

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEAZ ENZİMİNİN GLUTARALDEHİT KULLANARAK
KOVALENT BAĞLANMA İLE İMMOBİLİZASYONUNDA
OPTİMUM ŞARTLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Esra ÖZÇÖMLEKÇİ**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2006

**PROTEAZ ENZİMİNİN GLUTARALDEHİT KULLANARAK
KOVALENT BAĞLANMA İLE İMMOBİLİZASYONUNDA
OPTİMUM ŞARTLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Esra ÖZÇÖMLEKÇİ
(506031012)**

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

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Nuran DEVECİ
Diğer Jüri Üyeleri: Doç.Dr. Yüksel GÜVENİLİR
Yrd.Doç.Dr. Nevin KARAGÜLER**

HAZİRAN 2006

ÖNSÖZ

Çalışmalarım esnasında ve tüm üniversite eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Nuran Deveci ve Doç. Dr. Yüksel Güvenilir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı yürütürken yol gösteren ve bilgisini benimle paylaşan Kimya Yük. Müh. Didem Omay'a, çalışmamın her aşamasında tartışma olanağı bulduğum, desteğiyle ilerlememi sağlayan arkadaşım Ceyda Kasavi'ye, eğitimimin her aşamasında emeği geçen tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmalarıma proteaz enzimi sağlayarak katkıda bulunan Cognis firmasına teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini her an arkamda hissettiğim aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mayıs 2006

Esra ÖZÇÖMLEKÇİ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. ENZİMLER VE PROTEAZLAR	3
2.1 Enzimler	3
2.2 Proteazlar	4
2.2.1 Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları	4
2.2.1.1 Deterjan Endüstrisi	5
2.2.1.2 Deri Sanayi	6
2.2.1.3 İlaç Sanayi	6
2.2.1.4 Bakım Ürünleri	7
2.2.1.5 Tekstil Sanayi	7
2.2.1.6 Gümüş Eldesi	7
2.2.1.7 Gıda Endüstrisi	7
2.2.1.8 Atık İşleme	8
2.2.1.9 D,L-Amino Asitlerin Sentez Ve Çözündürülmesi	8
3. İMMOBİLİZASYON	11
3.1 İmmobilizasyonun Tarihçesi	15
3.2 İmmobilizasyon Yöntemleri	16
3.2.1 Tutuklama	19
3.2.2 Çapraz Bağlama	19
3.2.3 Taşıyıcı Bağlama	20
4. ÇİTİN ve ÇİTOSAN	25
5. PROTEAZ İMMOBİLİZASYONU ile İLGİLİ ÇALIŞMALAR	30
6. DENEYSEL ÇALIŞMA	33
6.1 Cihazlar	33
6.2 Kullanılan Malzemeler	33
6.2.1 Taşıyıcılar	33
6.2.2 Enzim ve Diğer Malzemeler	33
6.2.3 Çözeltiler ve Tamponlar	34

6.3 Metotlar	35
6.3.1 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	35
6.3.2 Verimin Hesaplanması	36
6.3.4 İmmobilizasyon	36
6.3.4.1 Taşıyıcıların Aktive Edilmesi	36
6.3.4.2 Kovalent Bağlanma ile Enzim İmmobilizasyonu	36
6.3.5 Serbest Enzimin Karakterizasyonu	37
6.3.5.1 pH Kararlılığının Belirlenmesi	37
6.3.5.2 Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi	37
6.3.6 İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	37
6.3.6.1 Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi	37
6.3.6.2 pH Kararlılığının Belirlenmesi	37
6.3.6.3 Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi	38
6.3.6.4 Deterjan Uyumluluğunun Belirlenmesi	38
6.3.6.5 Saklama Kararlılığının Belirlenmesi	38
7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	39
7.1 Proteaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu	39
7.1.1 Glutaraldehit Konsantrasyonunun Etkisi	39
7.1.2 Tampon Çözeltinin pH Değerinin Etkisi	42
7.1.3 Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Etkisi	45
7.1.4 Taşıyıcı/Enzim Oranının Etkisi	47
7.1.5 Enzim/Tampon Çözelti Oranının Etkisi	50
7.2 İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu	53
7.2.1 Sıcaklık Kararlılığı	53
7.2.2 pH Kararlılığı	55
7.2.3 Tekrar Kullanılabilirlik	57
7.2.4 Deterjan Uyumluluğu	58
7.2.5 Saklama Kararlılığı	61
7.2.6 Mikroskopik Karakterizasyon	62
8. VARGILAR ve ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	67
EK A	70
ÖZGEÇMİŞ	74

KISALTMALAR

a	: Ağırlık
AGK	: Aktivite geri kazanımı
B-R	: Britton Robinson
EO	: Etkinlik oranı
GA	: Glutaraldehit
Gt	: Giga ton
h	: Hacim
M	: Molarite
N	: Normalite
PFS	: Pellucit FS
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı (rotation per minute)
TCA	: Trikloro Asetik Asit
U	: Ünite
U₀	: Başlangıç aktivitesi (ünite cininden)
U_{imm}	: İmmobilize enzimin aktivitesi (ünite cinsinden)
U_R	: Rafinat aktivitesi (ünite cinsinden)
v.ç.a	: Ve çalışma arkadaşları

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Bazı Önemli Endüstriyel Proteazlar	9
Tablo 3.1. İmmobilize Enzimlerin En Önemli Endüstriyel Uygulamaları.....	13
Tablo 3.2. İmmobilize Enzimlerin Potansiyel Medikal Uygulamaları	14
Tablo 7.1. GA Konsantrasyonun Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	40
Tablo 7.2. GA Konsantrasyonun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	41
Tablo 7.3. Tampon Çözeltinin pH Değerinin Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	42
Tablo 7.4. Tampon Çözeltinin pH Değerinin Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	44
Tablo 7.5. Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	45
Tablo 7.6. Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	46
Tablo 7.7. Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	47
Tablo 7.8. Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	49
Tablo 7.9. Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	50
Tablo 7.10. Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	51
Tablo 7.11. Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki Sıcaklık Kararlılıkları.....	54
Tablo 7.12. Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki pH Kararlılıkları.....	55
Tablo 7.13. İmmobilize Proteaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği...	57
Tablo 7.14. İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-I...	59
Tablo 7.15. İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-II..	60
Tablo 7.16. Proteaz Enziminin İmmobilize Formdaki Saklama Kararlılıkları.....	61

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 3.1.	İmmobilize Enzimlerin Adlandırılması.....	16
Şekil 3.2.	Enzim Ve Matrisin İnteraksiyonu İle Ortaya Çıkan İmmobilize Enzimin Özellikleri.....	18
Şekil 3.3.	Shiff's Base Reaksiyonu.....	20
Şekil 4.1.	Çitin Yapısı.....	26
Şekil 4.2.	Çitosanın Yapısı.....	27
Şekil 4.3.	Selülozun Yapısı.....	27
Şekil 4.4.	Çitin ve Çitosan Prosesi Akım Şeması.....	28
Şekil 7.1.	GA Konsantrasyonun Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	40
Şekil 7.2.	GA Konsantrasyonun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	41
Şekil 7.3.	Tampon Çözeltilinin pH Değerinin Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	43
Şekil 7.4.	Tampon Çözeltilinin pH Değerinin Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	44
Şekil 7.5.	Tampon Çözeltilinin Konsantrasyonunun Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyondaki Etkisi.....	45
Şekil 7.6.	Tampon Çözeltilinin Konsantrasyonunun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyondaki Etkisi.....	46
Şekil 7.7.	Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	48
Şekil 7.8.	Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	49
Şekil 7.9.	Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	51
Şekil 7.10.	Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi.....	52
Şekil 7.11.	Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki Sıcaklık Kararlılıkları.....	54
Şekil 7.12.	Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki pH Kararlılıkları.....	56
Şekil 7.13.	İmmobilize Proteaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği.....	57
Şekil 7.14.	İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-I.....	59
Şekil 7.15.	İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-II.....	60
Şekil 7.16.	Proteaz Enziminin İmmobilize Formdaki Saklama Kararlılıkları.....	61
Şekil 7.17.	Çitin Dış Yüzeyinin SEM Görüntüsü.....	62
Şekil 7.18.	Çitin Proteaz İmmobilizasyonu Sonrası Dış Yüzeyinin	63

	SEM Görüntüsü.....	
Şekil A.1.	Tutuklama ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi.....	70
Şekil A.2.	Mikrokapsülleme ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi	70
Şekil A.3.	Polimer Matrislerde Tutuklama ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi.....	70
Şekil A.4.	Sürekli ve Süreksiz Mikrokapsüllemenin Şematik Gösterimi.....	71
Şekil A.5.	Çapraz Bağlama ile Enzim İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi.....	71
Şekil A.6.	İyon Değiştiriciler ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi.....	71
Şekil A.7.	Adsorpsiyon ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi.....	72
Şekil A.8.	Adsorpsiyon ile Çapraz Bağlama Yoluyla Enzim İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi.....	72
Şekil A.9.	Kovalent Bağlanma ile Enzim İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi.....	72
Şekil A.10.	Tirozin Standart Eğrisi.....	73

PROTEAZ ENZİMİNİN GLUTARALDEHİT KULLANARAK KOVALENT BAĞLANMA İLE İMMOBİLİZASYONUNDA OPTİMUM ŞARTLARIN BELİRLENMESİ

ÖZET

Enzimlerin polimer yüzeylere immobilizasyonu pek çok uygulama için önemli bir değer kazanmıştır. Enzimlerin kovalent bağ ile immobilizasyonu genellikle oldukça kararlı şartların sağlanmasını beraberinde getirir. Kovalent bağlanma metodu proteinlerin katı polimer destek malzemelerine tutunması temeline dayanır.

Bu çalışmada proteaz enziminin çitin ve çitosan üzerine kovalent bağ ile immobilize edilmesi incelenmiştir. Denenen taşıyıcılar içinde en yüksek immobilize enzim aktivitesini sergilemesi nedeniyle, Proteaz-PFS'nin kovalent bağ ile immobilizasyon öncesi glutaraldehit ile çapraz bağlanma metoduyla aktive edilenleri seçilmiştir.

Aktivite geri kazanımı ve etkinlik oranı değerleri, glutaraldehit konsantrasyonunun optimumun üzerindeki artışıyla birlikte düşüş göstermiştir. Bu da enzimin, bağ yapmamış aldehit grupları tarafından pasifleştirildiğini göstermektedir. Çapraz bağlanma için kullanılan glutaraldehit konsantrasyonunun optimum değeri %1 (h/h) olarak belirlenmiştir. Kullanılan tampon çözeltinin pH ve konsantrasyon değerleri, immobilizasyon üzerinde iyonik şiddetin önemi sebebiyle araştırılmış ve en yüksek aktivite geri kazanımının ve etkinlik oranının pH 12, 0.5 M tampon (Tris-HCl) kullanıldığı durumlarda elde edildiği gözlenmiştir. Immobilize enzimin aktivitesi, taşıyıcı yükleme oranı belirli bir değerin üzerine çıktığında düşmeye başlar. Optimum taşıyıcı (mg) / enzim oranı (ml) çitin için 1.4 mg / ml, çitosan için ise 1 mg / ml olarak belirlenmiştir. Enzim (ml) / tampon (ml) oranına bakıldığında ise bu oran optimumun üzerine çıktığında immobilize enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Her iki taşıyıcı için de en iyi kontak sağlandığı enzim (ml) / tampon (ml) oranı 0.25 ml/ml'dir. Bu koşullar altında proteaz immobilizasyonu gerçekleştirildiğinde çitin için aktivite geri kazanımı ve etkinlik oranı sırasıyla ; %80 ve %86'dır. Çitosan için ise bu değerler sırasıyla; %64 ve %76'dır. Optimize edilmiş koşullar altında immobilize edilen proteazın sıcaklık kararlılığı her iki taşıyıcı için de 50°C'den 70°C'ye kaymıştır. pH kararlılığı serbest enzimle aynı aralıkta olmasına rağmen, serbest enzimin %7 aktivite gösterdiği pH 12'de immobilize enzim çitin üzerine %54 çitosan üzerinde ise %34 aktivite göstermiştir. Tekrar kullanımlarına bakıldığında çitin üzerine immobilize edilmiş proteazın 6 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %68'ini çitosan üzerine immobilize edilmiş proteazın ise başlangıç aktivitesinin %62'sini koruduğu tespit edilmiştir. Deterjan uyumluluğunda ise immobilize enzimin sıcaklık etkisiyle gösterdiği aktivite düşüşüne ek olarak çitin üzerindeki immobilize enzimde yaklaşık %24 çitosan üzerindeki immobilize enzimde ise yaklaşık %20'lik bir aktivite kaybı daha gösterdiği gözlenmiştir. Saklama kararlılığına bakıldığında ise 65 gün sonunda immobilize enzimin koruduğu aktivite çitin için, %83, çitosan için ise % 87 olarak belirlenmiştir.

DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITIONS OF PROTEASE ENZYME IMMOBILIZATION BY COVALENT BINDING USING GLUTARALDEHYDE

SUMMARY

Immobilization of enzymes onto polymer surfaces is of great interest for many applications. The immobilization of enzymes by covalent coupling usually leads to very stable preparations. The covalent binding method is based on the attachment of proteins to solid polymer supports.

Immobilization of protease, by covalent binding on chitin and chitosan was investigated in the present study. Protease-PFS was activated by cross linking with glutaraldehyde, was selected among the tested carriers, because of the highest immobilized enzyme activity. The optimization of immobilization conditions was performed to obtain the highest activity recovery and effluent ratio.

The activity recovery and effluent ratio decreased with increasing glutaraldehyde concentration over an optimal value, indicating the inactivation of enzymes by their reaction with uncoupled aldehyde groups. The optimum concentration of glutaraldehyde was selected as 1% (v/v). Buffer pH and concentration was investigated because of the important influence of ionic strength on immobilization. It's observed that the highest activity recovery and effluent ratio was obtained when pH 12, 0.5M buffer (Tris-HCl) was used. Immobilized enzyme activity started to decrease slightly, when carrier loading was increased over an optimal value. The optimum carrier/enzyme ratio was 1.4 for chitin and 1 for chitosan. Both chitin and chitosan used immobilization the highest activity recovery and effluent ratio was obtained when the enzyme/buffer ratio was 0.25 as a result of good contact between the carriers and enzyme molecules. When immobilization was performed with above conditions, activity recovery and effluent ratio of immobilized protease using chitin are; 80% and 86% respectively. When chitosan was used as a carrier these values are; 64% and 76%. Temperature stability of immobilized enzymes, according to above conditions, was shifted from 50°C to 70°C with both carriers. PH stability was remained at the same range but while pure enzyme shows 7% activity, immobilized enzyme on chitin and chitosan shows 54% and 34% activity respectively. When reusability of immobilized enzymes was tested, it was seen that after 6 cycle, immobilized protease on chitin saved 68% of it's original activity while on chitosan it saved 62%.Operational stability of immobilized enzyme was also investigated and it was estimated that, protease activity was shielded the ratio of 83% and 87% by using chitin and chitosan respectively.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler, biyolojik sistemlerde sentezler, parçalamalar ve değişik bileşiklerin kısmi dönüşümleri gibi reaksiyonları katalizlerler ve genellikle protein yapıdadırlar. Endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimlerin kullanımı pek çok avantaj sağlamaktadır. İlk öne çıkan avantajları yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları özgüllükleridir. Enzimler sadece reaksiyonlara karşı değil substratlara karşı da yüksek özgüllük sergilediklerinden istenilen tek bir son ürünün oluşumunu sağlamak ve gereksiz yan ürünlerin oluşmasını engellemektedirler. Bu da yüksek reaksiyon verimini sağladığından dolayı maliyeti düşürmektedir. Bunlara ek olarak enzimler diğer katalizörlere kıyasla daha ılıman şartlarda çalıştıklarından enerji sarfiyatını dolayısıyla işletme maliyetini düşürmektedirler. Çevre boyutu ele alındığında enzimlerin protein yapıda olmaları biyolojik olarak bozundurulabilmelerine olanak tanır ve atık yönetimini kolaylaştırır. Tüm bu özelliklerinde dolayı 1960’lardan bu yana enzimlerin endüstriyel kataliz olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır [1, 2].

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. Proteazlar, bir diğer adı ile peptidazlar, peptid bağlarının hidrolizini katalizlerler. Özellikle endüstrideki kullanım alanının genişliği yüzünden en önemli enzim grubudur. Proteaz enziminin pek çok çeşidi gıda, tekstil, deterjan, deri ve ilaç sanayi gibi endüstrinin değişik kollarında kendine kullanım alanı bulmuştur [3].

Önemli avantajlarının yanında enzimlerin pratik kullanımında bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinin yüksek maliyete neden olması, doğadaki ortamlarından izole edildikleri takdirde proses koşullarına olan duyarlılıkları, enzimlerin katalitik aktiviteleri için önemli olan moleküler yapılarının yüksek sıcaklık, düşük ya da yüksek basınç, organik çözücülerin varlığında hatta diğer katalizörler için elverişli olan ortamlarda bozunmaya yatkınlık göstermeleri, kısa kullanım zamanları, diğer konvansiyonel heterojen katalizörlerin aksine çoğu enzimin suda çözünmüş olarak, homojen katalizör sistemlerinde işlev göstermeleri

dolayısıyla ürüne kontamine olmaları ve reaksiyon karışımından aktif formda yeniden kullanım için geri elde edilememeleri serbest enzimlerin endüstriyel kullanımında karşılaşılan problemlerdendir. Serbest enzimlerde görülen bu dezavantajları ortadan kaldırmak için pek çok metot denenmektedir. İmmobilizasyon bu amaçla kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir. İmmobilize enzimler, “fiziksel olarak hapsedilmiş veya kesin olarak tanımlanmış bir bölgeye, sahip oldukları katalitik aktiviteyi koruyarak yerleştirilmiş, tekrarlı ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler” olarak tanımlanırlar. Suda çözünmeyen destek malzemelere immobilize edilen enzimler serbest olanlara oranla çok daha avantajlıdır. Öncelikle serbest enzimlere oranla çok daha güçlü, ortam koşullarına karşı çok daha dirençlidirler. Ayrıca meydana getirdikleri heterojen sistem sayesinde hem enzimin hem de ürünün ortamdan uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadırlar. Kesikli proseslerde tekrar kullanım, sürekli proseslerde de uzun süreli kullanım sağlaması da bir diğer önemli avantajlarıdır [1,2].

İmmobilize enzimlerin kullanımının yaygınlaşmasına rağmen henüz evrensel olarak kabul edilen enzim immobilizasyon metotları yoktur. Günümüzde immobilizasyon çalışmalarında deneme yanılma yöntemiyle enzim için en uygun metot belirlenmektedir. Bu çalışmanın da amacı proteaz enziminin immobilizasyonun yüksek verimle gerçekleşebilmesi için en uygun koşulların belirlenmesidir. Sağladıkları avantajlar nedeniyle taşıyıcı olarak seçilen çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla proteaz immobilizasyonu gerçekleştirilirken, çapraz bağlanmanın yardımcı etkisi, kullanılan çapraz bağlama ajanının konsantrasyonu, iyonik şiddetin önemi nedeniyle, kullanılan tampon çözeltinin pH ve konsantrasyon değerleri, taşıyıcı / enzim yükleme oranı, enzim / tampon çözelti oranı gibi parametreler daha yüksek verime ulaşabilecek şekilde optimize edilmeye çalışılmıştır. Uygun yöntem belirlendikten sonra immobilize enzimlerin sıcaklık ve pH kararlılıkları, tekrar kullanılabilirliği, deterjan uyumluluğu ve saklama kararlılığı için karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

2. ENZİMLER VE PROTEAZLAR

2.1 Enzimler

Biyolojik sistemlerde sentezler, parçalamalar ve değişik bileşiklerin kısmi dönüşümleri enzimler tarafından katalizlenir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, onların tersiyer ve kuaterner yapıları sayesinde gerçekleşir. Bütün enzimler katalitik bir merkeze, bir veya daha çok substrat bağlanma bölgesine, yine bir veya daha çok düzenleyici bölgeye sahiptir [1].

Birçok enzim katalizör işlevi için, protein kısmına ek olarak protein olmayan bileşenler de içermektedir. Bu yardımcı grup maddeler prostetik grup, kofaktör veya koenzim olarak adlandırılır. Prostetik grup, proteine bağlı, aminoasit olmayan ve enzime belli özellikler kazandıran gruptur. Kofaktörler, kataliz için gerekli küçük organik moleküllerdir. Koenzim terimi ise bir enzimin aktivitesi için gerekli olan ve sıklıkla bir vitaminden türeyen organik moleküller için kullanılır. Bir enzimin işlevi için gerekli bütün yardımcı faktörleri içeren biçimi, haloenzim, kofaktörlerini kaybetmiş yalnızca protein kısmını içeren biçimi ise apoenzim olarak adlandırılmaktadır. Enzimin özelliğini ve spesifikliğini sağlayan kısım apoenzimdir.

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılması için 1961 yılında toplanan ilk Enzim Komisyonun raporuna göre enzimler, katalizörlük yapılan tepkimenin tipine göre altı ana sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflar;

Oksidoredüktazlar: Bu sınıf, redoks tepkimelerini katalizleyen tüm enzimleri içine alır, bir substrattan diğerine H, O₂, ve e⁻ transferini sağlarlar.

Transferazlar: Transferazlar, metil, açıl, amino glikozil veya fosfat gibi belirli bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalize eder.

Hidrolazlar: Ester, peptid, eter, glikoz, asit, anhidrit, C-O, C-N, C-C bağlarını hidroliz ederler. Proteaz enzimi bu gruptandır

Liyazlar: Susuz ortamdaki grupların uzaklaştırılmasını katalizlerler.

İzomerazlar: Bir molekül içinde geometrik veya yapısal yeniden ayarlamaları katalize ederler.

Ligazlar: ATP veya diğer nükleosit trifosfat içindeki pirofosfatın hidrolizi ile eşleşmiş olan iki molekülün birleşmesini katalize ederler [4].

2.2 Proteazlar

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. Proteazlar, bir diğer adı ile peptidazlar, peptid bağlarının hidrolizini katalizlerler. Özellikle endüstrideki kullanım alanının genişliği yüzünden en önemli enzim grubudur.

Günümüzde proteazlar genellikle üç önemli kritere göre sınıflandırılırlar. Proteazların sınıflandırılmasında geçerli olan kriterler: (i) katalizledikleri reaksiyon, (ii) enzimin katalitik bölgesinin doğal kimyasal yapısı, (iii) evrimsel ilişkileridir [3, 5]. Bu ilk sınıflandırmanın ardından proteazlar bu üç kriterin altındaki ailelere ayrılabilirler. Üç ana kriterin ilki olan enzimin katalizledikleri reaksiyonun alt sınıflandırması yapılacak olursa peptid-hidrolazların altında, enzimatik reaksiyonun meydana geldiği bölgeye göre, ekzo-peptidaz ve endo-peptidazlar yer alır. Proteazların katalizledikleri reaksiyonların hepsinde polipeptid zincirinden bir parça koparılır ve suyun OH grubuna transfer edilir. Eğer bu ayrılma polipeptid zincirini ucundan yani amino terminalinden (aminopeptidaz) ya da karboksil terminalinden (karboksipeptidaz) oluyorsa buna “ ekzo-ayırma” denir ve proteaz, ekzo-peptidaz olarak adlandırılır, ortasından yani protein, substratın terminal bölgelerinden uzakta ayırıyorsa buna “endo- ayırma” denir ve proteaz, endo-peptidaz olarak adlandırılır. Endo-proteazlar da katalitik mekanizmalarına göre serin, sistein, aspartik ve metaloproteaz olarak aktif bölgeleri için gerekli olan artık birimlere dayanılarak alt gruplara ayrılabilirler [3, 6].

2.2.1 Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Proteaz enzimi en önemli endüstriyel enzimlerden bir tanesidir ve sanayi enzimlerinin en geniş kategorisini oluşturmaktadır. Proteaz enziminin pek çok çeşidi gıda, tekstil, deterjan, deri ve ilaç sanayi gibi sanayinin değişik kollarında kendine kullanım alanı bulmuştur.

2.2.1.1 Deterjan Endüstrisi

Günümüzde deterjanların tercih edilme sebepleri, yıkama sıcaklığından bağımsız olarak kirleri çıkarabilme kapasiteleridir. Bunlar için kullanılan deterjan enzimleri değişik özellikli enzimlerdir ve bunların arasında proteazlar yüksek oranda kullanılmaktadır. Özellikle bakteriyel proteazlar deterjan endüstrisindeki uygulamalarda büyük bir hâkimiyete sahiptir. Çamaşır deterjanlarında ilk kullanılan enzim de yine proteazdır.

Çevresel amaçlarla deterjanlardan fosfatların çıkarılması ve deterjan raf ömrü boyunca içine ilave edilen bakteriyel proteazların kararlı olması için gereken şartlar, deterjanların genel oluşumunda büyük bir değişime neden olmuştur. Sıcak yıkamalar için formüle edilmiş olan deterjanlar, sodyum fosfat ve yüksek ısılarda (60 °C üzeri) aktif hale gelen bir beyazlatma maddesi sodyum perborat içermektedirler, fosfat kirlenmesini azaltmak için ortaya çıkan çevresel baskılar ve polyester kumaşların kullanımının artması nedeniyle bakteriyel enzimlerin kullanımı artmıştır. Enzimler düşük fosfat içeriğine sahip, ılık ve soğuk yıkama ısıları için formüle edilmiş olan deterjanların, önemli bir bileşiği haline gelmiştir. Günümüzde deterjanlarda kullanılan enzimlerin market payının büyük bir kısmı *subtilin* ve/veya *Bacillus spp.*'den elde edilen alkalın proteazların egemenliğindedir. Enzimlerin kullanımı yıkama verimini artırmanın yanında daha düşük ısılarda ve daha düşük sürelerde temizliğin sağlanmasına olanak sağlayarak çamaşırların yıpranmasının da önüne geçmektedir.

Alkalın proteazların bulaşık makineleri için geliştirilen deterjanlarda kullanımı da son zamanlarda hızlı bir artış göstermiştir. Bulaşık makinesi deterjanlarında nişasta bazlı lekelerin çıkarılması önemlidir. Bunun için değişik proteazlar kullanılmaktadır. Yapışan protein lekeleri zamanla sert sudaki kirecin bulaşıklar üzerine birikmesine neden olur. Proteaz kullanımı bu sorunu gidermektedir. Bunun yanında ultrafiltrasyon (UF) ve ters osmoz (RO) membranlarının iç temizliği de süt ve gıda endüstrisi için önemli bir sorun teşkil etmektedir. UF ve RO membranları süt, yumurta beyazı, meyve suyu gibi sıvı gıdaların yoğunlaştırılması, fraksiyonlanması, arındırılması ve/veya sterilizasyonu gibi çok çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. 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)

başlıca önemli ürünlerdir. Bu tür enzim bazlı temizleyiciler, proteazların protein artıklarını parçalama ve çözme özelliğine dayandırılarak formüle edilmişlerdir.

Proteazların ve lipazların ortak olarak kullanıldığı deterjanlarda da protein ve yağ artıklarının parçalanıp, çözülmesi büyük bir yarar sağlamaktadır. Bunlara ek olarak deniz solucanlarından elde edilen proteazlar kullanılarak hazırlanan lens solüsyonları, kontak lenslerin düşük sıcaklıklarda temizlenmesini sağlamaktadırlar [3, 4].

2.2.1.2 Deri Sanayi

Derinin üretiminde postların ve hayvan derilerinin işlenmesi aşamalarında farklı proteazlar kullanılabilir. Bu sanayi kolunda proteazların kullanımının sebebi, kıl ve derinin başlıca yapı taşının protein olmasıdır. Farklı özelliklere sahip enzimler hayvan derisinin kolajen olmayan içeriklerinin hidrolizini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle deri işlemenin iyileştirme, ıslatma, kıldan arındırma, yünden arındırma ayırma ve tabaklama gibi aşamalarında değişik proteazlar kullanılmaktadır.

Islatma aşamasında postlar ve hayvan derileri yüzey aktif maddeler ve antimikrobik içerikler içinde yıkanır ve ıslatılırlar. Albüminler ve globülinler gibi lifli olmayan proteinlerin çıkarılması için alkalın proteazlar kullanılır. Pankreatin, deri yumuşatması için ana madde olmuştur.

Yünden arındırma, derinin etli kısmına yünden arındırma boyasının uygulanmasıyla ile gerçekleştirilmektedir. Yünden arındırma boyası, hidratlı kireç, sodyum klorit, alkalın proteazlar ve sudan oluşmaktadır. İnce yünlü deriler için kullanılan alternatif bir yöntem olarak, etli kısma bir tozun uygulanması ve derilerin 24 saat boyunca 25°C'de tutulmasını gerektirir. Bu toz, sodyum sülfat, amonyum sülfat, klorit ve mikroorganizmalar tarafından üretilen nötr proteazlardan oluşmaktadır.

Ayırma adımı, postlar ve hayvan derileri, yumuşak ve esnek hale getirilmek ve ayrıca tabaklamaya hazırlanmak için enzimler ve kimyasallarla işlenir. Bugün bu amaçla, tripsin ve daha düşük oranlarda alkalın ve nötr proteazlar kullanılmaktadır [4,7].

2.2.1.3 İlaç Sanayi

Enzimler ilaç sanayinde geniş uygulama alanına sahiptir. Vücuttaki çeşitli ihtiyaçları gidermek veya eksik enzim ihtiyacını karşılamak için enzim takviyeleri

üretilmektedir. Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır [4].

2.2.1.4 Bakım Ürünleri

Kozmetik ürünlerde enzimlerin kullanım alanı her geçen gün artmaktadır. Cilt bakımı, diş sağlığı, saç bakımında uygulama alanları vardır [4].

2.2.1.5 Tekstil Sanayi

Tekstil sanayi, enzim alanındaki gelişmeleri yakından takip eden bir sanayi koludur. Proteazlar, tekstil alanında yün ve ham ipeğin işlenmesi aşamasında tercih edilen bir enzim çeşididir [4].

2.2.1.6 Gümüş Eldesi

Alkalın proteazlar kullanılmış X-ray filmlerinden gümüş eldesi biyoproseslerinde potansiyel bir uygulama alanı bulmuşlardır. Kullanılmış X-ray filmlerinin jelatin tabakaları yaklaşık ağırlıkça %1.5–2.0 oranında gümüş içerirler. Mevcut olan filmlerin yakılmasıyla gümüş eldesi uygulaması, büyük bir çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle tercih edilen, X-ray filmlerinin jelâtin tabakasının enzimatik olarak hidrolizi sadece gümüşün değil, polyester film tabakanın da yeniden işlenmesini sağlamaktadır. *Bacillus* türü B21–2, *Bacillus* türü B 189 ve *B. Coagulans* PB–77 gümüşün geri kazanıldığı X-Ray filmlerinden jelâtin tabakasının ayrıştırılmasını sağlar [3].

2.2.1.7 Gıda Endüstrisi

Alkalın proteazlar bitki, balık ya da hayvan proteinlerini hidrolizleyerek iyi bir peptit profiline sahip hidrolisatlar üretebilirler. Ticari alkalın proteaz, *Alcalase*, terminal hidrofobik amino asitlere karşı geniş bir özgüllüğe sahiptir. Bu enzimi kullanarak, daha az acı hidrolisatlar ve acısı alınmış enzimatik protein hidrolisatları üretilebilir.

Genellikle kazein, kesilmiş sütün suyundan elde edilen protein ve soya proteininden üretilen protein hidrolisatları, hipoalerjenik bebek mamalarının üretiminde büyük oranda kullanıma sahiptir. Ayrıca meyve sularını ya da alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede ve proteince zengin tedavi amaçlı yiyeceklerin üretiminde kullanılırlar.

Proteazlar bağılı doku proteinlerini ve kas lifi proteinlerini hidrolizleme gücü sebebiyle etin, özellikle bifteğin, yumuşatılmasında da kullanılırlar [3].

Laktik asit bakterileri, süt ve süt endüstrisinde peynir gibi fermente edilmiş süt ürünlerinin üretiminde önemli bir grubu oluşturmaktadırlar. Bu bakteriler peynirin olgunlaşması aşamasında lezzetinin oluşması ve çeşitlenmesini sağlamaktadırlar. Peynir endüstrisinde *Lactobacillus sp.* ve *Streptococcus cremoris* en önemli iki bakteri türüdür. Laktik asit bakterileri, peynir üretiminde başlangıç bakterileri olarak iki önemli fonksiyona sahiptirler: birincisi sütün asitlendirilmesi, ikincisi ise peynirin olgunlaştırılması aşamasında lezzetinin geliştirilmesi. Her iki süreçte de proteolitik aktivite temel rolü üstlenmektedir. Proteazların peynir üretimindeki bu önemleri neticesinde son senelerde başlangıç bakterileri olarak kullanımı üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

Streptococcus cremoris'dan elde edilen peynir üretiminde kullanılan proteazların pH 8'de optimum aktiviteyi gösterdiği, pH 5'den daha düşük değerlerde hiçbir hidrolizleme aktivitesi gözlemlenmezken, pH 10'da aktivitesinin sadece %50'sini gösterdiği bulunmuştur ki bu da proteazın alkali doğasının süt ve süt ürünleri endüstrisindeki önemini vurgulamaktadır [7].

Bira yapımında da kullanılan proteazlar, serbest amino azot miktarını arttırmaktadırlar. Bitkiler yeterli miktarda serbest amino azot içermediklerinde istenilen alkol içeriğine geç ulaşılmakta bu da bozulma riskinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Proteazların kullanımıyla bu risk ortadan kaldırılmaktadır [8].

2.2.1.8 Atık İşleme

Boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi lifli proteinler doğada atık olarak bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar belirli mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar sayesinde yararlı biyo-kütle haline dönüştürülebilirler. Bu konudaki en önemli örnek tüylerin ön işlemlerden geçirilip çözündürüldükten sonra mekanik parçalama ve enzimatik hidroliz sonucu yüksek protein içerikli biyo kütlenin eldesidir. Elde edilen bu son ürün yem olarak kullanılabilir [7].

2.2.1.9 D,L-Amino Asitlerin Sentez Ve Çözündürülmesi

Amino asitler hem insanlar hem de evcil hayvanlar için ek besin olarak giderek artan bir öneme sahiptir. Sadece L-amino asitler canlı organizmalar tarafından

sindirilebildiği için, kimyasal sentezler sonucu elde edilen rasemik karışımın ticari kullanımdan önce izomerlerine ayrılması gerekmektedir. Çözme optik olarak saf, doğal olmayan amino asit üretiminin en iyi yollarından biridir. Sutar ve çalışma arkadaşları 1991 yılında düşük molekül ağırlıklı proteazı *C. coronatus* kültüründen saflaştırmışlardır. Bu proteazın optimum pH'sı 9.7'dir ve N-benzoyl-L-tirosin etil ester (BTEE) üzerinde esterolitik aktivite göstermiştir. Bu sayede D,L-fenil alanin ve D,L-fenil glisin'in rasemik karışımlarının çözünmesinde başarıyla kullanılmışlar.

N-korumalı aminoasit esterlerin, organik çözücülerde kinetik çözünmeleri kararlı bir ticari alkalın proteaz olan 'Alkalaz' tarafından katalizlendiği 1991 yılında Chen ve çalışma arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Alkalazın organik çözücülerde kararlı olduğu ve alışılmadık yan zincire sahip olan N-korumalı amino asitleri çözebildiği gözlemlenmiştir.

1993 yılında ise Tsuchiya v.ç.a. *Cephalosporum* sp. KM 88 serin alkalın proteazın aromatik ve hidrofobik amino asitlerin esterlerine karşı özgül olduğunu bulmuşlardır. 1995 yılında da Chen ve çalışma arkadaşları alkalaz kullanarak biyolojik olarak aktif peptit sentezine dair kullanışlı bir prosedür geliştirmişlerdir [7].

Tablo 2.1. Bazı Önemli Endüstriyel Proteazlar [7]

<i>Tür</i>	<i>Kaynak</i>	<i>pH Karar.</i>	<i>Opt./</i>	<i>Endüstriyel Uygulama</i>	<i>Referans</i>
Streptococcus sp.	Bakteriyel	8.0		Süt ürünleri üretimi	Van Boven v.ç.a. (1988)
Bacillus stearothermophilus	Bakteriyel	9.5		Deterjan	Sato v.ç.a. (1990)
Tritirachium album (proteinaz T)	Mantarsı	9.0 – 12.0		Çamaşır deterjanları formülasyonu	Samal v.ç.a. (1990)
Tritirachium album (proteinaz R)	Mantarsı	7.0 – 10.0		Çamaşır deterjanları formülasyonu	Samal v.ç.a. (1990)
Condiobolus coronatus (alkalin proteaz B)	Mantarsı	9.7		D,L-fenil alanin ve glisininin rasemik karışımının çözüldürülmesi	Sutar v.ç.a (1991)
Bacillus sp. Y. (BYA)	Bakteriyel	10.0–12.5		Deterjan formülasyonu	Shimogi v.ç.a (1991)
Bacillus lichenformis (alkalaz)	Bakteriyel	8.2		N-korumalı amino asitlerin katalizi	Chen v.ç.a (1991)
Bacillus sp. (AH-101)	Bakteriyel	12.0–13.0		Deri endüstrisi	Takami v.ç.a. (1992)

Tablo 2.1. Bazı Önemli Endüstriyel Proteazlar (devamı)

<i>Rhizopus oryzae</i> (RO, IIT, KGP)	Mantarsı	3.0–11.0	?	Banerjee& Bhattacharya (1992)
<i>Condiobulus coronatus</i> (NCI 86.8.20)	Bakteriyel	8.5	Ticari deterjanlar	Phadatare v.ç.a. (1993)
<i>Bacillus firmus</i>	Bakteriyel	8.0	Deterjan endüstrisi	Moon& Parulekar (1993)
<i>Bacillus sp.</i> (P-001A)	Bakteriyel	9.5	Doğal atıklardan elde edilen biyo kütlelerin üretiminde	Atalo& Gashe(1993)
<i>Bacillus sp.</i> (B 18)	Bakteriyel	12.0	?	Fujiwara v.ç.a. (1993)
<i>Bacillus sp.</i>	Bakteriyel	12.0	?	Masui v.ç.a. (1994)
<i>Bacillus sp.</i>	Bakteriyel	8.5	Deri endüstrisi	Loperena v.ç.a. (1994)
<i>Thermus Rt 41A</i>	Bakteriyel	11.0	?	Wilson v.ç.a. (1994)
<i>Bacillus sp.</i> (Savina/Durazim)	Bakteriyel	9.0-11.0	Deterjan formülasyonlarında	Bossi v.ç.a. (1994)
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alkalaz)	Bakteriyel	8.2	Biyolojik aktif peptitlerin sentezinde	Chen v.ç.a. (1995)
<i>Bacillus subtilis</i>	Bakteriyel	8.5	Deri endüstrisi	Hameed v.ç.a. (1996)
<i>Bacillus sp.</i>	Bakteriyel	8.5	?	Sinha v.ç.a. (1996)
<i>Bacillus subtilis</i>	Bakteriyel	-	Kontak lens temizleyicisi	Sanyo v.ç.a. (1996)
<i>Amicolata/ Amicolatopsis</i>	-	8.0-11.0	Peynir ve deterjanlar	Danimarka patent no 04,082 (1997)
<i>Spilosoma obliqua</i> (Lepidoptera)	Böcek larvası	11.0	Ticari deterjanlar ve leke çıkarıcıların formülasyonunda	Anwar& Saleemuddin (1997)

3. İMMOBİLİZASYON

Endüstride pek çok ürünün sentezi, parçalanması ya da analitik olarak incelenmesine olanak tanıyan kimyasal proseslerde kullanılan konvansiyonel metotlar gelişmeye devam ederken, sadece verimli ve güvenli olmakla kalmayıp, yeniden kullanılabilen, çevreye zararsız, enerji tasarrufu sağlayan alternatif metotlar da hızla araştırılmaktadır. Bu hedeflere ulaşmakta en umut vaat edici olanı ise enzimlerin endüstride kullanımınıdır. Mevcut kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimler pek çok önemli özellik sergilemektedirler. En göze çarpan özellikleri sahip oldukları yüksek katalitik aktivite ve yüksek orandaki özgüllükleridir. Bu özgüllük sayesinde istenen reaksiyonun katalizlenmesi ve de istenen tek bir son ürünün eldesi mümkün olmaktadır. Bu da hem malzeme giderini düşürmeye hem de daha yüksek bir reaksiyon verimine ulaşabilmeye imkân sağlamaktadır [2]. Enzimlerin çok önemli bir diğer özelliği de reaksiyonları belirli bir ortam sıcaklığı, basınç ve nötre yakın bir pH aralığında katalizlemeleridir. Bu da, enerji-koruma, kaynak-koruma ve düşük kirlilik için proseslerin enzimler tarafından katalizlenmesini destekler, çünkü bu sayede prosesler göreceli olarak daha düşük sıcaklıkta ve de atmosferik basınçta yürütülebilirler [1]. Bunun yanında enzimler atık sorununu da büyük oranda ortadan kaldırırlar, proteinlerden ve peptidlerden oluştukları için ve bunlarda biyolojik olarak bozundurulabildiklerinden, kolaylıkla kontamine oldukları akımdan uzaklaştırılabilirler. Tüm bu avantajları nedeniyle 1960'lerden beri enzimler endüstride, örneğin gıda, ilaç, zirai kimyasal üretimi, katalizör olarak kullanılmaktadır ve organik kimyasal sentezlerinde denenmektedirler [2].

Bu önemli avantajlarının yanında enzimlerin pratik kullanımında bazı sorunlarla da karşılaşmaktadır. Bu dezavantajlarını saymak gerekirse şunlar sıralanabilir; İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinin yüksek maliyete neden olması, doğadaki ortamlarından izole edildikleri takdirde proses koşullarına olan duyarlılıkları, enzimlerin katalitik aktiviteleri için önemli olan moleküler yapılarının yüksek sıcaklık, düşük ya da yüksek basınç, organik çözücülerin varlığında hatta diğer katalizörler için elverişli olan ortamlarda bozunmaya yatkınlık göstermeleri, kısa

kullanım zamanları, diğer konvansiyonel heterojen katalizörlerin aksine çoğu enzimin suda çözünmüş olarak, homojen katalizör sistemlerinde işlev göstermeleri dolayısıyla ürüne kontamine olmaları ve reaksiyon karışımından aktif formda yeniden kullanım için geri elde edilememeleri [1, 2].

Serbest enzimlerde görülen bu dezavantajları ortadan kaldırmak için pek çok metot denenmektedir, immobilizasyon bu amaçla kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir. İmmobilize enzimler, “fiziksel olarak hapsedilmiş veya kesin olarak tanımlanmış bir bölgeye, sahip oldukları katalitik aktiviteyi koruyarak yerleştirilmiş, tekrarlı ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler” olarak tanımlanırlar [1]. İmmobilizasyon enzimlerin katı destek maddeleriyle ya da katı destek maddelerine bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Bazı durumlarda biyokatalizörler çözünmeyen katı desteklere (taşıyıcılar) fiziksel ya da kimyasal bağlarla bağlanırlar, diğer durumda ise biyokatalizörler serbesttir ancak destek malzemeleriyle belirli bir bölgeye hapsedilmişlerdir. Bu sayede heterojen immobilize enzim sistemleri elde edilir. Bu sistemler, enzimlerin canlı organizmalarda çoğunlukla hücre membranlarına tutunarak sağladıkları doğal enzim modunu taklit ederek, enzimlerin yapısını dolayısıyla aktivitesini kararlı hale getirirler. Bu da çözelti içinde, serbest enzimlerle kıyaslandığında immobilize enzimlerin çevre koşullarına karşı daha güçlü ve dirençli olmasına olanak tanır. Daha da önemlisi sistemin heterojen yapısı enzimin de ürünün de daha kolay ayrıştırılmasını, enzimlerin tekrar kullanımını, sürekli prosesin mümkün olmasını, reaksiyonun daha hızlı meydana gelmesini ve biyoreaktör dizaynında çeşitliliğin elde edilebilmesini sağlar [1, 2].

İmmobilize enzimler temelde serbest enzimlerle ve kullanılmakta olan diğer konvansiyonel kimyasal proseslerle karşılaştırılırlar. Seçim yapılırken yukarıda sayılan tüm olumlu ve olumsuz faktörler birlikte değerlendirilmelidir. Enzim maliyeti kararı etkileyen en önemli faktördür. Ucuz, kolay bulunabilen enzimlerin immobilizasyonu çok anlamlı değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon maliyeti, immobilizasyon sırasında enzimatik aktivitenin kaybı da eklendiğinde saf enzimin maliyetini aşacaktır. Bununla beraber immobilizasyon prensipte, şu durumlar için kazançlıdır:

- Pahalı enzimler için (penisilin ve açılaz gibi)
- Düşük molekül ağırlıklı substratlar için (şeker ve aminoasit gibi)

- Mikrobiyal kontaminasyonların meydana gelebileceği proseslerin kontrolünde. Bu koşulda steril substrat ya da 60°C'den daha yüksek bir reaksiyon sıcaklığı yardımcı olacaktır.
- Ürünün enzimden tamamıyla arındırılmış olması gereken durumlarda. (*allergen-free diets* gibi) [9].

Sadece enzimlerin değil organellerin, mikrobiyal hücrelerin, bitki ve hayvan hücrelerinin immobilizasyonu, biyolojik proseslerde tüm dünyanın dikkatini çeken bir kavram haline gelmiştir. Genel olarak immobilize biyokatalizörler serbest olanlara oranla daha karardır ve uygulamaları daha kolay yürütülür. En önemli özellikleri kesikli proseslerde tekrar tekrar uzun bir dönem, sürekli proseslerde ise devamlı olarak kullanılabilmeleridir. Günümüzde immobilize biyokatalizörler uygulamaları şunları kapsar;

- *Stereospecific* ya da *reiospecific* biyolojik dönüşümlerle önemli bileşiklerin üretimi,
- Biyolojik proseslerle enerji üretimi,
- Çevresel problemleri çözmek adına belirli kirleticilere seçici uygulamaların gerçekleştirilmesi,
- Yüksek duyarlılığa ve yüksek özgülüğe sahip çeşitli bileşiklerin sürekli analizleri,
- Tıbbi uygulamalar, enzim terapisi için yeni çeşitte ilaçlar ya da yapay organlar gibi.

İmmobilize enzimlerin mevcut ve potansiyel önemli endüstriyel uygulamaları aşağıdaki Tablo 3.1'de ve önemli bazı medikal uygulamaları ise Tablo 3.2'de verilmiştir [2].

Tablo 3.1. İmmobilize Enzimlerin En Önemli Endüstriyel Uygulamaları

<i>Enzim (EC Numarası)</i>	<i>Substrat</i>	<i>Ürün</i>
Glukoz İzomeraz (5.3.1.5)	Glukoz	Fruktoz
B-Galaktosidaz (3.2.1.23)	Laktoz	Glukoz ve Galaktoz (laktozsuz süt)
Lipaz (3.1.1.3)	Trigliserit	Kakao yağı eşdeğerleri

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

Aminoaçılaz (3.5.1.14)	D,L-Aminoasitler	L-Aminoasitler (metionin, alanin, fenilalanin, triptofan, valin)
Raffinaz (3.2.1.22)	Rafinoz	Galaktoz ve sukroz (rafinozsuz 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 aspartamın üretiminde kullanılırlar)
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 kullanılır
Hidantoinaz (3.5.2.2)	D,L-Amino asit hidantoinler	D,L-Aminoasitler
Penisilin amidaz (3.5.1.11)	Penisilin G ve V	6-Aminopenisilanik asit
β -Tirozinaz (4.1.99.2)	Pirokatekol	L-DOPA

Tablo 3.2. İmmobilize Enzimlerin Potansiyel Medikal Uygulamaları

<i>Enzim (EC Numarası)</i>	<i>Uygulama</i>
Asparaginaz (3.5.1.1)	Lösemi
Arginaz (3.5.3.1)	Kanser
Ureaz (3.5.1.5)	Yapay böbrek, üre rahatsızlıkları
Glukoz Oksidaz (1.1.3.4)	Yapay pankreas
Karbonat dehidratz (4.2.1.1) + Katalaz (1.11.1.6)	Yapay akciğer
Katalaz (1.11.1.6)	Akatalasemi
Glukoamilaz (3.2.1.3)	Glikojen depolama rahatsızlıkları
Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (1.1.1.49)	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz kusurları
Ksantin Oksidaz (1.1.3.22)	Lesch-Nyhan rahatsızlığı

Tablo 3.2. İmmobilize Enzimlerin Potansiyel Medikal Uygulamaları (devamı)

Fenilalanin Amonyak Liyaz (4.3.1.5)	Fenilketonuria
Ürat Oksidaz (1.7.3.3)	Hiperurikamia
Heparinaz (4.2.2.7)	Ekstrakorporeal terapi süreçlerinde

3.1 İmmobilizasyonun Tarihçesi

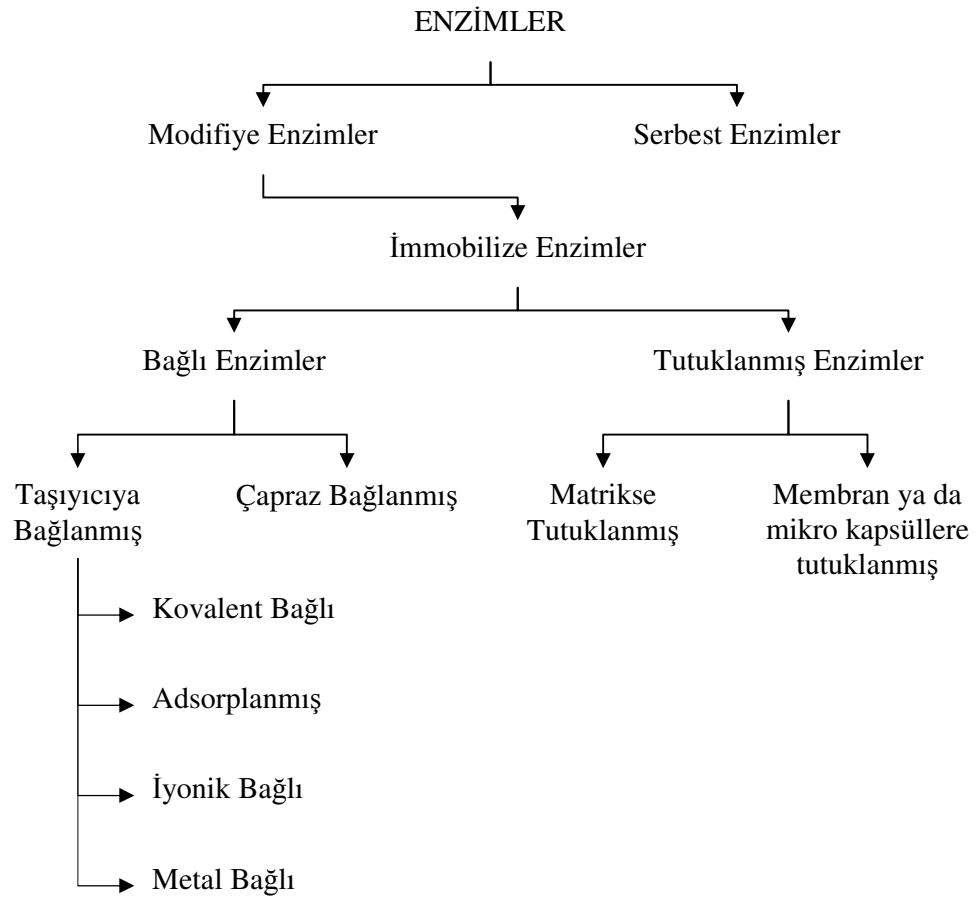
1916 yılında Nelsen ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorplanmış maya invertazın (E.C.3.2.1.26) [9001-57-4] sukrozun hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bunun ardından fizyolojik aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli desteklere immobilizasyonu üzerine pek çok rapor yayımlanmıştır. Buna rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi enzimleri diazolanmış poliaminstiren reçinesi kovalent bağlanmayla immobilize etmelerine kadar pratik bir kullanım alanları olmamıştır. Daha sonra Mitz, katalazın (E.C.1.11.1.6) [9001-05-2] DEAE-selüloz üzerine 1956 yılında iyonik bağlanmayla immobilizasyonunu yayımlamıştır. Bernfeld ve Wan tripsinin (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 1963 yılında tanımlarken, Quioco ve Richards 1964 yılında karboksipeptidaz A'nın (E.C.3.4.17.1) [11075-17-5] glutaraldehitte çapraz bağlanmasını göstermişlerdir. Karbonik anhidrazın (E.C.4.2.1.1) [9001-03-0] mikrokapsüllenmesi ise 1964 yılında Chang tarafından kaydedilirken, amiloglukozidaz (E.C.3.2.1.3) [9032-08-0] içeren lipozomların hazırlanması Gregoriadis tarafından 1971 yılında gerçekleştirilmiştir ki her ikisi de enzim terapisinde kullanılmaktadır. Katchalski-Katzir ve çalışma arkadaşlarının immobilize enzimlerin teorik olarak anlaşılmasında büyük yardımları olmuştur.

1969 yılında Chibata ve çalışma arkadaşları Tanabe Seiyaku Co., immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında ilk başarılı olan isimlerdir. Fungal aminoasılazı (E.C.3.5.1.14) [9012-37-7] DEAE Sephadex ile iyonik bağlanmayla immobilize ederek, N-açıl-D,L-amino asitleri hidrolizle, L-amino asitlere ve N-açıl-D-amino asitlere dönüştürmüşlerdir. Mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonun ilk endüstriyel uygulaması ise Chibata ve çalışma arkadaşları tarafından amonyum fumarattan poliakrilamid jele yüksek aktivitede aspartaz (E.C.4.3.1.1) [9027-30-9]

ihativa eden *Escherichia coli* hücrelerinin tutuklanması ile L-aspartat üretimi ile sağlanmıştır [1].

3.2 İmmobilizasyon Yöntemleri

Henniker, New Hampshire’da, (ABD) 1971 yılında yapılan “Enzim Mühendisliği” (*Enzyme Engineering*) toplantısında ilk olarak enzim immobilizasyonun olasılığı tartışılmış ve immobilizasyon dört farklı sınıfa ayrılmıştır. Günümüzde kullanılan immobilizasyon yöntemleri ise aşağıdaki diyagram da gösterilmiştir. Elbette bu yöntemlerin kombinasyonları da mümkündür [9].

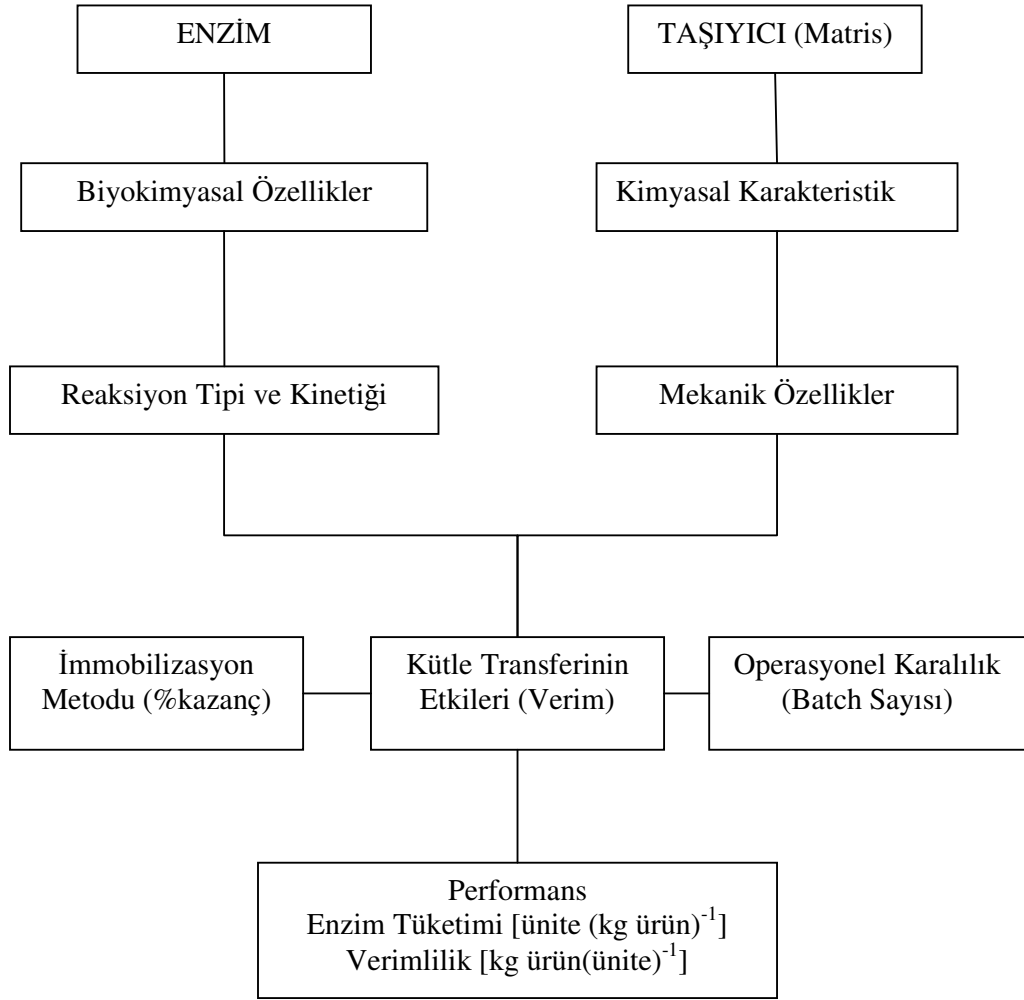


Şekil 3.1. İmmobilize Enzimlerin Sınıflandırılması

İmmobilize biyokatalizörlerin uygulamalarında, gereken aktiviteye ve karakterizasyonlarına göre elenmeleri en önemli noktadır. Ek olarak, destekleyici malzemelerin uygun kombinasyonunun ve immobilizasyon metodunun seçilmesi ve

her ikisinin de kullanılan biyokatalizör için elverişli olması da gerekmektedir. Günümüzde henüz pek çok biyokatalizör için en uygun immobilizasyon yönteminin tasarımında izlenecek sistematik bir yöntem bulunmamaktadır. Optimizasyon şu an için deneme-yanılma yöntemiyle yürütülmektedir. İmmobilizasyon tekniğinin seçimi amaçlanan sonuç esas alınarak ve biyokatalizörün, reaksiyonun ve reaktörün tipi göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Enzimi başka bir yüzeye immobilize ederken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta; enzimin katalitik aktivitesinde kayba neden olmayan, doğal yapısını ya da bağlanma bölgelerindeki reaktif grupları değiştirmeyen en uygun metodun seçilmesidir. Diğer bir deyişle enzimi mümkün olan en az hasarla bağlamaktır. Enzimin aktif bölgesine dair bilgiler bunun sağlanmasında yardımcı olacaktır. Enzimin aktif bölgesinde bir reaksiyon oluşmasını engellemek amaçlanmalıdır. Aktif bölge immobilizasyon sırasında korunabilir ve korumaya yardımcı olan maddeler, daha sonra aktivite kaybına neden olmadan uzaklaştırılabilirler. Bazı durumlarda bu koruma fonksiyonunu bir substrat ya da enzimin yarışmalı inhibitörü sağlayabilir. Enzimin immobilize edildiği yüzey enzim yapısını, hidrojen bağlarıyla veya elektron geçiş komplekslerinin oluşumuyla, korumak durumundadır. Bu bağlar enzimin vibrasyonuna engel olacak bu sayede de ısı kararlılığı artıracaktır. Yüzey ve enzimin etrafındaki sınırlı küçük çevre nötr yükleneceğinden enzimin optimum pH'sında 2 dereceye kadar bir kayma gözlemlenebilir. Bu da enzimin aktif olduğu pH aralığındaki daralmayı beraberinde getirecektir [1, 10].

İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellik kazanır. Bu özellikler de immobilize enzimin verimini ve performansını etkiler (Şekil3.2.) [11].



Şekil 3.2. Enzim Ve Matrisin İnteraksiyonu İle Ortaya Çıkan İmmobilize Enzimin Özellikleri

İmmobilize enzimin verimi hem bağlanma sırasında olan kayıplardan dolayı hem de enzim moleküllerinin gözeneklerden yavaş yavaş sızması ile azalır. Bu limitler verimi düşürür. Reaksiyon verimini artırmak için yapılabilecek şeyler şunlardır:

- Taşıyıcının parçacık boyutlarını düşürmek,
- Yüksek spesifik aktivitesi olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak,
- Enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamak [11].

Enzimlerin immobilizasyonu řu yöntemlerle gerçekleştirilir:

3.2.1 Tutuklama

Tutuklanmış biyokatalizörler beş değişik kategoride tanımlanırlar.

- i. Lattice tipi: Biyokatalizörler, polisakkarit, protein ve sentetik polimerlerden hazırlanan jel matrislerde tutuklanırlar.
- ii. Mikro kapsül tipi: Biyokatalizörler yarı geçirgen sentetik polimerlerde tutuklanırlar.
- iii. Lipozom tipi: Biyokatalizörler fosfolipitlerden hazırlanan sıvı membranlarda tutuklanırlar.
- iv. Hoolow-fiber tipi: Biyokatalizörler ortamdaki hollow fiberlerle ayrılırlar.
- v. Membran tipi: Biyokatalizörler harcanan reaksiyon çözeltisinden ultrafiltrasyon membranlarıyla ayrılırlar.

Tutuklama metodunun avantajı sadece tekil enzimlerin değil, değişik tipte enzimlerin, organellerin ve hücrelerin hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilmeleridir. Biyokatalizörler çeşitli modifikasyonlara uğramazlar ve immobilizasyon yüksek molekül ağırlığındaki enzim inhibitörlerinin etkisini elimine eder. Dezavantajları ise yüksek molekül ağırlığındaki substratlar enzime zorlukla tutunurlar ve taşıyıcılar yeniden elde edilemez. Ultrafiltrasyon membranıyla tutuklama yapıldığında, aktive olmamış enzim molekülleri bazen membran yüzeyine yapışıp reaksiyon çözeltisine geçişte azalmaya neden olsa da, yöntemin dezavantajları önlenebilir. Lattice tipi yöntem biyokatalizör immobilizasyonunda tutuklama yönteminin en çok kullanılan tipidir [1].

3.2.2 Çapraz Bağlama

Bu yöntemde immobilizasyon, proteinlerin çözünmeyen destek matrisindeki proteinlere veya fonksiyonel gruplara moleküller arası çapraz bağlanmasıyla sağlanır. Şekil A.5 da çapraz bağlanma şematik olarak gösterilmektedir. İki ve daha çok fonksiyona sahip bileşikler, enzimlerin molekülleri arasına çapraz bağlanmayı sağlayan maddeler olarak kullanılırlar. Proteinlerin kaçınılmaz olarak ana destek maddesi olarak davranmasından dolayı, enzimler kendi kendilerine çapraz bağlanabilirler, çapraz bağlanmış enzimler daha sonra çözünmeyen makro moleküller haline gelirler. Bu da verimin göreceli olarak düşmesine dolayısıyla

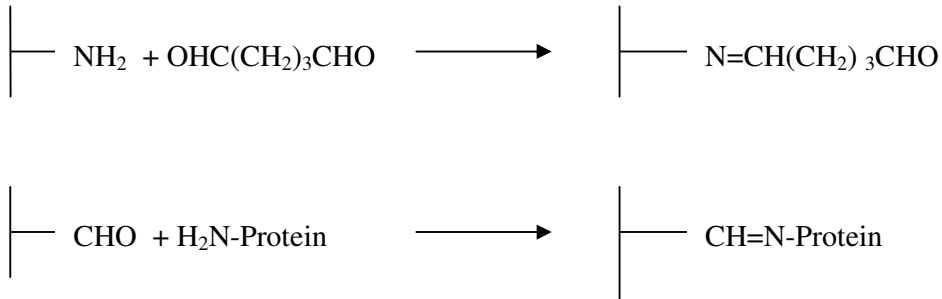
maliyetin artmasına neden olur. Bu dezavantajından dolayı çapraz bağlamanın başka bir yöntemle beraber kullanılması en iyi seçimdir [1,10].

Taşıyıcıyı aktive etmekte en çok kullanılan yöntem amid ya da birincil amin içeren taşıyıcının glutaraldehit ile muamelesidir. Glutaraldehit direkt olarak taşıyıcıya ilave edilerek, aldehit son grubuyla reaksiyon elde edilir. Aldehit grubun birincil amin ile pH 3–10'da 4–12 saat ve 4–25°C de gerçekleşen bu reaksiyonu *schiff base* formasyonu ile devam eder. Bunun ardından ikincil amin grubunu stabilize etmek için redüksiyon ajanı sodyum borohidrit, sodyum siyanoborohidrit ya da trimetilamin borat kullanılabilir. Redüksiyon ajanı ligand ile birlikte ya da ligand-taşıyıcı reaksiyonun ardından ayrı bir aşamada eklenebilir. Tüm bu aşamaların ardından taşıyıcı amin içeren bir tampon ile 0.1–0.5 M Tris- HCl ile yıkanarak artık aldehit grupları uzaklaştırılır. Protein ya da ligandlar, glutaraldehit ile aktive edilmiş taşıyıcıya üçlü bağ oluşturacak şekilde immobilize edilir.

Schiff's Base Reaksiyonu:

Bu metot *schiff's base* formasyonu yani aktive edilmiş taşıyıcının karbonil grubuyla enzimin serbest amino grubu arasında gerçekleşen aldimin bağla sağlanır (Şekil 3.2.).

Birincil amino grubu içeren taşıyıcı glutaraldehit ile aktive edilir bu sayede aktif karbonil türevi elde edilir. Bunun ardından aldehit türevi proteinin serbest amino grubu ile reaksiyona girerek *schiff's base* bağı meydana gelir. Bu metodun bir dezavantajı sulu ortamda geri dönüşümlü olmasıdır. Özellikle düşük pH'larda. Bu ise imin bağlarının NaBH_4 ile hidrojenasyonu sonucu stabil alkil amino grubu eldesiyle önlenir.



Şekil 3.3. Schiff's Base Reaksiyonu

3.2.3 Taşıyıcı Bağlama

Taşıyıcı bağlama uygulanan en eski immobilizasyon yöntemidir. Enzim proteinleri kimyasal aktif gruplar içeren aminoasit parçalar, iyonik gruplar ve/veya hidrofobik

gruplar ile hidrofobik alanlar içermektedir. Bu gruplar, kovalent bağ, iyonik bağ ya da fiziksel adsorpsiyon yöntemleriyle enzimlerin immobilizasyonunu sağlarlar. Taşıyıcıya bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası aktivitesi taşıyıcının doğasına bağlıdır.

Taşıyıcının seçimi enzimin yapısına bağlı olduğu kadar aşağıdaki kriterlere de bağlıdır:

- Partikül boyutu,
- Yüzey alanı,
- Hidrofilik ve hidrofobik grupların molar oranı,
- Kimyasal yapı.

Genel olarak hidrofilik grupların oranındaki ve bağlanan enzimin konsantrasyonundaki artış immobilize olan enzimin aktivitesinin daha yüksek olmasını sağlar. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılar; selüloz, dekstran, agaroz, ve poliakrilamid jel gibi polisakkarit türevleridir [10].

Enzimin bağlanma türüne göre taşıyıcı bağlama yöntemi alt sınıflara ayrılabilir:

İyonik Bağlama

Bu metot uygulanmasının kolay olması, desteklerin yenilenebilir olması ve enzimlerin modifiye olmaması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Enzimin taşıyıcıya bağlanması kullanılan tampon, pH, iyonik kuvvetler ve sıcaklık gibi değişkenlerden etkilenmektedir.

Fiziksel Adsorpsiyon

Biyokatalizörler çoğu zaman taşıyıcılara, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, van der Waal's kuvveti ya da bunların kombinasyonları gibi fiziksel yöntemlerle bağlanırlar. Biyokatalizörlerin herhangi bir modifikasyona uğramadan immobilize olmalarına rağmen, biyokatalizörle destek arasındaki etkileşim genellikle zayıftır ve sıcaklık ya da reaktan konsantrasyonu gibi dış etkenlerden etkilenirler. Çeşitli inorganik destekler kullanılır. Sentetik reçineler ya da çitosan gibi doğal malzemeler de yüksek adsorpsiyon kapasiteleri nedeniyle kullanılabilirler. Adsorpsiyonun ardından glutaraldehit (GA) çapraz bağlama immobilize enzimin aktivitesini stabilize eder. Proteinlerle kuvvetli bağ kuran tanin de immobilizasyonun ardından

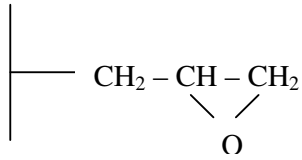
uygun bir ligand olarak kullanılabilir. Uygun koşullarda destekler yeniden elde edilebilir [1].

Kovalent Bağlama

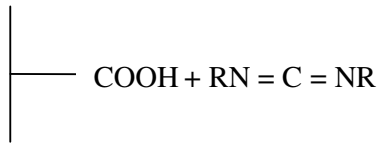
İmmobilize edilecek enzimin, aktif bölgesinde ya da substratla bağlanma bölgesinde bulunmayan fonksiyonel gruplarla gerçekleştirilebilirler. Genellikle bağlanma enzimin nükleofilik gruplarının, destek malzemesinin fonksiyonel grubuyla reaksiyonu sonucu meydana gelir. Enzim üzerindeki aminohidroksil ve tiol grupları bağlanmada rol alabilirler. Sistein, lizin, tirozin ve histidin artıkları en aktif yapılar olarak değerlendirilebilir. Bu tür moleküller arası bağlar enzimin kullanım süresinin genişlemesini sağlayabilirler.

Taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grubun tanıtılması gerekmektedir. Bunun için fonksiyonel monomerlerle kopolimerizasyon ya da polimer-tipi reaksiyon kullanılır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin başlıcaları aşağıdadır.

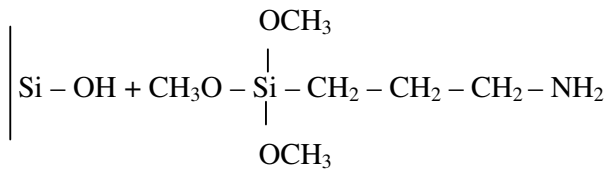
- Epoksidasyon metodu



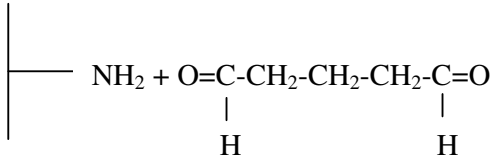
- Karbodiimid metodu



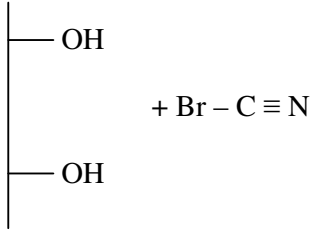
- Silanizasyon metodu



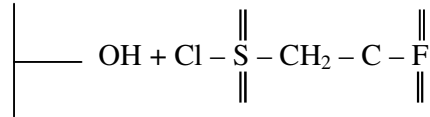
- Glutaraldehit (çapraz-bağlama)



- Siyanojen bromid



- Tresil klorid metodu



Kovalent bağla immobilize edilen enzimler şu avantajlara sahiptir:

- Oluşan sıkı bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı ya da parçalanmayla karşılaşılmaz,
- İmmobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir çünkü enzim desteğin yüzeyinde tutturulmuştur,
- Enzim molekülleriyle destek madde arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle çoğunlukla ısı-kararlılığında bir yükseliş görülebilir.

Diğer yandan kovalent bağın dezavantajları da vardır, bunlar ise:

- Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlarla bozulabilir,
- Enzim molekülleriyle destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketini engelleyebilir ve bu da enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açar;
- İmmobilizasyonun optimum koşullarını bulmak zordur,
- Destekler genellikle yenilenebilir değildir. Bu nedenle bu metot daha çok kararlılığın kovalent bağlanma yöntemiyle arttığından emin olunan enzimler için uygundur.

Tüm bu dezavantajlarına rağmen, kovalent bağlanma analitik amaçlı immobilizasyonlarda kullanılır.

Yukarıda bahsedilen tüm immobilizasyon yöntemlerini bir arada değerlendirmek gerekirse, adsorpsiyon kolay, ucuz ve efektiftir ancak çoğunlukla kararlı değildir ve geriye dönüşüm gözlenir. Tutuklama ve mikrokapsülleme yönteminde ise difüzyon problemleri gözlenir. Enzimin kovalent bağlanma ile bir taşıyıcıya bağlanması endüstriyel açıdan en cazip yöntem olarak öne çıkmaktadır. Çünkü kovalent bağlanma özellikle çapraz bağlanma ile birlikte uygulandığında efektif ve kararlıdır. Çapraz bağlama ajanı olarak da en iyi sonuçlar glutaraldehit ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Kovalent bağlanmanın uygulanacağı taşıyıcıya ait de günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Organik ya da inorganik, doğal ya da sentetik pek çok madde denenmiş ve çitin ve çitosan içlerinde en ön plana geçen iki malzeme olmuştur [1, 2, 9, 12].

4. ÇİTİN ve ÇİTOSAN

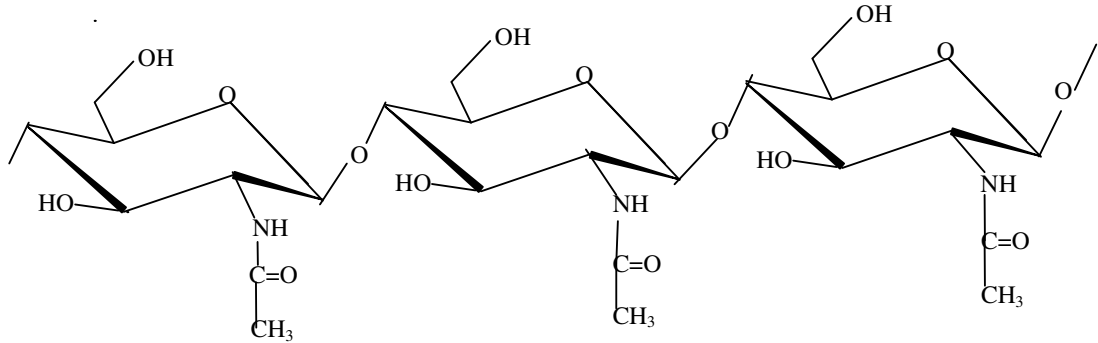
İmmobilize enzimlerin özellikleri hem enzimin hem de enzimin immobilize edildiği taşıyıcının özelliklerinin hâkimiyetindedir. Enzimin spesifik fiziko-kimyasal ve de kinetik özellikleri endüstrideki kullanım alanına göre seçilirken, taşıyıcının seçimine karar verilirken immobilize sistemin operasyonel özelliklerini güçlendirebilmesi dikkate alınmalıdır. Günümüzde henüz her enzim ve kullanım alanı için evrensel olarak belirlenmiş taşıyıcılar olmasa da aranan bazı genel nitelikler vardır. Bunlar: yüksek protein affinitesi, fonksiyonel reaktif gruplara enzimle direk reaksiyon sonucu ya da kimyasal modifikasyonlarla ulaşılabilmesi, hidrofilitiklik, mekanik kararlılık ve dayanıklılık, yeniden kullanılabilirlik, seçilen biyotransform için uygun yüzey alanıdır. Ek olarak artan toplum sağlığının ve çevrenin korunması bilincinin neticesinde seçilen malzemeler biyolojik olarak dönüştürülebilir ve ekonomik olmalıdır [2].

İmmobilizasyonda kullanılan silika bazlı taşıyıcılar ve sentetik polimerler gibi popüler taşıyıcıların yüksek maliyeti bunların yerini alabilecek daha ucuz materyallerin araştırılmasına neden olmuştur. CaCO_3 , pirinç kabuğu veya kamışı ile çitin ve çitosan kullanılan taşıyıcıların yerini alabilecek alternatifler olarak ortaya çıkmıştır. Tüm bu seçenekler arasından çitin ve çitosan en çok göz önüne çıkanlardır. Çünkü çitin selülozdan sonra doğada en bol bulunan ikinci biyopolimerdir ve buna ek olarak, enzim immobilizasyonu taşıyıcısı olarak pek çok avantaj sağlamaktadır. Sağladığı avantajlar arasında: değişik fiziksel formlarda kullanılabilmesi, (ince tabaka, gözenekli tanecikli yapı, jel, fiber, ince zar), bozunmasındaki düşük seviye, kolay yönetilmesi, proteinlere karşı yüksek affinite göstermesi ve zehirsiz olması sayılabilir. Bunların yanında yapılan pek çok immobilizasyon çalışmasında da iyi neticeler vermiş olması çitin ve çitosan taşıyıcı olarak kullanılmalarındaki çekiciliklerini artırmıştır [13].

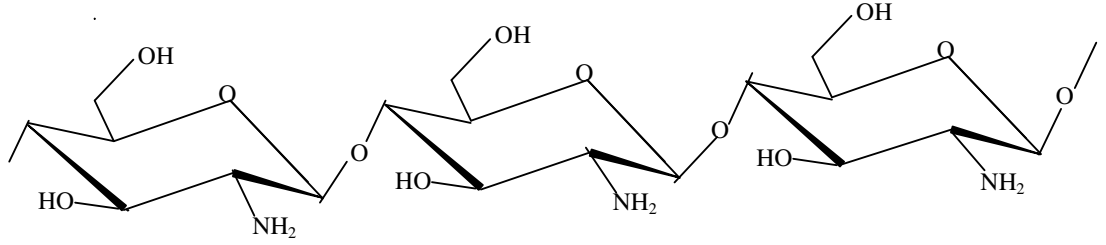
Çitin ve çitosan doğal poliaminosakkaritlerdir. Deniz kabuklularında (yengeç, karides gibi), örümceklerin *cuticle* bölgesinde, fungusların hücre duvarlarında bulunurlar, kararlılık ve dayanıklılığının temeli de buradan gelir. Çitin biyosferde,

yaklaşık 10 Gt gibi yüksek bir miktarda sentezlendiği hesaplanmıştır. Kimyasal olarak çitin β -(1 $\rightarrow$ 4) 2-asetamido- 2-deoksi- β -D-glukoz birimlerinden (ya da N-asetil-D-glukozamin) oluşan ve uzun zincirli lineer bir polimerdir (Şekil 4.1). Pek çok solvent içinde çözünmez. Çitosan ise β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cN) ve β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cNAc)'dan oluşan lineer ikili bir heteropolisakkarittir ve çitin, poli[β -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz], alkali deasetilasyonu ile elde edilir (Şekil 4.2). Çitosan terimi farklı molekül ağırlığındaki (50kDa-2000kDa), farklı viskozitelerdeki (%1 asetik asit içindeki çitosan, <2000 mPa.s) ve farklı derecelerde deasetilasyon görmüş (%40 - %98) bir polimerler serisini tanımlamak için kullanılır. [2, 14 -16].

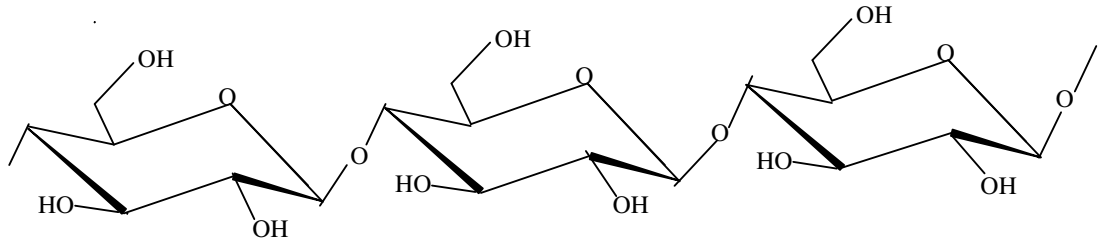
Çitin ve çitosan, kimyasal olarak selülozun (Şekil 4.3) analogları olarak değerlendirilebilir. Selülozun 2. karbonundaki hidroksil, çitinde asetamid, çitosanda ise amino gruplarıyla yer değiştirmiştir. Çitosan suda çözünmez, ancak amino gruplarının varlığı pH 6.5'in altındaki asidik çözeltilerde çözünmesine sebebiyet verir. Ayrıca hidroklorik asit, asetik asit, glutamik asit gibi organik ve inorganik asitlerde çözülebilir tuzlar meydana getirir. Çitin ve çitosanın doğada tek başlarına bulunmadıklarını, kaynaklarına ve elde edilme proseslerine bağlı olarak farklı kompozisyonlar içinde bulunduklarını da belirtmek gerekir.



Şekil 4.1. Çitin Yapısı

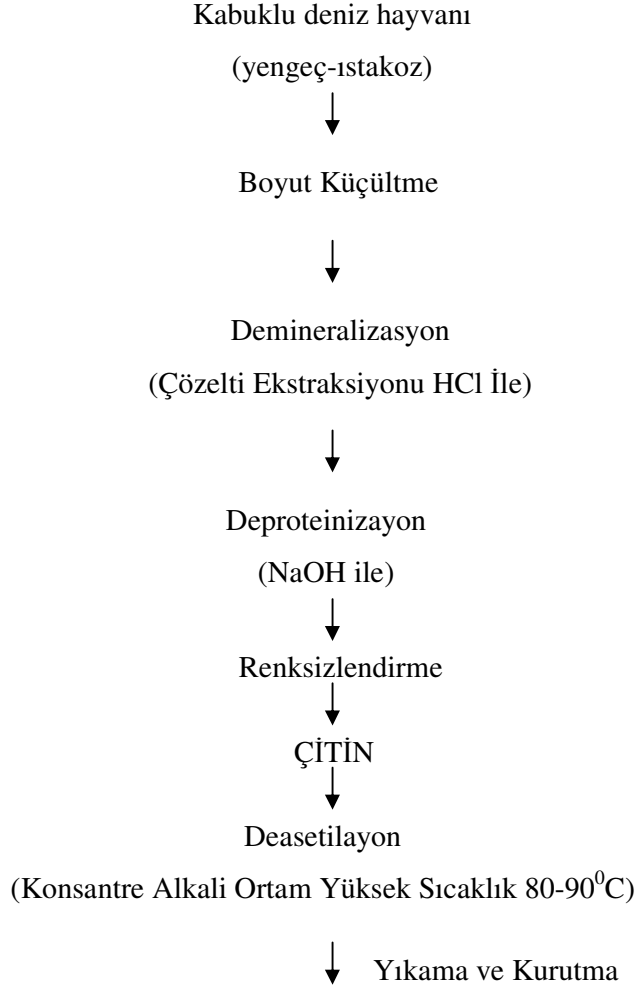


Şekil 4.2. Çitosanın Yapısı



Şekil 4.3. Selülozun Yapısı

Ticari olarak, çitin ve çitosan, oldukça düşük maliyetlerle, kabuklu deniz hayvanlarından (temel olarak yengeç, karides, ıstakoz gibi), deniz mahsulleri proseslerinin artıklarından elde edilirler. Temel olarak proses, ham haldeki deniz kabuklarının seyreltik NaOH ile proteinin alınması, ve seyreltik HCl çözeltisi ile kirecinin alınması şeklinde gerçekleştirilir. Çitosanın üretimi (Şekil 4.4) üç temel aşamadan oluşur. İlk aşama deniz kabuklularının ya da diğer materyallerin seyreltik (%3–5) hidroklorik asit ile oda sıcaklığında bekletilmesiyle, kalsiyum karbonatın ve kalsiyum klorürün çözündürülmesi, demineralizasyon aşaması. Bunun ardından seyreltik NaOH ve ısı ile deproteinizasyon aşaması ki bu aşama çitin eldesini sağlamaktadır. Renkli haldeki çitin renginin alınması çitin aseton ekstraksiyonu ile sağlanır ve sodyum hipoklorit çözeltisi ile ağartılır. Üçüncü aşamada berrak supernatant çözelti konsantre alkali ortama maruz bırakılarak, beyaz çökelti halinde saf çitosan eldesi tamamlanmış olur. Bu sayede çitosanın üretilip yararlı hale getirilmesi, deniz kabuklularının artıklarının değerlendirilmesi açısından dünya çapında ekonomik bir anlama da sahiptir [2, 17].



Şekil 4.4. Çitin ve Çitosan Prosesi Akım Şeması

Çitosan çok farklı kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Yüksek molekül ağırlıklı lineer poliglukozamin zincirinde, kimyasal modifikasyonlara uyumlu reaktif amino ve hidroksil grupları içerir. Buna ek olarak doğada çok az rastlanan bir şekilde içerdiği amino grupları çitosanı katyonik polielektrolit ($pK_a \approx 6.5$) hale getirir. Bu esas da çitosana özgül bir nitelik sağlar: çitosan $pH < 6.5$ olan sulu asidik ortamlarda çözülebilir ve eriyik $-NH_3^+$ gruplarında yüksek pozitif yüke sahip olup negatif yüklü yüzeylere yapışır, poliiyonik bileşiklerle birleşir ve ağır metal iyonlarını çelatlar. Hem asidik çözeltilerdeki çözünmesi hem de polianyonlarla agretasyonu çitosanın mükemmel bir jel oluşturma niteliğine sahip olmasına sebep olur. Çitin biyolojik uyumu, zararsız ürünlere ayrıştırılabilmesi, zehirsiz oluşu,

fizyolojik inertliği gibi nadir bulunan biyolojik özellikleriyle birlikte, proteinlere karşı olağanüstü affinitesi, hemostatik, fungistatik, antikolosteremik nitelikleri, çok geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlar. Çitin ve çitin türevlerinin standartlaştırılmasıyla birlikte sahip oldukları ilginin daha da hızlı büyüyeceği tahmin edilmektedir.

Özellikle son on yılda artarak, çitin ve çitosan bazlı malzemeler denmiş ve çok çeşitli potansiyel ürünler geliştirilmiştir. Atık su işlemlerinde (ağır metal iyonlarının uzaklaştırılması, boya ve proteinlerin flokülasyonu, koagülasyonu, membran temizleme prosesleri), gıda endüstrisinde (antikolesterol ve yağ bağlama, koruyucu, paketlenme malzemesi, hayvan yemi katkı maddesi), ziraatte (tohum ve gübre kaplama, kontrollü zirai kimyasal salınımı), hamur ve kâğıt endüstrisinde (yüzey işlemleri, fotografik kâğıt), kozmetikte (nemlendirici, vücut kremleri, banyo losyonları) yer aldığı prosesler gelişimlerine örnek olarak verilebilir.

Ama eşsiz biyolojik özellikleri sayesinde çitin ve çitosan bazlı malzemelerin en heyecan verici kullanımları elbette ilaç ve biyoteknoloji alanında olanlardır. İlaçta, bakteriyostatik ve fungistatik ajanlar olarak, ilaç salınım araçları, ilaç kontrollü salınım sistemlerinde, yapay hücrelerde, yara iyileştirici merhemlerde/pansumanlarda, kontakt lenslerde, yapay derilerde, doku mühendisliğinde kullanılırlar. Ayrıca enzim/hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılırlar.

Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak çitin ve çitosan bazlı malzemeler toz, ince tabaka ve jel gibi değişik geometrik konfigürasyonlarda kullanılırlar. Çitin/çitosan tozları ve tabakaları ticari ürün olarak Sigma-Aldrich ve çitosan jel tanecikleri (Chitopearl) Fuji Spinning Co. Ltd. (Tokyo, Japonya), firmalarından elde edilebilirler. Farklı formlardaki çitin ve çitosanlar laboratuar ortamında üretilmektedir. Çitosan jellerinin hazırlanması, çitosanın çoğunluğu organik asit olan formik asit, asetik asit, tartarik asit ve sitrik asitin seyreltik çözeltiğinde çözünüp viskoz solüsyonlar oluşturmaları ve pH'daki yükselmeye birlikte çökeliş suda çözünen anyonik polielektrolitlerle, iyonotropik kompleksler oluşturmaları ilkesiyle yürütülür. Bu yöntemle tanecik, membran, kapsül, lif, içi boş lif ve süngerimsi çitosan jelleri üretilebilir. Jel kararlılığını ve dayanıklılığını geliştirmek için çok farklı üretim sonrası modifikasyonlar uygulanır [2, 16].

5. PROTEAZ İMMOBİLİZASYONU ile İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Toshio Hayashi ve Yoshito Ikada 1991 yılında yayımlanan çalışmalarında proteaz enziminin gözenekli çitosan kürecikleri üzerine kovalent bağlanmayla immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Immobilize proteazların küçük ester substratında, N-benzil-L-arjinin etil ester (BAEE), kısmen yüksek aktivite göstermesine karşın kazein substratına karşı daha düşük aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada immobilize enzimin sıcaklık, pH, saklama ve operasyonel kararlılıkları da incelenmiştir. Bu incelemelere göre, yüksek sıcaklıklarda immobilize papain serbest olanlara göre daha karardır. +70°C’de immobilize enzimler serbest olanlara oranla 2.8–3.4 kez daha yüksek aktivite göstermişlerdir. pH’nın enzimler üzerindeki etkisine bakıldığında ise immobilize enzimin serbest enzim ile aynı optimum pH’ya (pH 8.0) sahip olduğu ancak kararlı olduğu pH aralığının genişlediği görülmüştür. Özellikle yüksek pH’larda immobilize enzim oldukça yüksek bir kararlılık sergilemiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin aynı koşullarda saklanması halinde ise serbest enzimin aktivitesinin %30 undan fazlasını kaybettiği 6 aylık sürede immobilize enzimin önemli bir aktivite kaybı olmaksızın korunduğu yayında belirtilmiştir. Tekrar kullanımı halinde ise immobilize enzim 10 kesikli reaksiyonun ardından belirgin bir aktivite kaybı sergilememiştir [16].

Bacillus Mycoides’den üretilen alkali proteazların immobilizasyonu üzerine, Naby ve çalışma arkadaşlarının 1997’de yayımladıkları makalelerinde, enzimin fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlanma, kovalent bağlanma ve tutuklama ile farklı destek malzemelere immobilizasyonuna ait çalışmalara yer verilmiştir. Fiziksel adsorpsiyonda, çitosan, iyonik bağlanmada, *Amberlite IR-120*, kovalent bağlanmada çitin ve tutuklamada %2’lik çapraz bağlı poliakrilamid en yüksek aktivitelerin gözlemlendiği destek malzemeler olmuştur. Optimum pH’sı serbest halde 9.0 olan enzimin immobilizasyon sonrasında optimum pH’sı, çitin ve çitosanın kullanıldığı durumlarda 8.7 gibi daha asidik bir değere, *Amberlite IR-120* ve poliakrilamidin kullanıldığı durumlarda ise sırasıyla 10.0 ve 9.7 gibi daha alkali değerlere kaydığı belirtilmiştir. Sıcaklık karşısındaki kararlılıkları incelendiğinde immobilize enzimler

%39–82 aralığında aktivitelerini korurken, serbest enzim başlangıç aktivitesinin %21’ini korumuştur. Sıcaklık karşısında en yüksek kararlılığı aktivitesinin %82’sini koruyan *Amberlite IR-120* gösterirken en dirençsiz immobilize enzim %39’luk aktivitesiyle çitin olmuştur. Saklama koşullarına bakıldığında serbest enzimin +5°C de 5–6 ay sonunda aktivitesinin %50’sini kaybetmesine karşın tüm immobilize enzimler aynı koşullarda aktivitelerini büyük oranda korumuşlardır. İmmobilize enzimlerin belirtilen süre sonunda başlangıç aktivitelerinin %88–100’ünü göstermişlerdir. Tüm bu çalışmaların neticesinde immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı olduğu ve uzun süre kuru ve ıslak formda saklanabildiği belirtilmiştir [17].

Chellapandian 1997 yılında sunduğu “*Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite*” adlı makalesinde kovalent bağlanmayla, çapraz bağlanmayı beraber kullanarak gerçekleştirdiği immobilizasyonu açıklamıştır. Glutaraldehit ile aktive edilmiş vermiculit üzerine alkali proteaz kovalent bağla immobilize edilmiştir. En yüksek aktiviteye glutaraldehitte 15 dakika işlem görmüş vermiculit üzerine pH 6.5 da 120 dakika süreyle gerçekleştirilen immobilizasyonla ulaşıldığı belirtilmiştir. Bu sayede 12.48 mg/g taşıyıcı oranında bağlanma sağlanırken, yüksek molekül ağırlıklı substrat, kazein kullanımında %36, düşük molekül ağırlıklı substrat, hemoglobin kullanımında %52 spesifik aktivite saptanmıştır. Serbest enzime göre immobilize enzimin optimum pH’sı bir birim daha alkali ortam yönünde kayma gösterirken, pH kararlılığında hem asidik hem de bazik pH aralıklarında immobilize enzimin daha dayanıklıdır. Sıcaklık kararlılığında da immobilize enzim serbest enzime göre daha yüksek kararlılık sergilemiştir. +70°C de serbest enzim aktivitesinin %17’sini korurken immobilize enzim %28’ini korumuştur. +4°C de borat tamponda 60 gün saklanan immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %84’ünü +25°C de yine borat tamponda saklanan immobilize enzim ise 60 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %66’sını korumuştur. Tekrar kullanılabilirliği de değerlendirilen immobilize enzimin 5 kullanım sonunda orijinal aktivitesinin %78’ini koruyabildiği gözlemlenmiştir [18].

1998 yılında Chae ve çalışma arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada ise glutaraldehit kullanarak proteaz enzimin kovalent bağlanmaya immobilizasyonunun optimizasyonu incelenmiştir. Hem taşıyıcı aktivasyonundaki hem de immobilizasyondaki pek çok parametre değerlendirilip immobilizasyonda en yüksek

verim elde edilmeye çalışılmıştır. İlk önce taşıyıcının aktive edilmesi aşamasındaki glutaraldehit etkisi incelenmiş ve GA konsantrasyonunun %1'in üzerindeki değerlerinin verim artışına bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Bu sebeple %1'lik konsantrasyonla 2 saatlik işlem uygulanmıştır. Kullanılan tampon çözelti için ise pH 7 ve molarite ise 50mM olarak setlenmiştir. Bu koşullar altında enzim çözeltisinin konsantrasyonu ve yükleme oranı incelenmiş ve immobilizasyon için optimum değer olarak 3 mg enzim/g taşıyıcı ile 1.8mg/ml enzim çözeltisi seçilmiştir. Bu koşullar altında aktivite geri kazanımında % 43 değerine ulaşılmıştır. İmmobilize enzimin sıcaklık kararlılığına bakıldığında serbest enzime kıyasla önemli bir dayanıma sahip olduğu gözlemlenmiş ve immobilize enzimin aktivitesinde bariz bir azalmanın görülmediği 15 saat sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin %38'ini kaybettiği belirtilmiştir [19].

Tanksale ve çalışma arkadaşları 2000 yılında *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen alkali proteazın poliamid üzerine immobilizasyonu üzerine yaptıkları çalışmayı yayımlamışlardır. Bu çalışmada da kovalent bağla immobilizasyon öncesi GA kullanılmıştır. %1.76'lık GA çözeltisi kullanarak yapılan 6 saatlik immobilizasyon en iyi sonucu vermiş ve immobilizasyon verimi %58 olarak kaydedilmiştir. Kovalent bağlı immobilize sistemlerin sıcaklık karşındaki yüksek dayanımı bu çalışma ile bir kez daha onaylanmış ve +40 °C de en yüksek aktivitesini gösteren saf *Conidiobolus* proteazına karşın immobilize proteaz +60°C de serbest enzimin 10 katı yüksek bir aktivite göstermiş ve yüksek bir sıcaklık kararlılığı sergilemiştir. pH kararlılığına bakıldığında immobilize enzim ile aserbest enzim aynı pH aralığında (5–12) aktivitelerinin %50'sini korumayı başarmışlardır. Bu anlamda immobilize enimin pH kararlılık aralığında fazla bir değişme olmamıştır ancak optimum pH'nın 1–2 derecelik bir düşüşle daha asidik ortama kaydığı gözlemlenmiştir. Enzimlerin deterjanla uyumluluklarının da incelendiği bu çalışmada serbest enzim ve immobilize enzimin her ikisinin de deterjanlara karşı uyumluluk gösterdiği anlaşılmıştır. Aynı koşullarda deterjan uyumlulukları incelendiğinde saf enzimin %76 immobilize enzim %84 oranında aktivitelerini koruyabilmişlerdir. Son olarak tekrar kullanılabilirliği incelenen immobilize enzimin 22 kez tekrarlanan reaksiyonlar sonunda aktivitesinde önemli bir düşüş olmadığı gözlemlenmiştir ki bu da enzimlerin maliyetini düşürmek noktasında çok iyi bir neticedir [20].

6. DENEYSEL ÇALIŞMA

6.1 Cihazlar

UV Spektrofotometre, UV mini 1240 SHIMADZU

Su Banyosu, Yamato Shaking Bath BW 400

Hassas Terazî, AND

Manyetik karıştırıcı, IKAMAY Janke-Kunkel

pH metre, WTW

Cam Malzemeler,

6.2 Kullanılan Malzemeler

6.2.1 Taşıyıcılar

Çitin, SIGMA Chitin from crab shells practical grade ($C_8H_{13}NO_5$)_n

Çitosan, SIGMA Chitosan from crab shells min 85% deacetylated $C_{12}H_{24}N_2O_9$

6.2.2 Enzim ve Diğer Malzemeler

Proteaz Enzimi, PELLUCIT FS

Glutaraldehit, BDH Chemicals Ltd.

Trikloroasetik asit (CCl_3COOH), Carlo Erba

Sodyum Asetat (CH_3COONa), Carlo Erba

Sodyum Hidroksit ($NaOH$), Carlo Erba

Süt Kazeini ($C_8H_{12}O_3N_2$), SIGMA Casein from bovine milk

Tris-HCl, Merck

HCl, Merck

Asetik Asit, Merck

Fosforik Asit, Riedel-de H  en

Borik Asit, Riedel-de H  en

Mavi Bant Süzgeç K  ğıdı, Filtrak

Distile Su

6.2.3 Çözeltiler ve Tamponlar

Tris-HCl Tamponu (0.5 M): 78.8 g Tris-HCl tartılıp 1 litre distile suda çözülmüş ve 0.1 N NaOH ile istenen pH'ya ayarlanır.

Tris-HCl Tamponu (0.05 M): 7.88 g Tris-HCl tartılıp 1 litre distile suda çözülmüş ve 0.1 N NaOH ile istenen pH'ya ayarlanmıştır.

Tris-HCl Tamponu (0.1 M): 15.76 g Tris-HCl tartılıp 1 litre distile suda çözülmüş ve 0.1 N NaOH ile istenen pH'ya ayarlanmıştır.

Tris-HCl Tamponu (1 M): 157.6 g Tris-HCl tartılıp 1 litre distile suda çözülmüş ve 0.1 N NaOH ile istenen pH'ya ayarlanmıştır.

NaOH Çözeltisi (0.1 N): 4 g NaOH tartılıp 1 litre distile suda çözülmüştür.

NaOH Çözeltisi (10 N): 40 g NaOH tartılıp 100 ml distile suda çözülmüştür.

HCl Çözeltisi (1N) : 8.3 ml hidroklorik asit 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Süt Kazeini Substrat Çözeltisi A (%0.6 a/h): 0.6 g süt kazeini 10 ml 0.1 N NaOH çözeltisinde manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra bir miktar distile su ve Tris-HCl eklenir. pH'sı istenen değere 10 N NaOH veya 1N HCl ayarlandıktan sonra 100 ml ye distile su ile tamamlanır.

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

TCA Karışım Çözeltisi (0.11 mol/l Trikloroasetik asit; 0.22 mol/l Sodyum Asetat; 0.33 mol/l Asetik Asit): 8.985 g Trikloroasetik asit, 14.97 g Sodyum Asetat ve 15.7 ml Asetik Asit karıştırılarak distile su ile 500 ml ye tamamlanır.

Sodyum Asetat Çözeltisi (0.1 M): 0.68 g sodyum asetat tartılır ve distile su ile 50 ml ye tamamlanır.

Asetik Asit Çözeltisi (0.1M): 0.2857 ml asetik asit distile suda çözülerek 50 ml'ye tamamlanır.

Asetat Tampon (0.1M pH 5) : 30 ml 0.1M sodyum asetat alınarak, pH 5'e ulaşıncaya kadar asetik asit ilave edilir.

Glutaraldehit Çözeltisi (%0.8): 0.08 ml glutaraldehit 9.92 ml 0.1M pH 5 asetat tamponda çözülür.

Glutaraldehit Çözeltisi (%1): 0.1 ml glutaraldehit 9.9 ml 0.1M pH 5 asetat tamponda çözülür.

Glutaraldehit Çözeltisi (%2): 0.2 ml glutaraldehit 9.8 ml 0.1M pH 5 asetat tamponda çözülür.

Britton-Robinson Tampon (B-R Tampon):

Çözelti A: 2.71 ml H_3PO_4 , 2.36 ml asetik asit, 2.47 g H_3BO_3 karıştırılır ve distile su ile 1 litreye tamamlanır.

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

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

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

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

B-R Tampon; pH 10: 100 ml A çözeltisi, 80 ml B çözeltisi 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

2.5 ml %0.6 kazein çözeltisi +30 °C su banyosunda 5 dakika bekletilir. Ardından 0.5 ml enzim çözeltisi ya da 0.5 ml enzimin immobilize edilmiş olduğu taşıyıcı tartılarak kazein çözeltisine ilave edilir ve yine +30°C de 10 dakika daha 150 rpm de karıştırılarak bekletildikten sonra 2.5 ml TCA karışım çözeltisi ile reaksiyon sona erdirilir. TCA karışım çözeltisinin eklenmesinden sonra karışım aynı sıcaklıktaki su banyosunda 20 dakika aynı rpm de karıştırılmaya devam edilir. Bu süre sonunda reaksiyon karışımı çitinin kullanıldığı immobilizasyonlarda süzgeç kağıdından süzülürken, çitosanın kullanıldığı çözeltilerde ise santrifüj edilir. Şahit hazırlanırken de aynı işlemler enzim çözeltisi yerine distile su kullanılarak yapılır. Karışım içindeki tirozin miktarı UV spektrofotometrede 275nm de absorbansı ölçülerek tayin edilir. Bir ünite enzim aktivitesi 1µg tirozini +30°C’de bir dakikada açığa çıkarmak için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanır.

1U/ml= 1µg tirozin / dakika. ml

Tirozin standart eğrisini oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda tirozin %50 TCA çözeltisi içinde çözülür. Elde edilen çözeltilerin UV spektrofotometrede 275nm dalga

boyunda absorbansları okunur. Tirozin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek tirozin standart eğrisi hazırlanır (Şekil A.10).

Enzim aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$1U/ml = (\text{Numunenin absorbans değeri/tirozin standardının eğimi}) \times (1/\text{reaksiyon süresi (dakika)}) \times (\text{reaksiyon hacmi/enzim hacmi}) \times \text{seyreltme oranı} \quad (6.1)$$

$$1U/ \text{mg taşıyıcı} = (U/ml \text{ enzim}) / (\text{mg taşıyıcı/ml enzim}) \quad (6.2)$$

6.3.2 Verimin Hesaplanması

İmmobilizasyonun verimine karar verirken hesaplanan iki katsayıdan biri aktivite geri kazanımı (AGK), diğeri ise etkinlik oranıdır (EO).

$$AGK = \text{immobilize enzim aktivitesi} / \text{ilk eklenen aktivite} \times 100 \quad (6.3a)$$

$$AGK = U_{\text{imm}} / U_0 \times 100 \quad (6.3b)$$

$$EO = \text{immobilize enzim aktivitesi} / (\text{ilk eklenen aktivite} - \text{rafinat aktivitesi}) \times 100 \quad (6.4a)$$

$$EO = U_{\text{imm}} / (U_0 - U_R) \times 100 \quad (6.4b)$$

6.3.4 İmmobilizasyon

6.3.4.1 Taşıyıcıların Aktive Edilmesi

İmmobilizasyon için kullanılacak olan taşıyıcılardan, çitin ve çitosan, istenen miktar tartıldıktan sonra GA (glutaraldehit) çözeltisi ile karıştırılır ve +4°C’de bekletilir. 1 g taşıyıcı için 10 ml GA kullanılmıştır. GA yüzdesi ve kontak zamanı deneysel olarak belirlenmiştir aktivasyon süresinin sonunda aynı tampon ile karışım yıkanarak GA fazlası uzaklaştırılır.

6.3.4.2 Kovalent Bağlanma ile Enzim İmmobilizasyonu

Proteaz enzimi Tris-HCl tamponu içinde çözülerek enzim çözeltisi hazırlanır. Aktive edilmiş taşıyıcıya, enzim çözeltisi eklenerek +4°C’de 2 saat bekletilir ve kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi sağlanır. İmmobilizasyonda kullanılacak enzim miktarı, enzim çözeltisinin hazırlanmasında kullanılacak tamponun konsantrasyonu ve pH değeri, enzim çözeltisinin konsantrasyonu, enzim/taşıyıcı oranı, deneysel olarak belirlenir. İmmobilizasyonun ardından taşıyıcı ve enzim çözeltisinden oluşan karışım

aynı tampon ile yıkanarak bağlanmamış enzim fraksiyonu toplanır. Enzim bağlanmış taşıyıcı ve bağlanmamış enzim fraksiyonunun proteolitik enzim aktivitesi ölçülür.

6.3.5 Serbest Enzimin Karakterizasyonu

6.3.5.1 pH Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest enzimin pH kararlılığının belirlenebilmesi için 50 µl enzim çözeltisi 150 µl 7 ve 12 aralığındaki pH'lardaki B-R tampon çözeltilerinde +4°C'de 20 saat bekletilir. Daha sonra 0.05M Tris-HCl tamponu (pH 7.2) ile 1 ml ye seyreltilerek enzim aktivitesine bakılır. Referans numune olarak 50 µl enzim 150 µl 0.05M Tris-HCl tamponu (pH 7.2) içinde +4°C'de 20 saat bekletilerek hazırlanır. Referans numune de aynı tampon ile 1 ml ye seyreltilerek aktivitesi ölçülür.

6.3.5.2 Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

Saf enzimin 0.025 ml si 0.475 ml 0.05M pH 7.2 olan Tris-HCl çözeltisinde +30°C'den +80°C'ye kadar değişen sıcaklıklarda hazırlanmış su banyolarında 30 dakika bekletilir. 30 dakikanın sonunda numuneler buz üstüne konarak hızla soğutulur. 5 dakika soğuma işleminin gerçekleşmesinin ardından aktivite ölçümü yapılır. Referans olarak +30°C'de sıcaklık kararlılığı belirlenen numune kullanılır.

6.3.6 İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

6.3.6.1 Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

Enzim immobilizasyonu tamamlanmış taşıyıcılar tartılarak saf enzimde kullanılan oranlarda 0.05M pH 7.2 Tris-HCl çözeltisinde +30°C'den +80°C'ye kadar değişen sıcaklıklarda hazırlanmış su banyolarında 30 dakika bekletilir. 30 dakikanın sonunda numuneler buz üstüne konarak hızla soğutulur ve enzim aktiviteleri ölçülür. Referans olarak +30°C'de sıcaklık kararlılığı belirlenen numune kullanılır.

6.3.6.2 pH Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize enzimin pH kararlılığının belirlenebilmesi için enzimin immobilize olduğu taşıyıcı, kullanılan enzimin 3 katı hacmindeki 7-12 aralığındaki pH'lardaki B-R tampon çözeltilerinde +4°C'de 20 saat bekletilir. Daha sonra aynı miktardaki 0.05M Tris-HCl tamponu (pH 7.2) ile yıkanıp süzülerek, enzim aktivitesi ölçülür.

Referans olarak +4°C’de 20 saat 0.05M Tris-HCl tamponu (pH 7.2) bekletilmiş ve 1 ml aynı tampon ile seyreltilerek aktivitesi ölçülmüş olan numune kullanılır.

6.3.6.3 Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi

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

6.3.6.4 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.

6.3.6.5 Saklama Kararlılığının Belirlenmesi

Taşıyıcılara kovalent bağlanmayla immobilize edilen enzimler tampon çözelti ile yıkandıktan sonra süzülüp kurutularak +4°C de saklanırlar. Belirli aralıklarla alınan numunelerin aktivitesi ölçülerek immobilize enzimlerin saklanması halinde aktivitelerinin ne kadarını koruduğu tayin edilmiş olur.

7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

7.1 Proteaz İmmobilizasyonunun Optimizasyonu

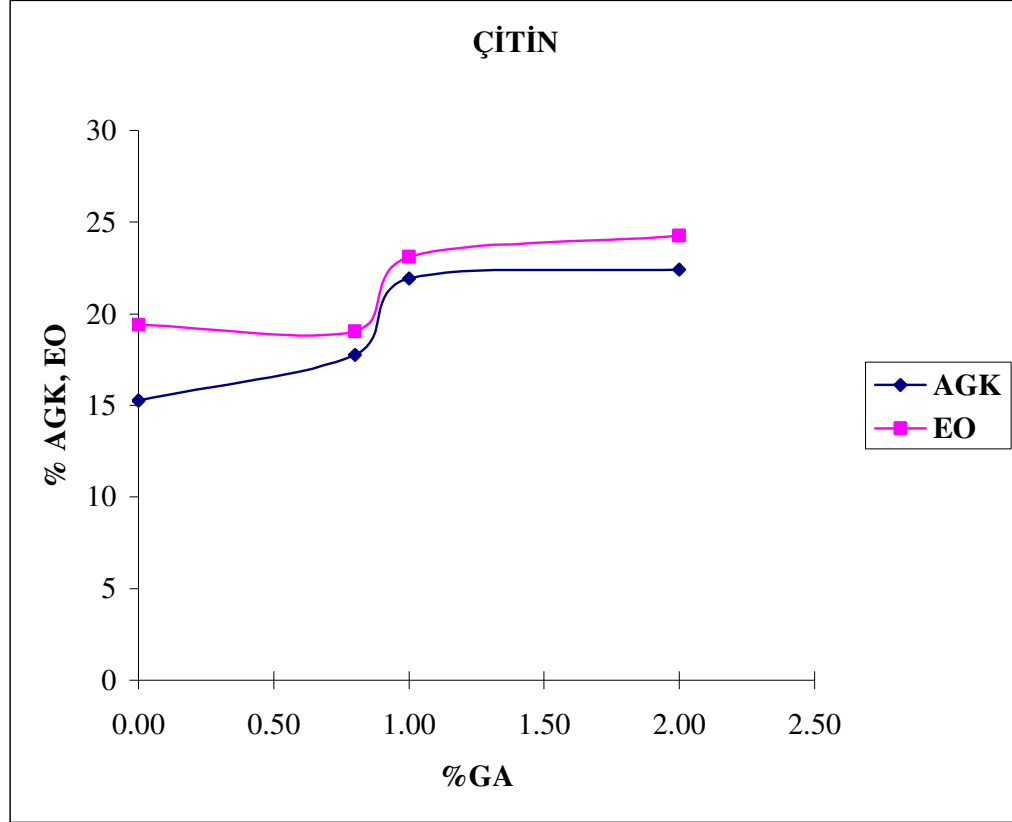
7.1.1 Glutaraldehit Konsantrasyonunun Etkisi

Daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi immobilizasyon yöntemlerinin bir arada uygulanması mümkündür. Bu nedenle birincil yöntem olarak kovalent bağlanmanın uygulanacağı bu çalışmada, çapraz bağlanmanın yardımcı etkisi ilk olarak incelenmiştir. Kovalent bağlanma öncesinde glutaraldehit (GA) çapraz bağlama yapılması aktivite geri kazanımını (AGK) ve etkinlik oranını (EO) artıran bir etki yapmıştır. Bunun nedeni taşıyıcı ile enzim arasında glutaraldehitin bir ara halka görevi yaparak kararlı bir çapraz bağlanmayı sağlamasıdır. Ek olarak ara halka grubuyla kovalent bağlanma büyük olasılıkla taşıyıcının lokal yüzey alanında artış sağlamakta ve bunun sonucunda enzim molekülünün aktif bölgesi etrafındaki sterik engel düşmektedir. Ancak eğer ara halkanın yani glutaraldehitin fonksiyonel grubu (-CHO) enzimin amin grubu ile tam olarak örtüşmezse, bağlanmamış gruplar (-CHO fazlası) enzimin amin grubu ile rasgele bağlanabilir ve enzimin tersiyer yapısını bozarak enzimin immobilizasyonu sırasında pasifleşmesine neden olabilir. Bu nedenle optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi gerekir [19, 21, 23].

Glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenebilmesi için ilk olarak taşıyıcılar GA ile aktive edilmeden immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu deneme sonucunda aktivite geri kazanımı ve etkinlik oranları çitinin taşıyıcı olarak kullanılması halinde sırasıyla %15, %19 olarak bulunmuştur. Çitinin GA ile aktive edilmesi denemelerinde ise %0.8 (h/h), %1 (h/h) ve %2 (h/h) konsantrasyonlarında GA çözeltisi kullanılmıştır. Bu denemeler sonucunda Tablo 7.1 de belirtilen değerler elde edilmiştir. Şekil 7.1de de görüldüğü gibi GA çözeltisi %1 olarak hazırlandığında çitin üzerine immobilize edilen proteaz diğerlerine oranla en yüksek AGK ve EO verimlerini sağlamıştır. Bu koşullarda AGK %22, EO ise %23'tür.

Tablo 7.1. GA Konsantrasyonun Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

GA %	U ₀ (U/mg Taşıyıcı)	U _{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U _R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.00	1.00	0.1525	0.2138	15.25	19.39
0.80	1.00	0.1777	0.0671	17.77	19.05
1.00	1.00	0.2191	0.0519	21.91	23.11
2.00	1.00	0.2242	0.0760	22.42	24.27



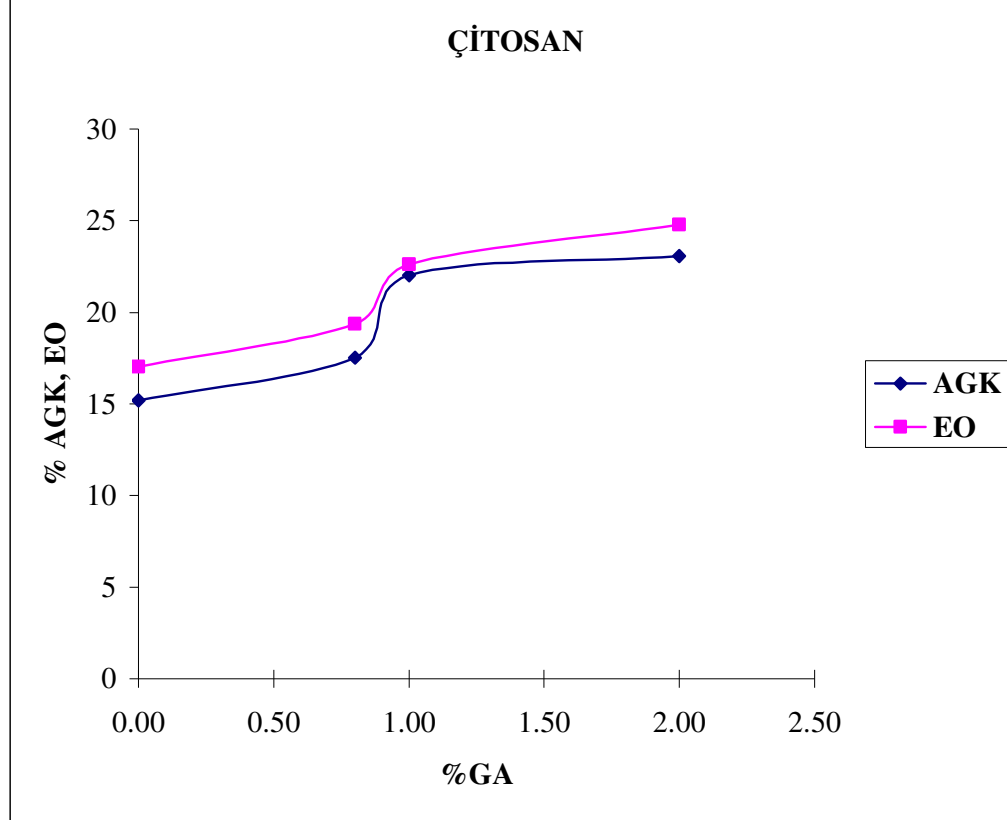
Şekil 7.1. GA Konsantrasyonun Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitin; taşıyıcı miktarı 0.25g; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml 0.5M pH 7.2 Tris-HCl tampon; glutaraldehitte kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

Çitosanın taşıyıcı olarak kullanılması halinde GA ile ön işlem görmeyen immobilize enzimin AGK ve EO oranları %15 ve %17'dir. Çitosanın GA ile aktive edilmesi çitinde olduğu gibi verimleri artırıcı etki yapmıştır ve Tablo 7.2'de verilen değerler elde edilmiştir. Şekil 7.2'den de anlaşılabileceği gibi çitosanın taşıyıcı olarak kullanılması halinde de en uygun GA konsantrasyonu %1 (h/h) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda %22 aktivite geri kazanımı ve %23 etkinlik oranı elde edilmiştir.

Tablo 7.2. GA Konsantrasyonun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

GA %	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.00	1.00	0.1519	0.1082	15.19	17.03
0.80	1.00	0.1753	0.0939	17.53	19.35
1.00	1.00	0.2203	0.0259	22.03	22.61
2.00	1.00	0.2306	0.0689	23.06	24.77



Şekil 7.2. GA Konsantrasyonun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyondaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitosan; taşıyıcı miktarı 0.25g; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml 0.5M pH 7.2 Tris-HCl tampon; glutaraldehit ile kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

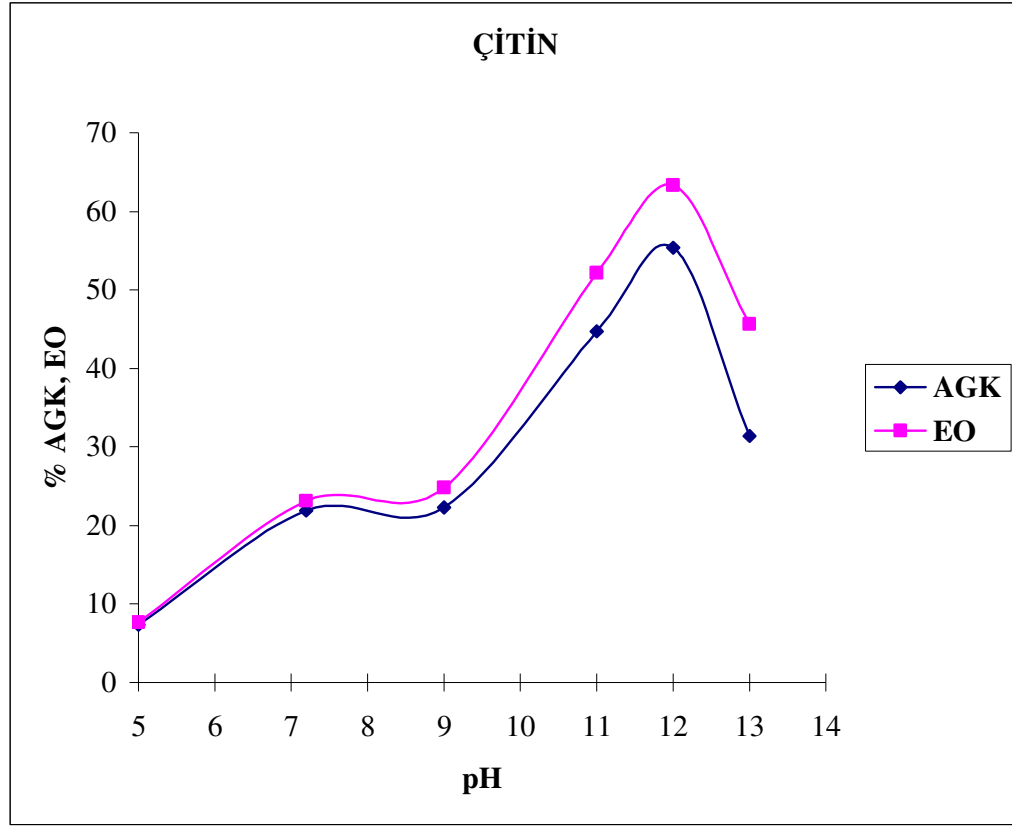
Abdel-Naby ve çalışma arkadaşları *bacillus mycoides*'den elde ettikleri proteazı çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize ettikleri çalışmalarında %2.5 (h/h) olarak seçerken, Chae v.ç.a. yaptıkları proteazın kovalent bağlanmayla glutaraldehit kullanarak immobilizasyonunun optimizasyonunu inceledikleri çalışmalarında %1'in üzerindeki glutaraldehit konsantrasyonunun herhangi bir etkisinin olmadığını kaydetmişlerdir [19, 21].

7.1.2 Tampon Çözeltinin pH Değerinin Etkisi

İmmobilizasyon üzerinde iyonik şiddetin öneminin belirlenebilmesi için kullanılan tampon çözeltinin de optimizasyonu incelenmiştir. Şimdiye kadar yapılan immobilizasyon çalışmalarında genelde iki tür tampon çözelti kullanılmıştır. Bunlardan birincisi fosfat tamponu, ikincisi ise Tris-HCl'dir. İmmobilizasyon esnasında kullanılan tampon çözeltinin (Tris-HCl) pH değeri değiştirilip diğer tüm değerler sabit tutularak yapılan deneylerde tampon çözeltinin pH değerinin asidik ortamdan bazik ortama kaymasıyla immobilizasyon veriminde önemli bir yükselme gözlemlenmiştir. Tampon çözeltinin pH değerinin 7.2'den 5'e düşürülmesi aktivite geri kazanımı ve etkinlik oranının çitin kullanılması halinde yaklaşık %66 oranında düşüş göstermesiyle sonuçlanmıştır (Tablo 7.3). Buna karşılık pH'nın 7.2'den 12'ye yükseltilmesi durumunda aktivite geri kazanımı %152, etkinlik oranı ise %175 oranında artış gösterirken pH değerinin 12'nin üstüne çıkarılması halindeki durum incelendiğinde ise hem aktivite geri kazanımı değerinde hem de etkinlik oranında belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 7.3). Bu sonuçlara göre proteaz enzimini çitin üzerine immobilize ederken kullanılan Tris-HCl tampon çözeltisi için en uygun pH değeri 12 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen verimler AGK %55 ve EO %63'dür.

Tablo 7.3. Tampon Çözeltinin pH Değerinin Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

pH	U ₀ (U/mg Taşıyıcı)	U _{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U _R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
5.00	1.00	0.0732	0.0447	7.32	7.66
7.20	1.00	0.2191	0.0519	21.91	23.11
9.00	1.00	0.2230	0.1020	22.30	24.84
11.0	1.00	0.4473	0.1422	44.73	52.15
12.0	1.00	0.5534	0.1261	55.34	63.33
13.0	1.00	0.3141	0.3113	31.41	45.61



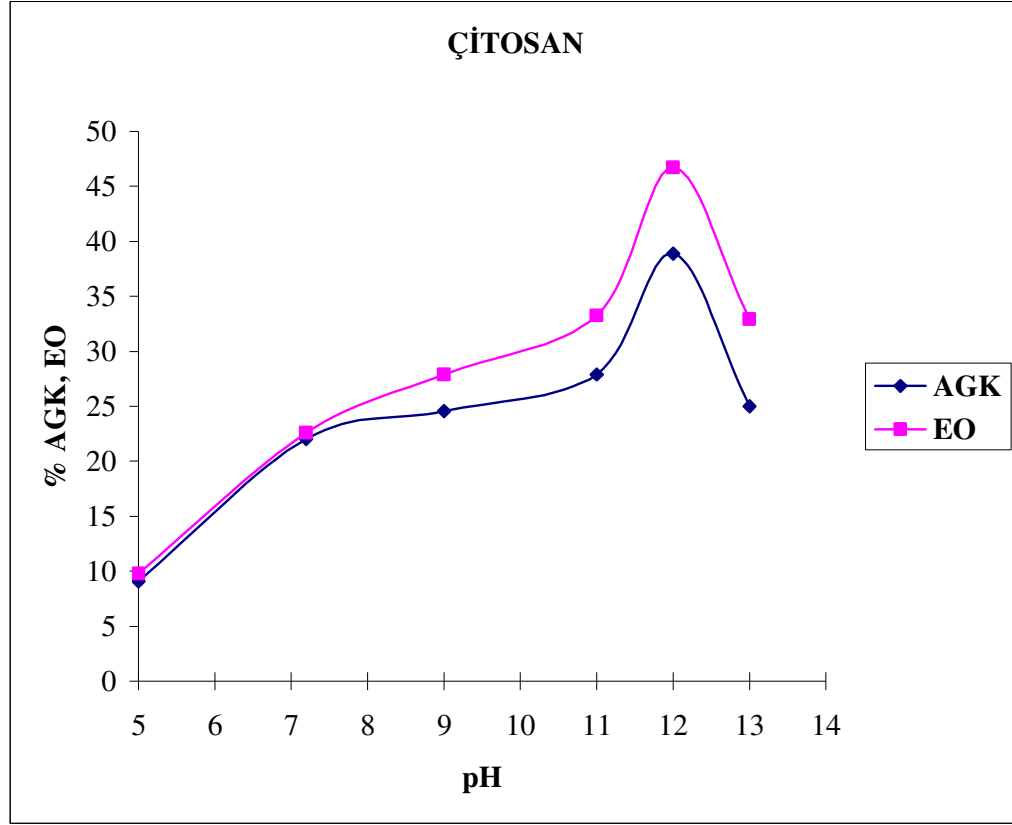
Şekil 7.3. Tampon Çözeltinin pH Değerinin Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitin; taşıyıcı miktarı 0.25g; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml; 0.5M Tris-HCl tampon; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehit ile kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

Tampon çözeltinin pH değerinin çitosan üzerine proteaz enzimi immobilizasyonundaki etkisine bakıldığında çitin ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tampon çözeltinin pH'sı 7.2'den 5'e düşürüldüğünde verimler yaklaşık %58 düşüş göstermiştir (Tablo 7.4). pH 7.2'den 12'ye yükseltildiğinde ise aktivite geri kazanımı %76, etkinlik oranı ise %172 artmıştır. Diğer pH'lardaki tampon kullanımlarına kıyasla en yüksek verimin elde edildiği bu koşulda çitosan üzerine immobilize edilmiş olan enzim %39 aktivite geri kazanımı ve %47 etkinlik oranı elde edilmesini sağlamıştır. Bu veriler neticesinde bundan sonraki deneylerde kullanılacak olan Tris-HCl tampon çözeltisinin pH değeri 12 olarak setlenmiştir.

Tablo 7.4. Tampon Çözeltinin pH Değerinin Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

pH	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
5.00	1.00	0.0910	0.0680	9.10	9.77
7.20	1.00	0.2203	0.0259	22.03	22.61
9.00	1.00	0.2457	0.1190	24.57	27.89
11.0	1.00	0.2791	0.1610	27.91	33.27
12.0	1.00	0.3888	0.1676	38.88	46.71
13.0	1.00	0.2501	0.2406	25.01	32.93



Şekil 7.4. Tampon Çözeltinin pH Değerinin Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

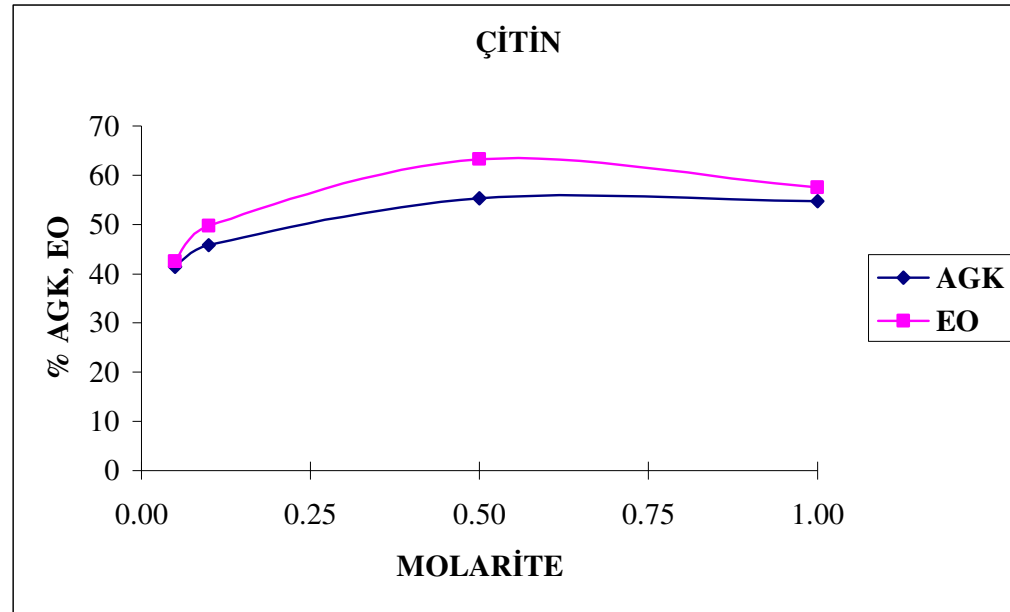
İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitosan; taşıyıcı miktarı 0.25 g; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml; enzim konsantrasyonu 0.5 ml/ml; 0.5M Tris-HCl tampon; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehitle kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

7.1.3 Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Etkisi

Tampon çözeltinin konsantrasyonunun değişiminin immobilizasyon üzerine etkisi incelenirken 0.5M'dan daha düşük konsantrasyonda tampon çözelti kullanılması halinde çitin üzerine immobilizasyonda AGK ve EO değerlerinin düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 7.5). Molaritenin 0.5 yerine 1 seçilmesi halinde ise çok büyük olmamasına rağmen her iki değerde de bir düşme yaşanmıştır. Şekil 7.5'de görüldüğü üzere immobilizasyon en yüksek verime tampon çözeltinin (Tris-HCl) konsantrasyonunun 0.5 M olduğu durumda ulaşmıştır. Bu koşullarda çitin üzerine proteaz immobilizasyonunda aktivite geri kazanımı %55 etkinlik oranı %63'dür.

Tablo 7.5. Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Çitin Üzerine Proteaz Immobilizasyonundaki Etkisi

M	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.05	1.00	0.4143	0.0268	41.43	42.57
0.10	1.00	0.4580	0.0796	45.80	49.76
0.5	1.00	0.5534	0.1261	55.34	63.33
1	1.00	0.5471	0.0501	54.71	57.59



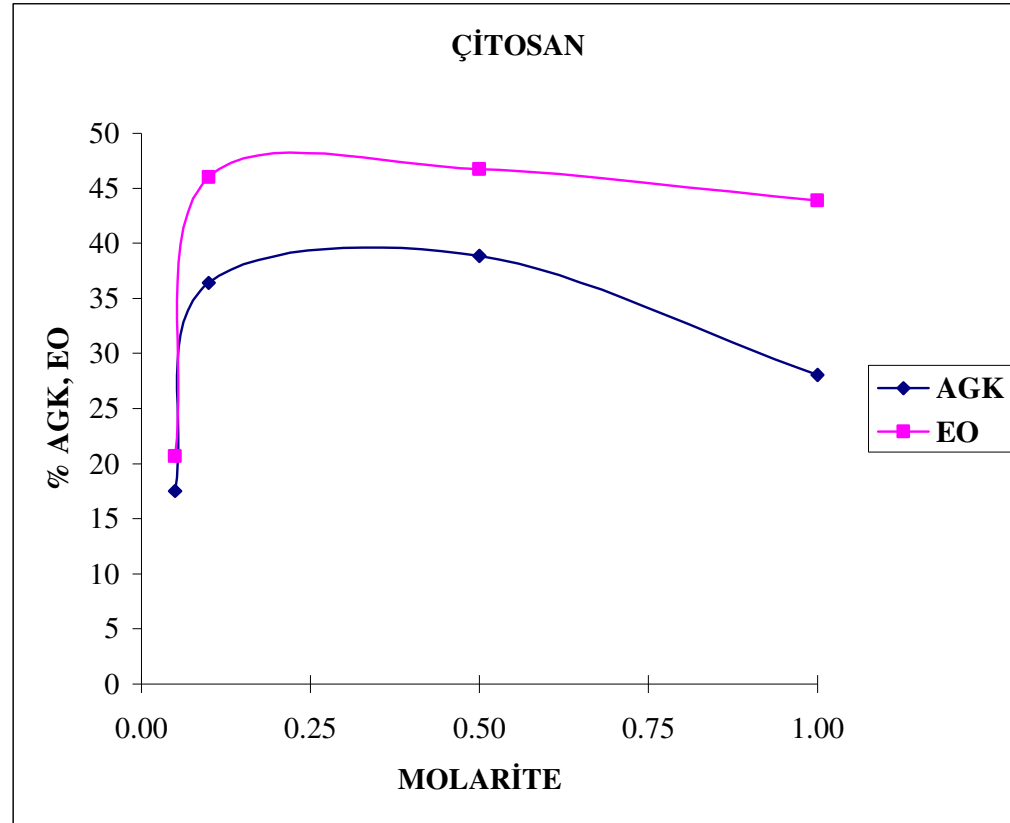
Şekil 7.5. Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Çitin Üzerine Proteaz Immobilizasyonundaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitin; taşıyıcı miktarı 0.25g; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml; pH 12 Tris-HCl tampon; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehitle kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

Taşıyıcı olarak çitosan seçildiğinde ise kullanılan tampon çözeltinin molaritesinin 0.5M'dan 0.05M'a düşürülmesi aktivite geri kazanımının %39'dan %18'e etkinlik oranının ise %47'den %21'e düşmesine neden olmuştur. 0.5M'dan daha yüksek konsantrasyonlu tampon kullanılması ise belirgin bir etki yaratmamıştır (Tablo 7.6 ve Şekil 7.6).

Tablo 7.6. Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

M	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.05	1.00	0.1753	0.1521	17.53	20.68
0.10	1.00	0.3642	0.2084	36.42	46.01
0.5	1.00	0.3888	0.1676	38.88	46.71
1	1.00	0.2803	0.3615	28.03	43.89



Şekil 7.6. Tampon Çözeltinin Konsantrasyonunun Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyondaki Etkisi

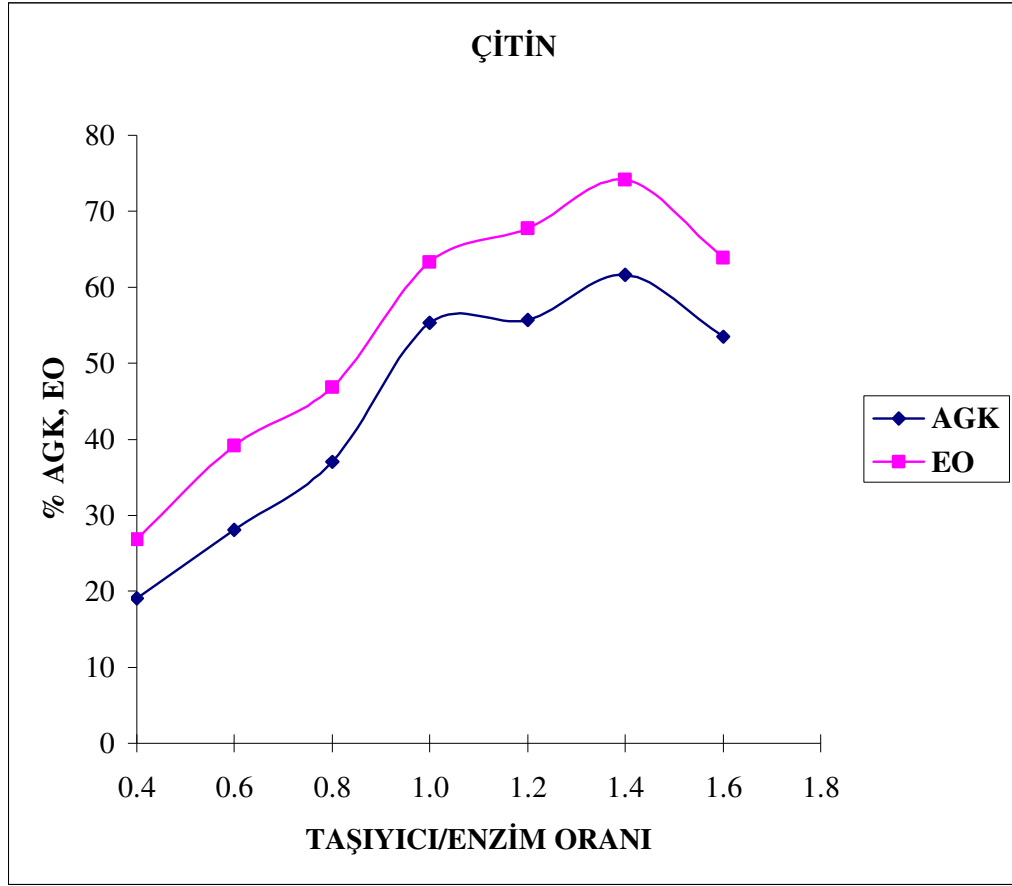
İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitosan; taşıyıcı miktarı 0.25g ; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml ; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml; pH 12 Tris-HCl tampon; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehit ile kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

7.1.4 Taşıyıcı/Enzim Oranının Etkisi

Proteaz enzimin immobilizasyonunda taşıyıcı yükleme miktarının önemi de araştırıldı. Buna göre enzim oranı her bir denemede sabit tutularak enzimin immobilize edileceği taşıyıcının miktarı artırılmak kaydıyla farklı taşıyıcı/enzim oranlarında immobilizasyon tekrarlandı. Taşıyıcın yükleme miktarı belirli bir değerin üstüne çıktığında immobilizasyon veriminde bir düşüş görülmeye başlanmıştır. Bunun nedeni Chae ve çalışma arkadaşlarının da belirttiği gibi taşıyıcının belirli miktarda eklenen enzim için yarışmasıdır. Optimum değerin üstüne çıkılması halinde taşıyıcı fazlasının enzime bağlanamayan grupları (-CHO) enzimin aktivite kaybına neden olurlar [21]. Çitin üzerine immobilizasyon gerçekleştirilirken taşıyıcı/enzim oranı 0.4 değerinde tutulduğunda AGK ve EO sırasıyla %19 ve %27 değerlerindedir. Bu oran 1.4'e yükseltirirken verimler de yükselmiştir (Tablo 7.7 ve Şekil 7.7). Bu değerin üzerine çıkıldığında ise verimler yine düşmeye başlamıştır. Taşıyıcı/enzim oranı 1.4 mg çitin/ml proteaz iken elde edilen AGK ve EO değerleri sırasıyla %62 ve %74'dür. Bu sonuçlar doğrultusunda çitin üzerine proteaz immobilizasyonunda en uygun taşıyıcı/enzim oranı 1.4 olarak belirlenmiştir.

Tablo 7.7. Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

T/E	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.40	2.50	0.4771	0.7224	19.08	26.84
0.60	1.67	0.4685	0.4711	28.11	39.19
0.80	1.25	0.4632	0.2617	37.06	46.87
1.00	1.00	0.5534	0.1261	55.34	63.33
1.20	0.83	0.4642	0.1484	55.70	67.77
1.40	0.71	0.4402	0.1208	61.63	74.17
1.60	0.63	0.3342	0.1018	53.48	63.88



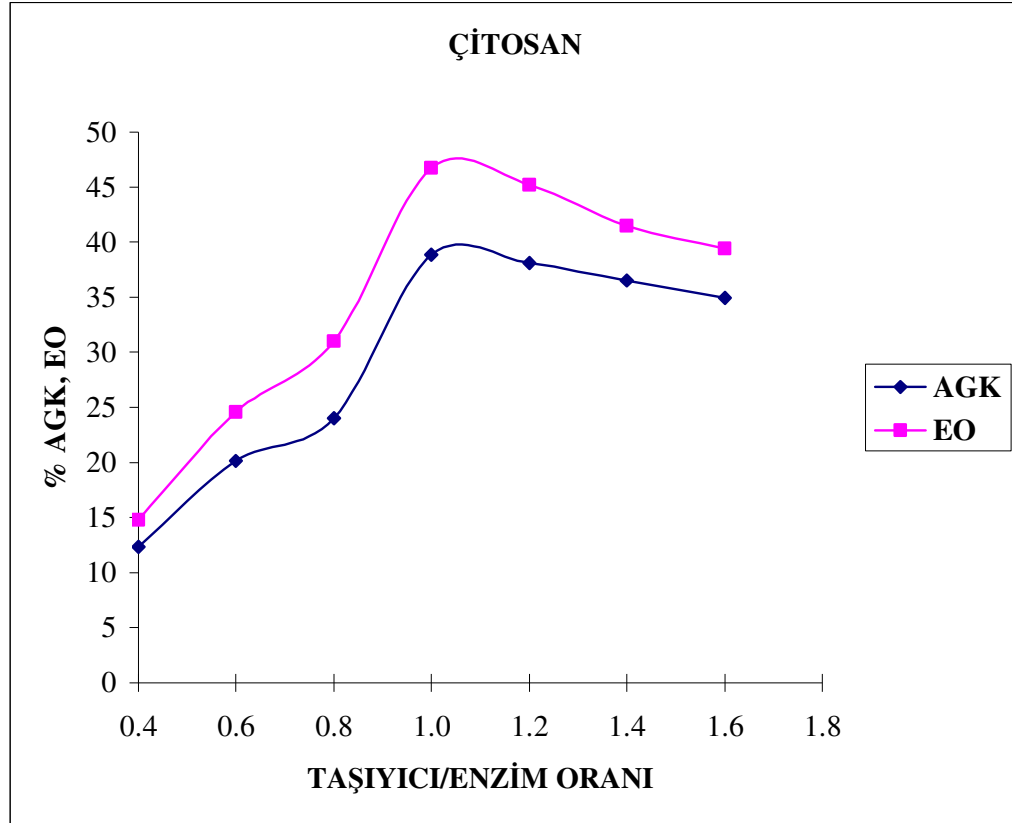
Şekil 7.7. Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitin; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml ; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml; 0.5 M pH 12 Tris-HCl tampon; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehitle kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

Proteaz immobilizasyonunda taşıyıcı olarak çitosanın kullanılması halinde taşıyıcı miktarının enzim miktarına oranının etkisine ait veriler Tablo 7.8’de verilmiştir. Şekil 7.8’de de görüldüğü gibi en yüksek verimler 1mg çitosan/ml proteaz kullanımıyla gerçekleştirilen immobilizasyon neticesinde elde edilmiştir. Bu koşulda elde edilen AGK %39 iken EO %47’dir.

Tablo 7.8. Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

T/E	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.40	2.50	0.3081	0.4137	12.33	14.77
0.60	1.67	0.3360	0.2982	20.16	24.55
0.80	1.25	0.3002	0.2818	24.01	31.00
1.00	1.00	0.3888	0.1676	38.88	46.71
1.20	0.83	0.3174	0.1279	38.09	45.21
1.40	0.71	0.2607	0.0814	36.50	41.47
1.60	0.63	0.2184	0.0755	34.95	39.39



Şekil 7.8. Taşıyıcı (mg) / Enzim (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

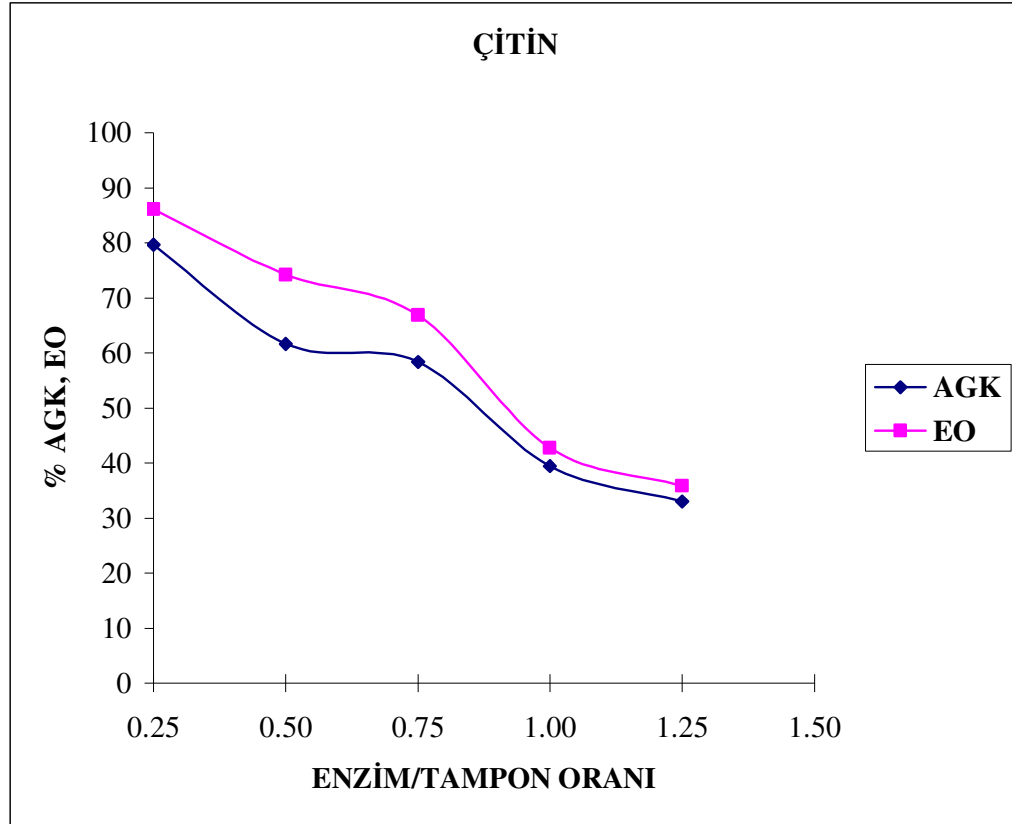
İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitosan; enzim çözeltisinin hacmi 0.75 ml; enzim konsantrasyonu 0.5ml/ml; 0.5 M pH 12 Tris-HCl tampon; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehit ile kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

7.1.5 Enzim/Tampon Çözelti Oranının Etkisi

Taşıyıcı yükleme miktarı yani, taşıyıcı (mg) / enzim (ml) değerinin optimum değeri belirlendikten sonra, 1.4 mg çitin /ml proteaz ve 1.0 mg çitosan / ml proteaz, enzim yükleme miktarı incelenmiştir. Enzim miktarı 0.25 ml olarak sabit tutularak immobilizasyonda kullanılacak taşıyıcılar da 0.35 mg çitin ve 0.25 mg çitosan olarak setlendikten sonra kullanılan tampon çözeltinin (0.5 M, pH 12 Tris-HCl) miktarı değiştirilerek çitin için Tablo 3.9’da belirtilen değerler elde edilmiştir. Şekil 3.9’da daha rahat bir şekilde görüleceği gibi enzim/tampon çözelti oranı arttıkça immobilizasyon verimi düşmektedir. Bunun sebebi taşıyıcılar ile enzim molekülleri arasındaki kontak derecesinin etkisidir. Enzim/tampon çözelti oranı yükseldikçe kullanılan enzim çözeltisinin hacmi de azalmaktadır bu da taşıyıcıyla enzim yeterince etkileşim alanı bulamamasına neden olmaktadır. Elbette daha yüksek hacimlerde enzim çözeltisi kullanılması da yine aynı olumsuz etkiyi yapacak ve enzimle taşıyıcının yeterli etkileşim alanı bulmasını engelleyici etki yapacaktır [21]. Çitin üzerine proteaz immobilizasyonunda en uygun enzim yükleme oranı 0.25 ml proteaz/ml Tris-HCl’dir.

Tablo 7.9. Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz Immobilizasyonundaki Etkisi

E/T	U₀ (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.25	0.71	0.5689	0.0490	79.65	86.07
0.50	0.71	0.4402	0.1208	61.63	74.17
0.75	0.71	0.4166	0.0914	58.33	66.89
1.00	0.71	0.2821	0.0537	39.49	42.70
1.25	0.71	0.2360	0.0560	33.04	35.85



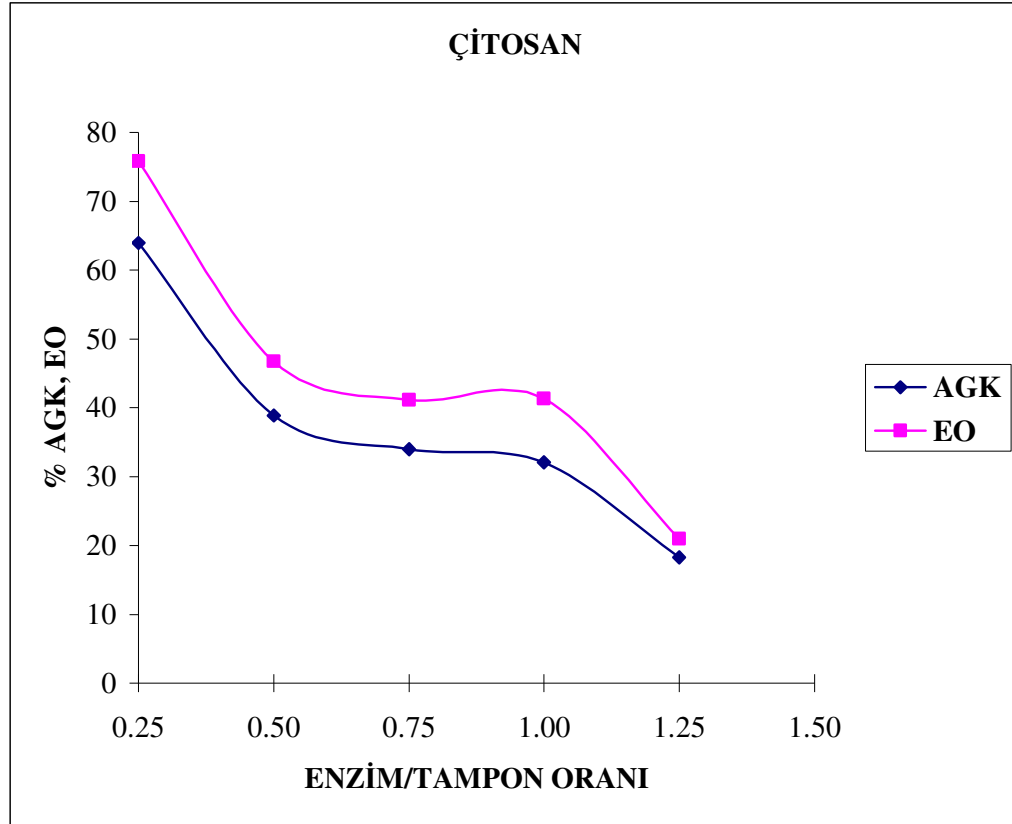
Şekil 7.9. Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitin Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitin; taşıyıcı miktarı, 0.35 mg; enzim miktarı, 0.25 ml; tampon çözelti, 0.5M pH 12 Tris-HCl; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehit ile kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

İmmobilizasyonda taşıyıcı olarak çitosan kullanılması halinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu deneylere ait değerler Tablo 7.10 ve Şekil 7.10'da verilmiştir. En uygun enzim yükleme oranı taşıyıcının çitosan olması halinde de 0.25 ml proteaz/ml Tris-HCl olarak belirlenmiştir.

Tablo 7.10. Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

E/T	U_0 (U/mg Taşıyıcı)	U_{imm} (U/mg Taşıyıcı)	U_R (U/mg Taşıyıcı)	AGK	EO
0.25	1.00	0.6395	0.1566	63.95	75.81
0.50	1.00	0.3888	0.1676	38.88	46.71
0.75	1.00	0.3398	0.1743	33.98	41.15
1.00	1.00	0.3207	0.2230	32.07	41.28
1.25	1.00	0.1825	0.1288	18.25	20.95



Şekil 7.10. Enzim (ml) /Tampon Çözelti (ml) Oranının Çitosan Üzerine Proteaz İmmobilizasyonundaki Etkisi

İmmobilizasyon koşulları: taşıyıcı, çitosan; taşıyıcı miktarı, 0.25 mg; enzim miktarı, 0.25 ml; tampon çözelti, 0.5M pH 12 Tris-HCl; glutaraldehit konsantrasyonu, %1; glutaraldehit ile kontak zamanı 2 saat; immobilizasyon süresi 2 saat.

Bu çalışmada çitin ve çitosan üzerine proteaz enziminin, kovalent bağlanma ile glutaraldehit kullanarak immobilizasyonunda en yüksek verime ulaşabilmek için immobilizasyondaki bazı parametrelerde en uygun değerlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu doğrultuda seçilen parametreler için belirlenen en uygun değerler şöyledir:

i. Taşıyıcı olarak çitin kullanıldığında:

Glutaraldehit Konsantrasyonu: %1 (h/h)

Tampon çözeltinin pH değeri: pH 12

Tampon çözeltinin konsantrasyonu: 0.5 M

Taşıyıcı/enzim oranı: 1.4 mg çitin/ml proteaz

Enzim/tampon oranı: 0.25 ml proteaz/ml Tris-HCl

ii. Taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında:

Glutaraldehit Konsantrasyonu: %1 (h/h)

Tampon çözeltinin pH değeri: pH 12

Tampon çözeltinin konsantrasyonu: 0.5 M

Taşıyıcı/enzim oranı: 1 mg çitosan/ml proteaz

Enzim/tampon oranı: 0.25 ml proteaz/ml Tris-HCl

7.2 İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

7.2.1 Sıcaklık Kararlılığı

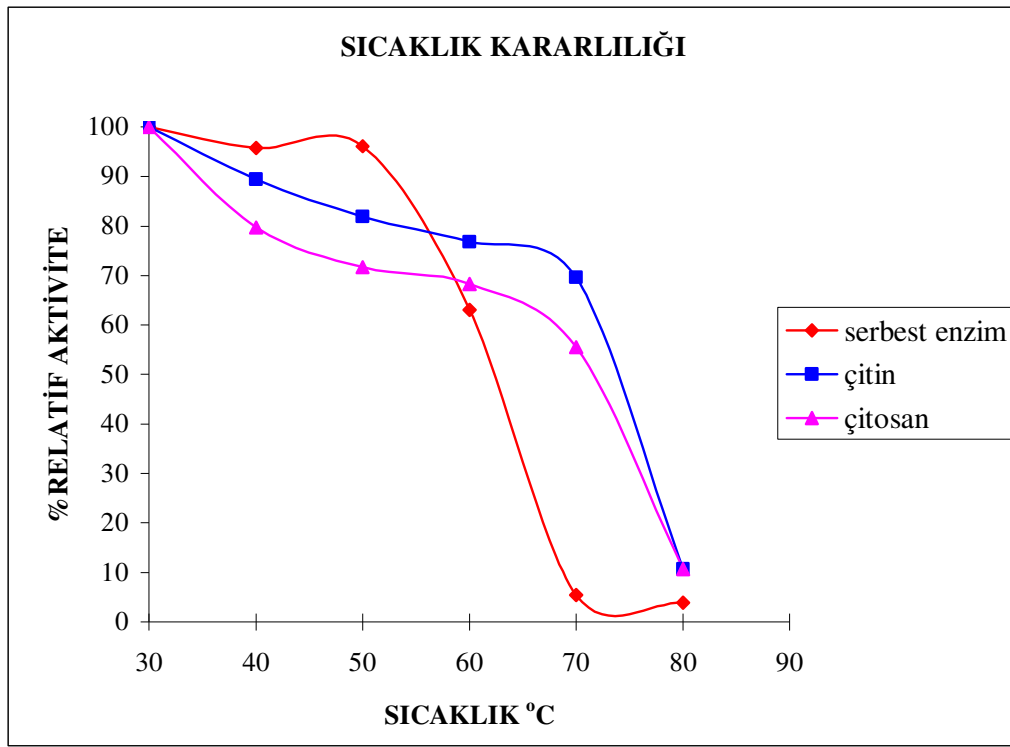
İmmobilize enzimlerin sıcaklık kararlılığı uygulanmalarının en önemli nedenlerinden biridir. Özellikle kovalent bağlanmayla immobilize edilen enzimler sıcaklığa karşı serbest enzimlerden daha dirençlidirler. Bu da immobilize enzimlerin belirli bir zaman aralığındaki kullanımlarında sabit seviyede aktivite göstermelerini sağlar ve prosesin kontrolü kolaylaşır. Enzimlerin biçimsel esnekliği immobilizasyon ile etkilenir. İmmobilizasyon enzimin esnekliğini bozarak sertliğini artırır bu da çoğu zaman yükselen ısıya karşı kararlılığın artması halinde kendini gösterir. Çoğu araştırmayla desteklenmiştir ki immobilizasyon neticesinde biçimsel esnekliği azalan immobilize enzimlerin sıcaklık kararlılığı serbest enziminkinden daha yüksektir [2, 16, 18]. Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilen proteazın tersiyer yapısı korunmuş ve çevresel etkilere karşı bu yapının bozunması engellenmiştir.

Sıcaklık kararlılığının belirlenebilmesi için immobilize enzimler +30°C ve +80°C arasındaki sıcaklıklarda yarım saat bekletilip hızla soğumaya bırakılmıştır. Çitin üzerine immobilize olmuş enzim +70°C'de başlangıç aktivitesinin %70'ini korurken çitosan üzerine immobilize edilen proteaz yine +70°C'de başlangıç aktivitesinin %55'ini korumaktadır. Buna karşılık serbest enzim +70°C'de başlangıç aktivitesinin sadece %5'ini gösterebilmektedir (Tablo 7.11). İmmobilize enzim aktivite kaybetmesine rağmen, serbest enzimin 30°C - 50°C arasındaki kararlılığını daha geniş bir sıcaklık aralığında yakalamayı başarmış ve sınırları 30°C - 70°C'ye genişletmiştir. Hatta 70°C - 80°C aralığında ve 80°C'de immobilize enzimlerin

gösterdiği aktivite serbest enziminkinden daha yüksektir. Sıcaklık kararlılığına ait değerler Şekil 7.11’de gösterilmiştir.

Tablo 7.11. Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki Sıcaklık Kararlılıkları

	% RELATİF AKTİVİTE					
SICAKLIK	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
Serbest Enzim	100	95.79	96.12	63.11	5.5	3.88
Çitin	100	89.48	81.9	76.85	69.67	10.72
Çitosan	100	79.69	71.72	68.23	55.57	10.70



Şekil 7.11. Proteaz Enziminin Serbest Halde ve İmmobilize Formdaki Sıcaklık Kararlılıkları

α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilazın serbest ve çitosan-kil matrisine immobilize hallerinin sıcaklık stabiliteilerinin karşılaştırıldığı Chang ve Juang’ın çalışmasında 15-85°C aralığında üç immobilize enzimin relatif aktiviteyi sırasıyla %71, %63 ve %74 değerlerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada immobilize enzimlerin düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivite kayıpları serbest olanlara oranla çok daha azdır. Taşıyıcı, enzim deaktivasyonunun gerçekleştiği yüksek sıcaklıklarda koruyucu görevi görmüştür. Düşük sıcaklıklarda aktivitenin kaybının önlenmesi ise

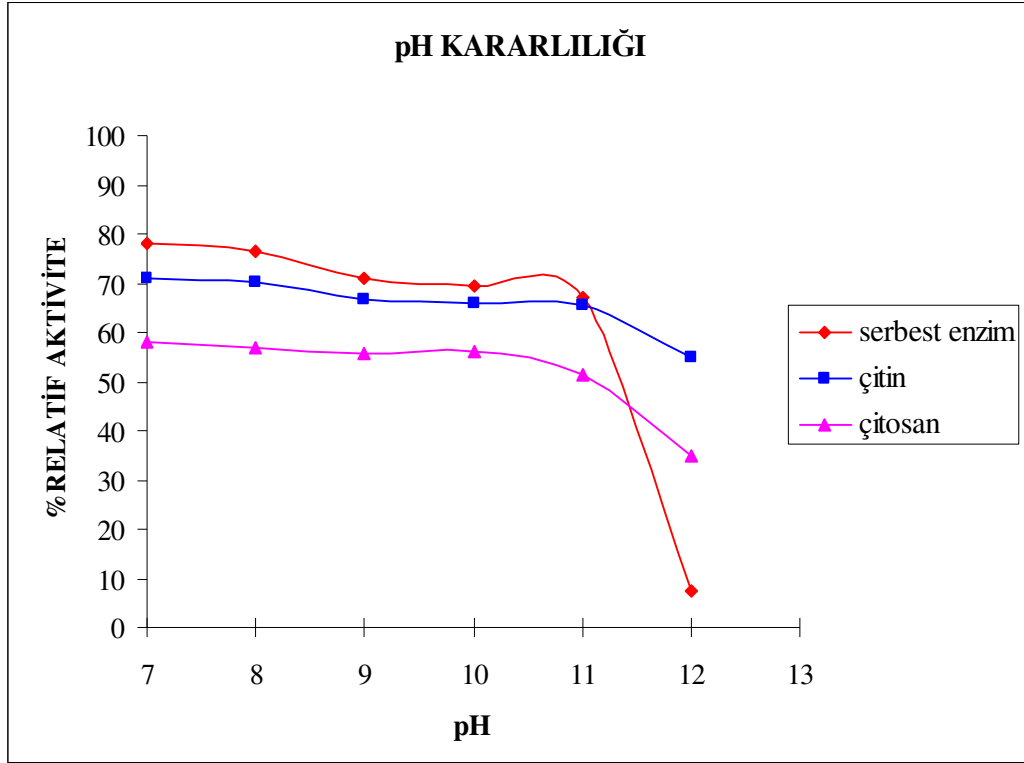
enzimin kil üzerine adsorpsiyonunun bir sonucudur [16]. Chellapandian, vermikulit üzerine kovalent bağlanma ile immobilize ettiği alkali proteazın sıcaklık kararlılığını incelediğinde, serbest enzime oranla kararlılığında artış olduğu gözlemlenmiştir. +70°C’de immobilize alkali proteaz %28 aktivite gösterirken, serbest enzimin relatif aktivitesi %17’dir. Sıcaklık etkisiyle aktivite kaybının, molekül içi kuvvetlerin bozulması ve protein zincirinin dağılmasına bağlayan Chellapandian, immobilizasyonun zayıf iyonik kuvvetleri ve hidrojen bağlarını stabilize ederek sıcaklık karşısındaki kararlılığı artırdığını eklemiştir [20].

7.2.2 pH Kararlılığı

Çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin ve serbest enzimin pH kararlılıkları incelenmiş ve Tablo 7.12 ile Şekil 7.12’de gösterilmiştir. pH 7-12 arasında yapılan deneyler sonucu hem serbest hem de immobilize enzimlerin pH kararlılığının pH 11’de bir kırılma yaşadığı gözlemlenmektedir. pH 11 değerine kadar aktivitesinin %67’sini koruyan serbest enzim pH 12’ye yükseltildiğinde %7 gibi oldukça düşük bir oranda aktiviteye sahiptir. Çitin üzerine immobilize edilen proteazın pH kararlılığına bakıldığında yine pH 11’e kadar aktivitesinin %65’ini koruyan enzim pH 11-12 arasında daha hızlı bir aktivite kaybına uğramıştır. Ancak yine de pH 12’de aktivitesinin %54’ünü korumayı başarmıştır. Çitosan üzerine immobilize edilen proteazın pH kararlılığı çitin üzerine immobilize edilen proteazla aynı karakteristiği göstermiştir. Bu kez pH 11’e kadar aktivitesinin %51’ini koruyan proteaz pH 11-12 arasında daha yüksek bir aktivite kaybına uğramış ve pH 12’de aktivitesinin %34’ünü koruyabilmiştir. Serbest enzimle kıyaslandığında immobilize enzimlerin alkali ortamlara daha dayanıklı olduğu görülmektedir.

Tablo 7.12. Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki pH Kararlılıkları

	% RELATİF AKTİVİTE					
<i>pH</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
Serbest Enzim	78.10	76.64	70.80	69.34	67.15	7.30
Çitin	70.79	70.08	66.83	66.02	65.42	54.77
Çitosan	58.13	56.91	55.69	56.18	51.54	34.96



Şekil 7.12. Proteaz Enziminin Serbest Halde Ve İmmobilize Formdaki pH Kararlılıkları.

Chang ve Juang α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilazın ve aynı enzimlerin çitosan-kil kompozitlerine kovalent bağ ile glutaraldehit kullanılarak elde edilen immobilize formlarının stabilitelerini incelendiğinde her enzim için farklı karakteristikte pH kararlılık sonuçlarına ulaşmışlardır. α -amilaz enzimin serbest haliyle immobilize hali pH 7 noktasına kadar aktivitelerinde bir farklılık göstermemiştir. Ancak pH'nın 7 noktasına yükselmesiyle beraber serbest enzim hızlı bir aktivite kaybı gösterirken, immobilize enzim %93 oranında relatif aktivitesini korumaya devam etmiştir. β -amilaz ise pH<4 değerinde serbest halde daha yüksek aktivite gösterirken, pH>5 değerlerinde immobilize formun sahip olduğu aktivite daha yüksektir. Glukoamilaza bakıldığında ise serbest ve immobilize enzim şekil olarak aynı pH eğrisine sahip olup immobilize enzimin aktivitesi serbest enzime oranla biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada immobilize enzimlerin genel olarak serbest enzimlerle aynı veya daha dar bir pH kararlılık aralığına sahip olup daha yüksek aktivite gösterdikleri eklenmiştir. Düşük pH'larda chitosan-kil matrisine immobilize edilmiş enzimlerin daha yüksek aktiviteye sahip olması, çitosanın amino/amin gruplarının

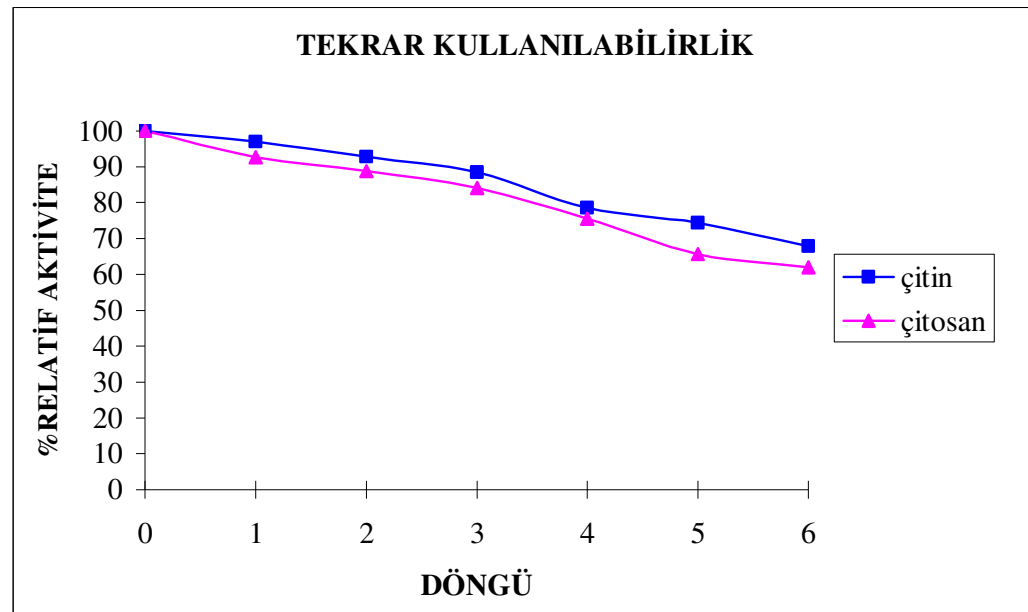
matristeki protonu bağlayarak, enzim molekülü civarındaki proton konsantrasyonunu düşürmesi olarak açıklanmıştır [16].

7.2.3 Tekrar Kullanılabilirlik

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği enzimlerin ekonomik kullanımı için çok önemli bir faktördür. Bu sayede enzimlerin kesikli reaktörlerde, tekrarlanan kullanımı, sürekli reaktörlerde ise, daha uzun süreli kullanımı mümkün hale gelmektedir [22-24]. Tekrar kullanım sonrasında çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş proteazın aktivite geri kazanımındaki düşüş Tablo 7.13’de verilmiştir. Şekil 7.13’de grafiğe dökülmüş olan değerlere göre çitin üzerine immobilize edilmiş enzim arka arkaya 6 kez kullanıldıktan sonra başlangıç aktivitesinin %68’ini koruyabilmektedir. Aynı grafikte çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin değerleri incelendiğinde yine 6 arka arkaya kullanım sonucunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %62’sini koruduğu gözlenmektedir.

Tablo 7.13. İmmobilize Proteaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği

	%RELATİF AKTİVİTE					
<i>DÖNGÜ</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Çitin	96.92	92.85	88.52	78.62	74.38	67.89
Çitosan	92.64	88.81	84.04	75.54	65.70	61.97



Şekil 7.13. İmmobilize Proteaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği

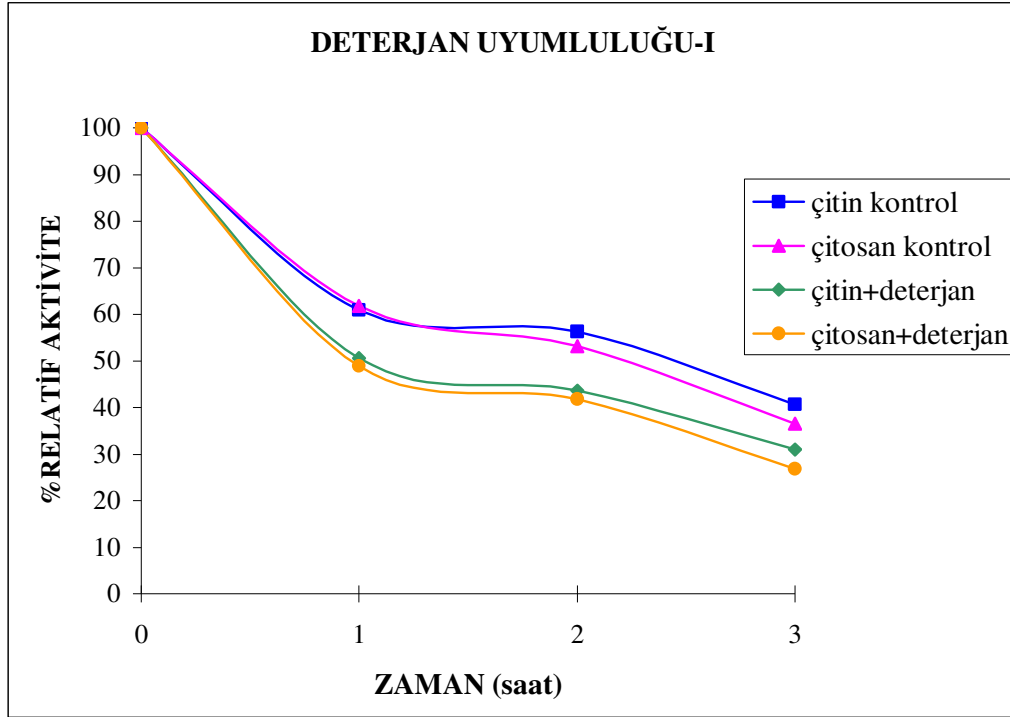
Chang ve Juang çalışmlarında, çitosan-kil üzerine kovalent bağ ile immobilize olan α -amilazın 50 tekrar kullanım sonunda orjinal aktivitesinin %81'ini koruduğunu kaydetmiştir. Aynı şartlarda immobilize β -amilaz'ın relatif aktivitesindeki düşüş çok daha fazladır ve 5. kullanımın ardından azalan ivmeyle bu düşüş devam etmektedir. Glukoamilaz ise 25 tekrar kullanımın ardından başlangıç aktivitesinin %55'ini koruyabilmiştir [16]. Alkali proteazın vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilizasyonu sonucu 5 kullanım sonucunda orijinal aktivitesinin % 78'ini koruduğu Chellapandian tarafından belirlenmiştir [20]. Tripsinin silikat üzerine adsorpsiyon ile immobilizasyonunda tekrar kullanım incelendiğinde ise Goradia ve çalışma arkadaşlarının, 6 tekrar kullanım sonucunda korunan aktivite için bildirdiği değer %40'dır [24].

7.2.4 Deterjan Uyumluluğu

Alkali proteazlar deterjan endüstrisinde, bölgesel ya da bütün olarak toksik kimyasalların yer değiştirmesini sağladıklarından, çok geniş bir kullanım alanına sahiptirler. İdeal bir deterjan enzimi yeterli sıcaklık kararlılığı göstermenin yanında deterjan solüsyonu içinde kararlılığını koruyabilme özelliğini de sahip olmalıdır [22, 25]. Bu nedenle bu çalışmada çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş olan proteazın deterjan uyumluluğu da incelenmiştir. Şekil 7.14'de 3 saatlik bir süre boyunca ticari deterjan kullanılarak hazırlanan çözeltide bekletilmiş immobilize enzimlerin relatif aktiviteleri (%) gösterilmiştir. Şekil 7.14 incelendiğinde immobilize çitin ve çitosanın deterjan eklenmeden hazırlanan kontrol numunelerinin sıcaklık karşısında önemli bir aktivite kaybına uğradığı ve aktivitelerinin sırasıyla %41 ve %36'sını koruduğu gözlenmektedir. İmmobilize enzimler deterjan çözeltisinde bekletildiklerinde sıcaklık karşısındaki aktivite kaybına ek olarak deterjan etkisiyle oluşan bir aktive kaybı da söz konusudur. Aynı sürenin sonunda deterjan çözeltisinde bekletilen immobilize enzimlerden çitin üzerine immobilize edileni %31 çitosan üzerine immobilize edileni ise %27 oranında aktivitesini koruyabilmiştir.

Tablo 7.14. İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-I

	%RELATİF AKTİVİTE			
SÜRE	Çitin Kontrol	Çitin+Deterjan	Çitosan Kontrol	Çitosan+Deterjan
0. saat	100.00	100.00	100.00	100.00
1. saat	60.90	50.54	61.87	48.88
2. saat	56.24	43.55	53.16	41.85
3. saat	40.68	30.91	36.48	26.90

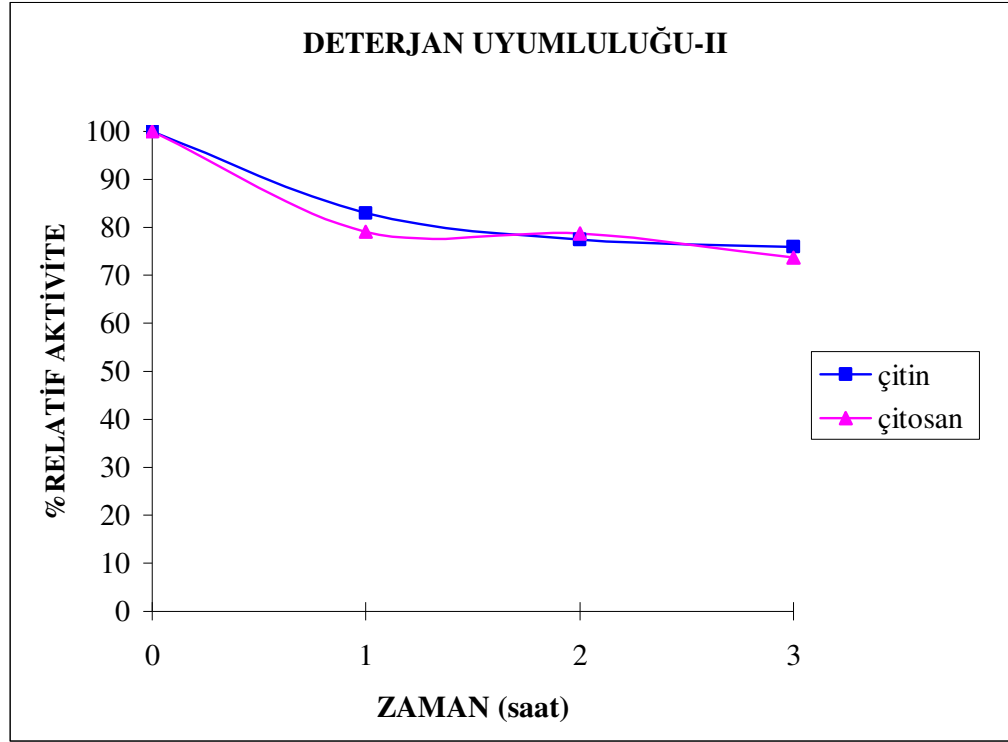


Şekil 7.14. İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-I

İmmobilize enzimlerin sıcaklık karşısındaki aktivite kaybından bağımsız olarak deterjan karşısındaki davranışlarını daha net görebilmek için deterjan varlığında elde edilen relatif aktiviteler deterjan yokluğundakilere oranlanarak Tablo 7.15'deki değerler elde edilmiştir. Şekil 7.15'de daha net gözlenebildiği gibi immobilize enzimlerin deterjan etkisiyle kaybettikleri aktiviteler çitin için %24 ve %26 değerlerindedir.

Tablo 7.15. İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-II

SÜRE	% RELATİF AKTİVİTE	
	Çitin	Çitosan
0. saat	100.00	100.00
1. saat	82.99	79.02
2. saat	77.43	78.73
3. saat	75.99	73.74



Şekil 7.15. İmmobilize Proteaz Enziminin Deterjan Uyumluluğu-II

Tanksale ve çalışma arkadaşları *Conidiobulus macrosporus*'dan elde edilen alkali proteazın immobilizasyon öncesi ve sonrası deterjan uyumluluğunu incelemişlerdir. Araştırmalarında serbest ve immobilize enzimin *Ariel*, *Rin Shakt*, ve *Surf Excel* marka ticari deterjanlarla 28°C'de 1 saat bekletilmesinin ardından, korudukları aktivite ölçülmüştür. Rin Shakti markasıyla yapılan deneylerde immobilize enzim aktivitesinin %84'ünü korurken, serbest enzim %76'sını korumuştur. Ariel ve Surf Excel kullanıldığında ise her iki enzim de aktivitesinin %50'sini koruyabilmiştir [22]. Adinarayana ve çalışma arkadaşları ise *Bacillus subtilis* PE-11 den izole ettikleri serin proteazın deterjan uyumluluğunu Nirma, Wheel, Henko, Surf, Surf Excel, Ariel ve Rin gibi farklı ticari deterjanlarda +60°C'de 3 saat boyunca

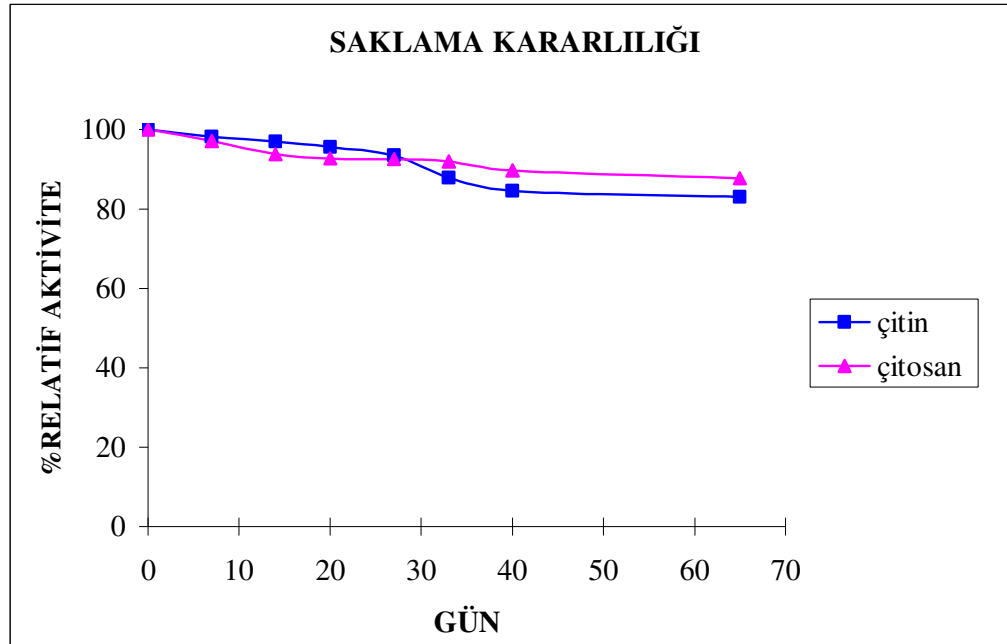
bekleterek denemişlerdir. Serbest enzim deterjan varlığında 3 saatlik süre sonunda ancak %10 civarında bir relatif aktivite gösterebilmiştir. Enzimin deterjan karşısındaki kararlılığı arttırmak için aynı deney CaCl_2 ve glisin varlığında tekrarlandığında enzim kullanılan deterjanların çoğuna karşı aktivitesinin %50'den fazlasını koruyabilmiştir [25].

7.2.5 Saklama Kararlılığı

İmmobilize enzimlerin uzun süre depolanabilir olması tercih edilmelerinin sebeplerinden biridir. Bu nedenle çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş olan proteazın $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanma koşulları incelendi. $+4^\circ\text{C}$ 'de saklana çitin üzerine immobilize edilmiş olan proteaz 65 gün sonunda hala aktivitesinin %83'üne sahiptir. Çitosan üzerine immobilize edilmiş olan proteazda benzerlik göstererek yine 65 gün sonunda aktivitesinin %87'sini korumaktadır (Tablo 7.16 ve Şekil 7.16).

Tablo 7.16. Proteaz Enziminin İmmobilize Formdaki Saklama Kararlılıkları

	% RELATİF AKTİVİTE						
GÜN	7	14	20	27	33	40	65
Çitin	98.24	96.92	95.6	93.41	87.91	84.62	83.08
Çitosan	97.07	93.75	92.77	92.58	91.99	89.65	87.69

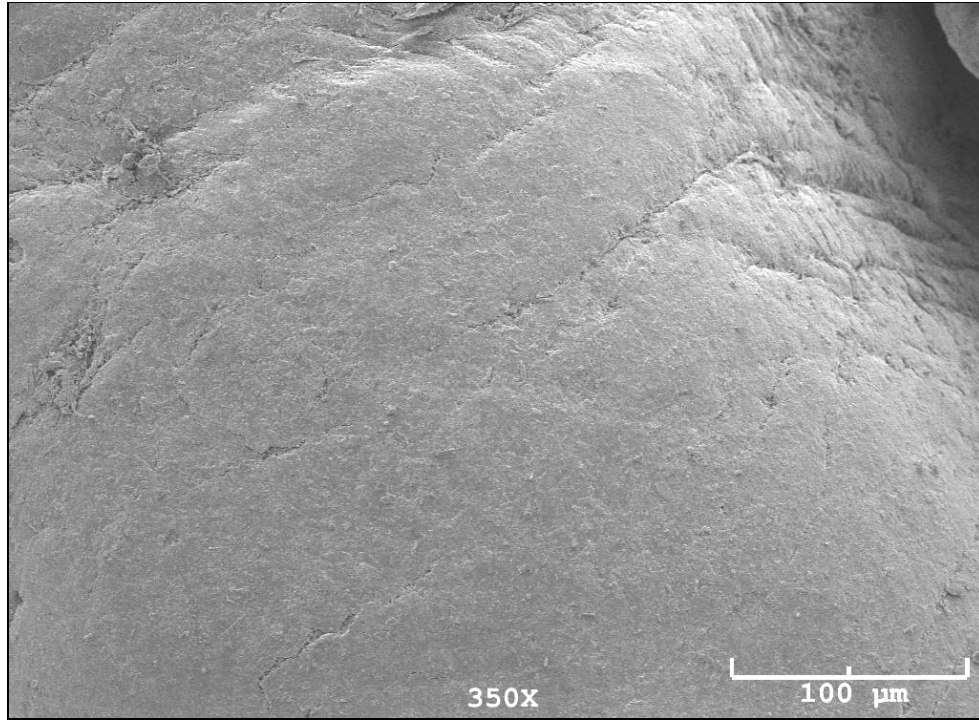


Şekil 7.16. Proteaz Enziminin İmmobilize Formdaki Saklama Kararlılıkları.

Chellepandian, vermikulit üzerindeki immobilize alkali proteazın 60 gün boyunca +4°C’de saklanması halinde başlangıç aktivitesinin %84’ünü aynı süre boyunca +25°C’de saklanması halinde ise başlangıç aktivitesinin %66’sını koruduğunu kaydetmiştir. +25°C’de görülen bu aktivite düşüşün sebebi ise immobilize alkali proteazın denatürasyonudur [20]. Kılınç ve çalışma arkadaşları papaini adsorpsiyon ve glutaraldehitte çapraz bağlama metotlarını kullanarak çitosana immobilize ettikleri çalışmalarında saklama kararlılığını incelemişlerdir. Saklama +45°C’de bir ay sürdürülmüştür. Bu koşulların yaklaşık olarak oda koşullarında bir yıllık süreye eşit olduğunun belirtildiği çalışmada, immobilize papain deney sonunda aktivitesinin %85’ini korurken serbest enzim aktivitesinin %16’sını koruyabilmiştir [26].

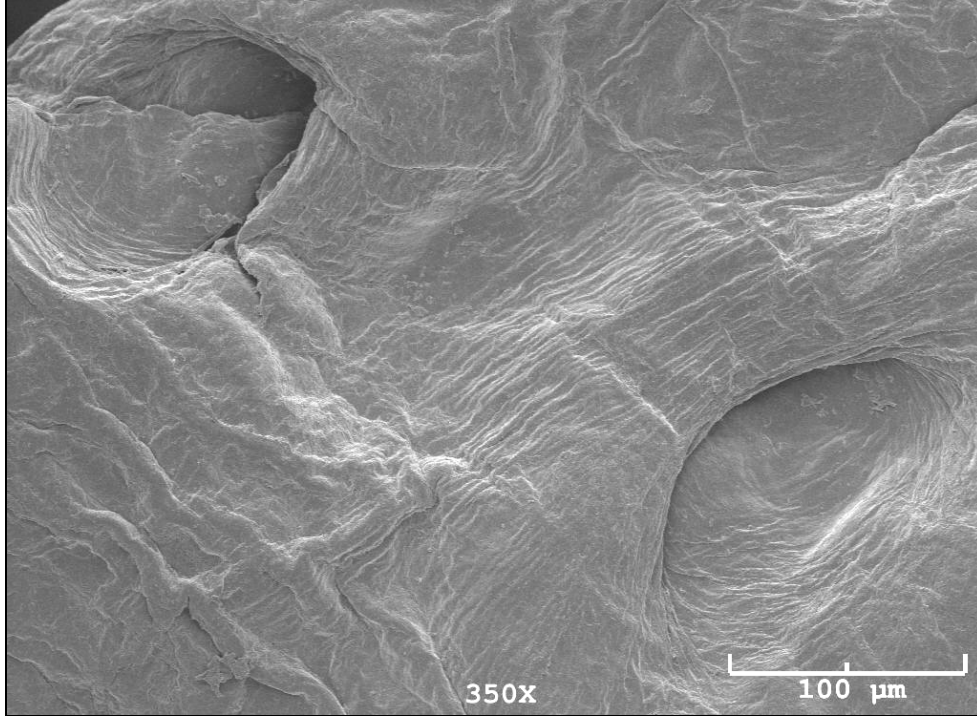
7.2.6 Mikroskopik Karakterizasyon

Çitin saf hali ve proteaz immobilizasyonundan sonraki hali SEM ile taranarak elde edilen görüntüler Şekil 7.17 ve Şekil 7.18’de verilmiştir. Şekil 7.17’de görüldüğü gibi saf halde çitin dış yüzeyi oldukça düzdür.



Şekil 7.17. Çitin Dış Yüzeyinin SEM Görüntüsü

Proteaz immobilizasyonu ise çitin dış yüzeyinde değişikliklere yol açmıştır. Şekil 7.18’deki çitin immobilizasyon sonra elde edilen SEM görüntüsünde daha lifli bir yapı göze çarpmaktadır. Ayrıca enzimin yerleştiği oyuklarda gözlenmektedir.



Şekil 7.18. Çitinin Proteaz İmmobilizasyonu Sonrası Dış Yüzeyinin SEM Görüntüsü

8. VARGILAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada sağladıkları avantajlar nedeniyle taşıyıcı olarak seçilen çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla proteaz immobilizasyonu gerçekleştirilirken, çapraz bağlanmanın yardımcı etkisi, kullanılan çapraz bağlama ajanının konsantrasyonu, iyonik şiddetin önemi nedeniyle, kullanılan tampon çözeltinin pH ve konsantrasyon değerleri, taşıyıcı/enzim yükleme oranı, enzim/tampon çözelti oranı gibi parametreler daha yüksek verime ulaşabilecek şekilde optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. Kovalent bağlanma öncesi glutaraldehit kullanarak çapraz bağlama yapılması aktivite geri kazanımı ve etkinlik oranını artırıcı etki yapmıştır. Her iki taşıyıcının kullanılması durumunda da optimum GA oranı %1 olarak bulunmuştur. Bunun üzerindeki konsantrasyonların verimi artırıcı etkisi olmamıştır. Optimum GA oranıyla çapraz bağlama yapıldıktan sonra kovalent bağlanma gerçekleştirildiğinde AGK ve EO değerleri sırasıyla çitin için; %22 , % 23 çitosan için %22 ve %23'dür.
2. İmmobilizasyonda kullanılan tampon çözeltinin (Tris-HCl) optimum pH değeri her iki taşıyıcı içinde 12'dir. Bu koşullarda elde edilen AGK ve EO oranları sırasıyla, taşıyıcının çitin olması durumunda %55 %63 taşıyıcının çitosan olması durumunda %39 ve %47'dir.
3. Tampon çözeltinin konsantrasyonu 0.5M olarak optimize edilmiştir. Buna göre elde edilen verimler çitin için, AGK, %55. EO, % 63 çitosan için AGK, %39 EO, %47'dir.
4. Taşıyıcı/yükleme oranına bakıldığında optimum değer çitin için, 1.40 mg taşıyıcı/ml enzim, çitosan için 1 mg taşıyıcı/ml enzim olarak bulunmuştur. 1.40 mg taşıyıcı/ml enzim oranında yükleme yapıldığında çitin üzerine immobilize edilen proteazın AGK oranı %62 EO oranı %74 olarak bulunmuştur. 1mg çitosan/ml Proteaz oranında yükleme yapıldığında ise elde edilen AGK %39, EO ise %47'dir.
5. Enzim/tampon çözelti oranına bakıldığında, her iki taşıyıcı içinde 0.25 değerinin üzerine çıkıldığında verimin düştüğü görülmüştür. Bu oran kullanılarak

hazırlanan enzim çözeltisiyle immobilizasyon gerçekleştirildiğinde, çitin için AGK ve EO değerleri sırasıyla %80, %86 çitosan için ise aynı değerler sırasıyla %64, %76 olarak bulunmuştur.

Yukarıda açıklan değerleri özetlemek immobilizasyon verimine etkisi olan parametreler için belirlenen en uygun değerler şöyledir:

i. Taşıyıcı olarak çitin kullanıldığında:

Glutaraldehit Konsantrasyonu:	%1 (h/h)
Tampon çözeltinin pH değeri:	pH 12
Tampon çözeltinin konsantrasyonu:	0.5 M
Taşıyıcı/enzim oranı:	1.4 mg çitin/ml proteaz
Enzim/tampon oranı:	0.25 ml proteaz/ml Tris-HCl

ii. Taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında:

Glutaraldehit Konsantrasyonu:	%1 (h/h)
Tampon çözeltinin pH değeri:	pH 12
Tampon çözeltinin konsantrasyonu:	0.5 M
Taşıyıcı/enzim oranı:	1 mg çitosan/ml proteaz
Enzim/tampon oranı:	0.25 ml proteaz/ml Tris-HCl

Belirlenen bu koşullarla immobilizasyon gerçekleştirildikten sonra immobilize enzimlerin, sıcaklık kararlılığı, pH kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği, deterjan uyumluluğu ve saklama kararlılığı değerlerine bakılmıştır. Buna göre:

1. Serbest enzimin sıcaklık kararlılığı 50°C'den 70°C'ye kaydırılmıştır.
2. pH kararlılığı aynı aralıkta kalmış serbest enzim de immobilize enzimler de pH 7-11 arasında kararlılık göstermiş ancak, serbest enzimin %7 aktivite gösterdiği pH 12 değerinde çitin üzerine immobilize edilen enzim %54 çitosan üzerine immobilize edilen enzim ise %34 oranında aktivitesini korumuştur.
3. Tekrar kullanımlarına bakılan immobilize enzimlerin 6 arka arkaya kullanım sonucu korudukları aktiviteleri çitin ve çitosan için sırasıyla %68 ve %62'dir.

4. Çitin üzerine immobilize edilen proteazın 60°C’de 3 saat sonunda deterjan varlığındaki aktivitesinin aynı koşullarda deterjan yokluğundaki aktivitesine oranı %76, çitosan üzerine immobilize edilen proteazınki ise %74’dür.
5. +4°C’de 65 gün saklanan immobilize enzimlerden, çitin üzerine immobilize edilen enzim aktivitesinin % 83’ünü, çitosan üzerine immobilize edilen enzim ise %87’sini korumuştur.

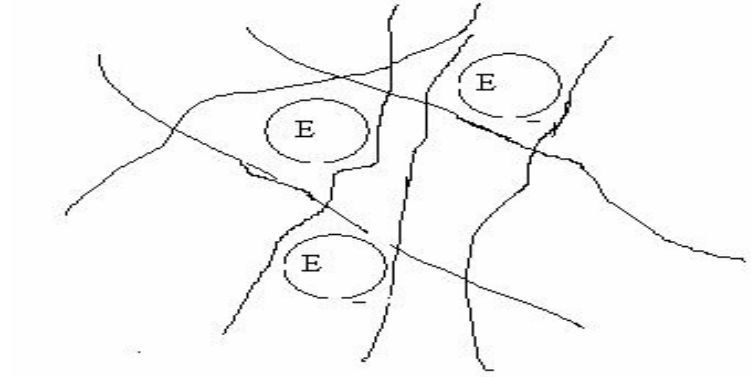
KAYNAKLAR

- [1] **Aehle, W.**, 2004. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley, Weinheim
- [2] **Krajewska, B.**, 2003. Applicaiton of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immoblization: a Review, *Enzyme and Microbial Technology*, **35** , 126-139
- [3] **Öztrük, M. H.**, 2004. Partial Purification And Characterization Of Alkaline Proteases From Isolated Bacillus Strains, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [4] **Gerze, A.**, 2003. Proteaz Enziminin *Bacillus Subtilis Megatherium* ve *Bacillus Polymxa* Bakteri Türlerinden Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [5] **Longo, M.A., Novella, I.S. , Garcia, L.A. and Diaz, M.** ,1999. Comparison of *Bacillus Subtilis* and *Serratia Marcescens* as Protease Producers Under Different Operating Conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 35-40
- [6] **Kırkköprü, İ., Alpaslan, S. C.**, 2004. Proteaz Enziminin Değişik Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu, *Bitirme Tezi*, İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul
- [7] **Anwar, A. , Saleemuddin, M.**, 1997. Alkaline Protease: a Review, *Biosource Technology*, **64**, 175-183
- [8] **Bugg, T.**, 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Oxford,U.K.
- [9] **Uhlig, H.**, 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, pp.147-179, 202-222, John Wiley & Sons, Canada
- [10] 2004 <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/whatis.htm>

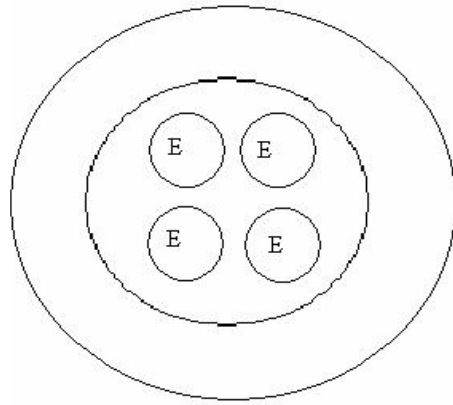
- [11] **Uludağ, Y.B.**, 2000. İmmobilize Glukoamilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli
- [12] **Petri, A. , Gambicorti, T. and Salvadori, P.**, 2003. Covalent Immobilization of Chloroperoxidase on Silica Gel and Properties of The Immobilized Catalyst, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* ,**27**, 103-106
- [13] **Pereira, E. B., Zanin, G.M. and Castro, H.F.**, 2003. Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterifaciton Reactions, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **20-4**
- [14] **Magnin, D. , Dumitriu, S. , Chornet, E.**,2003. Immobilization of Enzymes into a Polyionic Hydrogel: Chitoxan, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **18**, 355-373
- [15] **Li, J. , Du, Y., Yang, J. ,Feng, T. ,Li, A. and Chen, P.**, 2004. Preperition and Chracterisation of Low Molecular Weight Chitosan and Chito-oligomers by a Commercial Enzyme, *Polymer Degredation and Stability*,
- [16] **Chang, M.Y. , Juang, R.S.**, 2004. Activities, Stabilities, and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan Clay Composite Immobilized Enzymes, *Enzyme and Microbial Technology* , **36**, 75-82
- [17] **Alsarra İ.A.**, 2002. Preparation and Characterization of Chitosan-Containing Hydrogel Beads for Immobilization of Candida Rugosa Lipase With High Retention of It's Hydrolytic Activity, *Thesis of PhD*, University of Missouri Kansas City, Missouri
- [18] **Hayashi, T. , Ikada, Y.**,1991. Protease Immobilization onto Porous Chitosan Beads, *Journal of Applied Polymer Science*, **42**, 85-92
- [19] **Abdel-Naby, M.A., Ismail, A-M., Ahmed, S.A. and Fattah, A.F.**, 1997. Production and Immobilization of Alkaline Protease From *Bacillus Mycoides*, *Biosource and Technology*, **64**, 205-210
- [20] **Chellapadian, M.**, 1997. Preparation and Characterization of Alkaline Protease Immobilized on Vermiculite, *Process Biochemistry*, **33**, 169-173
- [21] **Chae, H.J., In, M-J. and Kim, E.Y.**, 1998. Optimization of Protease Immobilization by Covalent Binding Using Glutaraldehyde, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **73**,195-204

- [22] Tanksale, A., Chandra, P.M., Rao, M. and Desphande, V., 2001. Immobilization of Alkaline Protease from *Conidiobolus Macrosporus* for Reuse and Improved Thermal Stability, *Biotechnology Letters*, **23**, 51-54
- [23] Chae, H.J., Kim, E.Y. and In, M.-J., 1999. Improved Immobilization Yields by Addition of Protecting Agents in Glutaraldehyde Induced of Protease, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89-4**, 377-379
- [24] Gorodia, D., Cooney, J., Hodnett, B.K. and Magner, E., 2005. The Adsorption Characteristic, Activity and Stability of Trypsin onto Mesoporous Silicates, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **32**, 231-239
- [25] 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*, 4(4) Article 56,
- [26] Kılınç, A., Önal, S. and Telefoncu, A., 2001. Stabilization of Papain by Modification with Chitosan, *Turk J Chem*, **26**, 311-316

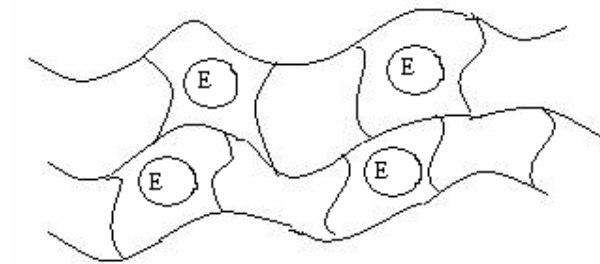
EK A



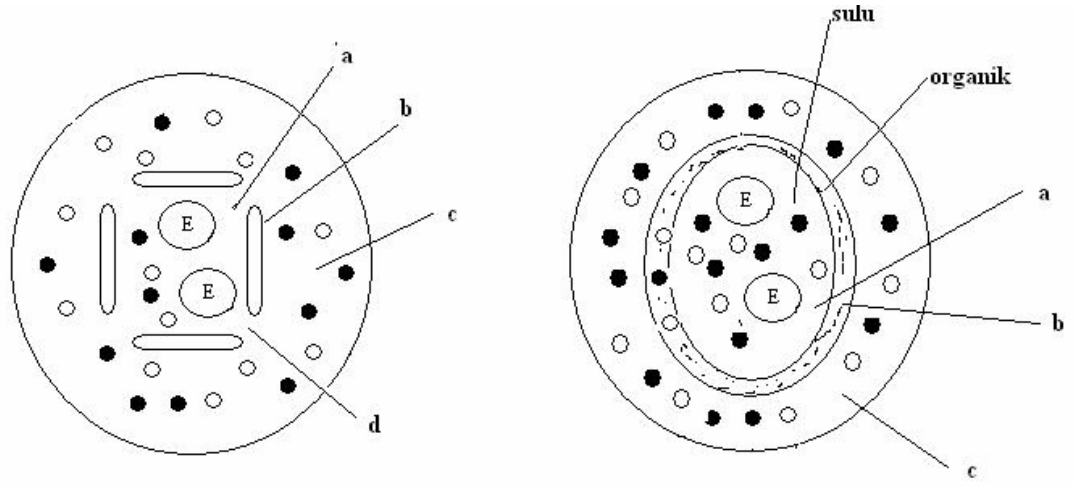
Şekil A.1. Tutuklama ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi



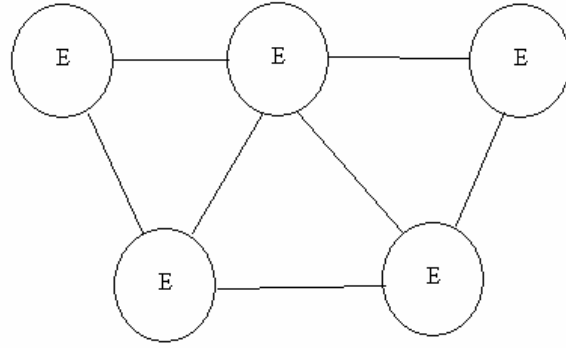
Şekil A.2. Mikrokapsülleme ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi



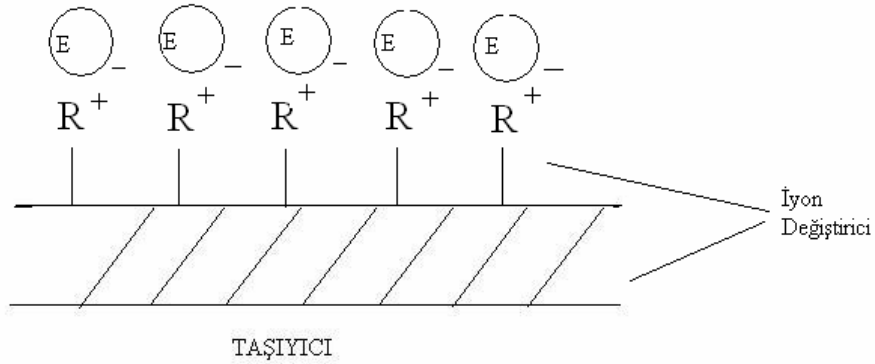
Şekil A.3. Polimer Matrislerde Tutuklama ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi



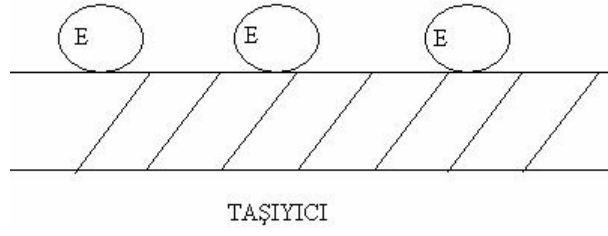
Şekil A.4. Sürekli ve Süreksiz Mikrokapsüllemenin Şematik Gösterimi



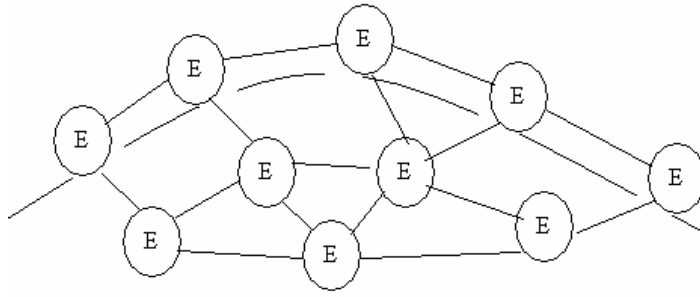
Şekil A.5. Çapraz Bağlama ile Enzim İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi



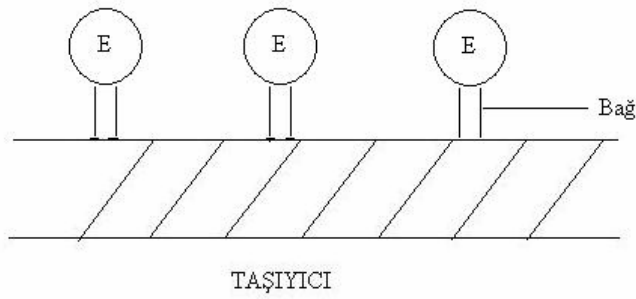
Şekil A.6. İyon Değiştiriciler ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi



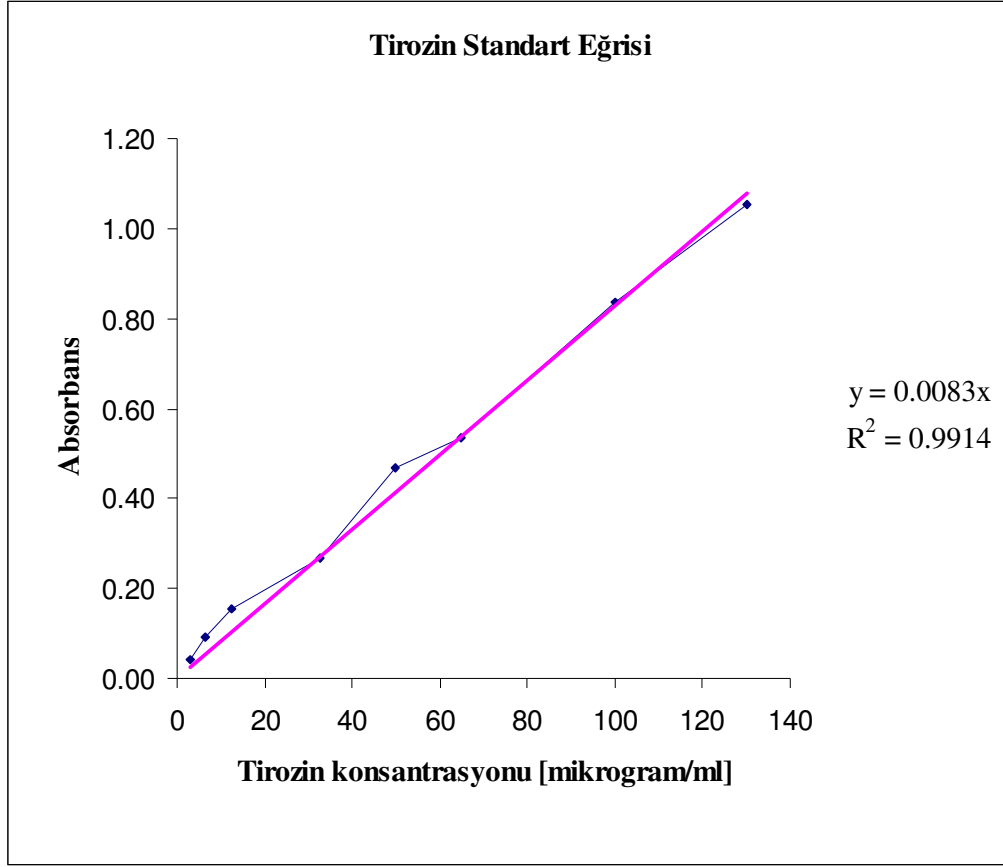
Şekil A.7. Adsorpsiyon ile İmmobilizasyonun Şematik Gösterimi



Şekil A.8. Adsorpsiyon ile Çapraz Bağlama Yoluyla Enzim İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi



Şekil A.9. Kovalent Bağlanma ile Enzim İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi



Şekil A.10. Tirozin Standart Eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Esra Özçömlekçi 1981 yılında İstanbul'da doğdu. 1998 yılında Kadir Has Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Metalürji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde öğrenimine başladı. 2003 yılında Kimya Mühendisi unvanı ile mezun oldu ve aynı yıl İ.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans programına başladı. Şu anda yüksek lisans programında çalışmalarına devam etmektedir.