

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOVALENT BAĞLANMA VE FİZİKSEL
ADSORPSİYON METOTLARI İLE PROTEAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Ceyda KASA Vİ**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2006

**KOVALENT BAĞLANMA VE FİZİKSEL
ADSORPSİYON METOTLARI İLE PROTEAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Ceyda KASAVİ
(506031007)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 8 Mayıs 2006
Tezin Savunulduğu Tarih : 13 Haziran 2006**

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Yüksel AVCIBAŞI-GÜVENİLİR
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Melek TÜTER
Prof.Dr. Bülent GÜRLER (İ.Ü)**

HAZİRAN 2006

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen, beni her konuda destekleyen, gösterdiği ilgi ve emek ile bu çalışmanın sonuca ulaşmasını sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Yüksel Güvenilir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgisini benimle paylaşan Kimya Yük. Müh. Didem Omay'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı gerçekleştirmemde proteaz enzimi sağlayarak katkıda bulunan Cognis firmasına teşekkür ederim.

Çalışmalarımı yürütürken fikir alışverişinde bulunduğum arkadaşım Esra Özçömlekçi'ye çok teşekkür ederim.

Mesleki açıdan gelişmemi sağlayan, bilgilerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve de eğitimim boyunca bana destek olan arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, beni her konuda daima destekleyen aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mayıs 2006

Ceyda KASAVİ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. ENZİMLER ve PROTEAZLAR	3
2.1. Proteaz Enzimi ve Özellikleri	4
2.2. Proteazların Sınıflandırılması	4
2.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları	5
2.3.1. Deterjan Sanayi	5
2.3.2. Deri Sanayi	6
2.3.3. Klinik Uygulamalar	7
2.3.4. Kozmetik ve İlaç Sanayi	8
2.3.5. Gümüş Eldesi	8
2.3.6. Gıda Endüstrisi	8
2.3.7. Sığır Yemi Yapımı	10
2.3.8. Atık İşleme	10
2.3.9. D,L-Amino Asitlerin Sentez ve Çözündürülmesi	11
3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU	12
3.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi	12
3.2. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları	13
3.3. İmmobilizasyon Yöntemleri	14
3.3.1. Taşıyıcı Bağlama Yöntemi	15
3.3.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi	16
3.3.1.2. İyonik Bağlanma Yöntemi	17
3.3.1.3. Kovalent Bağlanma Yöntemi	18
3.3.2. Çapraz Bağlanma Yöntemi	20
3.3.3. Tutuklama Yöntemi	21
3.3.3.1. Jel Tutuklama Yöntemi	22
3.3.3.2. Fiber Tutuklama Yöntemi	22
3.3.3.3. Mirokapsülleme Yöntemi	22
3.4. İmmobilize Enzimlerin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımları	23

4. İMMOBİLİZASYONDA TAŞIYICI SEÇİMİ	25
4.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılara Örnekler	25
4.1.1. Çitin	25
4.1.2. Çitosan	27
4.1.3. Aljinat	29
4.1.4. Zeolit	29
5. PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	32
6. DENEYSEL ÇALIŞMA	37
6.1. Cihazlar	37
6.2. Malzemeler	37
6.2.1. Taşıyıcılar	37
6.2.2. Enzim ve Diğer Malzemeler	37
6.2.3. Çözeltiler ve Tamponlar	38
6.3. Metotlar	40
6.3.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	40
6.3.2. Verimin Hesaplanması	41
6.3.3. Serbest Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi	41
6.3.3.1. pH Kararlılığının ve Optimum pH'nın Belirlenmesi	41
6.3.3.2. Sıcaklık Kararlılığının ve Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	41
6.3.4. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Proteaz Enziminin Çitosan Üzerine İmmobilizasyonu	42
6.3.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Proteaz Enziminin Çitin Üzerine İmmobilizasyonu	43
6.3.6. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle Proteaz Enziminin Aljinat ve Ham Zeolit Üzerine İmmobilizasyonu	43
6.3.7. İmmobilize Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi	44
6.3.7.1. pH Kararlılığının ve Optimum pH'nın Belirlenmesi	44
6.3.7.2. Sıcaklık Kararlılığının ve Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	44
6.3.7.3. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi	44
6.3.7.4. Deterjan Uyumluluğunun Belirlenmesi	45
6.3.7.5. Raf Ömrünün Belirlenmesi	45
7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	46
7.1. İmmobilize Proteaz Enzimleri İçin Verimin Hesaplanması	46
7.1.1. Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması	46
7.1.2. Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması	47
7.1.3. Ham Zeolit Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması	48
7.1.4. Aljinat Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması	49

7.2. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi	49
7.2.1. pH Kararlılığı	50
7.2.2. Sıcaklık Kararlılığı	53
7.2.3. Optimum pH	57
7.2.4. Optimum Sıcaklık	61
7.2.5. Tekrar Kullanılabilirlik	64
7.2.6. Deterjan Uyumluluğu	66
7.2.7. Raf Ömrü	71
8. VARGILAR ve ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	77
EK A	80
ÖZGEÇMİŞ	81

KISALTMALAR

a	: Ağırlık
AGK	: Aktivite Geri Kazanımı
B-R	: Britton-Robinson
EC	: Avrupa Birliği Komitesi
EO	: Etkinlik Oranı
GA	: Glutaraldehit
h	: Hacim
M	: Molar
N	: Normal
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı (rotation per minute)
TCA	: Trikloro Asetik Asit
U	: Ünite
U_{imm}	: İmmobilize olmuş (bağlanmış) enzimin aktivitesi (ünite)
U₀	: Başlangıçtaki enzimin aktivitesi(ünite)
U_R	: Bağlanmamış enzimin aktivitesi(ünite)

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. İmmobilize Enzimlerin En Önemli Endüstriyel Uygulamaları.	23
Tablo 4.1. Canlılar ve İçerdikleri Çitin Miktarları (%)	26
Tablo 7.1. Proteaz Enziminin Çitosan Üzerine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim	46
Tablo 7.2. Proteaz Enziminin Çitin Üzerine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim	47
Tablo 7.3. Proteaz Enziminin Ham Zeolit Üzerine Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim	49
Tablo 7.4. Proteaz Enziminin Aljinat Üzerine Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim	49
Tablo 7.5. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı	50
Tablo 7.6. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı	52
Tablo 7.7. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı	54
Tablo 7.8. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı	56
Tablo 7.9. pH'nın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi	58
Tablo 7.10. pH'nın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi	59
Tablo 7.11. Sıcaklığın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi	61
Tablo 7.12. Sıcaklığın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi	62
Tablo 7.13. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Tekrar Kullanımlarının Relatif Aktiviteye Etkisi	64
Tablo 7.14. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu..	67
Tablo 7.15. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu..	68
Tablo 7.16. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Deterjan Varlığı ve Yokluğundaki Aktivitelerinin Oranı	69
Tablo 7.17. Adinarayana, Ellaiyah, Prasad'ın Çalışmasındaki Enzimin Deterjan Uyumluluğu	71
Tablo 7.18. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Raf Ömürleri	72

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1.	Enzimin Taşıyıcıya Bağlanması 15
Şekil 3.2.	Fiziksel Adsorpsiyon 16
Şekil 3.3.	Kovalent Bağlanma 19
Şekil 3.4.	Çapraz Bağlanma 20
Şekil 3.5.	Enzimin Bir Taşıyıcı İçerisinde Tutuklanması 22
Şekil 3.6.	Enzimin Bir Kapsül İçerisinde Tutuklanması 23
Şekil 4.1.	Çitinin Kimyasal Yapısı 26
Şekil 4.2.	Selülozun Kimyasal Yapısı 27
Şekil 4.3.	Çitosanın Kimyasal Yapısı 27
Şekil 4.4.	Kabuklu Deniz Hayvanlarından Çitin ve Çitosan Üretimi 28
Şekil 4.5.	Kalsiyum Aljinatın Kimyasal Yapısı 29
Şekil 4.6.	Bir Zeolitin Çalışma Prensibi 31
Şekil 7.1.	Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı 51
Şekil 7.2.	Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı 53
Şekil 7.3.	Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı 55
Şekil 7.4.	Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı 57
Şekil 7.5.	pH'nın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi 58
Şekil 7.6.	pH'nın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi 60
Şekil 7.7.	Sıcaklığın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi 62
Şekil 7.8.	Sıcaklığın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi 63
Şekil 7.9.	İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Tekrar Kullanımlarının Relatif Aktiviteye Etkisi 65
Şekil 7.10.	Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu.. 67
Şekil 7.11.	Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu.. 68
Şekil 7.12.	İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Deterjan Varlığı ve Yokluğundaki Aktivitelerinin Oranı 70
Şekil 7.13.	İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Raf Ömürleri 72
Şekil A.1.	Tirozin Standart Eğrisi 80

KOVALENT BAĞLANMA VE FİZİKSEL ADSORPSİYON METOTLARI İLE PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU

ÖZET

Enzimlerin ve biyolojik bileşiklerin immobilizasyonu, özellikle gıda ve ilaç sanayilerinde ve biyomedikal uygulamalarda geniş alanlarda kullanılmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Enzimlerin çitin ve çitosan gibi polisakkaritlere immobilize edilerek aktive olabildiği belirlenmiştir. Immobilizasyonda çoğunlukla iyi akış özellikleri, mekanik kuvvetleri ve rejenerasyon özellikleri nedeniyle inorganik taşıyıcılar kullanılmaktadır. Immobilizasyon, enzimin katı taşıyıcı üzerine kovalent ve/veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla bağlanmasını içermektedir.

Bu çalışmada, proteaz enzimi çitin ve çitosan üzerine 30°C'de kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiştir. Kovalent bağlanma metodunda, çapraz bağlanmanın sağlanması için, çitin ve çitosan glutaraldehit ile aktive edilmiştir. Proteazın çitin ve çitosan üzerine immobilizasyonunda, aktivite geri kazanımını ve etkinlik oranını yükseltmek amacıyla, glutaraldehit miktarının ve Tris-HCl tampon çözeltisinin pH değerinin immobilizasyona etkisi incelenmiştir.

Ayrıca, proteaz enzimi aljinat ve zeolit üzerine +4°C'de fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile de immobilize edilmiştir. Her iki metotta da immobilizasyon süresi, optimum koşullardaki değişimler, enzimlerin kararlılıkları, tekrar kullanılabilirlikleri ve deterjan uyumlulukları belirlenmiştir. Immobilizasyon süresinin immobilizasyon verimi üzerinde direkt bir etkisi olduğu belirlenmiştir. En yüksek bağlanmış enzim miktarı ve immobilizasyon verimi kovalent bağlanma yönteminde çitin üzerine immobilizasyonda görülmüştür. Serbest enzimle karşılaştırıldığında, immobilize enzimlerin toplam aktivitenin %80'ini tutabildiği belirlenmiştir.

Ayrıca, immobilize proteaz enzimleri, pH ve sıcaklık aktivite profilleri bakımından serbest enzimle karşılaştırıldığında, immobilizasyon sonucu optimum pH ve optimum sıcaklıkta bazı değişiklikler göstermiştir. Bu da enzim immobilizasyonunun, enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığını değiştirdiğini göstermektedir. Çitin üzerine immobilize edilen proteaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olup serbest proteaz enziminden (50°C) daha yüksektir. Aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enziminin optimum sıcaklığı ise 40°C olup serbest proteaz enziminden daha düşüktür. Serbest ve immobilize proteaz enzimlerinin relatif aktiviteleri pH 10.0 ile 12.3 arasında incelenmiştir. Çitosan üzerine immobilize edilen enzimin optimum pH değeri 9.5'tir, ancak tüm pH değerlerinde serbest enzimden daha yüksek aktivite göstermektedir. Çitin, aljinat ve zeolit üzerine immobilize edilen enzimlerin optimum pH değerleri sırasıyla 11.5, 10.0, 8.4'tür.

pH ve sıcaklık dışında, iyi bir deterjan proteazının ticari deterjan varlığında da kararlı olması gerekmektedir. Immobilize proteaz enzimleri ticari bir deterjana %90 uyumluluk göstermiştir. Immobilizasyon prosesleri ile serbest enzimin sıcaklık ve pH kararlılıkları geliştirilmiş ve enzim sürekli sistemlere uygun hale getirilmiştir.

PROTEASE IMMOBILIZATION BY COVALENT BINDING AND PHYSICAL ADSORPTION METHODS

SUMMARY

Immobilization of enzymes and biological compounds is currently gaining importance due to its wide variety of applications in the food and pharmaceutical industries and also its biomedical applications. It was reported that enzymes can be activated by complexation with polysaccharides such as chitin or chitosan. Inorganic supports are widely used for immobilization of enzymes mainly due to their good flow through properties, mechanical strength and regeneration. Immobilization involves the coupling of the enzyme with a selected solid support via covalent and (or) non-covalent interactions.

In this study, the protease enzyme was immobilized on chitin and chitosan by covalent binding method at 30°C. Chitin and chitosan were activated with glutaraldehyde in order to obtain cross linking in covalent binding method. While immobilizing protease on chitin and chitosan, the effect of the rate of glutaraldehyde and pH of buffer (Tris-HCl) was investigated in order to obtain high activity recovery and effluent ratio.

Also, the protease enzyme was immobilized on alginate and zeolite by physical adsorption method at + 4°C. In both methods, effects of immobilization time, changes in the optimum conditions and stabilities of the enzyme, reusability and the compatibility with detergents were determined. It was found that the immobilization time was directly affected to the immobilization yield. The highest bound enzyme and immobilization yield was found with chitin by covalent binding method. The immobilized enzyme retained 80% of total activity compared with the soluble enzyme.

Also immobilized protease in comparison of the pH and temperature activity profiles with the soluble enzyme showed some change in the pH optimum and temperature optimum as results of immobilization. Indicating that immobilization of the enzyme altered the pH or temperature optima of the enzyme. The optimum activity temperature of the resulting immobilized protease on chitin 60°C and higher than that of free protease (50°C). The optimum activity temperature of the resulting immobilized protease on alginate 40°C and lower than that of free protease.

Relative activities of the immobilized and free protease were investigated between medium pH values of 6.8 to 12.3. Optimum pH of the immobilized enzyme on chitosan was 9.5. However, the immobilized enzyme on chitosan showed higher activities than the free enzyme shows in all pH values. Optimum pH values of the immobilized enzymes on chitin, alginate and zeolite were 11.5, 10.0, 8.4.

Besides pH and temperature, a good detergent protease is expected to be stable in the presence of commercial detergents. Immobilized protease enzymes showed 90% compatibility with a commercial detergent. The thermal and pH stabilities of the free enzyme were improved and the enzyme was made suitable for continuous systems.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Enzimler de diğer katalizörler gibi reaksiyonların hızlarını arttırmaktadırlar. Benzer koşullar altında enzim varlığındaki reaksiyon oranı, katalizörün yokluğundaki reaksiyon oranına göre bir veya birkaç milyon kat daha yüksek olabilmektedir [1,2].

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir, ancak enzimlerin avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması yüksek maliyet gerektirmektedir. Doğal ortamlarından izole edilen enzimlerin yapısında kararsızlık oluşmaktadır. Ayrıca, enzimlerin proses koşullarına karşı duyarlılıkları da oldukça fazladır. Enzimler reaksiyonlar sonucunda modifiye olmadıkları için aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak endüstriyel, analitik ve klinik proseslerin pek çoğunda enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılmaktadır. Substratların ürünlere dönüştürülmesinden sonra, enzimlerin substrat ve ürünlerle birlikte bulunduğu çözeltiden ayrılması zorlaşmaktadır ve enzimler ekonomik olarak geri kazanılamamaktadır. Bu yönüyle enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları ve pahalı olmaları uygulamalarda büyük masraflara neden olmaktadır [1,3].

Enzimlerin bir katıya tutundurularak immobilize edilmeleri defalarca kullanılmalarını sağlamaktadır. Immobilize enzimler, ekonomik olarak daha makul olmakla birlikte enzimatik proseslerin sürekli olarak da gerçekleştirilebilmelerine olanak sağlamaktadır. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır. Ayrıca immobilize enzimler endüstriyel uygulamaların dışında laboratuvar ölçeğinde organik sentezlerde, analitik ve medikal uygulamalarda da kullanılmaktadır. Ticari amaçlı bir prosesin gerçekleştirilmesinde, kimyasal bir katalizör mü, yoksa enzim mi kullanılacağına, serbest enzim mi yoksa immobilize enzim mi kullanılacağına karar verilirken sağlık ve çevresel faktörlerin yanında ekonomik koşullar da dikkate alınmaktadır. Bazı durumlarda, immobilize enzimlerin kullanıldığı prosesler, kimyasal bir katalizörün ya da serbest enzimin kullanıldığı

proseslere oranla geniş ölçekte üretim sağlayarak daha ekonomik olabilmektedir [1,3]. İmmobilizasyonda çoğunlukla iyi akış özellikleri, mekanik kuvvetleri ve rejenerasyon özellikleri nedeniyle inorganik taşıyıcılar kullanılmaktadır [4].

İmmobilizasyon yöntemlerinin değişik avantaj ve dezavantajları vardır. İmmobilizasyondan sonra enzimin aktivitesi, optimum pH ve sıcaklığı, substrata ilgisi ve kararlılığı değişmektedir. Genellikle enzimin aktivitesi ve substrata ilgisi immobilizasyondan olumsuz etkilenirken, optimum sıcaklığı ve kararlılığı olumlu etkilenmektedir. Enzimdeki bu değişiklikler enzimin yapısına, taşıyıcının tipine, immobilizasyon yöntemine ve şartlarına göre değişmektedir [1].

Endüstriyel uygulamalarında sıklıkla rastlanan enzimlerden biri de proteaz enzimidir. Proteazlar, uygun koşullarda proteinlerin peptid bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler. Ayrıca, proteazlar kullanım alanlarının fazlalığı ile sanayi enzimlerinin en geniş kısmını oluşturmaktadır. Proteaz enzimi; deterjan sanayinde, deri sanayinde, çeşitli klinik uygulamalarda, kozmetik ve ilaç sanayinde, gümüş eldesinde, gıda sanayinde, peynir yapımında, bira yapımında, fırıncılıkta, sığır yemi üretiminde, atık işleme sanayinde, D,L-Amino asitlerin sentez ve çözündürülmesinde kullanılmaktadır [5-8]

Bu çalışmada proteaz enzimi çitosan ve çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle, aljinat ve zeolit üzerine de fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir. Kolay bulunabilmeleri ve ekonomik olmaları nedeniyle immobilizasyon işlemlerinde taşıyıcı olarak çitin, çitosan, aljinat ve zeolit kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, immobilizasyon ile serbest proteaz enziminin özelliklerinin iyileştirilmesidir. Bu nedenle çalışmada, immobilize edilen proteaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkları, pH ve sıcaklık kararlılıkları, tekrar kullanılabilirlikleri, deterjan uyumlulukları ve raf ömürleri incelenmiştir.

2. ENZİMLER ve PROTEAZLAR

Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilen, oldukça özel yapı kazanmış, genellikle büyük protein molekülleridir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmektedir.

Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan, genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş olan yan gruplarına kofaktör adı verilmektedir.

Enzimlerin aktivite göstermek için gereksinim duyduğu kompleks organik moleküllere ise koenzim adı verilmektedir.

Bazı hallerde enzim aktivite göstermek için hem kofaktöre hem de koenzime ihtiyaç duyabilir. Kofaktörler genellikle ısıya dayanıklıdır. Kofaktörler ve koenzimler enzime gevşek veya sıkı bağlıdır. Genellikle diyaliz ile enzimden ayırmak mümkündür. Kofaktörler ve koenzimler bazen enzime kovalent olarak bağlanmıştır ve diyaliz ile uzaklaştırmak mümkün olmaz. Enzim yüzeyine sıkıca bağlanmış ve protein yapısında olmayan bu gruplara prostetik grup adı verilmektedir.

Eğer enzim koenzimi veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan aktif durumda ise enzimin bu haline holoenzim adı verilmektedir.

Eğer koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin diyalize edilmeyen ve yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif şekline de apoenzim adı verilmektedir [9].

Enzimler, sistematik olarak etki ettikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılmakta ve sınıflandırılmaktadır. Buna göre enzimler altı sınıfa ve her sınıf alt sınıflara ayrılmıştır.

- a) Oksidoredüktazlar: Biyolojik redoks reaksiyonlarını kataliz eden enzimlerdir.
- b) Transferazlar: Bazı grupların bir bileşik molekülünden diğerine geçmesini kataliz eden enzimlerdir.

- c) Hidrolazlar: Ester, glikoliz, eter, peptid, asit anhidrit, C-C, C-Halojen ve P-N bağlarına etki ederek bu bileşiklerin hidroliz reaksiyonlarını kataliz ederler ve etki ettikleri bağ tipine göre alt sınıflara ayrılırlar.
- d) Liyazlar: Bir organik bileşikteki C-C, C-O, C-S ve C-Halojen bağlarının ayrılmasını kataliz eden enzimlerdir.
- e) İzomerazlar: Molekül içi çevrilmeleri, rasemizasyon, epimerizasyon ve cis-trans izomerizasyon reaksiyonlarını kataliz eden enzimlerdir.
- f) Ligazlar: İki molekülün yeni C-O, C-N, C-S, C-C bağları oluşturarak birleşmesini (kondenzasyon reaksiyonlarını) kataliz eden enzimlerdir [10].

2.1. Proteaz Enzimi ve Özellikleri

Enzim sınıflandırmasında hidrolaz grubunda yer alan proteazlar, uygun koşullarda proteinlerin peptid bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler. Proteazlar aynı zamanda proteinaz ve peptidazlar olarak da bilinmektedirler. Genel olarak E.C.3.4.X.X şeklinde gösterilmektedirler. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır. Endüstriyel açıdan çok önemli olan bu enzim türünün %60'ını ise proteazlar oluşturmaktadır [5,11].

Diğer enzimler gibi proteazlar da protein yapısındadırlar. Tüm proteazlar pH, sıcaklık, iyon gereklilikleri, spesifiklik, aktivite ve kararlılık yönünden karakteristik özelliklere sahiptirler. Bu özellikler hidroliz edilecek olan peptid bağında bulunan amino asitlere bağlıdır. Bu biyokimyasal parametreler bir proteazın uygulama alanını belirler [12].

2.2. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar kaynaklarına (hayvan organları, bitki, mikroorganizma), katalitik aktivitelerine (endo peptidaz veya ekzo peptidaz) ve aktif sitelerinin yapısına göre (serin, sistein, aspartil, metallo) sınıflandırılmaktadırlar. Enzim terminolojisiyle ilgili olarak Avrupa Birliği Komitesi (EC) sisteminde, tüm proteazlar ekzo peptidazlar ve endo peptidazlar olarak bölünmüştür.

Proteazlar, polipeptid zincirini iki farklı bölgeden ayırabilirler. Ekzo peptidazlar polipeptid zincirini amino ucundan ya da karboksi ucundan ayırmaktadırlar. Ekzo

peptidazlar, polipeptid zincirini ayırdıkları uca göre aminopeptidazlar ya da karboksipeptidazlar olarak adlandırılmaktadır.

Endo peptidazlar ise polipeptid zincirini ortasından ayırmaktadırlar. Endo peptidazlar; serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartil proteazlar ve metallo proteazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Serin, sistein ve aspartil proteazlar katalitik sitenin önemli bir parçası olarak sırayla serin, sistein ve aspartil asit yan zincirlerine sahiptir [6,13].

2.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları

Proteazlar, kullanım alanlarının fazlalığı ile sanayi enzimlerinin en geniş kısmını oluşturmaktadır. Proteaz enzimi; deterjan sanayinde, deri sanayinde, çeşitli klinik uygulamalarda, kozmetik ve ilaç sanayinde, gümüş eldesinde, gıda sanayinde, sığır yemi üretiminde, atık işleme sanayinde, D,L-Amino asitlerin sentez ve çözündürülmesinde kullanılmaktadır [6-8,12,13]

2.3.1. Deterjan Sanayi

Çamaşır deterjanlarında kullanılan enzimlerin yüksek verime sahip olması, 1 saat boyunca 95°C'ye ulaşan sıcaklıklarda pH 9-11 arasında aktivitesini koruması, beyazlatıcı, perborat ve yüzey temizleyicilerin varlığında kararlı olması ve de deterjan içerisinde en az 1 sene aktivitesini kaybetmemesi gerekmektedir. Mikrobiyal serin proteazlar; bu özelliklere uygunluğu ile deterjan sanayinde geniş kullanım alanına sahiptir [7].

Proteazlar; protein moleküllerini parçalayarak çamaşırlardaki lekeleri çıkabilecek veya deterjan içeriğindeki diğer maddelerle çözülebilecek hale getirmektedir. Bakteriyel proteazlar ticari uygulamalarda büyük bir hakimiyete sahiptir. Çamaşır deterjanlarında kullanılan proteazlar; *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* veya *Basillus sp.*'nin fermentasyonu ile elde edilmektedir [7,12].

Proteazlar, günümüzde tüm dünyada çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Proteazların bu alanda kullanımlarındaki artışın temel sebebi, çevresel olarak kabul edilebilir, fosfatsız deterjanlarda bu enzimlerin gösterdiği temizleme kapasitesidir. Ayrıca, yıkama verimini arttıran proteazlar, daha düşük ısılarda ve daha düşük sürelerde temizliği sağlamaktadır. Proteazların özellikle kan

ve çim gibi lekelerin çıkarılmasında çok etkili olduğu bilinmektedir. Yiyecek lekelerinin çıkarılmasında ise proteazların amilaz ve lipazlarla birlikte kullanıldığı kombinasyonlarının daha etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca, deniz solucanlarından elde edilen proteazlar lens yıkama çözeltilerinde kullanılmakta ve düşük sıcaklıklarda kontak lenslerin temizlenmesini sağlamaktadırlar [6,12,13].

Enzimler düşük fosfat içeriğine sahip, ılık ve soğuk yıkama ısıları için formüle edilmiş olan deterjanların, değerli bir bileşiği olmuştur. Sıcak yıkamalar için tasarlanmış olan deterjanlar, sodyum fosfat ve 60°C üzerindeki yüksek sıcaklıklarda aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi olan sodyum perborat içermekteydi, ancak fosfat kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bu içerikler deterjanlarda azaltılmış hatta kaldırılmıştır. Bunun sonucu olarak da bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır [13].

Çevresel amaçlarla deterjanlardan fosfatların çıkarılması ve deterjanlara ilave edilen mikrobiyal proteazların deterjanın raf ömrü boyunca aktifliğini koruması için gereken şartlar, deterjanların genel oluşumunda büyük bir değişime neden olmuştur. Daha iyi fosfatsız ürünlerde kullanılan, yüzey gerilimini azaltan maddeler ve beyazlatıcılar, iyi bilinen serin proteaz inhibitörleridir. Özellikle alkil benzen sülfonatlar gibi anyonik bir sıvının yüzey gerilimini azaltan maddeler, proteazların açılmasına ve kendinden ısıyla yumuşamasına neden olmaktadır [13].

Günümüzde ticari olarak membran temizliği için üretilen deterjanlar arasında *Alkazym* (Novodan A/S, Danimarka), *Terg-a-zyme* (Alconox, Inc, ABD), *Ultrasil 53* (Henkel KGaA, Almanya) ve *P3-paradigm* (Henkel-Ecolab GmbH, Almanya) sayılmaktadır. Bu tür enzim bazlı temizleyiciler, proteazların protein artıklarını parçalama ve çözme özelliğine dayandırılarak formüle edilmişlerdir [6].

2.3.2. Deri Sanayi

Hayvan postlarını deriye dönüştürmede proteaz enziminden faydalanılmaktadır. Deri üretimi için postlar ve hayvan derilerinin işlenmesinde proteazların kullanım nedeni; kıl ve derinin başlıca yapı taşlarının protein olmasıdır. Kıl (saç) α -keratinden, yani suda çözünmeyen lifli protein moleküllerinden oluşmaktadır. Farklı deri tabakaları, kolajen, α -keratin (epidermis) ve bazı elastinlerden oluşmaktadır. Ayrıca yapısında, albümin, globülin, glikoproteinler ve diğer küresel proteinleri içermektedir. Farklı özelliklere sahip enzimlerin kullanımı, hayvan derisinin kolajen olmayan

içeriklerinin hidrolizini mümkün kılmaktadır. Proteazlar, hayvan postlarını deriye dönüştürmede ıslatma, kireçleme, kıldan arındırma, yünden arındırma ve ayırma aşamalarında kullanılmaktadır [6,7,13].

Islatma aşamasında post; kan, kir, tuz ve yağ kalıntılarında arındırılmaktadır. Ayrıca bu aşamada, postun doğal nem seviyesine ulaşması ve globülin, albümin gibi lifli olmayan proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Islatma aşamasının verimliliğinin artması için yüzey aktif maddeler, antimikrobik içerikler ve enzimler kullanılmaktadır. Bu aşamada proteaz ve lipazlar iyonik olmayan bir deterjan ile birlikte kullanılmaktadır. Böylece hem lifli olmayan proteinlerin, hem de yağ ile çevrelenmiş proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu aşamada kullanılan proteazın kolajen olmayan proteinleri hidroliz etmesi, kolajen proteinleri bozulmadan koruması istenmektedir. Bu nedenle ıslatma sırasında pankreatik proteaz ve pankreatin, nötral proteaz ve alkalın bakteriyel proteazla birlikte kullanılmaktadır [7].

Kireçleme prosesinde postun şişmesi, kıl ve yünden arındırılması sağlanmaktadır. Bu amaçla kireç, sodyum hidroksit, çeşitli ajanlar, su ve alkalın mantar proteaz ile hazırlanan bir çözelti kullanılmaktadır [7].

Kıldan ve yünden arındırma aşamasında yünden arındırma boyası kullanılmaktadır. Yünden arındırma, derinin etli kısmına yünden arındırma boyasının uygulanmasıyla ve derinin, yün çekilmeden önce 10-20 saat boyunca 20-30°C'de tutulması ile gerçekleştirilmektedir. Yünden arındırma boyası, hidratlı kireç, sodyum klorit, alkalın proteazlar ve sudan oluşmaktadır. İnce yünlü deriler için kullanılan alternatif bir yöntem de etli kısma bir tozun uygulanması ve derilerin 24 saat boyunca 25°C'de tutulması ile gerçekleştirilmektedir. Bu toz, sodyum sülfat, amonyum sülfat, klorit ve mikroorganizmalar tarafından üretilen nötr proteazlardan oluşmaktadır [13].

Ayırma adımında, postları ve hayvan derilerini, yumuşak ve esnek hale getirmek için enzimler ve kimyasallar kullanılmaktadır. Bu aşamada tripsin, az miktarda alkalın ve nötr proteazlar kullanılmaktadır [13].

2.3.3. Klinik Uygulamalar

Proteazlar, kan ve doku örneklerinde uyuşturucu maddelerin tahlilinde kullanılmaktadır. Çoğu uyuşturucu maddenin ana bileşeni vücuttaki proteinlere bağlamakta, alınan doku proteazla karşı karşıya bırakıldığında protein çözülürken

uyuşturucu madde ortaya çıkmaktadır. Bylyce uyuşturucu madde analizleri yapılmaktadır [13].

2.3.4. Kozmetik ve İlaç Sanayi

Proteazlar, kozmetikte saç bakımı ürünlerinde, diş macunlarında, istenmeyen tüylerin yok edilmesini sağlayan ürünlerde ve kontak lens solüsyonlarında kullanılmaktadır. İlaç sanayinde ise sindirim sistemini takviye eden ilaçlarda kullanılmaktadır [13].

2.3.5. Gümüş Eldesi

Alkalin proteazlar, kullanılmış X-ışını filmlerden gümüş eldesi amacıyla gerçekleştirilen proseslerde geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanılmış X ışını filmleri jelatin tabakalarında ortalama ağırlıkça %1.5-2 gümüş içermektedir. Gümüşün geri kazanılabilmesi için, jelatin tabakasının filminden ayrılması gerekmektedir. Geleneksel uygulamalarda, filmin yakılarak gümüşün geri kazanılması evre kirliliğine yol açmaktadır. Bu nedenle jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi tercih edilmekte ve bu yolla gümüşün yanında polyeşter filmin de geri kazanımı sağlanmaktadır. Bu proseste bakteriyel proteazların yanında pankreatik proteazlar kullanılmaktadır [6,7].

2.3.6. Gıda Endüstrisi

Enzimler tarafından üretilen protein hidrolisatları genellikle acı bir tada sahiptir. Amino asit türüne ve peptidin uzunluğuna göre bu hidrolisatların acılığı az veya çok olabilir. Acı peptidler, hidrofobik amino asit içeriğinin yüksek olmasıyla karakterize edilmektedir. Genellikle, yüksek hidrofilik amino asit içeriğine sahip peptidler tatlı olmaktadır. Kazein ve hemoglobinden üretilen hidrolisatlar; et, balık ve jelatinden elde edilen hidrolisatlardan daha acı olmaktadır [12].

Proteinlerin enzimatik hidrolizi ile elde edilen ürünlerin tadı; kullanılan protein türüne (hayvan veya bitki) ve enzim türüne bağlıdır. Proteazlar, iyi tasarlanmış peptit profiline sahip hidrolisatlar üretmek amacıyla bitki, balık ya da hayvan proteinlerini hidrolizleyebilmektedirler. Proteazların tadı iyileştirmesiyle daha az acı hidrolisatlar ve acısı alınmış enzimatik protein hidrolisatları retilenmektedir. Bu amaçla *Aspergillus oryzae*'den üretilen asit, nötral ve alkalin proteaz karışımları kullanılmaktadır. Ayrıca, acısı alınmış enzimatik protein hidrolisatları üretmek için ticari alkalin proteaz olan Alkalaz (*Alcalase*) enzimi de kullanılmaktadır [6,12].

Gıda sanayinde proteazlar; meyve sularını, alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede ve proteince zengin diyet amaçlı yiyeceklerin üretiminde kullanılmaktadırlar.

Ayrıca proteazlar, etlerin yumuşatılmasında önemli bir role sahiptir. Proteazlar, bağlı doku proteinlerini ve kas lifi proteinlerini hidrolizleme gücüne sahip olduklarından özellikle bifteklerin yumuşatılmasında kullanılmaktadırlar [6].

Aspartil proteaz grubuna dahil olan, sığır kimosin (rennin) uzun zamandır peynir yapımı sırasında sütün kesilmesi veya pıhtılaşması için kullanılmaktadır. Kaynağı nedeniyle sığır kimosin pahalı bir malzemedir. Alternatif olarak domuzdan elde edilen pepsin de kullanılmaktadır, ancak pepsinin yüksek proteolitik aktivitesi peynir özü için istenmeyen bir durumdur. Bu yüzden, süt kesme enziminin çeşitli mikrobik kaynakları aranmıştır. Sığır kimosin'in ihtiva ettiği aktiviteye yakın olan peynir mayalarının mikrobik kaynakları, *Rhizomucor miehei*, *Mucor pusillus lindt* ve *Endothia parasitica*'dır. İlk iki organizma, termofilik mantar, üçüncüsü ise bir mayadır. Mikrobik kaynaklar ile sığır kimosin arasındaki farklılıkları en aza indirmeye çalışmalarına rağmen, farklar sığır kimosinin peynir yapımı için tercih edilmesine sebep olmaktadır [13].

Proteazlar, bira yapımında serbest amino azot miktarını arttırmaktadırlar. Yeterli serbest amino azot içermeyen bitkiler, fermentasyonda gerekli alkol içeriğine yeterince erken ulaşamamakta ve büyük bir bozulma riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Bu nedenle proteazlar, bira yapımında önemli bir role sahiptirler. Proteazlar, fermentasyon aşamasında ezilmiş arpa ile su karışımı fiçısına eklenmektedir. Proteazlar, fiçıda tahıl proteinlerini hidrolize ederek, peptit ve amino asitlerin fermentasyon sırasında maya tarafından özümsemesini sağlamaktadır. Bu işlemde *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen nötr metallo proteazlar kullanılmaktadır. Arpa özlerindeki serin proteaz inhibitörlerinden etkilenmemesi ve bitkininkine yakın optimum pH'ya sahip olması bu enzimin avantajları arasında sayılmaktadır [13].

Ayrıca, proteazlar fırıncılıkta iki ayrı uygulama için kullanılmaktadır: Bu uygulamaların birincisi yüksek gluten içeren hamurların yumuşatılması ve ikincisi de kraker, bisküvi üretimidir. Birinci uygulamada proteaz, hamur içerisinde elastik bir ağ oluşturan glutenin bir kısmını parçalara ayırmaktadır. Az miktarda enzim kullanılarak yapılan hidrolizle, sert, lastik gibi olan hamur, daha yoğrulabilir, sıkma

ve kalıp vermesi kolay bir şekle dönüştürülmektedir. Bu işlem için mantar asit proteazlar kullanılmaktadır. Mantarlardan elde edilen asit proteazın kraker ve bisküvi üretimindeki işlevi birinci uygulamaya benzerdir. Tek fark, hidroliz işleminin enzim miktarı artırılarak, gluten yoğun bir şekilde gerçekleşmesidir. Böylece, hamurun mayalandırılması sırasında oluşan hava kabarcıklarını tutması engellenmektedir. Sonuç olarak piştikten sonra meydana gelen ürün çıtır çıtır, gevrek bir yapıya sahip olmaktadır. Ayrıca proteazlar, bisküvi, kraker gibi fırınlanmış ürünlerin raf ömürlerini uzatmak amacıyla da kullanılmaktadır. Bu alanda asidik mantar proteazlar amilazlarla birlikte kullanılarak ürünün tadına ve aromasına da etki etmektedir [7,13].

2.3.7. Sığır Yemi Yapımı

Burroughs ve çalışma arkadaşları tarafından yayınlanan rapora göre proteaz, amilaz gibi sığır yemine eklenen enzimler, yemin niteliğini zenginleştirmektedir. Sığır yemi yapımında bakteriyel proteazlar tercih edilmektedir [7].

2.3.8. Atık İşleme

Alkalın proteazlar, gıda endüstrisinden gelen ve evlerden çıkan atıkların işlenmesinde uygulama alanına sahiptir. Ayrıca, proteazlar doğada atık olarak bol miktarda bulunan boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinleri de yararlı biyokütle haline dönüştürebilmektedirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda, 1989 yılında Venugopal ve çalışma arkadaşları *B. Megaterium* hücrelerini kalsiyum aljinat üzerine immobilize etmiş ve immobilize hücrelerle hücre dışı proteazları sararak balık etinin çözüldürülmesini sağlamıştır.

1992 yılında Dalev ve Simeonova deri endüstrisindeki temel atıkları işlemek üzere *B. Subtilis*'den ürettikleri alkalın proteazla, atıklardan hayvansal tutkal gibi yararlı ürünler üretmişlerdir.

Ayrıca, Dalev 1994 yılında *B. Subtilis*'den üretilen alkalın proteazların, kümes hayvanlarının kesim yerlerindeki kuş tüyü atıklarının işlenmesindeki kullanımını açıklamıştır. Kümes hayvanlarının ağırlığının %5'ini oluşturan tüyler ve sert keratin yapının tamamen parçalanması sonucu oluşan ürün önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu ürün yüksek protein içeriği nedeniyle yem olarak kullanılmaktadır [6,8].

2.3.9. D,L-Amino Asitlerin Sentez ve Çözündürülmesi

Amino asitler, insanlar ve evcil hayvanlar için bir besin kaynağı olduğundan büyük bir öneme sahiptir. Canlı organizmalar tarafından sadece L-amino asitlerin sindirilebilmesi, kimyasal sentezlerle elde edilen rasemik karışımın ticari kullanımdan önce izomerlerine ayrılmasını gerektirmektedir. Optik olarak saf, doğal olmayan amino asit üretiminin en iyi yollarından biri çözme işlemidir. Bu konuda yapılan çalışmalarda alkalın proteaz çeşitlerinin kullanıldığı prosesler geliştirilmiştir [6,8].

3. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Enzimler yaşayan hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları hızlandıran protein molekülleridir. Enzimler reaksiyonlar sonucunda modifiye olmazlar. Bu nedenle aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak enzimin reaktanlar ve/veya ürünler ile birlikte bir çözelti içerisinde bulunması, enzimin çözülden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda enzimin bir katıya tutundurulması sağlanarak, ürünler ortamdaki alınmakta ve enzim tekrar kullanılabilir bir hale gelmektedir. Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir. Bir katıya tutundurulması, üzerinden geçen substratların ürünlere dönüşmesini sağlayan enzimlere immobilize enzimler denir. Enzim immobilizasyonu, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketinin önemli ölçüde kısıtlandığı bir süreçtir [14-16].

3.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi

1916 yılında Nelsen ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertazın (E.C.3.2.1.26) [9001-57-4] sukrozun hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu gelişmenin ardından fizyolojik aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu üzerine çok çeşitli raporlar yayınlanmıştır. Bütün bu çalışmalara rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi çeşitli enzimleri diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine kovalent bağlanmayla immobilize etmelerine kadar immobilizasyon pratikte kullanılmamıştır. Daha sonra 1956 yılında Mitz, katalazın (E.C.1.11.1.6) [9001-05-2] DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. 1963 yılında Bernfeld ve Wan tripsin (E.C.3.4.21.4) [9002-07-7], papain (E.C.3.4.22.2) [9001-73-4] amilaz ve ribonükleazın, poliakrilamid jel içine tutuklanmasını sağlamış, 1964 yılında Quijcho ve Richards karboksipeptidaz A'nın (E.C.3.4.17.1) [11075-17-5] glutaraldehit ile çapraz bağlanmasını gerçekleştirmiştir. Ayrıca, 1964 yılında Chang karbonik anhidrazın (E.C.4.2.1.1) [9001-03-0] mikrokapsüllemesini, 1971 yılında da Gregoriadis amiloglukozidaz (E.C.3.2.1.3) [9032-08-0] içeren lipozomların

hazırlanmasını gerçekleştirmiştir. Bu her iki çalışma da enzim terapisinde kullanılmaktadır. Bu sırada Katchalski-Katzir ve arkadaşlarının immobilize enzimlerin teorik olarak anlaşılmasında büyük yararları olmuştur.

1969 da Chibata ve arkadaşları, ilk defa immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında başarı sağlamış kişilerdir. Fungal aminoaçilazı (E.C.3.5.1.14) [9012-37-7] DEAE Sephadex ile iyonik bağlanma yöntemile immobilize etmişler ve bu immobilize enzimi N-açıl-D,L-amino asitleri hidrolizle, L-amino asitlere ve N-açıl-D-amino asitlere dönüştürmekte kullanmışlardır. 1973 yılında, Chibata ve arkadaşları tarafından mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamaları gerçekleştirilmiş, poliakrilamit jele tutuklanmış, yüksek aktivitede aspartaz (E.C.4.3.1.1) [9027-30-9] içeren *Escherichia coli* hücreleri ile amonyum fumarattan L-aspartat üretiminde kullanılmıştır [12].

3.2. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları

İmmobilizasyon işlemiyle bir katıya tutundurulmuş enzimin, çözelti içerisindeki bir enzime göre bir çok avantajı bulunmaktadır:

- Enzim bir çok kere kullanılabilmekte ve bu da maliyeti düşürmektedir.
- Enzimin ortamdaki uzaklaştırılması sonucu reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilmektedir.
- Oluşan ürünlerde enzim kalıntıları bulunmamaktadır (Özellikle gıda ve ilaç sektörleri için enzimin kirletici içermemesi çok önemlidir.).
- Enzimin kararlılığı artmaktadır.
- Enzimin ortamdaki ayrılması kolaylaşmaktadır.
- Sürekli sistemde çalışabilmektedir.
- Ürünün kolayca ayrılması sağlanmaktadır.
- Atık sıvı miktarı azalmaktadır.
- Bazı durumlarda enzimin aktivitesi artmaktadır.
- Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır [14,15].

Enzim immobilizasyonunun – bütün avantajlarına rağmen – endüstriyel uygulamaları aşağıdaki nedenlerden dolayı sınırlanmaktadır [15]:

- Çözülebilir enzimlerin maliyetinin daha düşük olması.
- Geleneksel yöntemlerin değiştirilmek istenmemesi.

- Kurulmuş prosesleri değiştirmek için yeni yatırımlara gerek duyulması.
- İmmobilizasyon işleminde kullanılacak taşıyıcının maliyeti.
- Sistemin performansı.

3.3. İmmobilizasyon Yöntemleri

Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelerle immobilizasyon işlemi sırasında oluşabilecek sorunlara çabuk ve etkili çözümler getirilebilmektedir, ancak her enzim için ayrı ayrı kabul edilen genel bir metot bulunmamaktadır [7].

İmmobilizasyon yöntemi seçilirken kullanılan enzimin kimyasal yapısı ve bileşimi, substrat ve ürünlerin özellikleri, oluşan ürünün kullanılacağı alanlar dikkate alınmalıdır [3]. Ayrıca, immobilizasyon işleminde, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarını ve kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzimde aktivite kaybına neden olmayacak bir yöntem seçilmesi çok önemlidir. Bu nedenle enzimin bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyon vermekten kaçınılmalıdır. İmmobilizasyon işleminde bağlanma sırasında enzimin aktif bölgesi koruyucu gruplarla korunur. Bağlanma sonrasında koruyucu gruplar, enzimde aktivite kaybına neden olmadan uzaklaştırılır. Bazı durumlarda bu koruyucu etki substrat ya da yarışan tip inhibitör ile sağlanabilir [14].

İmmobilizasyon yöntemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

1. Taşıyıcı Bağlama
 - 1.1. Fiziksel Adsorpsiyon
 - 1.2. İyonik Bağlanma
 - 1.3. Kovalent Bağlanma
2. Çapraz Bağlanma
3. Tutuklama
 - 3.1. Jel Tutuklama
 - 3.2. Fiber Tutuklama
 - 3.3. Mikrokapsülleme

Enzimin immobilize edileceği yüzey hidrojen bağları veya elektron geçiş komplekslerinin oluşması sırasında enzimin yapısını korumaktadır. Bu bağlanmalar enzimdeki titreşimi engellemekte ve bu da sıcaklık kararlılığının artmasını sağlamaktadır. Yüzey ve enzimin yakın çevresi elektrik yüklüdür ve bu da enzimin

optimum pH'sının 2 pH birimi kadar artmasına neden olmaktadır. Böylece enzimin etkin bir şekilde çalışabileceği pH aralığı artmakta ve aynı pH'ta çalışamayan enzimlerin bir arada çalışması sağlanmaktadır [14].

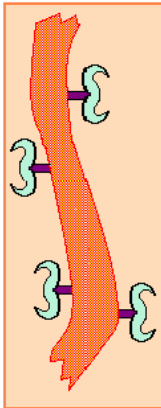
3.3.1. Taşıyıcı Bağlama Yöntemi

Taşıyıcı bağlama metodu en eski immobilizasyon yöntemidir, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması şeklinde gerçekleşir. Bu yöntemde bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır [14].

Taşıyıcının seçilmesi immobilize enzimin performansı açısından büyük önem taşımaktadır. Taşıyıcı seçiminde en önemli kriter enzimin cinsidir [14,15]. Bunun dışında taşıyıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken kriterler aşağıdaki gibidir:

- Geniş yüzey alanı
- Tanecik boyutu ve şekli
- Kimyasal bileşimi
- Hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı
- Geçirgenliği
- Hidrofilik karakteri
- Kimyasal, mekanik ve ısıl kararlılığı
- Yüksek sertliği
- Mikrobiyal saldırılara karşı dayanıklılığı
- Rejenerasyon kabiliyeti [14,15]

Aşağıdaki şekilde enzimin taşıyıcıya bağlanması görülmektedir:



Şekil 3.1. Enzimin Taşıyıcıya Bağlanması

Genel olarak; hidrofilik gruptaki ve bağlanan enzim konsantrasyonundaki artış immobilize enzimin aktivitesinin yükselmesini sağlamaktadır. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılardan bazıları seluloz, dekstran, agaroz, poliakrilamid jel gibi polisakkarit türevleridir [14].

Enzimin bağlanmasına göre bu yöntem üç alt sınıfta incelenmektedir:

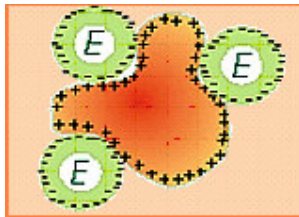
- a. Fiziksel Adsorpsiyon
- b. İyonik Bağlanma
- c. Kovalent Bağlanma

3.3.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcının yüzeyine fiziksel adsorpsiyonuna dayanmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında tersinir bir yüzey etkileşimi gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, en basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda ucuz bir immobilizasyon metodudur. Bu yöntemde hidrofobik bağlanma gerçekleşebilmekte, ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler de etkili olmaktadır. Bu yöntem ilk olarak beta-D-frukto-furanosidaz enziminin alüminyum hidroksit üzerine immobilizasyonunda kullanılmıştır [14-16].

Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon işleminde enzimin aktif merkezinin yapısında ve de enzimde konformasyonel değişiklik çok az olmakta ya da hiç olmamaktadır. İşlem sırasında enzimin aktivitesini kaybetmemesi ve optimum adsorpsiyon koşullarının sağlanabilmesi için uygun çözücü kullanılmalı, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, adsorbant konsantrasyonu, pH ve iyon konsantrasyonları kontrol edilmelidir [14-16].

Enzimin taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi şekilde görülmektedir:



Şekil 3.2. Fiziksel Adsorpsiyon

Bu immobilizasyon yönteminin en büyük avantajı genellikle bir ayıraç kullanılmaması ve çok az sayıda aktivasyon aşamasına ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca adsorpsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiğinden; adsorpsiyonun enzim üzerindeki bozucu etkisi kimyasal bağlanmaya göre çok daha azdır. Yani, enzim veya taşıyıcıda kimyasal değişim gerçekleşmemektedir. Bu anlamda adsorpsiyon işlemi doğal biyolojik membranlarda oluşan duruma çok benzemektedir ve bu tür sistemlerin modellenmesinde de kullanılmaktadır [14,16].

Avantajlarının yanı sıra adsorpsiyon işleminin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. İşlem sırasında enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri zayıf olduğundan adsorplanmış enzim taşıyıcıdan sızabilir. Bu zayıf bağlar nedeniyle enzimin adsorpsiyonu; sıcaklık, pH, iyonik kuvvetlerdeki değişikliklerle ve ortamda sadece substrat varlığı ile sonuçlanabilir. Ayrıca bu yöntemde ortamda bulunan diğer protein veya maddeler de taşıyıcı üzerine adsorplanabilir. Bu da immobilize enzimin özelliklerinin değişmesine, aktivasyonunun düşmesine sebep olur [14,15].

Fiziksel adsorpsiyon işleminde genellikle adsorbant olarak alumina, aktif karbon, kil, kolojen, cam ve hidroksilapatit kullanılmaktadır [15].

3.3.1.2. İyonik Bağlanma Yöntemi

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları içeren bir taşıyıcıya iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. Uygulanmasının kolay olması, taşıyıcının yenilenebilir olması ve enzimin modifiye olmaması yöntemin kullanımını arttıran özelliklerdir. İyonik bağlanma metodunda kullanılan taşıyıcılar; organik (selüloz, dekstran) ve inorganik (silika) destek maddeler ile iyon değiştirici kalıntılarından türeyen iyon değiştiricilerdir. Genellikle taşıyıcı olarak iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Taşıyıcılar, iyon değiştirici kalıntılara bağlı olarak anyonik veya katyonik değiştirici olarak isimlendirilirler. Fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi iyonik bağlanmada da immobilizasyon işlemi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyonda olduğundan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmada olduğundan daha zayıftır. Bu nedenle de enzimin taşıyıcıdan sızma olasılığı vardır. Bu durum genelde iyonik kuvvetin yüksek olduğu substrat çözeltilerine ya da pH

değişimlerine neden olmaktadır. İyonik bağlanmada operasyon koşulları kovalent bağlanmadakine göre daha hafiftir, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezindeki değişiklik azdır. Bu nedenle genellikle immobilize edilen enzimin aktivitesi yüksek olmaktadır [12,14,15].

3.3.1.3. Kovalent Bağlanma Yöntemi

Bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzimin nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH₂), karboksil grubu (CO₂H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur [7,14,16].

Kovalent bağlanma yönteminde kullanılacak çok sayıda taşıyıcı vardır, hangi taşıyıcının kullanılacağı taşıyıcının avantaj ve dezavantajları dikkate alınarak seçilmektedir. Araştırmalar taşıyıcının hidrofilik özelliğinin önemli olduğunu göstermektedir. Hidrofilik özelliği yüksek olan polisakkarit polimerleri enzim immobilizasyonunda popüler olan taşıyıcılardandır. Örneğin, enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak seluloz, dekstran, nişasta ve agaroz kullanılmaktadır. Ayrıca taşıyıcı olarak gözenekli silika ve cam da kullanılmaktadır, ancak bunların hidrofilik özelliği polisakkarit polimerlerinden daha düşüktür [16].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon; bağlanma şekline göre diazo, peptid ve alkilleme metodu olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Uygun metodu seçerken aşağıdaki üç ana unsur dikkate alınmalıdır:

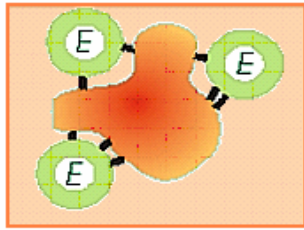
- 1) Bağlanma reaksiyonu enzim aktivitesinin düşmesine neden olmayacak koşullarda gerçekleşmelidir.
- 2) Enzimin aktif merkezi kullanılan ayıraçlardan etkilenmemelidir.
- 3) Ticari olarak elde edilebilir taşıyıcı kullanılmalıdır [14,15].

Kovalent bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerinedekine göre daha kuvvetlidir. Bu nedenle substrat veya yüksek iyonik kuvvete sahip çözelti varlığında bile enzim ile taşıyıcı arasında sızıntı olmamaktadır. Ayrıca enzim taşıyıcının üzerine tutturulmuş olduğundan, immobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir [14].

Kovalent bağlanmada immobilizasyon koşulları diğer immobilizasyon yöntemlerindeki gibi daha karmaşıktır. Bu nedenle de kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi ve konformasyonel yapısı değişiklik göstermekte ve buna bağlı olarak enzimin aktivitesi düşmektedir. Aktivite düşmesini engellemek için enzimin katalitik aktivite gösteren grupları dışındaki fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması gerekmektedir. Aktif bölgenin aminoasit kalıntılarıyla inaktivasyon reaksiyonlarının engellenmesi sonucunda yüksek aktiviteler elde edilmektedir [14,15]. Enzimin katalitik fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması sonucu aktivite düşmesini engellemek için;

- 1) İmmobilizasyon işlemi yarışan tip inhibitör veya substrat varlığında gerçekleştirilebilir.
- 2) Tersinir, kovalent olarak bağlanmış enzim-inhibitör kompleksi kullanılabilir.
- 3) Taşıyıcıya kovalent bağlanması, yeni birleşmiş kalıntılarla sağlanan bir kimyasal olarak modifiye edilmiş çözünebilir bir enzim kullanılabilir [14,15].

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmesi şekilde görülmektedir:



Şekil 3.3. Kovalent Bağlanma

Kovalent bağlanma aşağıdaki yöntemlerle meydana gelmektedir [14]:

- Diazotizasyon: Taşıyıcı-N=N-Enzim
- Amid Bağı Oluşumu: Taşıyıcı-CO-NH-Enzim
- Alkilasyon ve Arilasyon: Taşıyıcı-CH₂-NH-Enzim, Taşıyıcı-CH₂-S-Enzim
- Schiff'in Baz Oluşumu: Taşıyıcı-CH=N-Enzim
- Amidasyon Reaksiyonu: Taşıyıcı-CNH-NH-Enzim
- Tiyol-Disülfit Yer değiştirmesi: Taşıyıcı-S-S-Enzim
- Ugi Reaksiyonu
- Civa-Enzim Yer değiştirmesi
- Bifonksiyonel Ayıraçlarla Taşıyıcı Bağlanma:
Taşıyıcı-O(CH₂)N=CH(CH₂)₃CH=N-Enzim

Kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi engellenmiş olmamalıdır. Bazı durumlarda immobilize enzimin verimini arttırmak için enzimin reaktif kalıntılarının miktarını arttırmak mümkündür. Böylece enzimatik aktivite için gerekli olan alternatif reaksiyon bölgeleri sağlanmaktadır [14].

Çapraz bağlanma ile uygulandığında kovalent bağlanma sonucunda kararlı, çevredeki çözeltiliye sızıntı yapmayan immobilize enzim türevleri elde edilmektedir. Bağlanma reaksiyonlarının ve kovalent bağ yapabilen taşıyıcıların çeşitliliği bu yöntemin genellikle kullanılan bir immobilizasyon yöntemi olmasını sağlamaktadır [14].

3.3.2. Çapraz Bağlanma Yöntemi

Enzimlerin çapraz bağlanma ile immobilizasyonu, diğer protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla sağlanmaktadır. Bir enzimin kendisi üzerine çapraz bağlanması pahalı ve de yetersiz bir yöntemdir, çünkü bu durumda proteinin bir kısmı taşıyıcı gibi davranmakta ve bu da enzimatik aktivitenin düşmesiyle sonuçlanmaktadır. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon metotlarından biriyle kullanılması daha iyidir. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu gerçekleştirilirken çapraz bağlanma da uygulandığında desorpsiyon çok az olmaktadır. Adsorblanmış enzimleri stabilize etmek ve poliakrilamid jellerden sızıntıyı önlemek çapraz bağlanmanın sıklıkla kullanıldığı alanlardır [14]. Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlanması şekillerde görülmektedir:



Şekil 3.4. Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlanmanın sağlanması için en çok kullanılan maddeler glutaraldehit ya da toluen diizosiyanattır. Çapraz bağlanma ile immobilizasyon yönteminin en büyük avantajı basit ve hızlı prosedürlerde immobilize enzimlerin sadece ajanın varlığında hazırlanabilmeleridir [14,16]. Ayrıca bu yöntemin 2 önemli dezavantajı bulunmaktadır:

1. Çapraz bağlanma reaksiyonları daha sert koşullarda gerçekleşmektedir ve kolaylıkla kontrol edilememektedirler. Koşullar enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açabilir ve bu da önemli miktarda aktivite kaybı ile sonuçlanabilir [14,15].

2. İmmobilizasyon için çapraz bağlanma uygulanarak hazırlanan taşıyıcının jelatinimsi yapısı bir çok uygulamaya sınırlama getirmektedir [15].

İyi bir immobilizasyon gerçekleştirebilmek için gerekli optimum koşullar aşağıdaki özelliklere bağlıdır [15]:

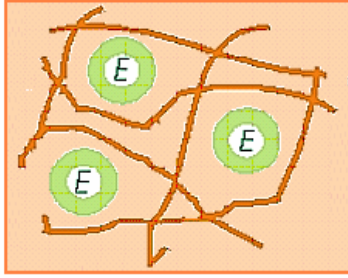
- Enzim konsantrasyonu ve yapısı
- Çapraz bağlanma için kullanılan ajanın konsantrasyonu ve yapısı
- pH
- İyonik kuvvet
- Sıcaklık
- Reaksiyon süresi

3.3.3. Tutuklama Yöntemi

Tutuklama metoduyla immobilizasyonda enzim kafes görevi gören polimer matris veya membran içerisinde tutulmaktadır. Bu tutulma öyle bir şekilde gerçekleşir ki, substratın içeri girmesine izin verilirken, protein de içeride muhafaza edilmektedir. Bu yöntemin kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadan farkı enzimin çözeltide serbest olması, ancak jel matris ya da membran içerisinde tutularak hareketinin kısıtlanmasıdır. Bu nedenle tutuklama yöntemi geniş uygulanabilirlik alanı kazanmıştır [14,16].

Tutuklama metodunun en önemli avantajı tekil enzimlerin dışında değişik tipte enzim, organel ve hücrelerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Ayrıca biyokatalizörlerin çeşitli modifikasyonlara uğramaları ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkisini elimine etmesi de yöntemin avantajları arasında sayılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı substratların enzime zorlukla tutunmaları ve taşıyıcıların yeniden elde edilemez olması yöntemin dezavantajlarından. Yöntemin dezavantajları ultrafiltrasyon membranıyla tutuklama yapılarak önlenilmektedir, ancak bu durumda da aktive olmamış enzim molekülleri bazen membran yüzeyine yapışıp reaksiyon çözeltisine

geçişte azalmaya neden olabilmektedir [12]. Aşağıdaki şekilde enzimin bir taşıyıcı içerisinde tutuklanması görülmektedir:



Şekil 3.5. Enzimin Bir Taşıyıcı İçerisinde Tutuklanması

3.3.3.1. Jel Tutuklama Yöntemi

Jel tutuklama metodunda tutuklama; monomer (akrilamid), oligomerik ve polimerik (kolojen, jelatin, kalsiyum aljinat) maddelerden elde edilen, suda çözünmeyen polimer jellerde gerçekleşir. Tutuklama sırasında sıcaklık, iyonik kuvvet, pH değişir ve çapraz bağlanma reaksiyonu oluşur. Endüstriyel uygulamalar; monomerlerin zehirliliği ve reaktör operasyonu sırasındaki yüksek basınç düşüşü nedenleri yüzünden sınırlanmaktadır [15].

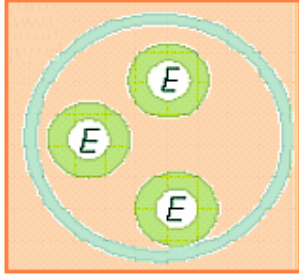
3.3.3.2. Fiber Tutuklama Yöntemi

Fiber tutuklama metodu, enzimin selüloz, triasetat gibi fiber formundaki bir polimere tutuklanması sonucunda gerçekleşir. Fiberlerin zayıf asit, alkali ve bazı organik çözücülere karşı dirençli olması ve yüksek iyonik kuvvete sahip olması bu yöntemde çeşitli avantajlar sağlamaktadır, ancak düşük molekül ağırlıklı substratlarla kullanımı sınırlanmaktadır. Ayrıca polimer çözücüsü olarak suda çözünmeyen sıvıların kullanılması enzimin inaktive olmasına neden olabilmektedir [15].

3.3.3.3. Mirokapsülleme Yöntemi

Mikrokapsül tipi tutuklamada enzim yarı geçirgen polimer membran içerisinde tutuklanır. Bu metodun avantajları substratla enzime geniş yüzey alanı sağlaması ve sadece tekil enzimler değil, değişik tipte enzimlerin de hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilir olmasıdır. Metodun yüksek molekül ağırlıklı substratlara uygulanamaması, bazı durumlarda enzimin inaktive olması, membran duvarına yapışması ve mikrokapsüllerden damlaması yöntemin dezavantajları arasında

sayılmaktadır [15]. Aşağıdaki şekilde enzimin bir kapsül içerisinde tutuklanması görülmektedir:



Şekil 3.6. Enzimin Bir Kapsül İçerisinde Tutuklanması

3.4. İmmobilize Enzimlerin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımları

Ticari amaçlı bir prosesin gerçekleştirilmesinde, kimyasal bir katalizör mü, yoksa enzim mi kullanılacağına, serbest enzim mi yoksa immobilize enzim mi kullanılacağına karar verilirken sağlık ve çevresel faktörlerin yanında ekonomik koşullar da dikkate alınmaktadır. Bazı durumlarda, özellikle gıda sektöründe, immobilize enzimlerin kullanıldığı prosesler, kimyasal bir katalizörün ya da serbest enzimin kullanıldığı proseslere oranla geniş ölçekte üretim sağlayarak daha ekonomik olabilmektedir. Endüstride kullanılan immobilize enzimlerin önemli uygulamaları Tablo 3.1 de verilmektedir [3].

Tablo 3.1. İmmobilize Enzimlerin En Önemli Endüstriyel Uygulamaları

Enzim (EC Numarası)	Substrat	Ürün
Glukoz İzomeraz (5.3.1.5)	Glukoz	Fruktoz
B-Galaktosidaz (3.2.1.23)	Laktoz	Glukoz ve Galaktoz
Lipaz (3.1.1.3)	Trigliseritler	Kakao yağı muadilleri
Nitril Hidrataz (4.2.1.84)	Akrilonitril 3-Siyanopiridin Adiponitril	Akrilamid Nikotinamid 5-siyanovaleramid
Aminoçilaz (3.5.1.14)	_{D,L} -Aminoasitler	_L -Aminoasitler (metionin, alanin, fenilalanin, triptofan, valin)

Tablo 3.1. İmmobilize Enzimlerin En Önemli Endüstriyel Uygulamaları (Devam)

Enzim (EC Numarası)	Substrat	Ürün
Raffinaz (3.2.1.22)	Rafinoz	Galaktoz ve sukroz (rafinoz içermeyen çözeltiler)
İnvertaz (3.2.1.26)	Sukroz	Glukoz/fruktoz karışımları (invert şeker)
Aspartat Amonyak-liyaz (4.3.1.1)	Amonyak + Fumarik asit	L-Aspartik asit (sentetik tatlandırıcı olan aspartamın üretiminde kullanılmaktadır)
Termolisiz (3.4.24.27)	Peptidler	Aspartam
Glukoamilaz (3.2.1.3)	Nişasta	D-Glukoz
Papain (3.4.22.2)	Proteinler	Biradaki soğuk sisin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır
Hidantoinaz (3.5.2.2)	D,L-Amino asit hidantoinler	D,L-Aminoasitler
Penisilin amidaz (3.5.1.11)	Penisilin G ve V	6-Amino penisilanik asit
β -Tirozinaz (4.1.99.2)	Pirokatekol	L-DOPA

İmmobilize enzimler günümüzde endüstriyel uygulamaların dışında laboratuvar ölçekte organik sentezlerde, analitik ve medikal uygulamalarda da kullanılmaktadır. Analitik uygulamalarda immobilize enzimler biyosensörlerde kullanılmaktadır. Ayrıca, kanser, lösemi, üre rahatsızlıkları, yapay böbrek, akciğer, pankreas uygulamaları, glikojen depolama rahatsızlıkları, Lesch-Nyhan rahatsızlığı immobilize enzimlerin medikal alanlardaki uygulamaları arasında sayılmaktadır.

Gelecekte de immobilize enzimlerin bu alanlardaki kullanımlarının artacağı düşünülmektedir [3].

4. İMMOBİLİZASYONDA TAŞIYICI SEÇİMİ

İmmobilizasyon işleminde farklı özelliklere sahip taşıyıcılar kullanılmaktadır. İmmobilizasyonda taşıyıcı seçimi çok önemlidir, çünkü bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır [14].

Taşıyıcının seçilmesi immobilize enzimin performansı açısından büyük önem taşımaktadır. Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelere rağmen her enzim için ayrı ayrı kabul edilen genel bir immobilizasyon metodu bulunmadığı gibi enzimler için evrensel olarak belirlenmiş taşıyıcılar da bulunmamaktadır. Taşıyıcı seçiminde en önemli kriter enzimin cinsidir. Bunun dışında taşıyıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken kriterler arasında; taşıyıcının yüzey alanı, tanecik boyutu ve şekli, kimyasal bileşimi, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı, geçirgenliği, kimyasal, mekanik ve ısı kararlılığı, sertliği, mikrobiyal saldırılara karşı dayanıklılığı ve rejenerasyon kabiliyeti sayılmaktadır. Ayrıca, taşıyıcıların maliyetlerinin yüksek olması immobilizasyon işleminin endüstriyel alanda kullanımını kısıtlayacağından immobilizasyon işleminde kullanılacak taşıyıcıların ekonomik olmaları gerekmektedir [7,14,15].

4.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılara Örnekler

Çitin, çitosan, aljinat ve zeolit kolay bulunabilmeleri ve ekonomik olmaları nedeniyle immobilizasyon işleminde kullanımına sıklıkla rastlanan taşıyıcılar arasında sayılmaktadır [7,14,15].

4.1.1. Çitin

Çitin, immobilizasyonda taşıyıcı olarak kullanılan kompleks bir moleküldür. Kabuklu, böcek, örümcek gibi omurgasızların dış iskeletinin temel yapısını oluşturmaktadır. Ayrıca, bazı mantar ve alglerin hücre duvarlarında da bulunmaktadır [17].

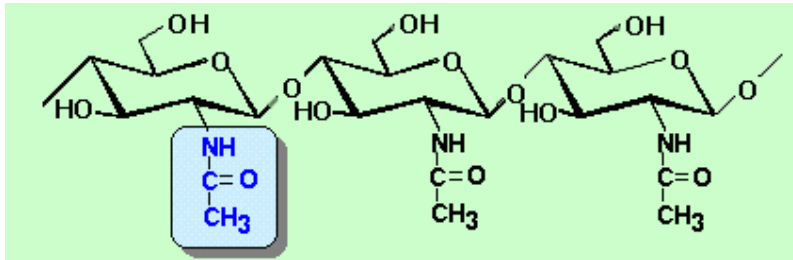
Tablo 4.1’de doğada çitin bulunan canlıların içerdikleri çitin yüzdeleri görülmektedir. (Bütün sayılar yaklaşık değerdedir.)

Tablo 4.1. Canlılar ve İçerdikleri Çitin Miktarları (%) [2].

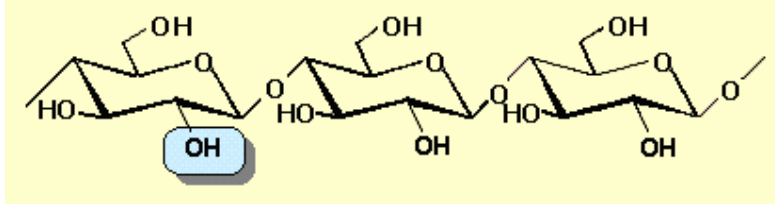
Canlı	İçerdiği Çitin Miktarı (%)
Mantar	5-20
Solucan	20-38
Ahtapot/Mürekkap Balığı	3-20
Akrep	30
Örümcek	38
Hamam Böceği	35
Kırankatlı Böcek	37
İpek Böceği	44
Yenilebilir Yengeç	70

Çitin selülozdan sonra doğada en sık rastlanan polisakkarittir. Biyosferde, yılda en az 10 gigaton çitin sentezlenmektedir. Çitin β -(1→4) bağlı glikandır, 2-asetamid-2-deoksi- δ -glukoz (N-asetil-D-glukozamin) birimlerinden oluşan uzun zincirli, lineer bir polimerdir. Çitin, selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun asetamid grubuyla yer değiştirmiş şeklidir. X-ışını analizlerinde selüloz ve çitin benzer yapılar göstermektedir. Çitin, immobilizasyon dışında atık suların arıtılmasında metal iyonlarının ayrıştırılması ve içme sularının saflaştırılmasında, kozmetik sanayinde saç ve cilt bakımında, gıda sanayinde antikolesterol ve yağ bağlayıcı olarak, tarımda böcek ilacı olarak, veterinerlik uygulamalarında ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır [15-19].

Aşağıdaki şekillerde çitin ve selülozun kimyasal yapıları görülmektedir:



Şekil 4.1. Çitin Kimyasal Yapısı [19]

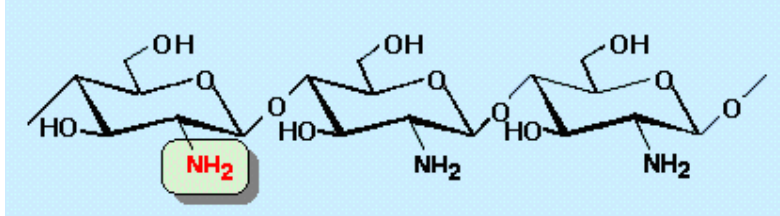


Şekil 4.2. Selülozun Kimyasal Yapısı [19]

4.1.2. Çitosan

Çitosan, çitinden türetilen modifiye bir polisakarittir, çitinin deasetilasyonu ile üretilmektedir. Çitosan β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cN) ve β -(1 \rightarrow 4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cNAc) birimlerinden oluşan ikili lineer bir heteropolisakarittir. Çitosan da yapı olarak selüloza çok benzemektedir; selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun amin grubuyla yer değiştirmiş şeklidir, yani çitosan çitinde olduğu gibi çift bağlı karbon atomlarına sahip değildir [2,16,18,19].

Aşağıdaki şekilde çitosanın kimyasal yapısı görülmektedir:

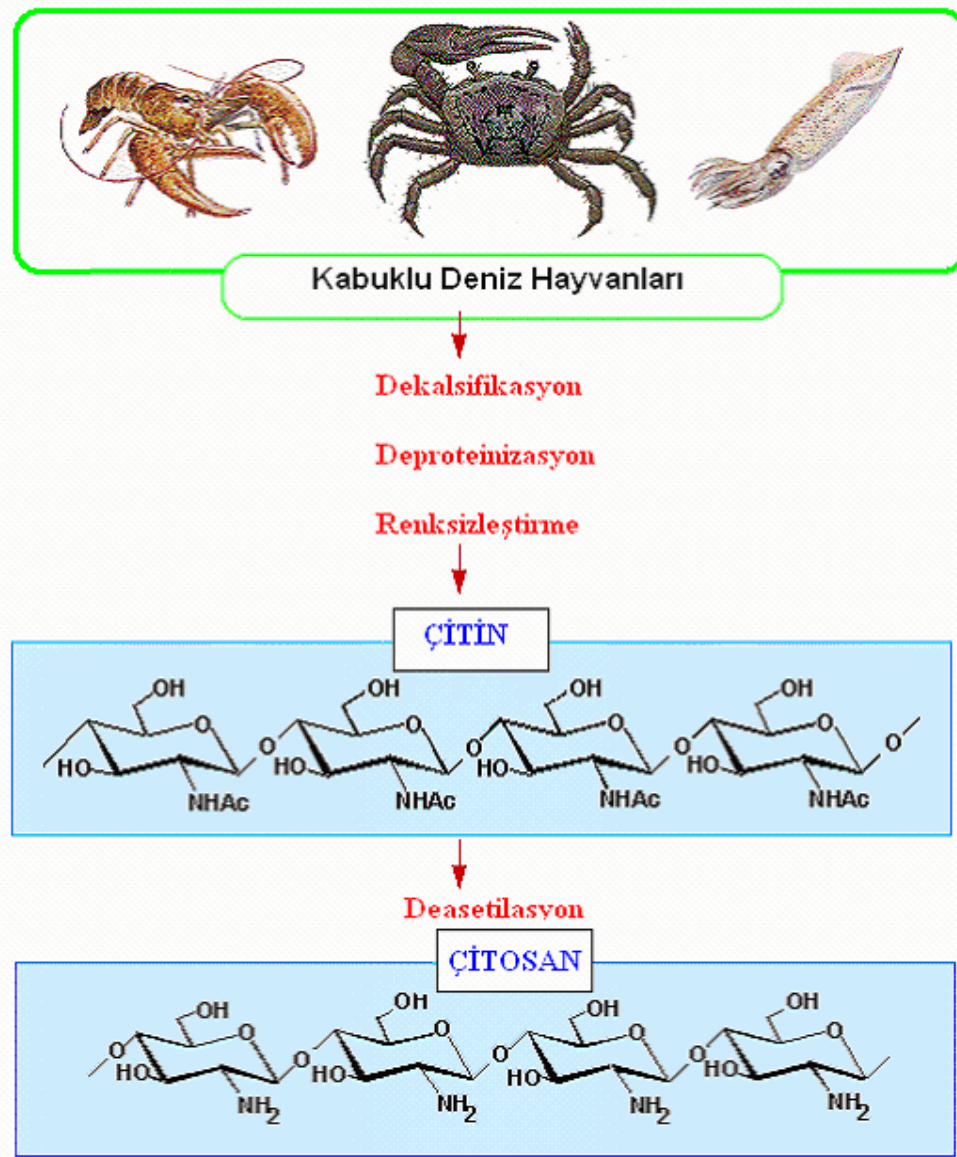


Şekil 4.3. Çitosanın Kimyasal Yapısı [19]

Çitosan, biyoteknolojide enzim immobilizasyonunun yanında, hücre immobilizasyonunda, protein ayırmada, hücre geri kazanımında ve kromatografik uygulamalarda da kullanılmaktadır. Ayrıca, gıda sanayinde boya maddelerinin ayrılmasında, renk stabilizasyonunda ve hayvan yemi katkısı olarak kullanılmaktadır. Atık su arıtmada metal iyonlarının ayrılmasını sağlamakta, tarımda gübrelemede kullanılmaktadır. Medikal uygulamalarda bandajlarda, kontak lenslerde, cilt yanıklarında, kanda kolesterol düzeyinin belirlenmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak, kozmetik sektöründe, nemlendiricilerde, el,yüz,vücut krem ve losyonlarında çitosandan yararlanılmaktadır [19].

Kabuklu deniz hayvanlarının atıklarından çitosan üretmek için öncelikle seyreltik sulu HCl çözeltisi kullanılarak dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Ardından seyreltik NaOH çözeltisiyle deproteinizasyon yapılarak çitin elde

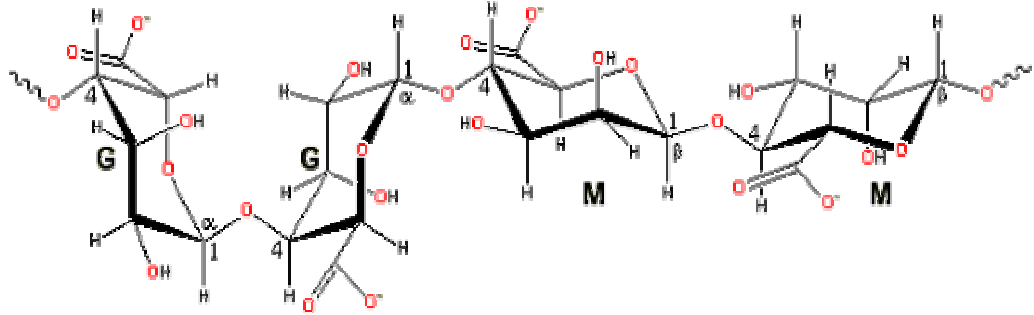
edilmektedir, ancak elde edilen çitin renginin giderilebilmesi için % 0.5'lik KMnO_4 sulu çözeltisi ve oksalik asit sulu çözeltisi ya da güneş ışığı kullanılarak renksizleştirme işlemi yapılmaktadır. Böylece çitin üretimi gerçekleştirilmektedir. Çitin % 40 – 50'lik NaOH çözeltisi kullanılarak sıcak ortamda deasetilasyonu ile de çitosan üretilmektedir. Kabuklu deniz hayvanlarından çitin ve çitosan üretim prosesi aşağıdaki şekilde görülmektedir [19]:



Şekil 4.4. Kabuklu Deniz Hayvanlarından Çitin ve Çitosan Üretimi

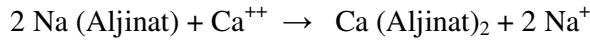
4.1.3. Aljinat

Kalsiyum aljinat deniz yosunlarında bulunan bir polisakkarit olup, immobilizasyon işlemlerinde kullanılan taşıyıcılardandır. Kalsiyum aljinat tanecikleri, yaklaşık 20 yıldır ilaç, böcek ilacı ve gübre gibi suda çözünen kimyasallar içeren maddelerde yavaş salınım özelliğinden dolayı kullanılmaktadırlar. Aljinatın eldesi kahverengi deniz yosunlarından (*Phaeophyceae*, genellikle *Laminaria*) olabildiği gibi, *Azobacter vindelaei* bakterisinden de olmaktadır. Aljinatın kimyasal yapısına bakıldığı zaman ise, Şekil 4.5'teki yapı görülmektedir. Bu yapıda, G harfi ile gösterilen kimyasal madde, α -L-gluronik asidi, M harfi ile gösterilen yapı da β -D-mannuronik asidi simgelemektedir [2].



Şekil 4.5. Kalsiyum Aljinatın Kimyasal Yapısı [2].

Aljinat molekülünün bileşimi elde edildiği organizmaya ve dokuya göre farklılıklar gösterebilmektedir. Aljinat 2 ve 3 değerlikli katyonlar ile reaksiyona girerek jel oluşturmaktadır. Katyonlar (Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} vb.) aljinat molekülündeki gluronik asitleri birbirlerine bağlayarak jel oluşumuna sebep olmaktadır.



Jel oluşturma özellikleri aljinat molekülünün kompozisyon ve sırasına bağlıdır. G bloklarının uzunluğu jel formasyonunun başlıca yapısal durumunu belirlemektedir. Aljinat içindeki G ve M oranlarındaki değişiklik aljinatın fiziksel özelliklerini de etkilemektedir. Örneğin, M içeriği fazla olan aljinatlar daha yumuşak ve elastik bir jel yapısı oluştururken, G içeriği yüksek olan aljinatlar ise daha sert ve kırılabilir bir jel yapısına sahip olmaktadır [1,2].

4.1.4. Zeolit

İmmobilizasyon işlemi için kullanılan bir diğer taşıyıcı da zeolitlerdir. Zeolitler mikro-gözenekli kristal yapıya sahip katılardır. Genellikle yapı iskelelerinde ve

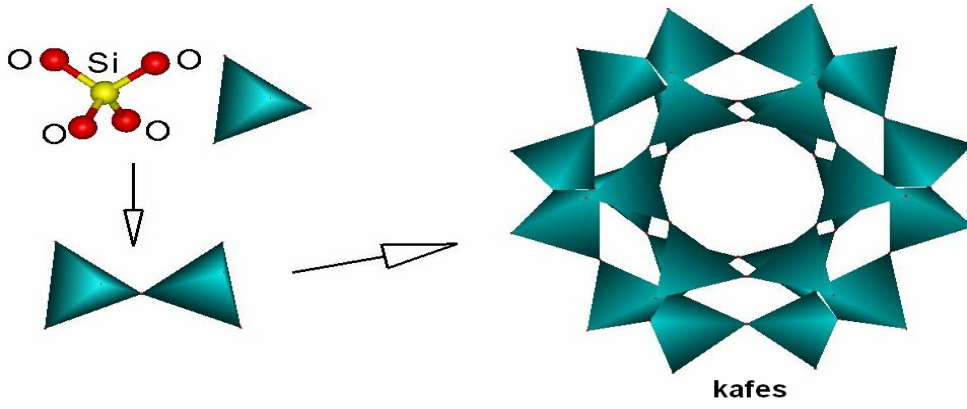
katyonlarında silikon, alüminyum, oksijen ve gözeneklerinde de su ile diğer molekülleri içermektedirler. Çoğunlukla zeolitler, mineraller şeklinde doğal olarak oluşurlar ve dünyanın bir çok yerinde maden halinde bulunmaktadırlar. Zeolitlerin bir diğer oluşum şekli ise sentetik yolla gerçekleşmektedir. Bunlar, zeolitin kimyası hakkında daha çok bilgi edinilmesi amacıyla ya da ticari olarak bazı spesifik kullanımlara yönelik üretilmektedir [2].

Kendilerine has olan gözenekli yapıları sayesinde, zeolitler bir çok endüstride yılda milyonlarca ton mertebesinde kullanılmaktadırlar. Zeolitler çoğunlukla moleküler elek olarak da adlandırılmaktadırlar. Tarım ve hayvancılıkta zeolitli tüfler gübrelerin kötü kokusunun giderilmesi, içeriğinin kontrol edilmesi ve asit volkanik toprakların pH'sının yükseltilmesi amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Zeolit mineralleri iyon değiştirme ve adsorpsiyon özellikleri nedeniyle kirlilik kontrolünde gittikçe artarak kullanılmaktadır. Bu alanda radyoaktif atıkların, atık suların, baca gazlarının, petrol sızıntılarının temizlenmesinde ve oksijen üretiminde kullanım alanına sahiptir. Dünyanın gittikçe büyüyen enerji ihtiyacının karşılanmasında, petrol ve kömür yanında, nükleer enerji ve güneş enerjisi gibi kaynakların enerjiye dönüştürülmesi sırasında doğal zeolitlerden yararlanılmaktadır. Zeolitler madencilikte ve metalurji sektöründe de kullanılmaktadır. Volkanik malzemenin hidrolizi sonucu oluşan zeolitler cevher yataklarının oluşumlarının açıklanması yanında, aramalarında da kullanılabilir. Çevre sağlığı açısından tehlike oluşturan bazı ağır metal katyonları içeren madencilik ve metalurjik faaliyetlerden ortaya çıkan atık sular, doğal zeolitlerin katyon değiştirme özelliklerinden faydalanılarak artırılabilir. Yüksek parlaklığı olan zeolit cevherlerinin, kağıt endüstrisinde dolgu malzemesi olarak kullanımı gittikçe artmaktadır. Doğal zeolitler sağlık alanında çeşitli şekillerde kullanılmakla birlikte, bunlar arasında en önemlisi florürlü diş macunlarında parlaticı katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Ayrıca kesik türü yaralanmış hayvanların tedavisinde yaranın enfeksiyon kapmaması için toz olarak kullanılmaktadır. Deterjan sektöründe ise çevre kirlenmesi nedeniyle deterjanlarda fosfat kullanımının bazı ülkelerde kısıtlanması sonucunda katkı maddesi olarak sentetik zeolitler fosfatların yerine kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda doğal zeolitlerin de bu alanda kullanılmasına yönelik bazı çalışmalar devam etmektedir [20].

Son yıllarda zeolitlerin enzim immobilizasyonunda kullanımı artmaktadır. Zeolitlerin kendilerine özgü yapısal karakteristikleri, geniş yüzey alanları, hidrofobik veya

hidrofilik davranışları ve elektrostatik etkileşimler gibi özellikler göstermeleri kullanımlarını arttıran sebepler arasında sayılmaktadır. Ayrıca, içindeki gözeneklerin mikrogözenekli ($<20 \text{ \AA}$) ya da mezogözenekli ($20-500 \text{ \AA}$) bir yapıda hazırlanabilmesi zeolitlerin kullanımını ve bu konudaki araştırmaları arttırmaktadır [21].

Günümüzde, zeolitler için 130'dan fazla yapı bilinmektedir. Zeolitlerin yapı iskelesi, 4 bağı atom ağından oluşmaktadır. Ortada silikon atomunun ve köşelerde oksijen atomlarının bulunduğu tetrahedral bir yapıdır. Bu tetrahedral yapı, daha zengin özelliklere sahip bir yapı oluşturmak üzere köşelerden birbirlerine bağlanabilmektedir. Aşağıda Şekil 4.6'da görülen yapı, bir zeolitin genel çalışma prensibini göstermektedir [22].



Şekil 4.6. Bir Zeolitin Çalışma Prensibi [22].

5. PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

1991 yılında Hayashi ve Ikada çalışmalarında proteaz enziminin gözenekli çitosan kürecikleri üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmalarında, immobilize proteazın aktivitesi substrat olarak düşük molekül ağırlıklı N-benzil-L-arjinin etil ester (BAEE) ve yüksek molekül ağırlıklı kazein kullanılarak ölçülmüş ve substrat olarak kazein kullanıldığı durumda immobilize enzimin aktivitesinin daha yüksek olduğunu belirlenmiştir.

İmmobilize edilmiş proteazların pH 8'de 1 saat boyunca sıcaklık kararlılıkları incelendiğinde, serbest enzimden daha yüksek sıcaklıklarda kararlılık gösterdikleri ve + 70°C'de immobilize enzimlerin serbest enzimden 2.8 – 3.4 kat daha yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

Ayrıca çalışmalarında, immobilize ettikleri proteaz enziminin serbest enzimden daha geniş pH aralığında kararlı olduğu ve serbest enzim için 8.0 olan optimum pH değerinin immobilizasyonla değişmediği belirlenmiştir.

6 ay boyunca +4°C'de saklama kararlılığı incelendiğinde ise serbest enzim aktivitesinin %30'unu kaybederken, immobilize enzimlerin herhangi bir aktivite kaybına uğramadığı saptanmıştır [23].

1997 yılında Naby, Ismail, Ahmed ve Fattah'ın yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus Megaterium*, *Bacillus Mycoides*, *Bacillus Subtilis* ve *Staphylococcus sp.* kültürlerinden elde edilen alkalın proteaz enzimlerinin sıcaklık kararlılıkları incelenmiştir. En kararlı davranışı gösteren *Bacillus Mycoides* kültüründen elde edilen alkalın proteaz enzimi fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlanma, kovalent bağlanma ve tutuklama yöntemleri ile farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiştir.

Yaptıkları çalışmada çitosan fiziksel adsorpsiyon, Amberlit IR-120 iyonik bağlanma, çitin kovalent bağlanma ve %2'lik çapraz bağlı poliakrilamid de tutuklama yöntemi

ile immobilizasyonda en yüksek aktiviteleri göstermiştir. İmmobilizasyon verimleri sırasıyla %18.80, %15.02, %79.29 ve %76.55 olarak saptanmıştır.

Ayrıca bu çalışmada serbest enzimin ve en yüksek aktiviteleri gösteren immobilize enzimlerin özellikleri de incelenmiştir. Serbest enzimin aktivitesi 29.3 U/mg protein iken, immobilize enzimlerde aktivite taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında 5.5, amberlit IR-120 kullanıldığında 4.35, çitin kullanıldığında 22.9 ve poliakrilamid kullanıldığında 21.7 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Serbest enzimin optimum pH değeri 9 iken, immobilize enzimlerde optimum pH taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında 8.7, amberlit IR-120 kullanıldığında 10.0, çitin kullanıldığında 8.71 ve poliakrilamid kullanıldığında 9.7 olarak saptanmıştır.

Serbest enzimin optimum sıcaklığı 50°C iken, immobilize enzimlerde optimum sıcaklık taşıyıcı olarak çitosan, amberlit IR-120 ve poliakrilamid kullanıldığında 55°C, çitin kullanıldığında ise 50°C olarak bulunmuştur.

Enzimlerin pH 9.0'da 70°C'de 6 saat süreyle sıcaklık kararlılıkları incelendiğinde; serbest enzim aktivitesinin %21.2'sini korurken, immobilize enzimlerin aktivitelerinin taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında %81'ini, amberlit IR-120 kullanıldığında %81.9'unu, çitin kullanıldığında %39.1'ini ve poliakrilamid kullanıldığında %39.7'sini koruduğu gözlenmiştir.

Enzimlerin +5°C'de 5-6 ay süreyle saklama kararlılıkları incelendiğinde ise serbest enzim aktivitesinin %50'sini korurken, immobilize enzimlerin aktivitelerinin taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında %90.1'ini, amberlit IR-120 kullanıldığında %88.4'ünü, çitin kullanıldığında %100'ünü ve poliakrilamid kullanıldığında %87.9'unu koruduğu gözlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda farklı yöntemlerle değişik taşıyıcılar üzerine immobilize edilen enzimlerin serbest enzimin özelliklerini geliştirebileceği saptanmıştır [24].

1998 yılında Chellapandian'ın yapmış olduğu bir çalışmada ise, alkalın proteaz vermikulit üzerine glutaraldehit ile kovalent bağlanarak immobilize edilmiştir. Serbest enzim ile kıyaslandığında, immobilize edilmiş enzimin yüksek molekül ağırlıklı substratlara karşı daha düşük spesifik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, immobilize edilmiş enzimlerin daha geniş bir pH toleransına ve sıcaklık kararlılığına sahip oldukları gözlenmiştir.

Serbest enzimin ve immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ları sırasıyla 8.5 ve 10 olarak tespit edilmiştir. Enzimin pH kararlılığı incelendiğinde ise 30°C'de 2 saatlik immobilizasyon sonucunda kararlılığın pH 5-11 arasında arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık serbest haldeki alkalın proteazın pH 8'in altında daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, alkalın proteazı immobilize etmek yoluyla hem asidik hem de alkalın aralıklarındaki kararlılığının geliştirildiğini göstermiştir.

Optimum sıcaklık serbest ve immobilize edilmiş enzim için 60°C olarak tespit edilmiş ve yapılan çalışmada serbest haldeki enzim ile kıyaslandığında vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin sıcaklık kararlılığında artış olduğu gözlenmiştir. İmmobilize edilmiş alkalın proteazın 70°C'de aktivitesi %28 iken serbest alkalın proteazın aktivitesi %17 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca, enzimin saklama kararlılığının da immobilizasyon ile geliştirildiği saptanmıştır. İmmobilize edilmiş alkalın proteaz 4°C'de ve 25°C'de borat tamponunda 60 gün bırakıldığında sırasıyla aktivitelerinin %84'ünü ve %66'sını korudukları belirlenmiştir.

İmmobilize edilmiş alkalın proteazın tekrar kullanılabilirliği de kesikli veya sürekli reaktörde kullanımının öneminden dolayı araştırılmıştır. Bu doğrultuda, üst üste beş kullanımdan sonra orijinal aktivitenin %78'inin korunduğu tespit edilmiş ve bunun sebebi olarak da alkalın proteazın taşıyıcı üzerine glutaraldehit ile güçlü bir şekilde bağlanması gösterilmiştir [25].

2000 yılında Tanksale, Chandra, Rao, Deshpande'nin yaptıkları çalışmada *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen alkalın proteaz enzimi immobilize edilerek enzimin sıcaklık kararlılığı geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada proteaz enzimi poliamid üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon aşamaları 4°C ile 10°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmiş ve çapraz bağlanmanın da sağlanabilmesi amacıyla glutaraldehit kullanılmıştır. İmmobilizasyon koşullarının iyileştirilmesi amacıyla yapılan çalışmada, %1.76 (a/h) glutaraldehit kullanılarak yapılan 6 saatlik immobilizasyonda maksimum aktivite gözlenmiştir. pH'nın 8.0 ve sıcaklığın 50°C olduğu optimum koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda verim %58 olarak bulunmuştur.

Amacı alkalın proteaz enzimini immobilize ederek enzimin sıcaklık kararlılığı geliştirmek olan çalışmada, serbest enzimin optimum sıcaklığı 40°C iken, immobilize

enzimin optimum sıcaklığı 50°C olarak saptanmıştır. 60°C'de serbest enzim %5 aktivite gösterirken, immobilize enzim aktivitesinin %50'sini korumuştur. Ayrıca, immobilizasyon işlemi ile enzimin sıcaklık kararlılığı gösterdiği aralık da genişletilmiştir.

pH kararlılığı incelendiğinde ise pH 5 ile 12 arasında serbest enzimin de, immobilize enziminde aktivitelerinin %50'sini korudukları görülmüştür. Serbest enzim pH 7.5'te, immobilize enzim pH 8.0'de maksimum kararlılık göstermiştir. Serbest enzimin optimum pH değeri 10 iken, immobilize enzimin optimum pH'sı 8-9 arasındadır.

Çalışmada enzimlerin çeşitli deterjanlarla uyumlulukları da incelenmiştir. Enzimler Rin Shakti marka deterjanda 28°C'de 1 saat süreyle bekletilmiştir. Bu çalışma sonucunda, serbest enzim aktivitesinin %76'sını korurken, immobilize enzim aktivitesinin %84'ünü korumuştur. Ariel ve Surf Excel marka deterjanlarla yapılan çalışmalarda da enzimler aktivitelerinin %50'den fazlasını koruyabilmişlerdir.

Ayrıca, çalışma sonunda immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde, enzimin 22 reaksiyon sonunda aktivitesinde önemli bir düşüş olmadığı gözlenmiştir [26].

2002 yılında, Ferreira, Ramos, Dordick, Gil tarafından yapılan çalışmada, *Substilin carlsberg* mikroorganizmasından elde edilen ticari bir enzim olan Alkalaz 2T, silika taşıyıcılar üzerine kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir.

Yapılan çalışmada, ortalama gözenek çapı ile yüzey kimyasının kazeinin hidrolizini gerçekleştiren enzimin üzerindeki etkisi incelenmiş ve bu amaç doğrultusunda iki farklı set silika taşıyıcı kullanılmıştır. Bu taşıyıcılar amino terminal grubunu sunan S_{APTES} ve hidrosil grubunu sunan S_{TESPM-PHEMA}'dır. S_{APTES} üzerine immobilize olan protein yüzdesinin (%31-39), S_{TESPM-PHEMA} üzerine immobilize olan protein yüzdesinden (%62-71) daha az olduğu belirlenmiş fakat S_{APTES} üzerine immobilize edilmiş enzimin daha yüksek spesifik ve toplam aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. S_{TESPM-PHEMA} üzerine daha çok protein bağlanmasının S_{TESPM-PHEMA} üzerinde enzim immobilizasyonunu sağlayacak bağlama noktalarının çokluğundan kaynaklandığı belirlenmiştir. Öte yandan, aktivitenin S_{APTES} üzerine bağlı olan enzimin aktivitesinden daha düşük olmasının nedeninin bir takım sterik engellemeler (İmmobilize olmuş enzimin sıklığı veya PHEMA ağının kompleks oluşu) ve enzimin

taşıyıcı üzerine bağlanması sonucunda uğradığı konformasyonel değişiklikler olabileceği düşünülmüştür. Büyük gözenek boyutuna sahip silikalarda (S_{1000} , $130/1200 \text{ \AA}$) gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda daha küçük gözenek boyutuna sahip silikalarda (S_{300} , $130/550 \text{ \AA}$) gerçekleştirilen immobilizasyona nazaran daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca, S_{1000} ve S_{APTES} üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH'sı 8.0 ve optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir.

İmmobilize edilmiş enzimin saklanma kararlılığının serbest haldeki enziminkinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İmmobilize edilmiş Alkalaz bir ayın sonunda orijinal aktivitesinin %86'sını korurken, aynı saklama koşullarında serbest enzimin bir ay sonunda aktivitesinin ancak %32'sini koruyabildiği gözlenmiştir [27].

6. DENEYSEL ÇALIŞMA

6.1. Cihazlar

UV Spektrofotometre, UV mini 1240 SHIMADZU

Su Banyosu, Yamato Shaking Bath BW 400

Hassas Terazı, AND

Manyetik karıştırıcı, IKAMAY Janke-Kunkel

pH metre, WTW

Cam Malzemeler

6.2. Malzemeler

6.2.1. Taşıyıcılar

Çitin, SIGMA Chitin from crab shells practical grade (C₈H₁₃NO₅)_n

Çitosan, SIGMA Chitosan from crab shells min 85% deacetylated C₁₂H₂₄N₂O₉

Aljinat, Riedel-De Haen Alginic acid sodium salt

Ham zeolit

6.2.2. Enzim ve Diğer Malzemeler

Proteaz Enzimi, PELLUCIT FS

Glutaraldehit, BDH Chemicals Ltd.

Trikloroasetik asit (CCl₃COOH), Carlo Erba

Sodyum Asetat (CH₃COONa), Carlo Erba

Sodyum Hidroksit (NaOH), Carlo Erba

Süt Kazeini (C₈H₁₂O₃N₂), SIGMA Casein from bovine milk

Tris-HCl, Merck

Hidro Klorik Asit, Merck

Asetik Asit, Merck

Fosforik Asit, Riedel-De Haen

Borik Asit, Riedel-De Haen

Mavi Bant Süzgeç Kağıdı, Filtrak

Distile Su

6.2.3. Çözeltiler ve Tamponlar

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 7.2: 3 g. kazein 50 ml. 0.1N. NaOH çözeltisinde çözülür ve üzerine 200 ml. distile su ilave edilir. Kazein çözünene kadar karıştırılır. 20 ml. 0.5 M Tris-HCl (%50) pH 7.2 eklenir. Karışımın pH'ı 1 N. HCl ile 7.2 ye ayarlanır. Daha sonra distile su ile 500 ml.'ye tamamlanır.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 6.77: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 7'de hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 7.51: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 8'de hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 8.38: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 9'da hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 9.45: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 10'da hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 9.96: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 11'de hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 11.5: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 12'de hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 12.31: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 12.55'te hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

Kazein çözeltisi (%0.6 (a/h)) pH 12.82: 0.3 g. kazein 50 ml. pH 12.97'de hazırlanan B-R çözeltisinde çözülür.

0.1 M. Sodyum Asetat Çözeltisi: Molekül ağırlığı 136 g/mol olan sodyum asetatın 0.68 gramı 50 ml. distile suda çözülerek 0.1 M. 50 ml. sodyum asetat çözeltisi hazırlanır.

0.1 M. Asetik Asit Çözeltisi: Molekül ağırlığı 60 g/mol olan glacial asetik asidin 0.2857 ml'si 50 ml. distile suda çözülerek 0.1 M. 50 ml. asetik asit çözeltisi hazırlanır.

0.1 M. pH 5.0 Sodyum Asetat Tampon Çözeltisi: 30 ml. 0.1 M asetat tampon çözeltisi üzerine 0.1 M asetik asit çözeltisinden damla damla eklenerek sürekli karıştırılır ve pH 5.0'e gelinceye kadar devam edilir.

0.05 M. pH 7.2 Tris-HCl Çözeltisi: 7.88 g tris-HCl tartılır ve 0.1 N NaOH ile pH'ı 7.2'ye ayarlanır. Distile su ile 1L.'ye tamamlanır.

0.5 M. pH 7.2 Tris-HCl Çözeltisi: 79.8 g. tris-HCl tartılır ve 0.1 N NaOH ile pH'ı 7.2'ye ayarlanır. Distile su ile 1L.'ye tamamlanır.

0.5 M. pH 9.0 Tris-HCl Çözeltisi: 79.8 g. tris-HCl tartılır ve 10 N NaOH ile pH'ı 9.0'a ayarlanır. Distile su ile 1L.'ye tamamlanır.

0.5 M. pH 11.0 Tris-HCl Çözeltisi: 79.8 g. tris-HCl tartılır ve 10 N NaOH ile pH'ı 11.0'e ayarlanır. Distile su ile 1L.'ye tamamlanır.

0.1 M. pH 10.0 Tris-HCl Çözeltisi: 15.76 g. tris-HCl tartılır ve 10 N NaOH ile pH'ı 10.0'a ayarlanır. Distile su ile 1L.'ye tamamlanır.

TCA Çözeltisi (%50 (a/h)): 18 g trikloroasetik asit 36 ml distile suda çözülür.

TCA Karışım Çözeltisi: 17.97 g. trikloroasetik asit, 29.94 g. sodyum asetat ve 31.4 ml. asetik asit karıştırılır ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

0.1 N. NaOH Çözeltisi: 4 g. sodyum hidroksit distile suda çözülerek 1 L.'ye tamamlanır.

10 N. NaOH Çözeltisi: 400 g. sodyum hidroksit distile suda çözülerek 1 L.'ye tamamlanır.

1 N. HCl Çözeltisi: 8.3 ml. hidroklorik asit distile suda çözülerek 100 ml.'ye tamamlanır.

Britton-Robinson Tampon Çözeltileri:

Çözelti A: 2.71 ml. % 85'lik H_3PO_4 , 2.36 ml. asetik asit, 2.47 g. H_3BO_3 karıştırılır ve distile suyla 1 L.'ye tamamlanır.

Çözelti B: 8 g. NaOH 1 L. distile suda çözülür.

B-R Tampon Çözelti; pH 6: 100 ml. çözelti A, 42.5 ml. çözelti B ile karıştırılır.

B-R Tampon Çözelti; pH 7: 100 ml. çözelti A, 52.5 ml. çözelti B ile karıştırılır.

B-R Tampon Çözelti; pH 8: 100 ml. çözelti A, 60 ml. çözelti B ile karıştırılır.

B-R Tampon Çözelti; pH 9: 100 ml. çözelti A, 67.5 ml. çözelti B ile karıştırılır.

B-R Tampon Çözelti; pH 10: 100 ml. çözelti A, 80 ml. çözelti B ile karıştırılır.

B-R Tampon Çözelti; pH 11: 100 ml. çözelti A, 85 ml. çözelti B ile karıştırılır.

B-R Tampon Çözelti; pH 11.82: 100 ml. çözelti A, 95 ml. çözelti B ile karıştırılır.

6.3. Metotlar

6.3.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için enzim çözeltisi 30°C'de %0.6'lık kazein çözeltisi ile reaksiyona sokulur. Bunun için 2.5 ml. kazein çözeltisi 30°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilir. Üzerine 0.5 ml. enzim çözeltisi (pH 7.2'deki tris-HCl tamponunda) ya da 0.5 ml enzim immobilize edilmiş olduğu taşıyıcı miktarı eklenerek 30°C'de 10 dakika daha bekletilir. Daha sonra da reaksiyonu durdurmak için 2.5 ml. trikloroasetik asit (TCA) karışım çözeltisi eklenir ve 30°C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilir. Su banyosu bütün aşamalarda 150 rpm'de karıştırılır. Şahit numune hazırlanırken de aynı işlemler enzim çözeltisi yerine distile su kullanılarak yapılır. Reaksiyon karışımı Whatman no:1 filtre kağıdı kullanılarak süzülür. Çözeltideki tirozin miktarı UV spektrometrede 275 nm'deki absorbans değerine bakılarak belirlenir [6]. Standart koşullar altında dakikada 1 µg tirozini dönüşüme uğratan enzim aktivitesine 1 U (ünite) denir.

1 U/ml = 1 µg tirozin / dak.ml.

Tirozin standart eğrisi TCA ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki tirozin

çözeltilerinin 275 nm dalga boyundaki absorbanslarının belirlenmesi ile elde edilir.

Tirozin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek tirozin

standart eğrisi hazırlanır (Şekil B.1).

Absorbans Değerlerinin Aktiviteye Dönüştürülmesi:

$$\text{Aktivite (U/ml)} = (\text{Abs (275 nm)}) / \text{Tirozin eğrisinin eğimi} \times (1/t) \times (V_1/V_2) \times \text{seyreltme oranı} \quad (6.1)$$

Abs (275 nm): Numunenin 275 nm dalga boyundaki absorbans değeri

t: Reaksiyon süresi (dakika),

V₁: Reaksiyon hacmi,

V₂: Enzim hacmi

$$Aktivite (U / ml) = \frac{Abs(275nm)}{0.0083} \times \frac{1}{10} \times \frac{V_1}{V_2} \times seyreltme \text{ oranı} \quad (6.2)$$

$$1U/mg \text{ taşıyıcı} = (U/ml \text{ enzim}) / (mg \text{ taşıyıcı} / ml \text{ enzim}) \quad (6.3)$$

6.3.2. Verimin Hesaplanması

İmmobilizasyon işlemleri sonucunda iki tür verim hesaplanabilmektedir. Bu verimler aktivite geri kazanımı (AGK) ve etkinlik oranı (EO) olarak isimlendirilmektedir [28].

$$AGK = \frac{U_{imm}}{U_0} \times 100 \quad (6.4)$$

$$EO = \frac{U_{imm}}{U_0 - U_R} \times 100 \quad (6.5)$$

U_{imm} : İmmobilize olmuş (bağlanmış) enzim

U_0 : Başlangıçtaki enzim

U_R : Bağlanmamış enzim

6.3.3. Serbest Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi

6.3.3.1. pH Kararlılığının ve Optimum pH'nın Belirlenmesi

Serbest enzimin pH kararlılığı relatif aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır. 50 µl enzim üzerine 150 µl farklı pH'lardaki B-R tampon çözeltileri eklenir ve 30°C'de 20 saat bekletilir. Daha sonra 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) ile 1 ml'ye seyreltilir. Referans olarak ise 50 µl enzim üzerine 150 µl 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) tampon çözeltisi eklenir, 4°C'de 20 saat bekletilir ve aynı tampon ile 1 ml'ye seyreltilir [6].

Serbest enzimin optimum pH değeri 30°C'de pH 6.0 ile 12.0 arasında proteaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır. 50 µl enzim 950 µl 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) ile 1 ml'ye seyreltilir. Enzimlere farklı pH'lardaki B-R tamponunda hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltileriyle 30°C'de reaksiyon yapılarak enzim aktiviteleri ölçülür. Böylece serbest enzimin optimum pH'sı belirlenmiş olur [6].

6.3.3.2. Sıcaklık Kararlılığının ve Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Serbest enzimin sıcaklık kararlılığı relatif aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır. 50 µl enzim 950 µl 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) ile 1 ml'ye seyreltilir. Enzim 30°C ile 80°C arasındaki sıcaklıklarda yarım saat bekletilir. Daha sonra 5 dakika süreyle buza konulur ve 30°C'de reaksiyon yapılır. Relatif aktivitenin hesaplanmasında 30°C'deki enzimin aktivitesi referans olarak alınır [6].

Serbest enzimin optimum sıcaklığı proteaz aktivitesinin ölçümü ile belirlenir. 50 µl enzim 950 µl 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) ile 1 ml'ye seyreltilir. Enzimlere 30°C ile 80°C arasındaki farklı sıcaklıklarda reaksiyon yapılarak enzim aktiviteleri ölçülür. Böylece serbest enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiş olur [6].

6.3.4. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Proteaz Enziminin Çitosan Üzerine İmmobilizasyonu

Proteaz enziminin çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonunda verimi arttırmak amacıyla farklı immobilizasyon süreleri ve glutaraldehit yüzdeleri denenmiştir. İmmobilizasyon %2.5 glutaraldehit içeren asetat tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilirken immobilizasyon süresi 1, 2 ve 4 saat olarak denenmiştir. İmmobilizasyon süresi belirlendikten sonra, %1.0 glutaraldehit içeren asetat tampon çözeltisi kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir.

Kovalent bağlanma yöntemiyle proteaz enziminin çitosan üzerine immobilizasyonu için öncelikle 0.1 M. pH 5.0'te hacimce %1.0 glutaraldehit içeren 5 ml. asetat tampon çözeltisi hazırlanır. 0.4 g. çitosan hazırlanan tampon çözeltiyle 30°C'lik su banyosunda 2 saat karıştırılır. Çözünen çitosana 1 ml. 0.1 M. NaOH eklenerek çökelme sağlanır. Filtrasyonla toplanan çökelti 6 ml. 30°C'deki distile su ile yıkanarak glutaraldehit fazlası uzaklaştırılır. Bu şekilde aktive edilmiş olan çitosan üzerine 0.4 ml. enzim ve 0.6 ml. tris-HCl (0.5 M ve pH 7.2) kullanılarak hazırlanan 400 U enzim çözeltisi eklenir. Çitosan ve enzim çözeltisi 2 saat boyunca 30°C'lik su banyosunda 150 rpm'de karıştırıldıktan sonra distile su ile yıkanarak bağlanmamış enzim uzaklaştırılır.

6.3.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Proteaz Enziminin Çitin Üzerine İmmobilizasyonu

Proteaz enziminin çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu sonucunda verimi arttırmak amacıyla immobilizasyon süresi, glutaraldehit yüzdesi ve tampon çözeltinin pH değerleri değiştirilmiştir.

Öncelikle glutaraldehit yüzdesinin immobilizasyon verimine etkisini görmek amacıyla immobilizasyon %1.0 ve %2.5 glutaraldehit içeren asetat tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tris-HCl çözeltisinin pH değerinin immobilizasyon verimine etkisini görmek amacıyla 0.5 M tris-HCl çözeltisinin pH değerleri 7.2, 9.0 ve 11.0 iken immobilizasyon gerçekleştirilmiştir.

Bütün çalışmalarda immobilizasyon süresi 1, 2, 4 ve 6 saat olarak denenerek immobilizasyon süresinin verime etkisi belirlenmiştir.

Kovalent bağlanma yöntemiyle proteaz enziminin çitin üzerine immobilizasyonu için öncelikle 0.1 M. pH 5.0'te hacimce %2.5 glutaraldehit içeren 5 ml. asetat tampon çözeltisi hazırlanır. 0.4 g. çitin hazırlanan tampon çözeltiyle 30°C'lik su banyosunda 2 saat karıştırılır. Çözünen çitine 1 ml. 0.1 M. NaOH eklenerek çökeltme sağlanır. Filtrasyonla toplanan çökelti 6 ml. 30°C'deki distile su ile yıkanarak glutaraldehit fazlası uzaklaştırılır. Böylece taşıyıcı olarak kullanılan çitin aktive edilmiş olur. Daha sonra çitin üzerine 0.4 ml. enzim ve 0.6 ml. tris-HCl (0.5 M ve pH 11) kullanılarak hazırlanan 400 U enzim çözeltisi eklenir. Çitin ve enzim çözeltisi 2 saat boyunca 30°C'lik su banyosunda 150 rpm'de karıştırıldıktan sonra distile su ile yıkanarak bağlanmamış enzim uzaklaştırılır.

6.3.6. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle Proteaz Enziminin Aljinat ve Ham Zeolit Üzerine İmmobilizasyonu

Taşıyıcı olarak seçilmiş aljinat ve ham zeolitten 100'er mg. tartılır. Taşıyıcıların üzerlerine 0.1 ml. enzim ve 0.9 ml. tris-HCl (0.1 M ve pH 10.0) kullanılarak hazırlanan 100 U'lık enzim çözeltisi eklenir. Taşıyıcı olarak kullanılan aljinat ve ham zeolit eklenen proteaz çözeltileriyle karıştırılarak +4°C'de belirli bir süre bekletilir. İmmobilizasyon işlemi sonunda, taşıyıcı enzim karışımları 3 ml. Tris-HCl çözeltisi

(0.1 M. pH 10.0) ile yıkanır. İmmobilizasyon süresini belirleyebilmek için her iki taşıyıcı için de immobilizasyon işlemleri 16, 20 ve 24 saat süreyle gerçekleştirilir.

6.3.7. İmmobilize Enzimin Özelliklerinin Belirlenmesi

6.3.7.1. pH Kararlılığının ve Optimum pH'nın Belirlenmesi

İmmobilize enzimin pH kararlılığı relatif aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır. İmmobilize enzim üzerine 3 ml. farklı pH'lardaki B-R tampon çözeltileri eklenir ve 30°C'de 20 saat bekletilir. Daha sonra 3 ml. 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) ile yıkanır ve süzülür. Referans olarak ise aynı şekilde hazırlanan immobilize enzim üzerine 3 ml. 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) tampon çözeltisi eklenir, 4°C'de 20 saat bekletilir, aynı tampon ile yıkanır ve süzülür.

İmmobilize enzimin optimum pH değeri 30°C'de pH 6.0 ile 12.0 arasında proteaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır. İmmobilize enzimlere farklı pH'lardaki B-R tamponunda hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltileriyle 30°C'de reaksiyon yapılarak enzim aktiviteleri ölçülür. Böylece immobilize enzimlerin optimum pH değerleri belirlenmiş olur.

6.3.7.2. Sıcaklık Kararlılığının ve Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

İmmobilize enzimin sıcaklık kararlılığı relatif aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır. İmmobilize enzimler 30°C ile 80°C arasındaki sıcaklıklarda yarım saat bekletilir. Daha sonra 5 dakika süreyle buza konulur ve 30°C'de reaksiyon yapılır. Relatif aktivitenin hesaplanmasında 30°C'deki enzimin aktivitesi referans olarak alınır.

İmmobilize enzimin optimum sıcaklığı proteaz aktivitesinin ölçümü ile belirlenir. İmmobilize enzimlere 30°C ile 80°C arasındaki farklı sıcaklıklarda reaksiyon yapılarak enzim aktiviteleri ölçülür. Böylece immobilize enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiş olur.

6.3.7.3. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi

İmmobilizasyon işleminin en önemli avantajlarından biri de enzimin bir katıya tutundurulması sağlanarak enzimin tekrar kullanılabilir bir hale getirilmesidir.

Tekrar kullanılabilirliğin belirlenebilmesi için immobilize enzim 30°C'de kazein çözeltisi ile reaksiyona sokulur, reaksiyon sonunda aktivitesi hesaplanır. Daha sonra bu enzim immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan uygun pH ve molaritedeki tris-

HCl tampon çözeltisiyle yıkanarak tekrar 30°C'de kazein çözeltisi ile reaksiyona sokulur ve reaksiyon sonunda aktivitesi hesaplanır. Bu işlem arka arkaya tekrarlanır ve enzimin aktivitesini kaçınıcı kullanımdan sonra kaybetmeye başladığı belirlenir.

6.3.7.4. Deterjan Uyumluluğunun Belirlenmesi

İmmobilize enzimin deterjan uyumluluğunun belirlenmesi için öncelikle 0.7 g. deterjan 100 ml. distile suda çözülerek %0.7'lik deterjan çözeltisi hazırlanır. İmmobilize enzimlere 1'er ml. deterjan çözeltisi eklenir. Enzimler 60°C'de 0, 1, 2 ve 3'er saat bekletilir. Bu süreler sonunda enzim 30°C'de kazein çözeltisi ile reaksiyona sokulur, reaksiyon sonunda aktivitesi hesaplanır. Deterjan uyumluluğunun belirlenmesinde referans olarak kullanılmak üzere deterjan çözeltisi eklenmemiş immobilize enzimlere de aynı işlem uygulanır.

6.3.7.5. Raf Ömrünün Belirlenmesi

İmmobilize enzimin raf ömrünü belirlemek için, belirli sayıda enzim taşıyıcıya immobilize edildikten sonra tampon çözelti ile yıkayıp süzülür ve kurutularak +4°C'de 3 ay süreyle depolanır. 3 ay içinde aralıklarla enzimlerin aktivite ölçülür. Bu işlem sonunda, enzimin 3 ayda ne kadar aktivite kaybettiği ve aktivitesini kaç ay süreyle koruyabildiği belirlenir.

7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

7.1. İmmobilize Proteaz Enzimleri İçin Verimin Hesaplanması

7.1.1. Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması

Proteaz enziminin çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonunda, immobilizasyon süresini belirlemek amacıyla süre 1, 2 ve 4 saat olarak denenmiştir. %2.5 (h/h) glutaraldehit içeren asetat tampon çözeltisi kullanıldığı durumda, en yüksek verim 4 saatlik immobilizasyonda elde edilmiş, ancak 2 saatlik immobilizasyonda elde edilen verime çok yakın olduğundan çalışmalara immobilizasyon süresi 2 saat alınarak devam edilmiştir. Daha sonra immobilizasyon %1.0 (h/h) GA içeren asetat tampon çözeltisi kullanılarak tekrarlanmıştır. %1.0 (h/h) GA içeren asetat tampon çözeltisi kullanıldığında verimin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Proteaz enzimi çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilirken Tablo 7.1'deki parametreler kullanılmıştır. Elde edilen verimler Tablo 7.1'te belirtilmektedir.

Tablo 7.1. Proteaz Enziminin Çitosan Üzerine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Immobilizasyonunda Verim ($U_0 = 1.0000$ U/mg taşıyıcı)

GA (%)	pH	İmmobilizasyon Süresi (saat)	U_{imm} (U/mg taşıyıcı)	U_R (U/mg taşıyıcı)	AGK (%)	EO (%)
2.5	7.2	1	0.5078	0.0400	50.78	52.89
2.5	7.2	2	0.6966	0.0343	69.66	72.14
2.5	7.2	4	0.7099	0.0305	70.99	73.22
1.0	7.2	2	0.7977	0.0191	79.77	81.32

pH 7.2'de, %1.0 (h/h) GA içeren asetat tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen 2 saatlik immobilizasyon sonucunda AGK %80 ve EO %81 olarak bulunmuştur.

Naby, Ismail, Ahmed ve Fattah (1997) çalışmalarında *Bacillus Mycoides*'ten elde ettikleri proteaz enzimini kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan üzerine immobilize etmiş ve %77.41 verim elde etmişlerdir [24].

7.1.2. Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması

Proteaz enziminin çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu sonucunda verimi arttırmak amacıyla öncelikle taşıyıcının (çitin) aktive edilmesi işlemi hacimce %1.0 ve %2.5 GA içeren asetat tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 7.2’de de görüldüğü gibi GA yüzdesi %1.0’dan %2.5’e çıkartıldığında verimde az bir artış sağlamaktadır. Bu nedenle verimi daha çok arttırmak amacıyla enzim çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan 0.5 M tris-HCl çözeltisinin pH değerleri 7.2, 9.0 ve 11.0 iken immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Kullanılan 0.5 M tris-HCl çözeltisinin pH değeri 11.0 iken en yüksek verim elde edilmiştir. Bütün çalışmalarda immobilizasyon süresi 1, 2, 4 ve 6 saat olarak denenmiştir. En yüksek verim 4 saatlik immobilizasyonda elde edilmiş, ancak 2 saatlik immobilizasyonda elde edilen verime çok yakın olduğundan çalışmalara immobilizasyon süresi 2 saat alınarak devam edilmiştir. İmmobilizasyon için uygun koşulların sağlanması amacıyla yapılan çalışmada, değişen koşullar ve elde edilen verimler Tablo 7.2’de gösterilmektedir.

Tablo 7.2. Proteaz Enziminin Çitin Üzerine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim ($U_0 = 1.0000$ U/mg taşıyıcı iken)

GA (%)	pH	İmmobilizasyon Süresi (saat)	U_{imm} (U/mg taşıyıcı)	U_R (U/mg taşıyıcı)	AGK (%)	EO (%)
1.0	7.2	1	0.1640	0.0232	16.40	16.79
		2	0.2626	0.0417	26.26	27.40
		4	0.2684	0.0533	26.84	28.35
		6	0.193	0.0348	19.30	20.00
1.0	9.0	1	0.3073	0.1113	30.73	34.58
		2	0.4100	0.1368	41.00	47.50
		4	0.4166	0.1392	41.66	48.40
		6	0.2841	0.0974	28.41	31.48
1.0	11.0	1	0.5608	0.0580	56.08	59.53
		2	0.8167	0.0626	81.67	87.13
		4	0.8234	0.0673	82.34	88.27
		6	0.5293	0.1113	52.93	59.56

Tablo 7.2. Proteaz Enziminin Çitin Üzerine Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim ($U_0 = 1.0000$ U/mg taşıyıcı iken) (Devam)

2.5	7.2	1	0.1756	0.0742	17.56	18.97
		2	0.2841	0.0951	28.41	31.40
		4	0.2924	0.1160	29.24	33.08
		6	0.1996	0.0649	19.96	21.35
2.5	9.0	1	0.3222	0.1183	32.22	36.54
		2	0.4241	0.1392	42.41	49.27
		4	0.4307	0.1438	43.07	50.31
		6	0.3661	0.1693	36.61	44.07
2.5	11.0	1	0.5848	0.0881	58.48	64.13
		2	0.8507	0.0394	85.07	88.56
		4	0.8598	0.0278	85.98	88.44
		6	0.5883	0.1020	55.83	62.17

pH 11.0'de, %2.5 (h/h) GA içeren asetat tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen 2 saatlik immobilizasyon sonucunda AGK %85 ve EO %89 olarak bulunmuştur.

Naby, Ismail, Ahmed ve Fattah (1997) çalışmalarında *Bacillus Mycooides*'ten elde ettikleri proteaz enzimini kovalent bağlanma yöntemiyle çitin üzerine immobilize etmiştir. Çalışmalarında çitini aktive etmek amacıyla %1.0 (h/h) GA içeren asetat tampon çözeltisi kullanmış ve 6 saatlik immobilizasyon gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda %79.29 verim elde etmişlerdir [24].

7.1.3. Ham Zeolit Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması

Proteaz enziminin ham zeolit üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunda, immobilizasyon süresi 16, 20 ve 24 saat olarak denenmiştir.

pH 10.0'da gerçekleştirilen 24 saatlik immobilizasyon sonucunda en yüksek verim elde edilmiştir. Bu koşullarda; AGK %79 ve EO %80 olarak bulunmuştur. Farklı immobilizasyon sürelerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verimler (AGK ve EO değerleri) Tablo 7.3'te belirtilmektedir.

Tablo 7.3. Proteaz Enziminin Ham Zeolit Üzerine Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim ($U_0 = 1.0000$ U/mg taşıyıcı iken)

pH	İmmobilizasyon Süresi (saat)	U_{imm} (U/mg taşıyıcı)	U_R (U/mg taşıyıcı)	AGK (%)	EO (%)
10.0	16	0.1696	0.0159	16.96	17.23
10.0	20	0.4996	0.0490	49.96	52.53
10.0	24	0.7912	0.0159	79.12	80.40

Xing, Li, Tian ve Ye yaptıkları çalışmada α -kimotripsin enzimini zeolit üzerine immobilize ederek %69 verim elde etmişlerdir [21].

7.1.4. Aljinat Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteaz Veriminin Hesaplanması

Proteaz enziminin aljinat üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunda, immobilizasyon süresi 16, 20 ve 24 saat olarak denenmiştir. Elde edilen verimler Tablo 7.4'te belirtilmektedir.

Tablo 7.4. Proteaz Enziminin Aljinat Üzerine Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilizasyonunda Verim ($U_0 = 1.0000$ U/mg taşıyıcı iken)

pH	İmmobilizasyon Süresi (saat)	U_{imm} (U/mg taşıyıcı)	U_R (U/mg taşıyıcı)	AGK (%)	EO (%)
10.0	16	0.4559	0.0212	45.59	46.58
10.0	20	0.8323	0.0053	83.23	83.67
10.0	24	0.6839	0.0331	68.39	70.73

pH 10.0'da gerçekleştirilen 20 saatlik immobilizasyon sonucunda en yüksek verim elde edilmiştir. Bu koşullarda, AGK %83 ve EO %84 olarak bulunmuştur.

Naby, Ismail, Ahmed ve Fattah (1997) çalışmalarında *Bacillus Mycooides*'ten elde ettikleri proteaz enzimini fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle çitosan üzerine immobilize ederek %18.8 verim elde etmişlerdir [24].

7.2. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi

Kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan ve çitin üzerine, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilmiş proteaz enzimlerinin pH ve sıcaklık kararlılıkları, optimum pH ve sıcaklıkları, tekrar kullanılabilirlik dereceleri, deterjan uyumlulukları ve raf ömürleri belirlenmiştir.

7.2.1. pH Kararlılığı

Serbest proteaz enziminin kararlılığı pH 6.0 ile 12.0 değerleri arasında incelenmiştir. Serbest enzimin farklı pH değerlerindeki relatif aktiviteleri Tablo 7.5'te görülmektedir.

Tablo 7.5 ve Şekil 7.1'de de görüldüğü gibi pH 6.0'da %18'lik aktiviteye sahip olan serbest proteaz enziminin aktivitesi pH 7.0'de %80'e çıkmaktadır. pH 7.0 ile 11.0 arasında serbest enzimin aktivitesinde yaklaşık olarak %10'luk bir düşüş gerçekleşmekte, ancak serbest enzimin relatif aktivitesi bu aralıkta %70'in altına düşmemektedir.

Yapılan deneyler sonucunda serbest proteaz enziminin, pH 7.0 ile 11.0 arasında kararlılığını büyük ölçüde koruduğu gözlemlenmektedir, ancak enzimin kararlılığı pH 11.0'de bir kırılma yaşamıştır, pH 11.0 ile 12.0 aralığında ise serbest enzim ani bir aktivite kaybına uğramış ve pH 12.0'de aktivitesi %7'ye düşmüştür.

Kovalent bağlanma yöntemi ile çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin pH kararlılıkları pH 6.0 ile 13.0 arasında incelenmiştir. Immobilize enzimlerin farklı pH değerlerindeki relatif aktiviteleri Tablo 7.5'te görülmektedir.

Tablo 7.5. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile Immobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı

pH	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitosana İmmobilize Edilen Enzim	Çitine İmmobilize Edilen Enzim
6.0	18.25	22.30	40.59
7.0	80.29	33.83	57.01
8.0	79.56	80.44	66.93
9.0	72.99	81.18	75.83
10.0	70.07	82.66	88.71
11.0	70.80	69.24	89.74
12.0	7.30	67.97	87.00
12.6	-	2.01	75.14
13.0	-	-	68.64

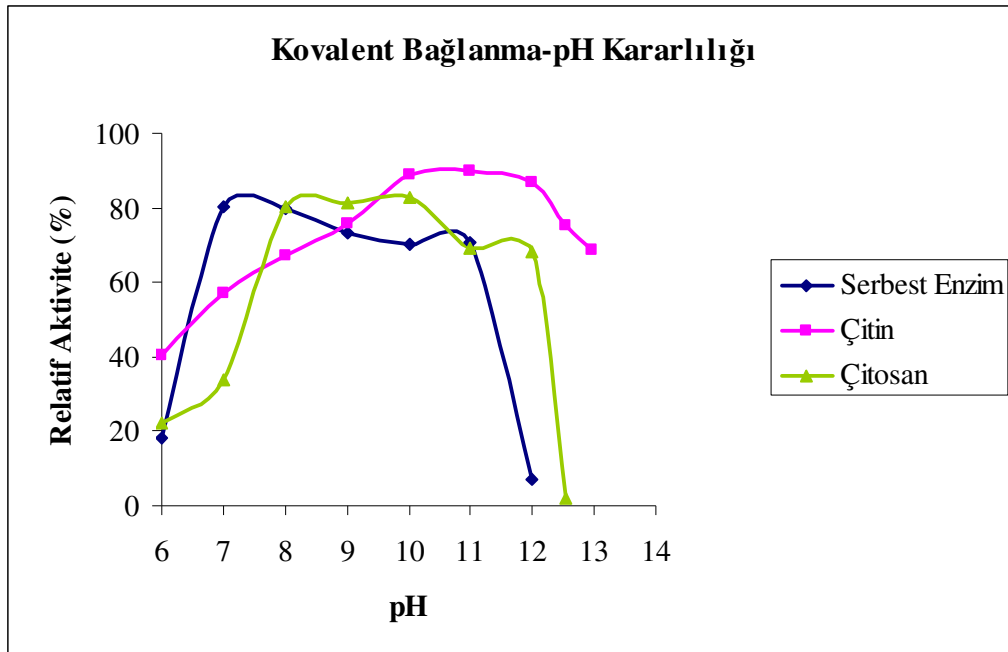
Tablo 7.5 ve Şekil 7.1'de de görüldüğü gibi yapılan deneyler sonucunda çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enziminin pH 8.0 ile 10.0 arasında, çitin üzerine

immobilize edilen proteaz enzimin pH 10.0 ile 12.0 arasında kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir.

Çitosana immobilize edilen enzim serbest enzimden daha dar bir alanda kararlılığını korumaktadır, ancak immobilize enzimin pH 6.0 ve 12.0 değerlerindeki relatif aktivitesi serbest enzimden yüksektir. İmmobilize enzim pH 12.0'de maksimum aktivitesinin %15'ini kaybetmektedir, relatif aktivitesi %68'dir, ancak serbest enzimin bu değerdeki relatif aktivitesi %7 civarındadır.

Çitine immobilize edilen proteaz enziminin pH 6.0'da ve pH 10.0-13.0 aralığındaki relatif aktivitesi, serbest enzimin ve çitosana immobilize edilen enzimin relatif aktivitesinden daha yüksektir. Çitine immobilize edilen enzim pH 13.0'te maksimum aktivitesinin %20'sini kaybetmektedir, ancak bu değerde bile relatif aktivitesi %68'in altına düşmemektedir.

Kovalent bağlanma yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin, serbest proteaz enziminden daha yüksek pH değerlerinde çalışmaya elverişli olduğu, ayrıca kararlılık gösterdikleri bölgelerde immobilize enzimlerin serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır.



Şekil 7.1. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin pH kararlılığı pH 6.0 ile 12.0 arasında incelenmiştir. Immobilize enzimlerin farklı pH değerlerindeki relatif aktiviteleri Tablo 7.6'da görülmektedir.

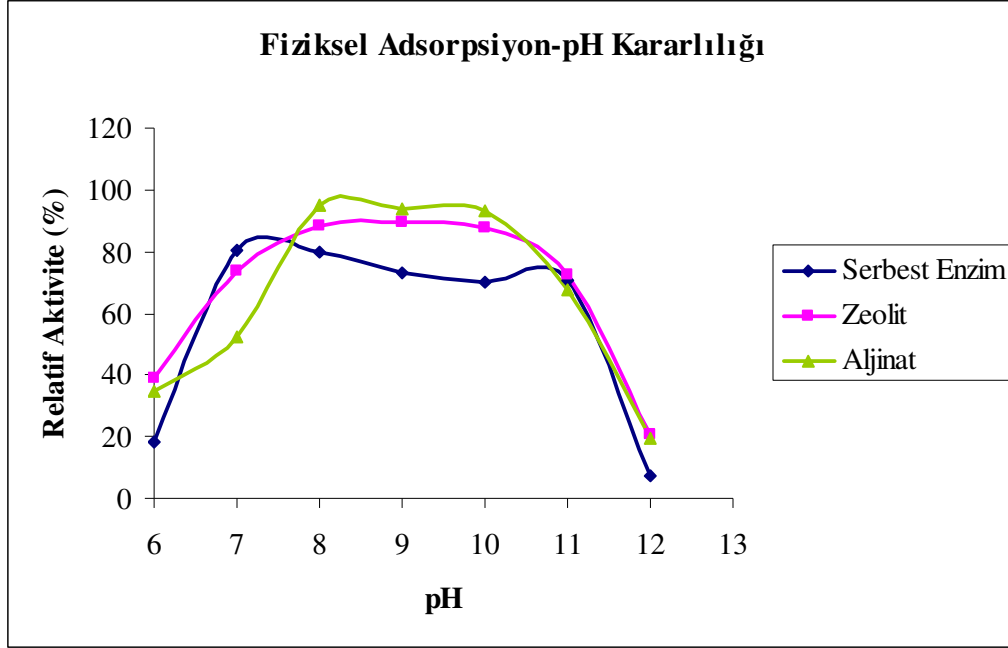
Tablo 7.6. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile Immobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı

pH	Relatif Aktivite (%)	
	Ham Zeolite Immobilize Edilen Enzim	Aljinata Immobilize Edilen Enzim
6.0	38.70	34.97
7.0	73.46	52.45
8.0	88.36	95.10
9.0	89.55	93.96
10.0	87.67	93.46
11.0	72.77	67.48
12.0	20.72	19.28

Tablo 7.6 ve Şekil 7.2'de de görüldüğü gibi yapılan deneyler sonucunda ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin pH kararlılığı bakımından aynı karakteristiği gösterdikleri ve pH 8.0 ile 10.0 arasında kararlılıklarını korudukları gözlemlenmektedir.

Ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimleri, serbest enzimden daha dar bir alanda kararlılıklarını korumaktadır, ancak immobilize enzimlerin pH kararlılığı gösterdikleri bölgede serbest enzimden yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Serbest enzim bu pH aralığında maksimum %79 relatif aktivite gösterirken, ham zeolit üzerine immobilize edilen enzim %90, aljinat üzerine immobilize edilen enzim ise %95 relatif aktivite göstermektedir. Ayrıca, ham zeolit üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi pH 7.0 ve 11.0'de de %70'in altına düşmemektedir. Immobilize enzimlerin kararlılığı, serbest enzimde de olduğu gibi pH 11.0'de bir kırılma yaşamıştır, pH 11.0-12.0 aralığında ise ani bir aktivite kaybına uğramış ve pH 12.0'de ham zeolit üzerine immobilize edilen proteazın aktivitesi serbest enzim gibi %7'ye, aljinat üzerine immobilize edilen proteazın aktivitesi de %19'a düşmüştür.

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin, serbest proteaz enziminden farklı pH değerlerinde çalışmaya uygun olmadıkları, ancak kararlı oldukları bölgelerde immobilize enzimlerin serbest enzimden çok daha yüksek aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.



Şekil 7.2. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin pH Kararlılığı

Yapılan pek çok çalışmada enzimler immobilize edilerek özellikleri iyileştirilmeye çalışılmıştır. Hayashi ve Ikada çalışmalarında çitosan kürecikleri üzerine immobilize ettikleri proteaz enzimin serbest enzimden daha geniş pH aralığında kararlı olduğunu saptamışlardır [23].

Chellapandian çalışmasında vermikulit üzerine immobilize ettiği proteaz enziminin serbest enzime göre hem asidik, hem de bazik ortamda daha yüksek aktivite gösterdiğini saptamıştır [25].

7.2.2. Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarında önemli bir kriter olduğundan bu konuda pek çok çalışma yapılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimler deaktive olurken, immobilize enzimlerde taşıyıcı genellikle yüksek sıcaklığa karşı koruyucu durumuna gelmektedir. İmmobilizasyon işlemi ile

enzimlerin biçimsel esnekliği değişmektedir. İmmobilizasyon, enzimin sertliğini arttırmaktadır, bu da genellikle enzimin yükselen sıcaklığa karşı kararlılığın artmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle bir çok çalışmada immobilizasyon işlemi sonucunda enzimin sıcaklık kararlılığında gelişme görülmektedir [29].

Serbest proteaz enziminin 30°C ile 80°C arasında sıcaklık kararlılığı incelenmiştir. Serbest enzimin farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekletilmesi ve ardından hızlı bir şekilde soğutulması sonucu elde edilen relatif aktiviteleri Tablo 7.7’de görülmektedir.

Tablo 7.7 ve Şekil 7.3’te de görüldüğü gibi serbest enzim 30°C ile 50°C arasında kararlılığını korumaktadır, ancak 60°C’de relatif aktivitesi %63’e düşmektedir, 70°C ve 80°C’de ise relatif aktivitesi %5’e kadar düşmektedir. Yapılan çalışma sonucunda serbest proteaz enzimin sıcaklık kararlılığında 50°C’den sonra bir kırılma olduğu ve özellikle 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda çalışmak için uygun olmadığı belirlenmiştir.

İmmobilizasyon işlemiyle proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı da iyileştirilmeye çalışılmıştır. İmmobilizasyon işlemi sonucunda enzimin sıcaklık kararlılığı geliştirilebilir, sabit kalabilir ya da düşebilir [25].

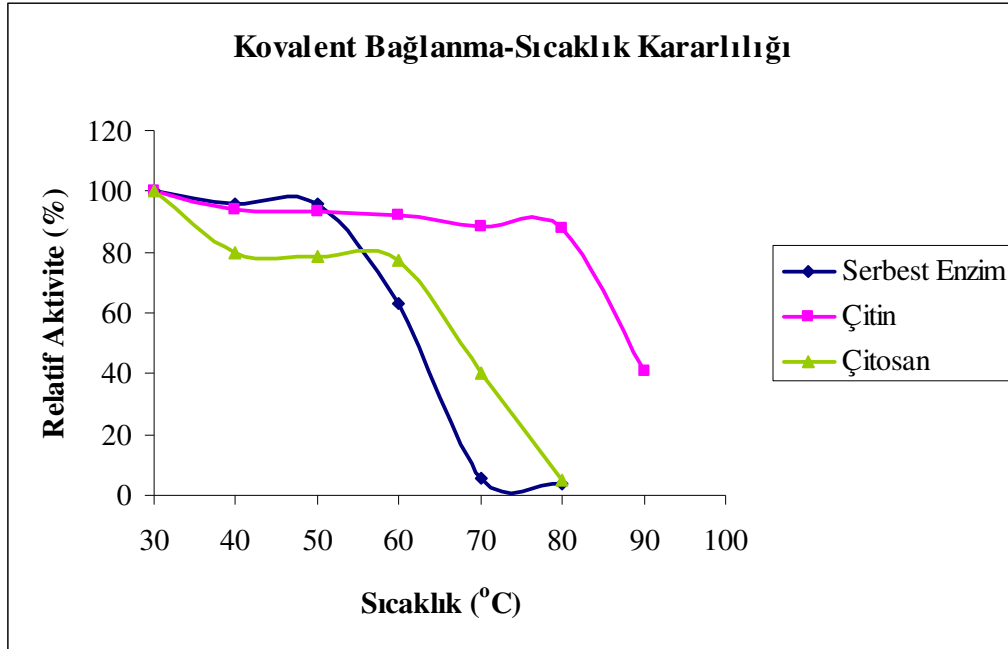
Kovalent bağlanma yöntemi ile çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin sıcaklık kararlılıkları 30°C ile 80°C arasında incelenmiştir. İmmobilize enzimlerin farklı sıcaklıklardaki relatif aktiviteleri Tablo 7.7’te görülmektedir.

Tablo 7.7. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitosana İmmobilize Edilen Enzim	Çitine İmmobilize Edilen Enzim
30	100.00	100.00	100.00
40	95.79	80.06	94.23
50	96.12	78.27	93.36
60	63.11	77.53	92.20
70	5.50	40.19	88.74
80	3.88	5.17	87.87
90	-	-	40.90

Çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen proteaz enzimi 40°C ile 60°C arasında kararlılığını korumaktadır. 70°C'de relatif aktivitesinin %40'ını, 80°C'de ise aktivitesinin sadece %5'ini koruyabilmektedir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize enzimin 60°C ve 70°C'deki relatif aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir, ancak çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimi de serbest enzim gibi 80°C'de düşük aktiviteye sahiptir ve 80°C'de çalışmak için uygun değildir.

Çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen proteaz enzimi 30°C ile 80°C arasında kararlılığını korumaktadır. Çitin üzerine immobilize edilen enzim 80°C'de aktivitesinin sadece %12'sini kaybetmektedir. Serbest enzimden ve çitosan üzerine immobilize edilen enzimden farklı olarak çitin üzerine immobilize edilen enzimin 80°C'deki relatif aktivitesi oldukça yüksektir. Şekil 7.3'te de görüldüğü gibi, çitin üzerine immobilize edilen proteaz enziminin sıcaklık kararlılığı grafiğinde 80°C'den sonra bir kırılma görülmekte ve 80°C'de %87 olan relatif aktivitesi 90°C'de %40'a düşmektedir.



Şekil 7.3. Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarında en önemli kriterlerden biridir. İmmobilize enzimler, özellikle de kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimler, sıcaklığa karşı serbest enzimlerden daha dirençlidirler [23].

Kovalent bağlanma yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin, özellikle çitin üzerine immobilize edilen proteaz enziminin, serbest proteaz enziminden daha yüksek sıcaklık değerlerinde çalışmaya elverişli olduğu saptanmıştır.

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin sıcaklık kararlılıkları 30°C ile 80°C arasında incelenmiştir. Immobilize enzimlerin farklı sıcaklıklardaki relatif aktiviteleri Tablo 7.8'de görülmektedir.

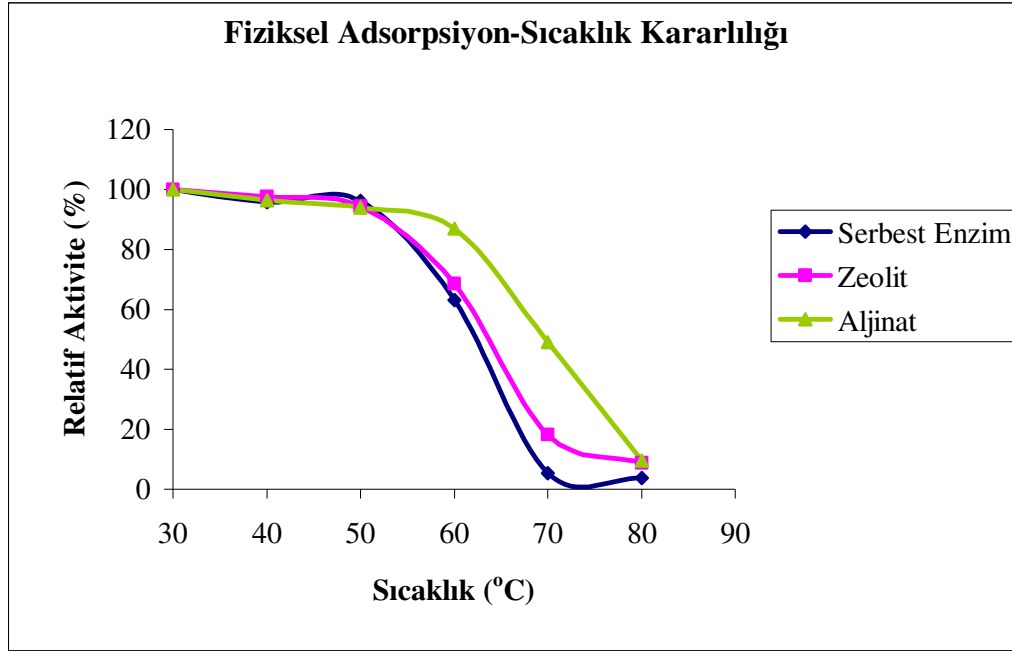
Tablo 7.8. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile Immobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)	
	Ham Zeolite Immobilize Edilen Enzim	Aljinata Immobilize Edilen Enzim
30	100.00	100.00
40	97.50	96.34
50	94.34	93.95
60	68.55	86.94
70	18.30	49.04
80	8.81	9.71

Tablo 7.8 ve Şekil 7.4'te görüldüğü gibi ham zeolit üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen proteaz enzimi, sıcaklık kararlılığı bakımından serbest proteaz enzimiyle aynı karakteristiği göstermektedir. Ham zeolit üzerine immobilize edilen enzim 30°C ile 50°C arasında kararlılığını korumaktadır.

Aljinat üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen proteaz enzimi ise 30°C ile 60°C arasında kararlılığını korumaktadır. Ayrıca, serbest enzimden ve ham zeolit üzerine immobilize edilen enzimden farklı olarak aljinat üzerine immobilize edilen enzim 70°C'de de relatif aktivitesinin %50'sini korumaktadır.

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda ham zeolit üzerine immobilize edilen proteaz enziminin serbest enzimin kararlı olduğu sıcaklık aralığını genişletemediği, aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enziminin ise bu aralığı 10°C daha genişlettiği ve serbest enzimden daha yüksek sıcaklıklarda çalışma kolaylığı sağladığı saptanmıştır.



Şekil 7.4. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Sıcaklık Kararlılığı

Naby, Ismail, Ahmed, Fattah yaptıkları çalışmada, çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize ettikleri proteaz enzimlerinin sıcaklık kararlılığının serbest enzimden daha iyi olduğunu belirtmektedirler [24].

Hayashi ve Ikada çalışmalarında çitosan kürecikleri üzerine immobilize ettikleri proteaz enzimin serbest enzimden daha yüksek sıcaklıklarda kararlılık gösterdiğini saptamışlardır [23].

Chellapandian çalışmasında vermikulit üzerine immobilize ettiği proteaz enziminin sıcaklık kararlılığında serbest enzime göre bir gelişme saptamıştır. Yaptığı çalışmada 70°C'de serbest enzimin aktivitesi %17 iken immobilize enzimin aktivitesini %28'e çıkarmayı başarmıştır [25].

7.2.3. Optimum pH

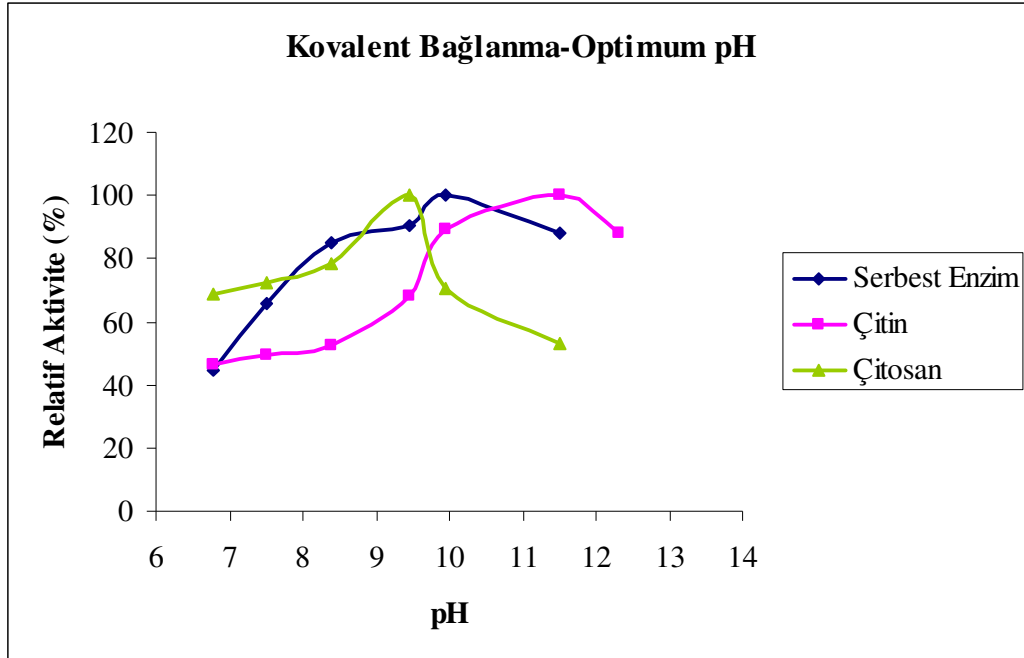
Serbest proteaz enziminin ve kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin farklı pH değerlerinde hazırlanan %0.6'luk kazein çözeltileriyle yapılan reaksiyonları sonucundaki relatif aktiviteleri Tablo 7.9'da görülmektedir.

Tablo 7.9 ve Şekil 7.5'te de görüldüğü gibi serbest enzim pH 10.0'da maksimum relatif aktivite değerine sahiptir. Serbest enzimin optimum pH değerinin, pH kararlılığı gösterdiği bölge içerisinde olduğu görülmektedir.

Tablo 7.9. pH'nın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Kazein Çözeltilisinin pH değeri	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitosana İmmobilize Edilen Enzim	Çitine İmmobilize Edilen Enzim
6.8	44.42	68.89	46.43
7.5	65.58	72.16	49.49
8.4	84.84	78.68	52.41
9.5	90.53	100.00	68.40
10.0	100.00	70.32	89.06
11.5	87.89	53.34	100.00
12.3	-	-	88.04

Tablo 7.9 ve Şekil 7.5'te de görüldüğü gibi, çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimi pH 9.5'te ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimi pH 11.5'te maksimum relatif aktiviteye sahiptirler.



Şekil 7.5. pH'nın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enziminin optimum pH değeri (9.5) serbest enzimin optimum pH değerine (10.0) yakındır. Çitin üzerine immobilize edilen enzim ise serbest enzimin optimum pH değerini 1.5 birim yukarı çekmiş ve daha alkali değerlerde çalışabilme olanağı sağlamıştır. Her iki immobilize enzimin de optimum pH değerleri pH kararlılıkları gösterdikleri bölgeler içerisinde yer almaktadır.

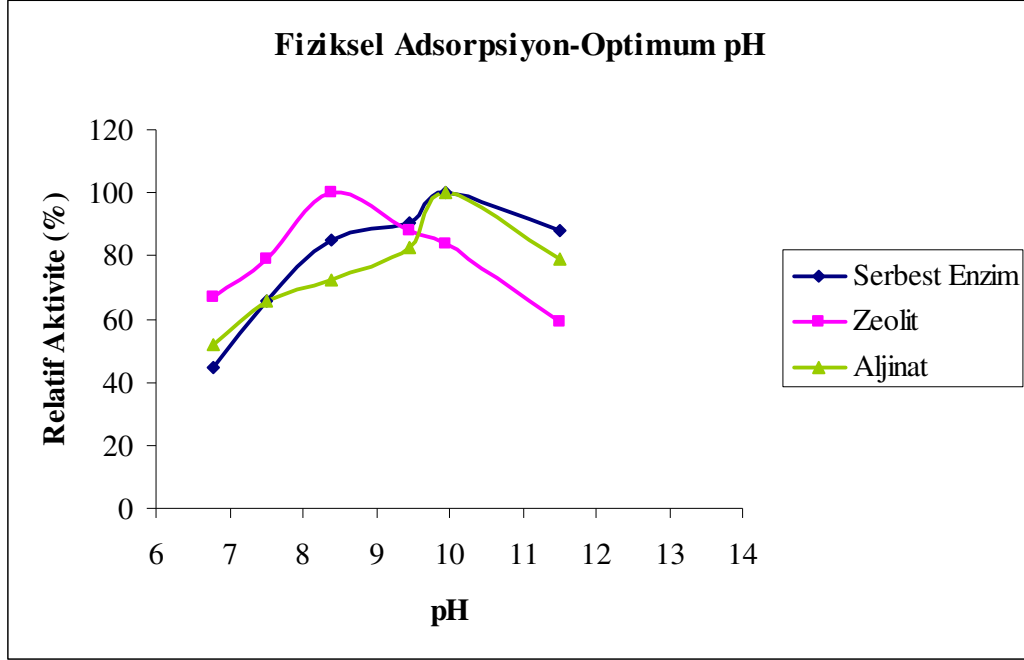
Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin farklı pH değerlerinde hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltileriyle yapılan reaksiyonları sonucundaki relatif aktiviteleri Tablo 7.10'da görülmektedir.

Tablo 7.10. pH'nın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Kazein Çözeltilisinin pH Değeri	Relatif Aktivite (%)	
	Ham Zeolite İmmobilize Edilen Enzim	Aljinata İmmobilize Edilen Enzim
6.8	67.04	52.09
7.5	78.98	65.65
8.4	100.00	72.50
9.5	88.21	82.76
10.0	84.09	100.00
11.5	59.09	78.71

Tablo 7.10 ve Şekil 7.6'da da görüldüğü gibi, ham zeolit üzerine immobilize edilen proteaz enzimi pH 8.4'te ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimi pH 10.0'da maksimum relatif aktiviteye sahiptirler.

Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle proteaz enziminin aljinat üzerine immobilizasyon işlemi enzimin optimum pH değerini değiştirmemiştir. Ham zeolit üzerine immobilize edilen enzim ise serbest enzimin optimum pH değerini 1.6 birim aşağı çekmiş ve daha az alkali değerlerde çalışabilme olanağı sağlamıştır. Her iki immobilize enzimin de optimum pH değerleri pH kararlılığı gösterdikleri bölgeler içerisinde kalmıştır.



Şekil 7.6. pH'nın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Hayashi ve Ikada çalışmalarında proteaz enzimini gözenekli çitosan kürecikleri üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize etmiş, serbest enzim için 8.0 olan optimum pH değerinin immobilizasyonla değişmediğini belirtmişlerdir [23].

Naby, Ismail, Ahmed, Fattah yaptıkları çalışmada, optimum pH değeri 9.0 olan proteaz enzimini çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize ettiklerinde, immobilize proteaz enziminin optimum pH değerini 8.71 olarak saptamışlardır. Ayrıca fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle çitosan üzerine immobilize ettikleri proteaz enziminin optimum pH değerini de 8.7 olarak belirtmişlerdir [24].

Chellapandian yaptığı bir çalışmada ise, alkalın proteaz enzimini vermikulit üzerine glutaraldehit ile kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize ederek, serbest enzimin ve immobilize edilmiş enzimin optimum pH'larını sırasıyla 8.5 ve 10 olarak tespit etmiştir [25].

Tanksale, Chandra, Rao, Deshpande yaptıkları çalışmada *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen alkalın proteaz enzimi immobilize ettiklerinde, serbest enzimin optimum pH değeri 10 iken, immobilize enzimin optimum pH'sının 8 – 9 arasında olduğunu saptamışlardır [26].

7.2.4. Optimum Sıcaklık

Serbest enzimin, kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen enzimlerin farklı sıcaklıklarda %0.6'lık kazein çözeltileriyle reaksiyona sokulmaları sonucunda elde edilen relatif aktiviteleri Tablo 7.11'de görülmektedir.

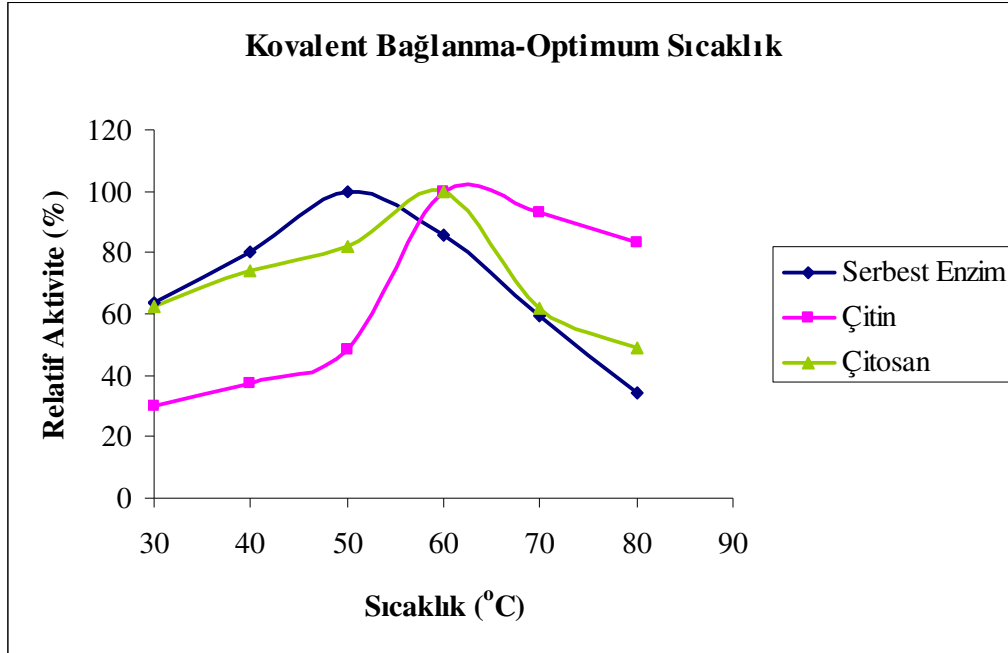
Tablo 7.11. Sıcaklığın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitosana İmmobilize Edilen Enzim	Çitine İmmobilize Edilen Enzim
30	63.93	62.45	29.79
40	80.36	73.94	37.13
50	100.00	81.85	48.45
60	85.47	100.00	100.00
70	59.22	61.87	93.09
80	34.07	48.71	82.99

Tablo 7.11 ve Şekil 7.7'de de görüldüğü gibi serbest proteaz enzimi 50°C'de, kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan ve çitin üzerine immobilize edilen proteaz enzimleri de 60°C'de maksimum relatif aktiviteye sahiptirler.

Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyon sonucunda proteaz enziminin optimum sıcaklığı 10°C yükselmiştir. Bu yükselme, immobilizasyon sırasında oluşan hidrojen bağları veya elektron geçiş komplekslerinin enzimin yapısını koruması ve enzimdeki titreşimi engelleyerek enzimin sıcaklığa karşı direncinin artmasını sağlamasıyla açıklanabilmektedir [14].

Tüm enzimlerin optimum sıcaklık değerleri sıcaklık kararlılığı gösterdikleri bölgelerdedir. Enzimlerin Şekil 7.7'deki optimum sıcaklık grafikleri, Şekil 7.3'teki sıcaklık kararlılığı grafikleriyle birlikte incelendiğinde; serbest enzimin ve çitosan üzerine immobilize edilen enzimin optimum sıcaklık eğrilerinin, sıcaklık kararlılığı eğrilerinin üzerinde bulunduğu görülmektedir. Çitin üzerine immobilize edilen enzimde ise optimum sıcaklık eğrisinin optimum sıcaklık değerinden (60°C) önce ve sonra sıcaklık kararlılığı eğrisinin altındaki bölgede bulunduğu görülmektedir. Bu; çitin üzerine immobilize edilen enzimin, çitosan üzerine immobilize edilen enzimden daha kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.7. Sıcaklığın Kovalent Bağlanma Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

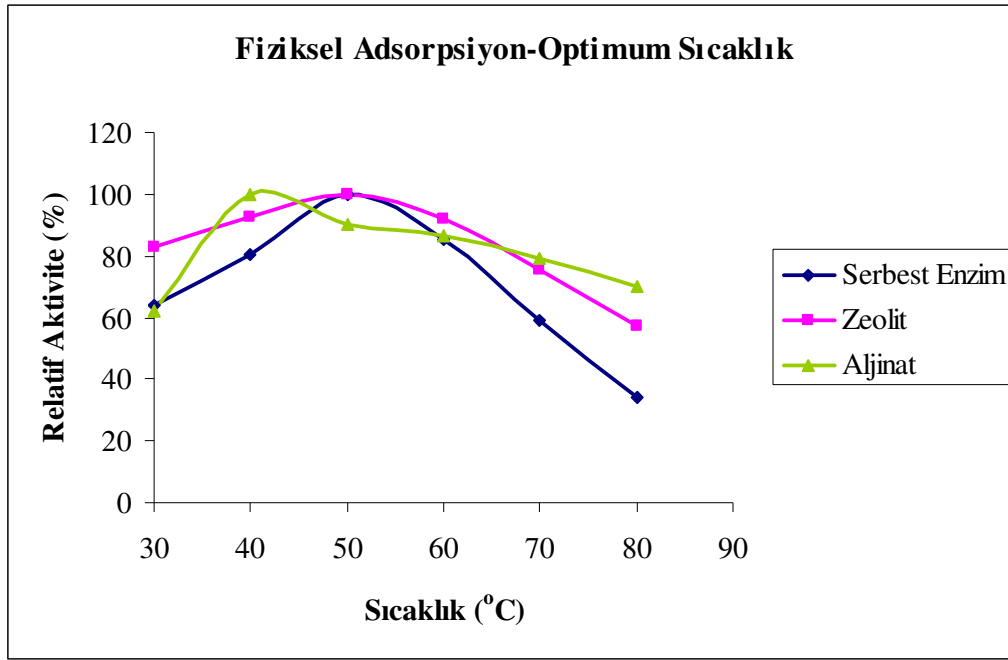
Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin farklı sıcaklıklarda %0.6'lık kazein çözeltisiyle reaksiyona sokulmaları sonucunda elde edilen relatif aktiviteleri Tablo 7.12'de görülmektedir.

Tablo 7.12. Sıcaklığın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)	
	Ham Zeolite İmmobilize Edilen Enzim	Aljinata İmmobilize Edilen Enzim
30	82.75	62.01
40	92.61	100.00
50	100.00	90.35
60	91.78	86.57
70	75.59	78.91
80	57.16	70.09

Tablo 7.12 ve Şekil 7.8'de de görüldüğü gibi fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen enzimlerin optimum sıcaklıkları sırasıyla 50°C ve 40°C'dir.

Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon sonucunda ham zeolite immobilize edilen proteaz enziminin optimum sıcaklığında bir değişim olmazken, aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enziminin optimum sıcaklığı 10°C düşmüştür. Her iki immobilize enzimin de optimum sıcaklık değerleri sıcaklık kararlılığı gösterdikleri bölgeler içerisinde yer almaktadır. İmmobilize enzimlerin Şekil 7.8'deki optimum sıcaklık grafikleri, Şekil 7.4'teki sıcaklık kararlılığı grafikleriyle birlikte incelendiğinde; ham zeolit üzerine immobilize edilen enzimin optimum sıcaklık eğrisinin, sıcaklık kararlılığı eğrisinin üzerinde bulunduğu, aljinat üzerine immobilize edilen enzimde ise optimum sıcaklık eğrisinin sıcaklık kararlılığı eğrisinin altındaki bölgede bulunduğu görülmektedir. Bu; aljinat üzerine immobilize edilen enzimin, ham zeolit üzerine immobilize edilen enzime göre daha kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.8. Sıcaklığın Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Relatif Aktivitelerine Etkisi

Naby, Ismail, Ahmed, Fattah yaptıkları çalışmada, optimum sıcaklığı 50°C olan proteaz enzimini çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle ve çitosan üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Çitin ve çitosan üzerine immobilize ettikleri enzimlerin optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 50°C ve 55°C olarak bulmuşlardır [24].

Chellapandian'ın alkalın proteaz enzimini vermikulit üzerine glutaraldehit ile kovalent bağlanarak immobilize ettiği bir çalışmada ise immobilize enzimin optimum sıcaklık değeri değişmemiştir [25].

Tanksale, Chandra, Rao, Deshpande, *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen alkalın proteaz enzimini immobilize ettikleri çalışmada, serbest enzimin optimum sıcaklığı 40°C iken, immobilize enzimin optimum sıcaklığını 50°C olarak saptamışlardır [26].

7.2.5. Tekrar Kullanılabilirlik

Enzim immobilizasyonunun amaçları arasında enzimlerin bir çok kere kullanılmasını sağlayarak maliyeti düşürmek ve enzimlerin kesikli veya sürekli reaktörlerde kullanımlarını sağlamak sayılmaktadır. Bu nedenle immobilize edilen bir enzimin tekrar kullanılabilirlik özelliği çok önemlidir [14,15].

Tablo 7.13'te kovalent bağlanma yöntemiyle çitin ve çitosan üzerine, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin ard arda tekrar kullanılmaları sonucunda relatif aktiviteleindeki değişim görülmektedir.

Tablo 7.13. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Tekrar Kullanımlarının Relatif Aktiviteye Etkisi

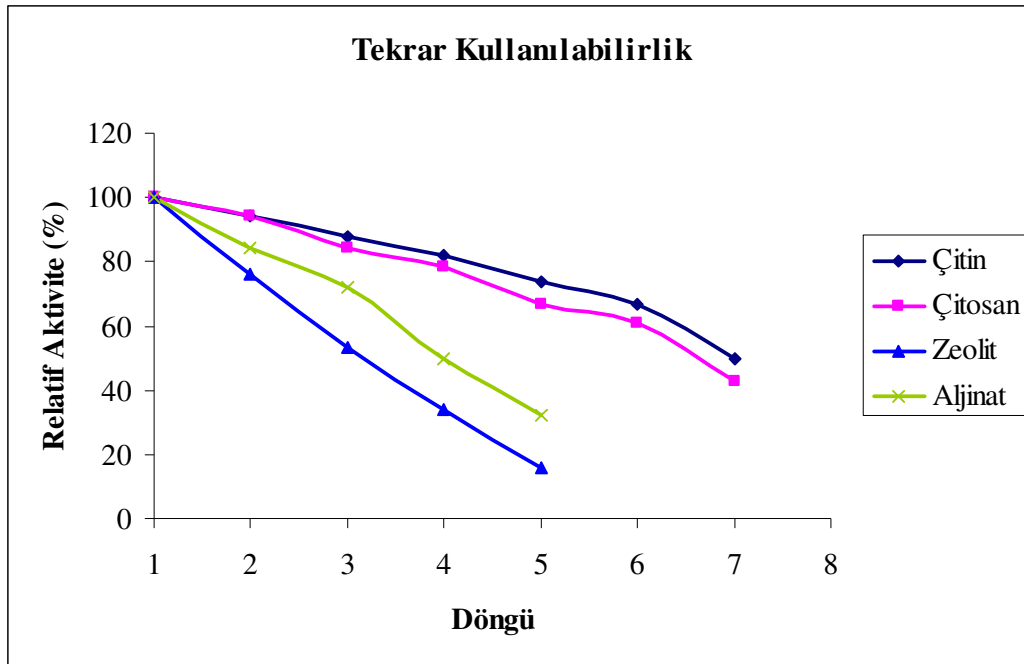
Döngü	Relatif Aktivite (%)			
	Kovalent Bağlanma		Fiziksel Adsorpsiyon	
	Çitin	Çitosan	Ham Zeolit	Aljinat
1	100.00	100.00	100.00	100.00
2	93.96	93.98	76.38	84.24
3	87.93	84.32	53.27	72.13
4	81.99	78.50	33.67	49.52
5	73.90	66.56	16.08	32.32
6	66.50	60.96	-	-
7	49.85	42.89	-	-

Tablo 7.13 ve Şekil 7.9'da da görüldüğü gibi arka arkaya 7 kullanımdan sonra, kovalent bağlanma yöntemiyle çitin üzerine immobilize edilmiş proteaz enzimi başlangıç aktivitesinin %50'sini ve çitosan üzerine immobilize edilmiş proteaz

enzimi başlangıç aktivitesinin %43'ünü koruyabilmektedir. Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilmiş proteaz enzimleri ise arka arkaya 5 kullanımdan sonra sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %16 ve %32'sini koruyabilmektedir.

Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen proteaz enzimlerinin aktiviteleri ilk 4 kullanımda %80 civarında kalabilmiş, 6 kullanımda da %60'ın altına düşmemiştir. Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enziminin aktivitesi 4 kullanım sonunda, ham zeolit üzerine immobilize edilen proteaz enziminin aktivitesi ise 3 kullanım sonunda %50'ye düşmüştür.

İmmobilize proteaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri incelendiğinde, sürekli sistemlerde çalışmak için kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiş proteaz enzimlerinin, fiziksel adsorpsiyonla immobilize edilmiş proteaz enzimlerinden daha uygun olduğu görülmektedir.



Şekil 7.9. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Tekrar Kullanımlarının Relatif Aktiviteye Etkisi

Tanksale, Chandra, Rao, Deshpande'nin *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen alkalın proteaz enzimini poliamid üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize ettikleri çalışmada immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde,

enzimin 22 reaksiyon sonunda aktivitesinde önemli bir düşüş olmadığı gözlenmiştir [26].

Xing, Li, Tian, Ye'nin nötral bir proteaz olan termolisini 4 ayrı tür zeolit üzerine immobilize ettikleri çalışmada enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Bu çalışmada 3 tane mikrogözenekli (HY, NH₄Y, NaY), 1 tane de mezogözenekli (H₂NH₄DAY) zeolit kullanılmıştır. HY üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi 1 kullanımdan sonra %8'den %2'ye, NH₄Y üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi 5 kullanımdan sonra %65'ten %40'a, NaY üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi 5 kullanımdan sonra %60'tan %40'a, H₂NH₄DAY üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi 4 kullanımdan sonra %60'tan %25'e düşmüştür [21].

Chellapandian'ın alkalın proteaz enzimini vermikulit üzerine glutaraldehit kullanarak kovalent bağlanma ile immobilize ettiği çalışmada, immobilize enzimin üst üste beş kullanımdan sonra orijinal aktivitesinin %78'inin korunduğu tespit edilmiş ve bunun sebebi olarak da alkalın proteazın taşıyıcı üzerine glutaraldehit ile güçlü bir şekilde bağlanması gösterilmiştir [25].

7.2.6. Deterjan Uyumluluğu

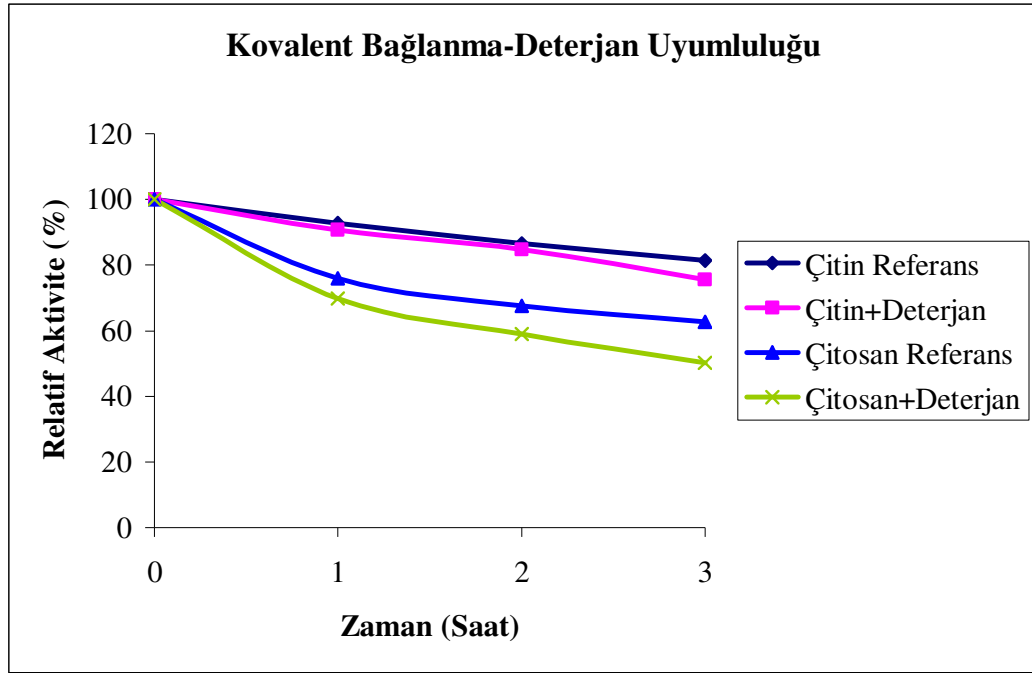
Proteaz enzimi deterjan sanayinde geniş kullanım alanına sahiptir. Özellikle alkalın proteazlar çevre dostu yapıları nedeniyle deterjanlardaki toksik kimyasallarla kısmen veya tamamen yer değiştirmektedir. İdeal bir deterjan enzimi, tüm yıkama sıcaklıklarında etkin olabilmek için yeterli sıcaklık kararlılığına sahip olmalı, deterjan solüsyonu içinde kararlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir [11,26].

Kovalent bağlanma yöntemiyle çitin ve çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin %0.7'lik ticari bir deterjan çözeltisi ile 60°C'de belirli süreler bekletilmesi sonucundaki relatif aktiviteleri Tablo 7.14'te görülmektedir. Tabloda verilen referans değerler ise çitin ve çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin deterjan eklenmeden 60°C'de belirli süreler bekletilmesi sonucundaki relatif aktiviteleridir.

Tablo 7.14. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu

Süre (Saat)	Relatif Aktivite (%)			
	Çitin Referans	Çitin + Deterjan	Çitosan Referans	Çitosan + Deterjan
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	92.70	90.75	76.01	69.86
2	86.56	84.80	67.60	59.02
3	81.30	75.66	62.62	50.11

Tablo 7.14 ve Şekil 7.10'da da görüldüğü gibi kovalent bağlanma yöntemiyle çitin ve çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin ticari bir deterjan ile 3 saat 60°C'de muamele edilmeleri sonucu aktiviteleri %50'nin altına düşmemektedir. Özellikle çitin üzerine immobilize edilen enzimin deterjan varlığında kararlılığını koruduğu ve aktivitesinin 3 saat sonunda %76'ya düştüğü görülmektedir.



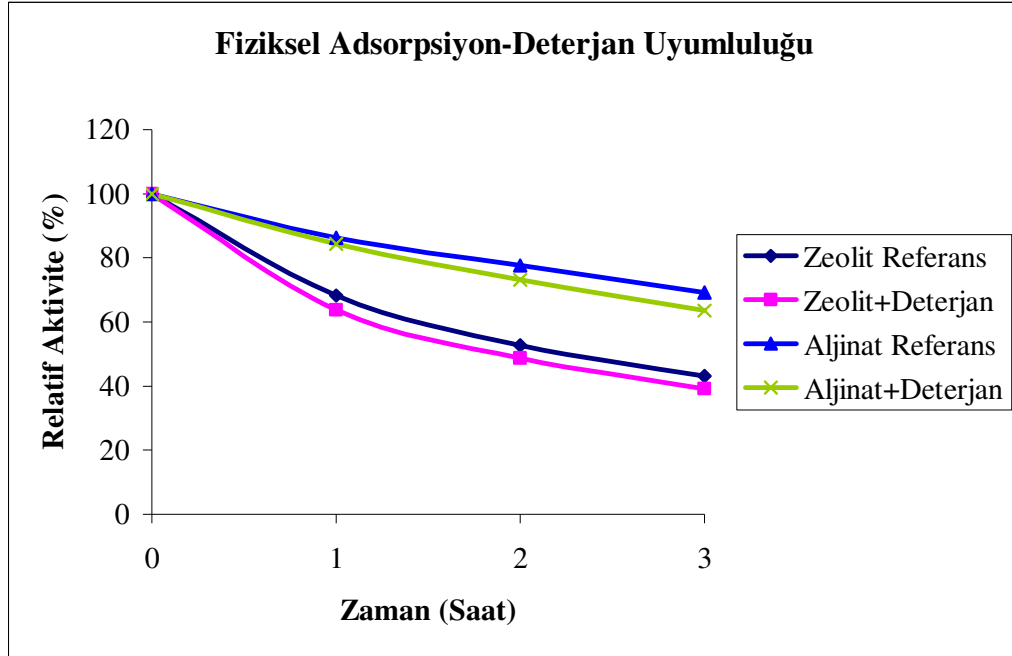
Şekil 7.10. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu

Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin 3 saat 60°C'de deterjanla muamele edilmeleri sonucunda relatif aktiviteleri Tablo 7.15'te görülmektedir.

Tablo 7.15. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu

Süre (Saat)	Relatif Aktivite (%)			
	Ham Zeolit Referans	Ham Zeolit + Deterjan	Aljinat Referans	Aljinat + Deterjan
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	68.34	63.67	86.31	84.36
2	52.60	48.74	77.55	73.04
3	43.05	39.21	69.27	63.56

Tablo 7.15 ve Şekil 7.11'de de görüldüğü gibi fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enziminin deterjan ile 3 saat 60°C'de muamele edilmesi sonucu aktivitesi %64'e düşerken, ham zeolit üzerine immobilize edilen proteaz enziminin aynı deterjan ile 3 saat 60°C'de muamele edilmesi sonucu aktivitesi %39'a düşmüştür. Aljinat üzerine immobilize edilen enzimin deterjan varlığında kararlılığını daha iyi koruduğu görülmektedir.



Şekil 7.11. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemiyle İmmobilize Edilen Proteaz Enzimlerinin Ticari Bir Deterjan ile 60°C'deki Uyumluluğu

Tüm immobilize proteaz enzimleri 60°C'de ticari bir deterjanla 3 saat muamele edildikten sonra belirli oranlarda aktivite kaybetmiştir. Özellikle fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin aktivite kayıplarının daha yüksek olduğu

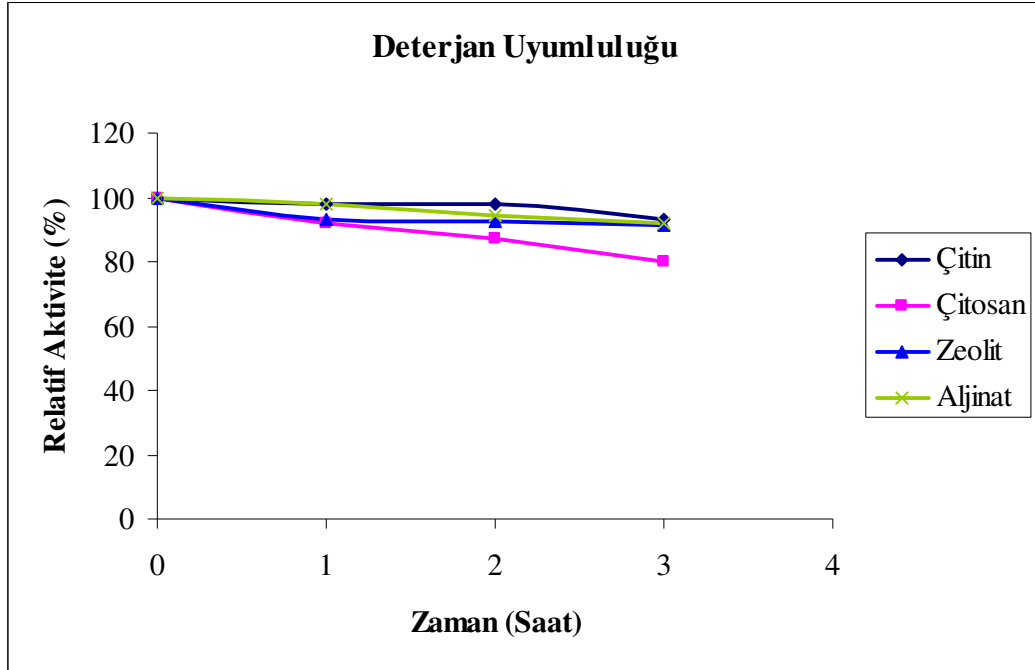
görülmektedir. Bu kayıpların nedeni enzimlerin deterjan uyumluluğuna 60°C’de bakılmasıdır. Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen enzimler deterjanla muamele edilmeseler de 60°C’de düşük aktiviteye sahiptirler. Deterjan ilave edilmeden 60°C’de bekletilen immobilize enzimlerin 3 saat sonunda relatif aktiviteleri taşıyıcı olarak çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat kullanıldığında sırasıyla %81, %63, %43, %69 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, immobilize enzimlerin deterjan uyumluluğuna bakılırken sıcaklığın etkisini yok etmek için, 60°C’de 3 saat deterjanla muamele edilen immobilize enzimlerin relatif aktiviteleri aynı koşullarda deterjansız bekletilen immobilize enzimlerin relatif aktivitelerine oranlanmıştır. Bu oran Tablo 7.16’da verilmektedir.

Tablo 7.16. Immobilize Proteaz Enzimlerinin Deterjan Varlığı ve Yokluğundaki Aktivitelerinin Oranı

Süre (Saat)	Relatif Aktivite (%)			
	Kovalent Bağlanma		Fiziksel Adsorpsiyon	
	Çitosan	Çitin	Ham Zeolit	Aljinat
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	91.91	97.90	93.16	97.74
2	87.31	97.97	92.67	94.19
3	80.03	93.06	91.08	91.76

Tablo 7.16 ve Şekil 7.12’de de görüldüğü gibi immobilize enzimlerin 60°C’de 3 saat bekletilmeleri sonucundaki aktiviteleri ile immobilize enzimlerin 60°C’de deterjan varlığında 3 saat bekletilmeleri sonucundaki aktiviteleri arasındaki fark çok düşüktür. Deterjanla en düşük uyumluluğa sahip olan enzim kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimidir ve onun da uyumluluğu %80 olarak bulunmuştur. Çitin, ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin deterjan ile uyumluluklarının sırasıyla %93, %91 ve %92 olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, tüm immobilize proteaz enzimlerinin kullanılan ticari deterjan ile uyumlu oldukları söylenebilmektedir.



Şekil 7.12. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Deterjan Varlığı ve Yokluğundaki Aktivitelerinin Oranı

Ayrıca, proteaz enzimlerinin aynı ticari deterjan ile 3 saat boyunca 30°C’de muamele edilmeleri sonucu aktiviteleri incelendiğinde; kovalent bağlanma ile çitin ve çitosan üzerine, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin aktiviteleri 3 saat sonunda sırasıyla %95, %92, %87 ve %85 olarak saptanmıştır. Bu da, immobilize enzimlerin deterjan varlığında yüksek aktiviteye sahip olmaları için uygun çalışma koşullarının belirlenmesi gerektiğini göstermektedir.

Tanksale, Chandra, Rao, Deshpande’nin yaptıkları çalışmada *Conidiobolus macrosporus*’dan elde edilen alkalın proteaz enziminin immobilizasyon sonrasında deterjan uyumluluğu incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzimler 1 saat 28°C’de Ariel, Rin Shakti ve Surf Excel gibi ticari deterjanlarla muamele edilerek aktiviteleri ölçülmüştür. Bu çalışmada Rin Shakti deterjanıyla muamele edilen serbest enzim aktivitesinin %76’sını korurken, immobilize enzimin aktivitesinin %84’ünü koruduğu saptanmıştır. Aynı koşullarda Ariel ve Surf Excel deterjanıyla muamele edilen serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerinin de %50’nin altına düşmediği belirlenmiştir [26].

Adinarayana, Ellaiah, Prasad’ın *Bacillus subtilis* PE-11’den izole ettikleri serin alkalın proteaz enzimiyle yaptıkları çalışmada enzimin deterjan uyumluluğu

incelenmiştir. Elde ettikleri proteaz enzimlerinin 10 mM CaCl₂ ve glisin varlığında 60°C’de 3 saat boyunca farklı tür ticari deterjanlarla muamele edilmesi sonucunda aktiviteleri Tablo 7.17’de görülmektedir [11].

Tablo 7.17. Adinarayana, Ellaiah, Prasad’ın Çalışmasındaki Enzimin Deterjan Uyumluluğu

Relatif Alkalin Proteaz Aktivitesi (%)								
Süre (Saat)	Kontrol	Nirma	Wheel	Henko	Surf	Surf Excel	Ariel	Rin
0.0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	96	90	95	92	91	93	88	87
1.0	94	87	92	89	87	90	85	83
1.5	91	85	89	86	83	87	82	81
2.0	87	79	82	79	75	80	74	72
2.5	80	69	73	68	63	70	61	59
3.0	76	58	65	58	51	56	52	53

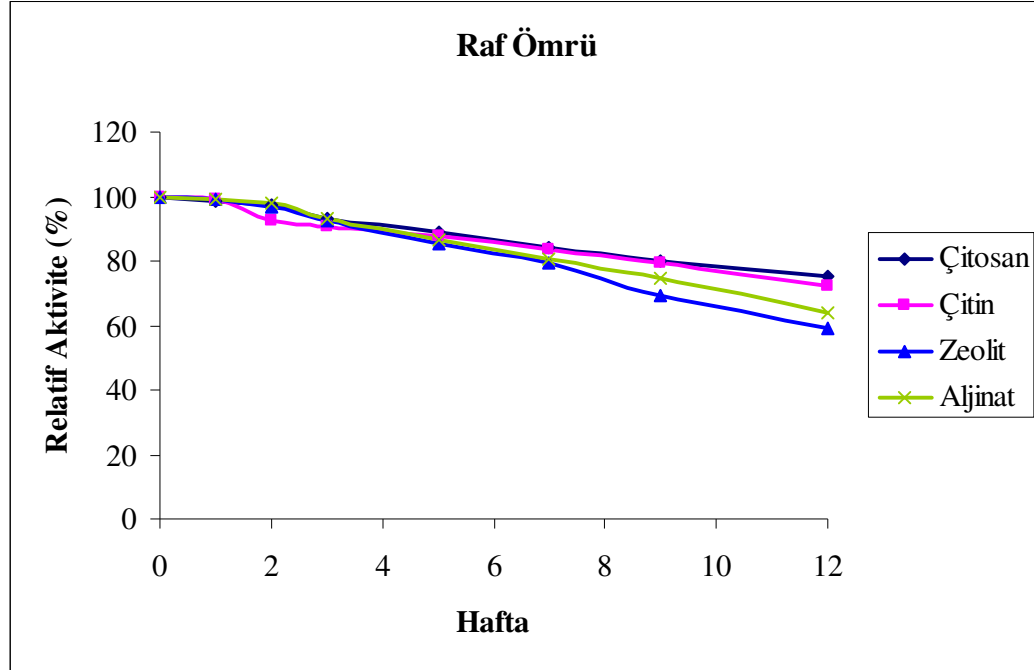
7.2.7. Raf Ömrü

Enzimlerin immobilizasyon sonrasında saklama kararlılıklarının, yani ne kadar süreyle aktivitelerini koruyabildiklerinin belirlenmesi önemlidir. Kovalent bağlanma yöntemiyle çitosan ve çitin üzerine, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin raf ömürleri incelenmiştir. Enzimlerin raf ömürlerini yani saklama kararlılıklarını belirlemek için, enzimler immobilizasyon sonrası immobilizasyonda kullanılan tamponla yıkanarak +4°C’de 3 ay bekletilmişlerdir. İmmobilize enzimlerin 3 ay içinde belirli aralıklarla ölçüm yapılarak belirlenen relatif aktiviteleri Tablo 7.18’de görülmektedir.

Tablo 7.18. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Raf Ömürleri

Hafta	Relatif Aktivite (%)			
	Kovalent Bağlanma		Fiziksel Adsorpsiyon	
	Çitosan	Çitin	Ham Zeolit	Aljinat
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	98.23	98.93	98.99	99.04
2	97.40	92.79	96.82	97.77
3	93.35	90.75	92.29	93.31
5	88.99	87.73	85.09	86.31
7	84.01	83.35	79.56	80.73
9	80.27	79.36	69.01	74.52
12	74.97	72.44	58.96	63.85

Tablo 7.18 ve Şekil 7.13'te görüldüğü gibi kovalent bağlanma ile çitin ve çitosan üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin saklama kararlılığı, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerine göre daha fazladır.



Şekil 7.13. İmmobilize Proteaz Enzimlerinin Raf Ömürleri

İmmobilize enzimlerin saklama kararlılıkları 12 hafta boyunca izlendiğinde, 12 hafta sonunda kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen enzimlerin aktivitelerinin

%70'in altına düşmediği, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen enzimlerin aktivitelerinin sırasıyla %59 ve %64'e düştüğü görülmektedir.

Naby, Ismail, Ahmed ve Fattah'ın yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus Megaterium*, *Bacillus Mycoides*, *Bacillus Subtilis* ve *Staphylococcus sp.* kültürlerinden elde edilen alkalın proteaz enzimlerinin +5°C'de 5-6 ay süreyle saklama kararlılıkları incelendiğinde, serbest enzim aktivitesinin %50'sini korurken, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle çitosan üzerine immobilize edilen enzim aktivitesinin %90.1'ini, iyonik bağlanma yöntemiyle amberlit IR-120 üzerine immobilize edilen enzim aktivitesinin %88.4'ünü, kovalent bağlanma yöntemiyle çitin üzerine immobilize edilen enzim aktivitesinin %100'ünü ve tutuklama yöntemi ile %2'lik çapraz bağlı poliakrilamide immobilize edilen enzim aktivitesinin %87.9'unu koruduğu gözlenmiştir [24].

8. VARGILAR ve ÖNERİLER

Proteaz enziminin çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle, aljinat ve ham zeolit üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi, immobilizasyon verimlerinin ve enzim özelliklerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- 1) Proteaz enziminin kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon yöntemleri ile farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu ile ilgili çalışmada immobilizasyon verimleri aktivite geri kazanımı (AGK) ve etkinlik oranı (EO) olarak belirlenmiştir. Çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen proteaz enzimlerinin AGK değerleri sırasıyla %80, %85, %79, %83 ve EO değerleri ise sırasıyla %81, %89, %80, %84 olarak bulunmuştur. Kovalent bağlanma yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde verimlerin daha yüksek olduğu görülmektedir ve en yüksek verim proteazın çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonundan elde edilmiştir.
- 2) Serbest proteaz enzimi pH 7.0 ile 11.0 arasında pH kararlılığını korurken, çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen enzimler sırasıyla pH 8.0-10.0, pH 10.0-12.0, pH 8.0-10.0, pH 8.0-10.0 arasında kararlılık göstermektedir. Genel olarak, immobilizasyon işlemi sonucunda proteaz enziminin pH kararlılığında iyileşme görülememektedir, ancak çitin üzerine immobilize edilen proteazın serbest proteazdan daha alkali ortamlarda çalışmaya uygun olduğu saptanmıştır.
- 3) Serbest proteaz enzimi pH 10.0'da en yüksek aktiviteye sahipken, çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edilen enzimlerin optimum pH değerleri sırasıyla 9.5, 11.5, 8.4, 10.0 olarak saptanmıştır.
- 4) Sıcaklık kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarında en önemli kriterlerden biridir. Bu çalışmada sıcaklık kararlılığı 30°C ile 50°C arasında olan serbest proteaz enziminin, çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat üzerine immobilize edildiği durumlarda sırasıyla 40-60°C, 30-80°C, 30-50°C, 30-60°C aralığında

sıcaklık kararlılıklarını koruduğu belirlenmiştir. Özellikle kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen proteaz enzimlerinin, sıcaklığa karşı serbest proteaz enziminden daha dirençli oldukları görülmektedir.

- 5) Serbest proteaz enzimi 50°C'de maksimum aktivite gösterirken, immobilize edilen enzimlerin optimum sıcaklık değerleri taşıyıcı olarak çitin ve çitosan kullanıldığında 60°C, ham zeolit kullanıldığında 50°C, aljinat kullanıldığında ise 40°C olarak saptanmıştır.
- 6) İmmobilize proteaz enzimlerinin 5 kez arka arkaya kullanılmaları sonucundaki relatif aktivitelerinin (%), taşıyıcı olarak çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat kullanıldığında sırasıyla 67, 74, 16, 32 olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen proteaz enzimlerinin tekrar kullanılabilirliğinin, fiziksel adsorpsiyon yöntemine göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir.
- 7) İmmobilize proteaz enzimlerinin deterjan uyumlulukları; 60°C'de 3 saat deterjanla muamele edilen immobilize enzimlerin relatif aktivitelerinin aynı koşullarda deterjansız bekletilen immobilize enzimlerin relatif aktivitelerine oranı olarak belirlendiğinde taşıyıcı olarak çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat kullanıldığı durumlar için enzimlerin sırasıyla ticari bir deterjana %80, %93, %91 ve %92 uyumlu oldukları saptanmıştır. Sonuç olarak, tüm immobilize enzimlerin deterjan uyumluluklarının yüksek olduğu görülmektedir.
- 8) Ayrıca raf ömürleri de incelenen immobilize enzimlerin +4°C'de 3 ay bekletilmeleri sonucu relatif aktivitelerinin (%), taşıyıcı olarak çitosan, çitin, ham zeolit ve aljinat kullanıldığı durumlar için sırasıyla 75, 72, 59, 64 olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen proteaz enzimlerinin, fiziksel adsorpsiyon yöntemine göre daha yüksek saklama kararlılığına sahip oldukları görülmektedir.
- 9) Bu çalışmada, serbest proteaz enzimi kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon yöntemleriyle immobilize edilerek özellikleri iyileştirilmeye çalışılmıştır. Özellikle çitin üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilen proteaz enzimi, yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde çalışabilme olanağı sağlaması, sürekli sistemlere uygulanabilir hale getirilmesi ve deterjana uyumluluğu ile serbest proteazın özelliklerini geliştirmektedir.

10) Yapılan çalışma sonucunda immobilize sistemlerin, özellikle kovalent bağlı sistemlerin, serbest enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir. İmmobilizasyon işlemleri ile;

- ✓ Enzimin sıcaklık ve pH kararlılığı geliştirilmiş,
- ✓ Enzimler sürekli sistemlere uygun hale getirilmiş,
- ✓ Enzimlerin ticari bir deterjan varlığında kararlı olduğu saptanmıştır.

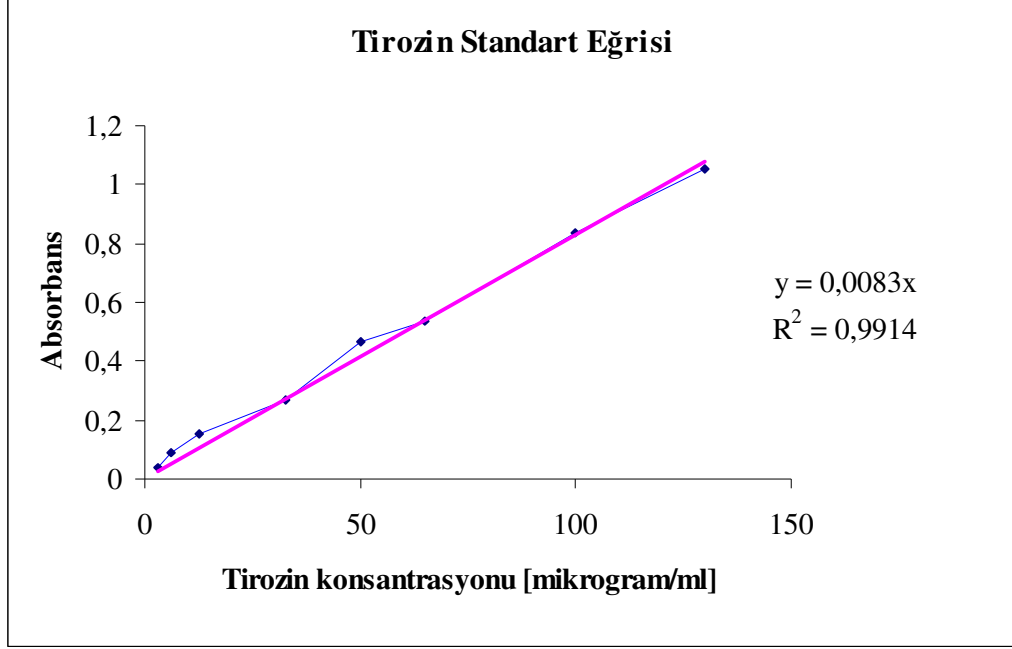
KAYNAKLAR

- [1] **Uludağ, Y.B.**, 2000. İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- [2] **Kırkköprü, İ. ve Alpaslan, S.C.**, 2004. Proteaz Enziminin Değişik Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu, *Bitirme Tezi*, İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- [3] **Krajewska, B.**, 2003. Application of Chitin -and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 126-139.
- [4] **Liang, J., Li, Y. and Yang, V.**, 2000. Biomedical Applications of Immobilized Enzymes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **89-8**, 979-990.
- [5] **Bugg, T.**, 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Oxford, U.K.
- [6] **Öztürk, M.H.**, 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [7] **Uhlir, H.**, 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, John Wiley & Sons, USA.
- [8] **Anwar, A. and Saleemuddin, M.**, 1997. Alkaline Proteases: A Review, *Bioresource Technology*, **64**, 175-183.
- [9] **Gözükara, E.M.**, 1997. Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara.
- [10] **Brown, H.W.**, 1987. Introduction to Organic and Biochemistry, Brooks/Cole Publishing Company, Belmont, California.
- [11] **Adinarayana, K., Ellaiah, P. and Prasad, D.S.**, 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11, *AAPS PharmSciTech*, **56**, 1-9.
- [12] **Aehle, W.**, 2004. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley-VCH, Weinheim.

- [13] **Orhan, E.**, 2003. *Bacillus Subtilis ve Bacillus Cereus* Bakterilerinden Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [14] Immobilized Enzymes, 2004. <http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immobilization.htm>.
- [15] Enzyme Immobilization, 2004.
<http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immobilization.html>.
- [16] **Bickerstaff, G.F.**, 1997. Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press, New Jersey.
- [17] **Voet, D., Voet, J.G. and Pratt, C.W.**, 1998. Fundamentals of Biochemistry, John Wiley & Sons, USA.
- [18] Chitin, 2005. <http://www.uni-ulm.de/biologie1/Forschung/Chitin/chitine.html>.
- [19] Preparation of chitin and chitosan, 2005.
<http://dalwoo.com/chitosan/preparation.htm>.
- [20] Zeolit nedir?, 2005. http://www.teknomin.com.tr/turkce/zeolit_b.html.
- [21] **Xing, G.W., Li, X.W., Tian, G.L. and Ye, Y.H.**, 2000. Enzymatic Peptide Synthesis in Organic Solvent with Different Zeolites as Immobilization Matrixes, *Tetrahedron*, **56**, 3517-3522.
- [22] What are Zeolites?, 2005. <http://www.bza.org/zeolites.html>.
- [23] **Hayashi, T. and Ikada, Y.**, 1991. Protease Immobilization onto Porous Chitosan Beads, *Journal of Applied Polymer Science*, **42**, 85-92.
- [24] **Abdel Naby, M.A., Ismail, A-M.S., Ahmed, S.A. and Abdel Fattah, A.F.**, 1998. Production and Immobilization of Alkaline Protease from *Bacillus Mycooides*, *Bioresource Technology*, **64**, 205-210.
- [25] **Chellapandian, M.**, 1997. Preparation and Characterization of Alkaline Protease Immobilized on Vermiculite, *Process Biochemistry*, **33**, 169-173.
- [26] **Tanksale, A., Chandra, P., Rao, M. and Deshpande, V.**, 2001. Immobilization of Alkaline Protease from *Conidiobolus Macrosporus* for Reuse and Improved Thermal Stability, *Biotechnology Letters*, **23-1**, 51-54.

- [27] **Ferreira, L., Ramos, M.A., Dordick, J.S. and Gil, M.H.**, 2003. Influence of Different Silica Derivatives in the Immobilization and Stabilization of a *Bacillus Licheniformis* Protease (Subtilisin Carlsberg), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **21**, 189-199.
- [28] **Chae, H.J., Kim, E.Y. and In, M.J.**, 2000. Improved Immobilization Yields by Addition of Protecting Agents in Glutaraldehyde-Induced Immobilization of Protease, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89-4**, 377-379.
- [29] **Chang, M.Y. and Juang, R.S.**, 2005. Activities, stabilities, and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan-Clay Composite Immobilized Enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 75-82.

EK A



Şekil A.1. Tirozin Standart Eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Ceyda Kasavi 1980 yılında İstanbul'da doğdu. 1998 yılında Terakki Vakfı Özel Şişli Terakki Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde öğrenimine başladı. 2003 yılında Kimya-Metalurji Fakültesinden Kimya Mühendisi unvanı ile mezun oldu ve aynı yıl İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Programı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Şu anda yüksek lisans programında çalışmalarına devam etmektedir.