enzim için 60°C olarak bulunmuştur [85]. *Aspergillus oryzae* β-galaktosidazı jelatin-gulutaraldehit üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri değişmemiş ve 50°C olarak bulunmuştur [80]. *Cicer arietinum* β-galaktosidazı glutaraldehit üzerine immobilize edildiğinde optimum sıcaklık değeri serbest enzim için 55°C, immobilize enzim için ise 60°C olarak bulunmuştur [82].

4.3. Enzim Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest β-galaktosidazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi incelenmiş ve çeşitli substrat derişimlerinde (0,06 – 0,20 mM) hesaplanan K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Enzim-substrat (ES) reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibidir.



Bu eşitlikte E= Enzim, S= Substrat, ES= Enzim-substrat kompleksi, $\ddot{U}$ = Ürünü gösterir.

Enzim reaksiyon hızı Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir.

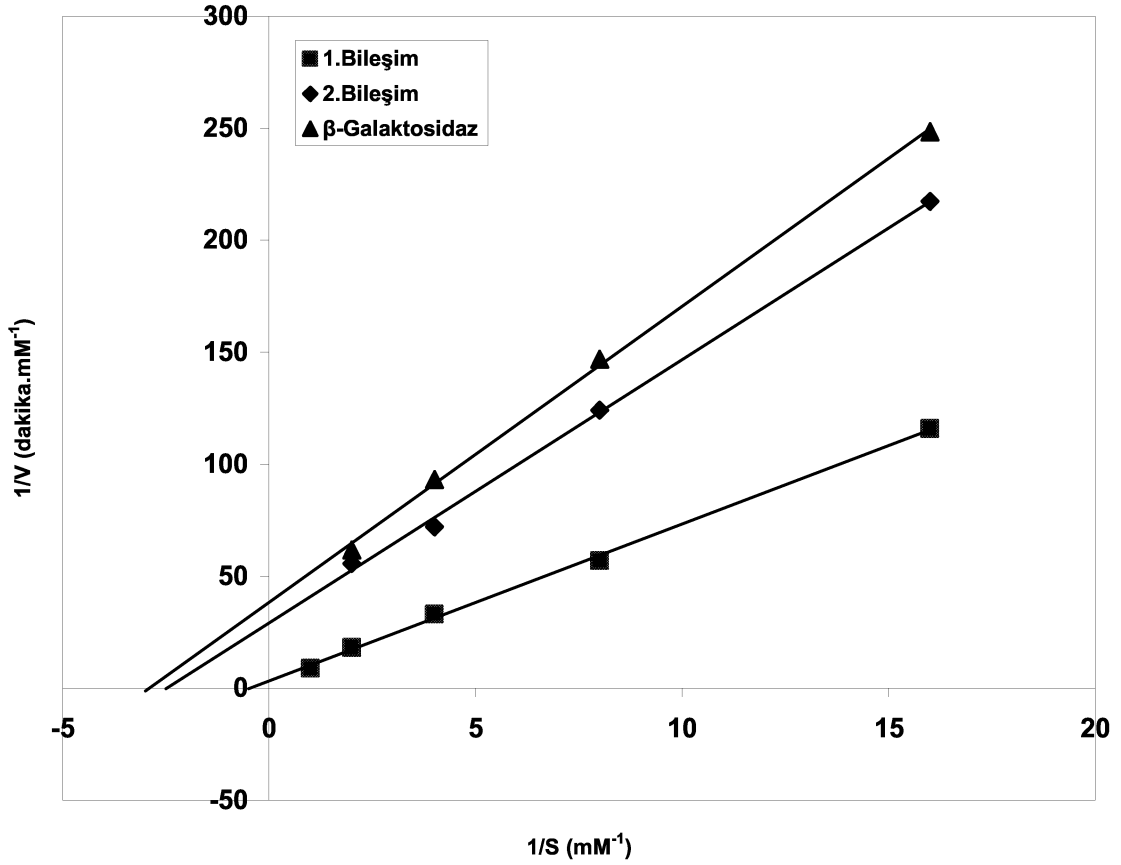
$$V = \frac{V_{mak} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliği} \quad (4.1)$$

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad (4.2)$$

Bu eşitliklerde; V= Başlangıç hızı, V_{mak}= Maksimum hızı, K_m=Michaelis sabiti, S=substrat derişimi olarak belirtilir.

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen β-galaktosidazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini araştırmak amacı ile çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle Bölüm 3.6.1 de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla hesaplanan reaksiyon hızlarından yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.3 de verilmiştir.



Şekil 4.3. Serbest ve immobilize β-galaktosidazıa ait Lineweaver- Burk grafiği

Çizelge 4.1. Serbest ve kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β-galaktosidazın kinetik parametreleri

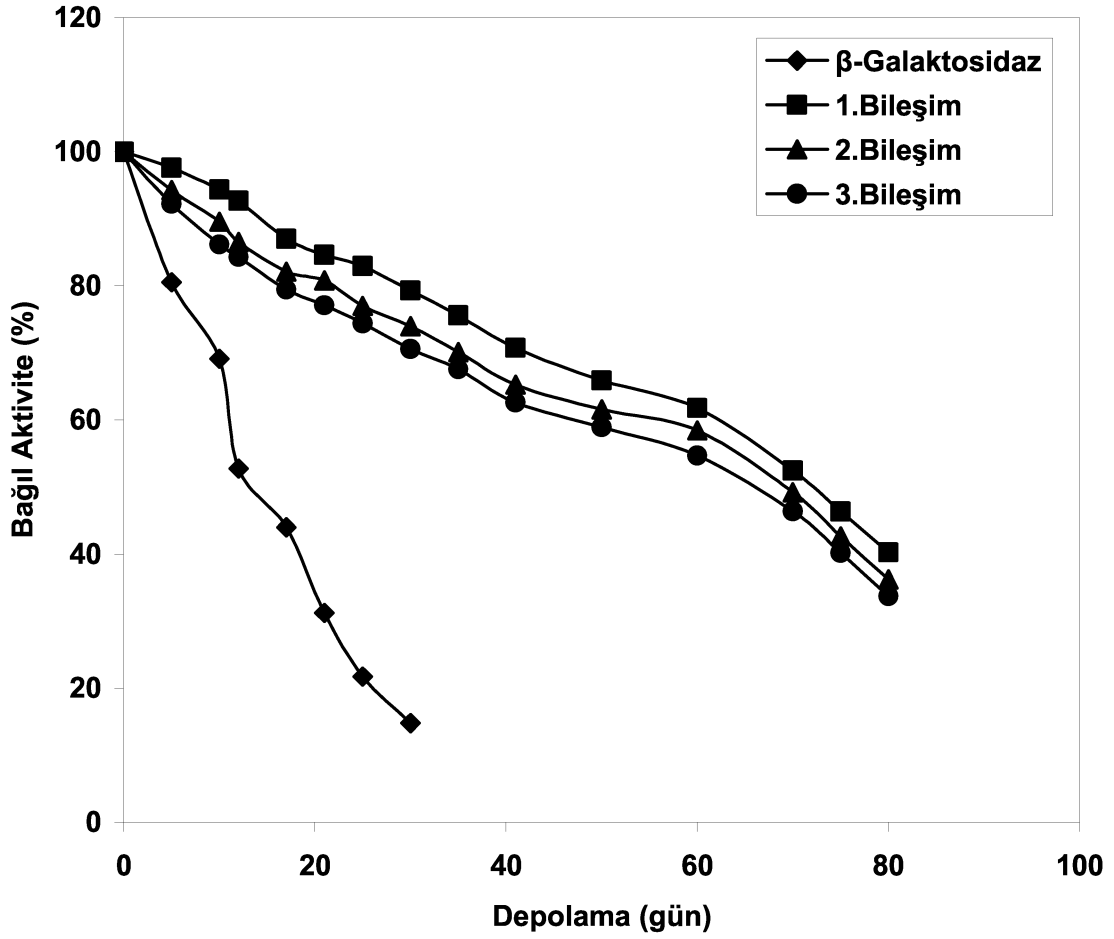
Destek	$K_m(\text{mM})$	$V_{\text{mak}}(\text{mM.dak}^{-1})$
Serbest β-galaktosidaz	0,343	0,0259
1 .Bileşim	0,625	0,0502
2. Bileşim	1,907	0,274

K_m değerindeki artış immobilize enzimin substrata olan ilgisinin az olduğunu gösterir. Enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekir. Enzim ve substrat arasındaki çeşitli etkileşimler ve difüzyonel sınırlamalar da bu artışa sebep olabilir.

Thermus acillus sp. β -galaktosidazı kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest β -galaktosidaz için $K_m = 3,1$ mM, $V_{mak} = 48$ IU/mg, immobilize enzimler için $K_m = 7,7-6,6$ mM, $V_{mak} = 45-47$ IU/mg olarak bulunmuştur (86). Başka bir çalışmada *Aspergillus niger* β -galaktosidazı aljinat üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde ise serbest enzim için $K_m = 42$ mM, $V_{mak} = 1,30$ mg.dak⁻¹, immobilize enzim için $K_m = 51$ mM, $V_{mak} = 0,7$ mg.dak⁻¹ olarak bulunmuştur [78]. Diğer bir çalışmada ise *Kluyveromyces lactis* β -galaktosidazı glutaraldehit üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest enzim için $K_m = 1,74$ mM, $V_{mak} = 77,45$ min⁻¹mg⁻¹, immobilize enzim için ise bu değerler $K_m = 9,34$ mM, $V_{mak} = 8,77 \cdot 10^{-3}$ min⁻¹mg⁻¹ olarak bulunmuştur [79]. *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı poli(glisidilmetakrilat) üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest enzim için $K_m = 21,4$ mM, $V_{mak} = 3,20$ μ mol.min⁻¹, immobilize enzim için ise bu değerler $K_m = 72$ mM $V_{mak} = 2,00$ μ mol.min⁻¹ olarak bulunmuştur [85]. *Escherichia coli* β -galaktosidazı perflurokarbon üzerine çapraz bağlanma yöntemiyle immobilize edildiğinde serbest enzim için $K_m = 0,69$ mol.m⁻³, $V_{mak} = 5,48 \cdot 10^{-3}$ mol.m⁻³.s⁻¹, immobilize enzim için ise bu değerler $K_m = 1,12$ mol.m⁻³ $V_{mak} = 1,87 \cdot 10^{-4}$ mol.m⁻³.s⁻¹ olarak bulunmuştur [87]. Genel olarak, immobilizasyon ile K_m 'de bir artış V_{mak} ' da ise bir azalma beklenir. Immobilize enzimle substrat daha kolay reaksiyona girebilecek durumda olduğunda V_{mak} değerinde bir artış gözlenebilir.

4.4. Serbest ve Immobilize β -Galaktosidazın Depolama Kararlılığı

Serbest ve kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin Aktivitesinedepolanma süresinin etkisini incelemek amacı ile çözeltiler 4° C de buzdolabında saklanmıştır. Belirli zaman aralıklarında alınan örnekler Bölüm 3.6.1 de belirtilen koşullarda incelenmiştir. Bağlı aktivitenin depolanma süresi ile değişimi Şekil 4.4 de gösterilmiştir.



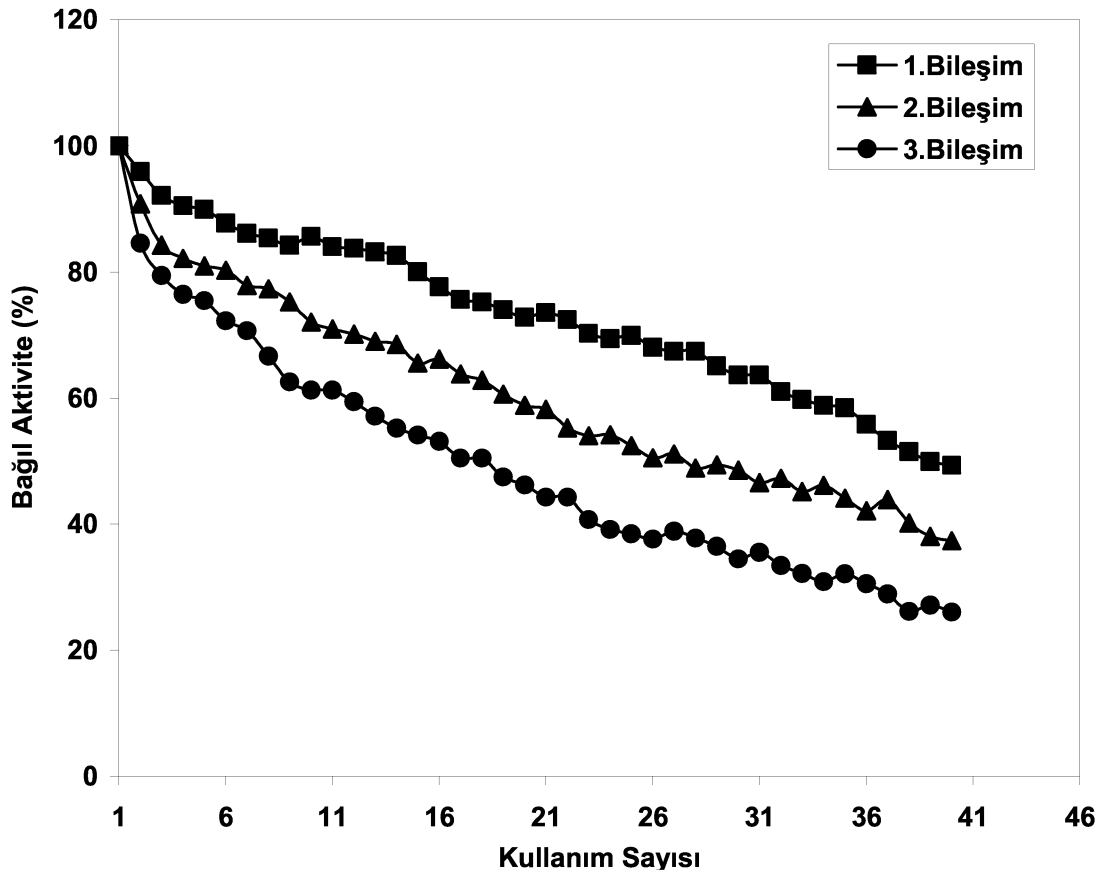
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize β -galaktosidazın depolama kararlılığı

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna bağlı olarak aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Bu değişimin sebebi ortamın sıcaklığı, iyon şiddeti ve pH gibi faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda serbest enzimin aktivitesi belirtilen depolama şartlarında 20 günde % 30 unu korurken immobilize β -galaktosidaz ise 1., 2. ve 3. bileşim sırasıyla % 84, % 80 ve % 77 lik aktiviteyi koruduğu gözlenmiştir. İmmobilizasyon ile enzimnin depolanma kararlılığında bir artış sağlanmıştır.

Aspergillus niger β -galaktosidazı aljinat üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiş ve 35 gün sonra enzim aktivitesinin %56'sını koruduğu gözlenmiştir [78].

4.5. İmmobilize β -Galaktosidazın Tekrar Kullanılabilirliği

Serbest β -galaktosidaz bir kez, immobilize enzim ise aktivitesini koruduğu sürece pek çok kez kullanılabilir. Tekrar kullanım sayıları Şekil 4.5 de verilmiştir.



Şekil 4.5. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanımı

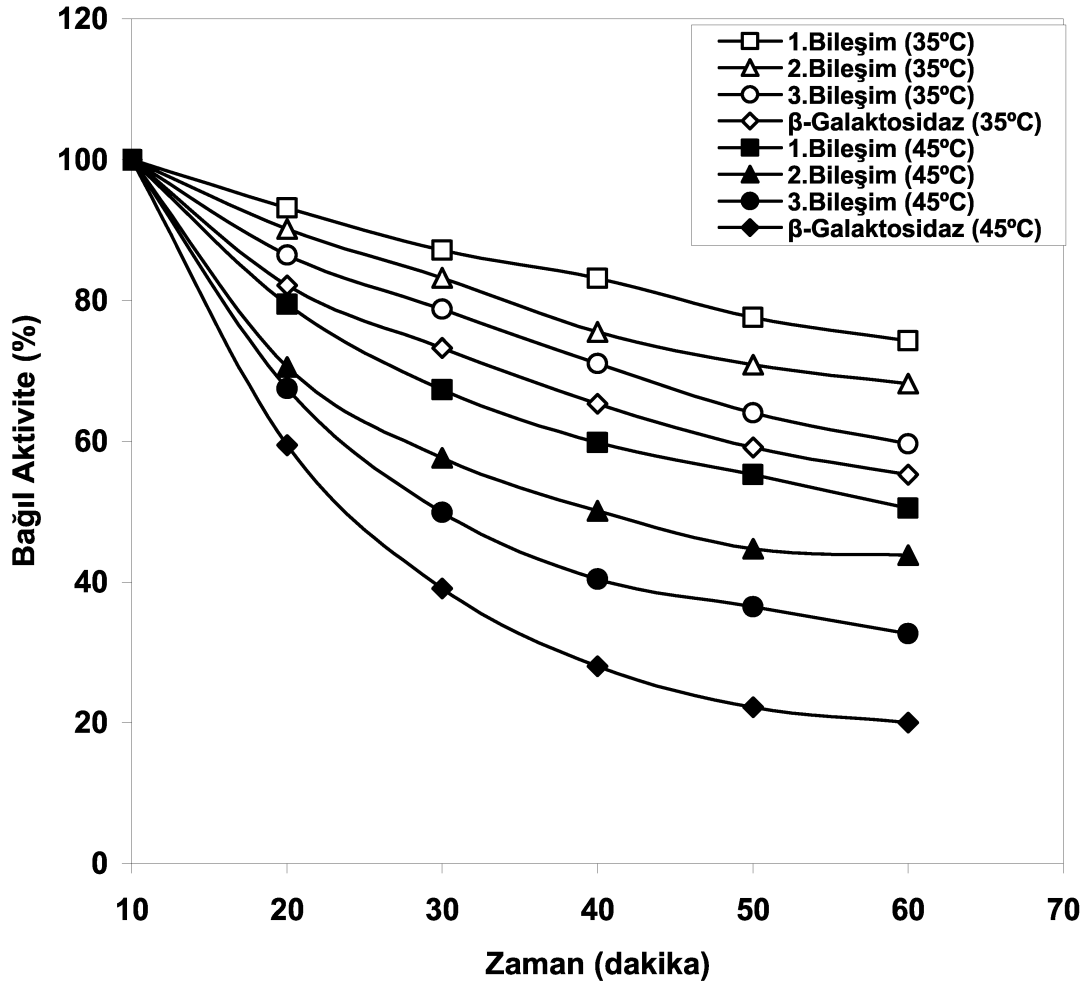
İmmobilize enzim 12 saatte 40 defa kullanıldığında 1., 2. ve 3. bileşim aktivitelerini sırasıyla %50, %37, %26 sını koruduğu gözlenmiştir.

İmmobilizasyonla kullanım sayısının artırıldığı literatürde verilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Kluyveromyces lactis* β -galaktosidazı selüloz jelatin kullanılarak çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde 17. kez kullanımından sonra enzim aktifliğinin %80'ini koruduğu bulunmuştur [85]. Diğer bir çalışmada ise *Bacillus circulans* β -galaktosidazı kovalent bağlanma

yöntemi ile immobilize edildiğinde 2.kez kullanımından sonra enzim aktifliğinin % 90'nını koruduğu, 30.kez kullanımından sonra ise aktivitesinin % 80'ini kaybettiği gözlenmiştir [77]. *Aspergillus oryzae* β -galaktosidazı kobalt aljinat küreleri içerisinde hapsetme yöntemiyle immobilize edildiğinde 4.kez kullanımından sonra enzim aktifliğinin %50'sini koruduğu gözlenmiştir [83].

4.6. Termal İnaktivasyon

Serbest ve immobilize β -galaktosidazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda (35° C-45° C) ve farklı zaman aralıklarında (10-60 dakika) inkübe edilen enzim çözeltilerinin Bölüm 3.6.1 deki reaksiyonlar gerçekleştirilerek aktiviteleri tayin edildi. Şekil 4.6 da verilen farklı sıcaklık ve zaman aralıklarındaki serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktivitesinin zamanla değişimi gösterilmiştir. Çizilen $\ln A-t$ grafiği yardımıyla hesaplanan farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon sabitleri Çizelge 4.2 de verilmiştir.



Şekil 4.6. Serbest ve β -galaktosidazın bağli aktivitesinin zamanla değişimi

Grafikten de görüldüğü gibi immobilize edilmiş enzimler serbest enzim formundan daha yavaş inaktive olmuştur. İmmobilizasyon ile enzimlerin kuaterner yapıları korunmuştur. Sıcaklığın artmasıyla termal inaktivasyon hız sabitlerinde bir artış gözlenir. Bunun nedeni serbest ve immobilize enzimlerin denatürasyonudur.

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize β -galaktosidazın farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri

Örnek	35°C($k_i \text{ dak}^{-1}$)	45°C($k_i \text{ dak}^{-1}$)
Serbest β -galaktosidaz	0,0144	0,0198
1.Bileşim	0,0401	0,0477
2. Bileşim	0,0422	0,0503
3. Bileşim	0,0446	0,0559

Yapılan bir çalışmada *Cicer arietinum* β -galaktosidazı selüloz üzerine immobilize edildiğinde serbest enzimin 50°C'nin üzerinde yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. İmmobilize β -galaktosidaz için ise 60°C de aktivitesinin % 70'ini, serbest β -galaktosidazın ise aktivitesinin % 30'unu koruduğu gözlenmiştir [82].

5. SONUÇLAR

Serbest ve immobilize β -galaktosidaz enziminin aktivitesine etki eden çeşitli parametreler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Serbest β -galaktosidaz için optimum pH değeri 5 olarak bulunmuştur. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz için optimum pH değeri değişmemiştir.

2. Serbest β -galaktosidaz için optimum sıcaklık 30° C olarak bulunmuştur. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz için bu sıcaklık değeri 35° C ye kaymıştır.

3. Serbest β -galaktosidaz için K_m değeri 0,343 mM olarak bulunmuştur. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz için K_m değerleri 0.625 mM ve 1.907 mM olarak bulunmuştur.

4. Serbest β -galaktosidaz için V_{mak} değeri 0,0259 mM.dak⁻¹, kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen β -galaktosidaz için ise bu değer 0.0502 mM.dak⁻¹ ve 0.274 mM.dak⁻¹ olarak bulunmuştur.

5. Serbest β -galaktosidaz enzimi 4° C de depolandığında 30.günde aktivitesini tamamen kaybettiği halde kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen enzimlerin daha uzun sürede aktivitelerini koruduğu 20 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 70-% 80 inin korunduğu gözlenmiştir.

6. İmmobilizasyonla β -galaktosidaz enziminin tekrar kullanım sayısı 40 olarak bulunmuştur.

7. Serbest β -galaktosidaz aktivitesi 35°C ve 60 dakikada yaklaşık %55 ini, 1., 2. ve 3.bileşim aktiviteleri yaklaşık olarak sırasıyla % 74, % 68, % 60 ını

koruduğu gözlenmiştir. 45° C ve 60 dakikada yaklaşık olarak serbest β -galaktosidaz aktivitesinin % 20 sini korurken 1., 2. ve 3.bileşim aktivitelerini yaklaşık olarak sırasıyla % 51, % 44, % 33 ünü koruduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Telefoncu, A., "Enzimoloji", **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi**, İzmir, 1-305 (1997).
2. Karadağ., H., "Soya Fasülyesi Lipoksijenazının Poliakrilamit Jel Üzerine İmmobilizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 1(2001).
3. Boyer, P.D., "The Enzymes", **Academic Pres Inc.**, New York, 112 (1970).
4. Kutay, F., "Enzimler", İnsan Biyokimyası, Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y. Sözmen, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).
5. Aksoyun, C., "Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1(2003).
6. Tekman, Ş., Öner, N., "Genel Biyokimya", **İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi**, İstanbul, 93-37 (1994).
7. Tüzün, C., "Biyokimya", **Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi**, Ankara, 131(1997).
8. Bailey, J. E., Gllis, F.D., "Biochemical Engineering Fundamentals", **Mc Graw Hill**, New York, 984 (1986).
9. Önal Tatar, S., "Karpuz(Citrullus Vulgaris) α -Galaktosidazının Doğal ve Sentetik Polimerlerde İmmobilizasyonu", Doktora Tezi, **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir, 2(2000).
10. Agrawell, K.M.L., Bahl, O.P., "Glycosidases of Phaseolus Vulgaris II: Isolation and General Properties", **Journal of Biological Chemistry**, 243:103-111(1968).
11. Jacdo, G.S., Scudder, P., "Glycosidases in Structural Analysis Methods in Enzymology", **Academic Press**, New York, 230:280(1994).
12. Bergmeyer, H.U., "Methods of Enzymatic Analysis", **Acamedic Press**, New York, 1:445(1973).
13. Gaudreault, P.R., Webb, J.A., "Partial Purification and Properties of an Alkaline α -Galactosidase from Mature Leuels of Cucurbito Pepo", **Plant Physiology**, 71:662-668(1983).

14. Harpaz, N., Flowers, H.M., Sharan, N., "α-Galactosidase from Soybeans Degrading Blood-Group β Antigens", **European Journal of Biochemistry** 22:421-428(1978).
15. Karasova-Lipovava, P., Strnad, H., Spiwalc, N., Mala, S., Kralova, B., Russell, N.J., "The Cloning, Purification and Characterisation of a Cold-Active β-Galactosidase from The Psychrotolerant *Arthrobacter* sp. C2-2", **Enzyme and Microbial Technology**, 33:836-844(2003).
16. "Hydrolysis of O-nitrophenyl-β-D-Galactoside by an Enzyme Immobilized on Perfluorocarbon in a Tapered Column Reactor", **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 10:127-135(1998).
17. Barker, S.A., Emery, A.N., Novois, J.M., "Enzyme Reactor for Industry", **Process Biochemistry**, 5:11(1971).
18. Kraulis, P. J. "MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures." **J. Appl. Crystallog.** 24, 946–950 (1991).
19. Merritt, E. A., Bacon, D. J. "Raster3D: photorealistic molecular graphics." **Methods Enzymol** 277, 505–524 (1997).
20. Lartillot, S., "Immobilization of Lactase on Silica Gel: Study of Lactase Hydrolysis Using The Immobilized Material", **Biochemical Education**, 21(3): 157-159(1993).
21. Axelsson, A., Nilsson, M., Zacchi, G., Hahn-Hagerdal, B., "Performance of Batch and Continuous Reactors with Coimmobilized Yeast and β-Galactosidase", **Journal Chemistry Tech. Biotechnology**, 52:227-241(1991).
22. Boze, H., Moulin, G., Galzy, P., "Uptake of Galactose and *Kluyveromyces Lactis*; Biochemical Characteristic and Attempted Genetical Analysis", **Journal General Microbiology**, 133:15-23(1987).
23. Numanoğlu, Y., "Maya Hücreleri ile β-Galaktosidaz Enzim Üretimi, İmmobilize Maya β-Galaktosidazı ile Laktozun Hidrolizi", Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 18-19(1997).
24. Gekas, V., Lopez-Leiva, M., "Hydrolysis of Lactose: a Literature Review", **Proses Biochemistry**, 20 (1): 2-10(1985).

25. Mahoney, R.R., "Modification of Lactose Containing Dairy Products with β - Galactosidase: Developments in Dairy Chemistry-3, Fox, P.F., **Elsevier Applied Science Publishers**, London and New York, 69-106(1985).
26. Mahoney, R.R., Adamhuck, C., "Effect of Milk Constituents on The Hydrolysis of Lactose by Lactase from K. Fragilis", **Journal of Food Science**, 45:962-964(1980).
27. Richmond, M.L., Gray, J.I., Stire, C.M., "Beta Galactosidase Review", **Journal Dairy Science**, 64:1759-1771(1981).
28. Stryer, L., "Biochemistry", **Stanford University**, 31 (1981).
29. Colin J. Suckling. "Enzyme Chemistry: Impact and Applications" **Chapman and Hall**, 412 (1990).
30. Zadow, J.G., "Lactose Properties and Uses", **Journal Dairy Science**, 67:2654-2679(1984).
31. Yang, S.T., Silva, E.M., "Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactase" , **Journal Dairy Science**, 78:2541-2562(1995).
32. Savaiano, D.A., Levitt, M.D., "Milk Intolerance and Microbe Containing Dairy Foods", **Journal Dairy Science**, 70:397-406(1987).
33. Walstra, P., Jenness, R., "Dairy Chemistry and Physics", **John Wiley and Sons Inc.**, New York, 459(1984).
34. Cook, G.C., "Lactase activity in newborn and infant baganda", **Brit Med J.**, 1:527-530 (1967).
35. Kretchmer, N., Hurwitz, R., Ransome-Kuti, O.,Dungy, C.,Alakija, W., "Intestinal absorption of lactose in nigerian ethnic groups", **Lancet**, 2:392-395 (1971).
36. Veith, J.W., "Lactose intolerance", **Lancet**, 338:663-664 (1991).
37. Calloway, D., "Respiratory hydrogen and methane as affected by consupnion of gas-forming foods", **Gastroenterology**, 51:383-389 (1966).
38. Woodruff, C. W., "Milk intolerances", **Nutrition Reviews**, 34:33-37 (1976).

39. Stephenson, L. S., Latham, M. C., Jones, D. V., "Milk consumption by black and white populations in two primary school", **J. Am. Diet Assoc.**, 71:258-262 (1977).
40. Bolin, T. D., Davis, A. E., "Asian lactose intolerance and its relation to intake of lactose", **Nature**, 222: 382-383 (1969).
41. Mitchell, H. S., Rynbergen, H. J., Anderson, L., "Nutrition in Health and Disease 16nd ed.", **J.B. Lippincott Company**, Philadelphia, 316-325 (1976).
42. Auricchio, S., Robino, A., Mürsel, G., "Intestinal glycosidase activities in the human embryo, fetus and newborn", **Pediatrics**, 35:944-954 (1965).
43. Harrison, M., Kilby, A., Walker-Smith, J. A., "Cow milk protein intolerance: a possible association with gastroenteritis lactose intolerance and IGA deficiency", **Brit. Med. J.**, 1:1501-1504 (1976).
44. Bryant, G. D., Chu, Y. K., Louitt, R., "Incidence and aetiology of lactose intolerance", **Med. J. Aust.**, 1:1285-1288 (1970).
45. Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S., Scounten, W. H., "Immobilizations Methods, Solid Phase Biochemistry", **New York Press**, New York, 253-391 (1995).
46. Pitcher, W. H., Ford, Jr., "Immobilized Lactase for Whey Hydrolysis: Stability and Operating Strategy", Enzyme Engineering ed. By Brown, Ganecte, G. B., Wingard, L. B., Jr., **Plenum Press**, New York, 4 (1978).
47. Mosbach, K., "Methods in Enzymology", **Academic Press**, New York, 4 (1976).
48. Trevan, M. D., "Techniques of Immobilization. In Immobilized Enzyme", **John Wiley and Sons**, New York, 1-11 (1980).
49. Dimitriu, S., Popa, M., Dimitriu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers", **J. Bioactive and Compalite Polymers**, 3:243-321 (1988).
50. Gregariadis, G., "Enzyme or drug entrapment in liposomes", **Insolubilized Enzyme**, 165-177 (1974).
51. Chazov, E. T., Smirnov, U. N., Torehilin, I. M., Teresinin, B. V., "Immobilized enzyme for medical application", **Enzyme Engineering**, 5:209-212 (1980).
52. Chen, S., Liu, Y., Yu, P., "Study on column reactor of chitosan-immobilized", **Chemical Abstracts**, 127:46739 (1996).

53. Kennedy, J. F., Paterson, M., "Aplication of cellulosic fast-flow column filters to protein immobilization and recovery", ***Polymer International***, 32:71-81 (1993).
54. Brown, G. B., Mancke, G., Wingard, L. B., "Enzyme Engineering" ***Plenium Press***, New York, 4 (1978).
55. Chang, T. M. S., "Removal of urea and amonia", ***Enzyme Engineering***, 5:225-230 (1980).
56. Ohtakara, A., Mitsutomi, M., Uchida, Y., "Purification and enzymatic properties of α -galactosidase from pycnopus cinnabarinus", ***Agricultural and Biological Chemistry***, 48(5):1319-1327 (1984).
57. Ohar, G. M., Mitsutomi, M., Ohtakara, A., "Immobilization of glucoamylases on chitosan beads and application of the conversion of starch to glucose", ***Bulletin of Faculty of Agriculture***, 74:59-68 (1993).
58. Walton, A. G., Blackwell, J., Carr, S. H., "Biopolymers, Chitin", ***Academic Press***, New York, 474 (1973).
59. Baysal, B., "Polimer Kimyası", ***O.D.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi***, Ankara, 1-24 (1984).
60. Saçak, M., "Polimer Kimyası", ***Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi***, Ankara, 1-63 (2004).
61. Rempp, Merril, E. W., "Polymers, Polymer Synthesisi", ***Hutting&Wepf.***, USA, 320-331 (1991).
62. Qui, Y., Park, K., "Environment-sensitive Hydrogels for Drug Delivery", ***Advanced Drug Deliver Reviews***, 53:321 (2001).
63. Jeang, B., Gutowska, A., " Lessons from nature : stimuli-responsive polymers and their biomedical applications ", ***Trends Biotechnology***, 20:305-311 (2002).
64. Gupta, P.,Vermani, K., Garg, S.," Hydogels from Controlled Release to pH-Responsive Drug Delivery" , ***Drug Discov Today*** , 7:569 (2002).
65. Lipatov, Y. S., "Polymer blends and interpenetrating polymer netwoks at the interface with solids", ***Prog. Polym. Sci.***, 27:1721-1801 (2002).
66. Wu, S. X., Hoffman, S. A. and Yager, P., " Senthesis and Characterization of Thermally Reversible Macroporous Poly (n-

- isopropylacrylamide) Hydrogels “, **Journal of Polymer Science Part A, Polymer Chemistry**, 30:2121-2129 (1992).
67. Zhang, X. Z., Wu, D. Q., Chu, C., "Effect of The Crosslinking Level on The Properties of Temperature-Sensitive Poly (N-isopropyl acrylamide) Hydrogels", **Journal of Polymer Science**, 41: 582-593 (2003).
 68. Roseman, T. J. And Cardarelli, N. F., " Monolithic Polymer Devices", **Controlled Release Technologies**, CRS Press, Florida, 11: 46-49 (1980).
 69. Soykan Cengiz, İtler Zülfiye “Alkil Metakrilatların Glisidil Metakrilat İle Kopolimerlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu” **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 17:103-110 (2001).
 70. Zaborsky, O., “Covalent attachment to water-insoluble functionalized polymers”, Immobilized enzyme, **CRC Pres**, Ohio, 5-27 (1974).
 71. Dumitriv, S., Papu, M., Dumitriv, M., “Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers”, **Journal Bioactive and Comptible Polymers**, 3:243-312 (1988).
 72. Gerharts, W., “Enzyme in Industry”, Production And Applications, **UCH Velosgesellschaft Mblt**, Weinheim, 35-43 (1990).
 73. Zaborsky, O., “In Biomedical Application Of Immobilized Enzymes Proteins”, Chang T.M.S., **Plenum**, New York, 1 (1997).
 74. Jones, J., B., Sh., C., S., Periman, D., “Techniques in chemistry”, Mosboch, K., **Interscience Publisher**, New York, 10,969 (1976).
 75. Boz, B.G., “Üreaz enziminin polianilin’e immobilizasyonu ile üreye duyarlı enzim mikroeletrotunun hazırlanması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 28-55 (2001).
 76. Zaborsky.O., “Immobilized Enzyme”, **CRC Pres**, Ohio, 1-3 (1973)
 77. Hernaiz M. j., Crout H. G. “A highly selective synthesis of N-acetyllactosamine catalyzed by immobilised b-galactosidase from *Bacillus circulans*” **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 10:403-408 (2000).
 78. Göktuğ T., Sezgintürk M.K., Dinçkaya E. “Glucose oxidase- β _galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination” **Analytica Chimica Acta**, 24:109-111 (2005)

79. Quinn Z.K., Zhou, Xiao Dong Chen "Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*" **Biochemical Engineering Journal**, 9:33-40 (2001).
80. Tanriseven A., Doğan Ş. "A novel method for the immobilization of β -galactosidase" **Process Biochemistry**, 38:27-30 (2002).
81. Ladero M., Santos A., Garcia J.L., Garcia-Ochoa F. "Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling" **Enzyme and Microbial Technology**, 29:181–193 (2001)
82. Weixia T., Sufong S., Shaoli N., Xuyuan L."Immobilization of β -galactosidase from *Cicer arietinum* (gra-chicken bean) and its catalytic actions" **Food Chemistry**, 64:495-500 (1999).
83. Ateş S., Metmetoğlu Ü. "A new method immobilization of β galactosidase and its utilization in a plug flow reactor" **Process Biochemistry**, 32:433-436 (1997).
84. Carpio C. , Gonzalez P., "Bone-bound enzymes for food industry application" **Food Chemistry**, 68:403-409 (2000).
85. El-Masry M. M., Maio A., Martelli P. L., Casadio R., Mousatafa A. B., Rossi S., Mita D. G. "Influence of the immobilization process on the activity of β -galactosidase bound to Nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate" **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 16: 175-189 (2001).
86. Benevides C.Ch. , Cesar M., Manuel F., Alejandro V. , José L., Alfonso V., José M. Roberto F. L. "The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibitionComplete hydrolysis of lactose in dairy products" **Enzyme and Microbial Technology**, 33:199–205 (2003).
87. Yang B., Shinoda N. , Goto S. "Hydrolysis of O-nitrophenyl-[3-D galactoside by an enzyme immobilized on perfluorocarbon in a tapered column reactor" **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 10:127-135 (1998).

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : TUNÇ Gül
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 02.07.1980 ISPARTA
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0555 5530724
Faks : -
e-mail : tun_gl@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2006
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Bölümü	2003
Lise	Şehit Alihsan Kalmaz Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2006-	TÜBİTAK ATAL	Kimyager

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Sinema, Bilgisayar teknolojileri, Kitap okumak, Yüzmek