

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Çiğdem TAŞDELEN**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2006

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Çiğdem TAŞDELEN
(506031008)**

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

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Bülent GÜRLER (İ.Ü.)
Yrd.Doç.Dr. Ramazan KIZIL (İ.T.Ü.)**

HAZİRAN 2006

ÖNSÖZ

Çok sevdiğim benim için sadece bir hoca olmaktan çok öte bir anlam taşıyan Sayın Hocam Doç.Dr. Yüksel GÜVENİLİR'e lisans eğitimim süresince ve tez çalışmam esnasındaki yardımlarından ve manevi desteğinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Beni büyüten, her zaman her zorlukta yanımda olan ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen aileme teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana yürekten inanan ve her zaman moral veren annem Emine Taşdelen'e ayrıca teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım ve tezimin her aşamasında yardımlarından ve desteğinden dolayı sevgili arkadaşım Ar.Gör. Didem OMA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullandığım Proteaz enzimini temin etmemi sağladığı için Cognis Kimya A.Ş. yetkililerine teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Beni seven, bana destek olan, hayatıma anlam katan tüm sevdiklerime ve dostlarıma her zaman yanımda oldukları için teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Haziran, 2006

Çiğdem TAŞDELEN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
SEMBOL LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. ENZİMLER VE PROTEAZLAR	3
2.1. Enzimler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları	3
2.2. Proteaz Enzimi ve Sınıflandırılması	4
2.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları	5
2.3.1. Deterjan endüstrisi	5
2.3.2. Deri endüstrisi	6
2.3.3. Peynir üretimi	6
2.3.4. Etin işlenmesi	6
2.3.5. Fırıncılık	7
2.2.6. Bira yapımı	7
2.2.7. Cilt bakım ürünleri	7
2.3.8. Membran temizlenmesi	7
2.3.9. Atık işleme	7
2.3.10. Hayvan yemi üretimi	7
2.3.11. D,L-Amino asitlerin sentez ve çözündürülmelerinde	8
2.3.12. İlaç endüstrisi	8
2.3.13. Tekstil endüstrisi	8
2.3.14. Klinik uygulamalar	8
2.3.15. Gümüşün geri kazanılması	8
3. ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU	10
3.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi	10
3.2. İmmobilizasyonun Avantajları	11
3.3. İmmobilizasyon Parametreleri	11
3.4. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar	12

3.4.1. İmmobilizasyonda genel olarak kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması	13
3.4.2. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılardan bazıları	14
3.4.2.1. Çitin ve Çitosan	14
3.4.2.2. Vermikulit	15
3.4.2.3. İyon değıştirciler	16
3.5. İmmobilizasyon Metotları	16
3.5.1. Taşıyıcı içine immobilizasyon yöntemi	17
3.5.1.1. Fiziksel adsorpsiyon	18
3.5.1.2. İyonik bağlanma	19
3.5.1.3. Kovalent bağlanma	20
3.5.1.4. Kompleks bağlanma	22
3.5.2. Tutuklama yöntemi	22
3.5.2.1. Mikrokapsülleme yöntemi	22
3.5.2.2. Fiber tutuklama yöntemi	23
4. PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI	24
5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
5.1. Malzemeler	35
5.1.1. Taşıyıcılar	35
5.1.2. Enzim ve diğer malzemeler	35
5.1.3. Tampon çözeltiler	35
5.1.3.1. Britton-Robinson tampon çözeltileri	35
5.1.3.2. Sitrat-fosfat tampon çözeltileri	36
5.1.3.3. Tris-HCl tampon çözeltileri	36
5.1.3.4. Asetat tampon çözeltileri	36
5.1.3.5. Borat tampon çözeltisi	37
5.1.4. Enzim aktivitesi tayinininde ve taşıyıcı aktivasyonunda kullanılan diğer çözeltiler	37
5.1.5. Laboratuvar ekipmanları	39
5.2. Metotlar	39
5.2.1. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyon	39
5.2.1.1. Proteaz enzimini çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu	39
5.2.1.2. Proteaz enziminin vermikulit üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu	40
5.2.2. İyonik bağlanma yöntemiyle immobilizasyon	40

5.2.3. Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon	41
5.2.3.1. Epiklorhidrin yöntemiyle tanin-çitosan hazırlanması	41
5.2.3.2. Proteaz enziminin tanin-çitosan ve çitin üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonu	42
5.2.4. Enzim aktivitesi tayin yöntemleri	42
5.2.4.1. Enzim aktivitesi tayin yöntemi 1	42
5.2.4.2. Enzim aktivitesi tayin yöntemi 2	42
5.2.4.3. Enzim aktivitesi tayin yöntemi 3	43
5.2.5. Protein konsantrasyonu tayin yöntemi	43
5.2.6. Serbest proteaz enziminin karakterizasyonu	43
5.2.6.1. pH' ın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	43
5.2.6.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	44
5.2.7. İmmobilize proteaz enziminin karakterizasyonu	44
5.2.7.1. pH'ın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	44
5.2.7.2. Sıcaklığın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	45
5.2.7.3. İmmobilize enzimin raf ömrü kararlılığı	45
5.2.7.4. İmmobilize enzimin operasyonel kararlılığı	45
5.2.7.5. İmmobilize enzimin deterjan uyumluluğu	46
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	47
6.1. Proteaz Enziminin Farklı Metotlar Kullanılarak İmmobilize Edilmesiyle Elde Edilen Verimler	47
6.1.1. Kovalent bağlanma metodu ile immobilize edilmiş proteazın immobilizasyon verimleri	47
6.1.2. İyonik bağlanma metodu ile immobilize edilmiş proteazın immobilizasyon verimleri	49
6.1.3. Fiziksel adsorpsiyon metodu ile immobilize edilmiş proteazın immobilizasyon verimleri	51
6.2. İmmobilize Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	52
6.2.1. pH' ın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	52
6.2.1.1. Optimum pH	52
6.2.1.2. pH kararlılığı	56

6.2.2. Sıcaklığın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	59
6.2.2.1. Optimum sıcaklık	59
6.2.2.2. Sıcaklık kararlılığı	63
6.2.3. İmmobilize enzimin raf ömrü kararlılığı	66
6.2.4. İmmobilize enzimin operasyonel kararlılığı	70
6.2.5. İmmobilize enzimin deterjan uyumluluğu	72
7. VARGILAR VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	82
EKLER	87
ÖZGEÇMİŞ	90

KISALTMALAR

EC	: Avrupa Birliği Komitesi
DEAE	: Dietil aminoetil
TCA	: Trikloroasetik asit
HMD	: Hekzametilen diamin
GA	: Glutaraldehit
B-R	: Britton-Robinson
UV	: Ultra Viole

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 6.1 Proteaz enzimin çitin, çitosan ve vermikulit üzerine immobilizasyon verimleri.....	47
Tablo 6.2 Proteaz enzimin farklı iyon-değiştiriciler üzerine immobilizasyon verimleri.....	50
Tablo 6.3 Proteaz enzimin çitin ve tanin-çitosan üzerine immobilizasyon verimleri.....	51
Tablo 6.4 Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH'ları.....	53
Tablo 6.5 Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı.....	54
Tablo 6.6 Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin pH kararlılıkları.....	56
Tablo 6.7 Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin pH kararlılığı.....	58
Tablo 6.8 Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum sıcaklıkları.....	60
Tablo 6.9 Vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı.....	61
Tablo 6.10 Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin sıcaklık kararlılıkları.....	63
Tablo 6.11 Vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin sıcaklık kararlılığı.....	64
Tablo 6.12 Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin raf ömrü kararlılıkları.....	67
Tablo 6.13 Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin raf ömrü kararlılığı.....	68
Tablo 6.14 Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin operasyonel kararlılıkları.....	70
Tablo 6.15 Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin operasyonel kararlılığı.....	71
Tablo 6.16 Çitin üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu.....	73
Tablo 6.17 Çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu.....	74
Tablo 6.18 Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin deterjan uyumluluğu.....	75

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1 : Çitin ve çitosanın kimyasal yapısı.....	15
Şekil 3.2 : Temsili çapraz bağlanma.....	17
Şekil 3.3 : Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyonun temsili gösterimi.....	18
Şekil 3.4 : Kovalent bağlanma ile immobilizasyonun temsili gösterimi.....	20
Şekil 3.5 : Mikrokapsülleme yöntemi ile immobilizasyonun temsili gösterimi.....	23
Şekil 3.6 : Fiber tutuklama yöntemi ile immobilizasyonun temsili gösterimi.....	23
Şekil 6.1 : Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH'ları.....	54
Şekil 6.2 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı.....	55
Şekil 6.3 : Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin pH kararlılıkları.....	57
Şekil 6.4 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin pH kararlılığı.....	58
Şekil 6.5 : Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum sıcaklıkları.....	60
Şekil 6.6 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı.....	62
Şekil 6.7 : Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin sıcaklık kararlılıkları.....	64
Şekil 6.8 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin sıcaklık kararlılığı.....	65
Şekil 6.9 : Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin raf ömrü kararlılıkları.....	68
Şekil 6.10 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin raf ömrü kararlılığı.....	69
Şekil 6.11 : Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin operasyonel kararlılıkları.....	71
Şekil 6.12 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin operasyonel kararlılığı.....	72
Şekil 6.13 : Çitin üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu.....	74
Şekil 6.14 : Çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu.....	75
Şekil 6.15 : Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu.....	76

Şekil A.1	:	Tirozin standart eğrisi.....	87
Şekil A.2	:	Standart protein eğrisi.....	88
Şekil B.1	:	İmmobilizasyon metotlarının sınıflandırılması.....	89

SEMBOL LİSTESİ

M	: Molar
N	: Normal
U	: Ünite
A	: Eklenen enzim
B	: Bağlanmamış enzim
C	: İmmobilize enzim
nm	: Nanometre
Å	: Angström

PROTEAZ ENZİMİNİN FİZİKSEL ADSORPSİYON, KOVALENT VE İYONİK BAĞLANMA METOTLARI İLE İMMOBİLİZASYONU

ÖZET

Enzimler, katalizledikleri proseslerdeki reaksiyon hızını kimyasal katalizli reaksiyonlara göre daha fazla artırabilen ve reaksiyon koşullarının daha ılımlı olmasına olanak veren biyokatalizörlerdir. Enzimler, kararlılıklarının artırılması ve tekrarlı kullanımlarının sağlanabilmesi için, çeşitli taşıyıcı maddeler kullanılarak immobilize edilirler. Immobilize enzimler, serbest enzimlere kıyasla daha iyi özelliklere sahip oldukları için değişik endüstriyel proseslerde geniş uygulama alanı bulmaktadır.

Bu çalışmada, endüstride geniş uygulama alanı olan proteazın immobilizasyonu incelenmiştir. Bu amaçla ticari proteaz enzimi fiziksel adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlanma yöntemleri kullanılarak farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiştir ve kovalent bağlanma metodu ile elde edilen immobilize enzimin karakterizasyonu yapılmıştır.

Deneyssel çalışmalarda ilk olarak fiziksel adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlanma sonucu immobilizasyon verimleri tespit edilmiştir.

Fiziksel adsorpsiyon metoduyla çitin ve tanin-çitosan üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin immobilizasyon verimleri sırasıyla, %44.2 ve %77.8 olarak bulunmuştur.

Proteaz enziminin çitin, çitosan ve vermikulit üzerine kovalent bağlanma metoduyla immobilizasyonu sonucunda immobilizasyon verimleri sırasıyla, %84.3, %81.2 ve %54.8 olarak belirlenmiştir.

Proteazın, iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen taşıyıcılar üzerine bağlanabilme kapasitesi iyonik bağlanma yöntemi uygulanarak incelenmiştir. İyonik bağlanma yöntemindeki en yüksek immobilizasyon verimi Ecteola23 Cellulose anyon değiştiricisi ile %26.5 olarak belirlenmiştir. Dowex 50W-X8(H), Amberlite IR-120, Dowex 1X8 Cl, DEAE-Cellulose ve BD-Sephadex üzerine proteaz immobilizasyonu sonucunda elde edilen verimler ise sırasıyla, %13.7, %10.4, %13.8, %11.9 ve %10.7'dir.

Kovalent bağlanma metodunda, enzim ile taşıyıcının bağlanması çaprazlanmış kovalent bağlarla sağlandığı için enzimin kararlılığı daha yüksektir. Bu sebeple kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş proteaz enziminin karakterizasyonu için, optimum pH, pH kararlılığı, optimum sıcaklık, sıcaklık kararlılığı, raf ömrü kararlılığı, tekrar kullanılabilirlik kararlılığı ve deterjan uyumluluğu incelenmiştir.

Çitin, çitosan ve vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteaz enzimi serbest enzimin optimum sıcaklığının 50°C'den 60°C'ye yükselmesini sağlamıştır. Proteazın çitin, çitosan ve vermikulit üzerine immobilizasyonu ile enzimin sıcaklık kararlılığında iyileşme gözlenmiştir. Çitin, çitosan ve vermikulit üzerine kovalent olarak bağlanmış enzimin optimum pH'ında

artış ve pH kararlılığında iyileşme tespit edilmiştir. Çitin, çitosan ve vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin raf ömrü ve tekrarlı kullanılabilme deneyleri sonucunda kararlı davrandığı belirlenmiştir. Ayrıca kovalent bağlanma metodu kullanılarak immobilize edilmiş enzimlerin tümünün ticari deterjanlarla uyumlu oldukları gözlenmiştir.

IMMOBILIZATION OF PROTEASE ENZYME BY PHYSICAL ADSORPTION, COVALENT AND IONIC BINDING METHODS

SUMMARY

Enzymes are excellent biocatalysts, used to increase the rate of reactions and to supply milder reaction conditions more than the reactions catalyzed by chemical catalysts. To stabilize the enzymes and to use them repeatedly, they are immobilized on a wide range of carriers. The immobilized enzymes, have several application areas in various industrial processes.

In this study, the immobilization of protease, used in multiple areas in industry, was investigated. For this goal, commercial protease enzyme was immobilized on various carriers by the methods of physical adsorption, covalent and ionic binding and the characterization of the immobilized enzyme, which obtained by covalent binding, was analyzed.

In the experimental analysis, firstly the immobilization yields were obtained after the immobilization processes by physical adsorption, covalent and ionic binding methods.

The immobilization yields of the proteases immobilized on chitin and tannin-chitosan by physical adsorption method were 44.2% and 77.8%, respectively.

Covalent binding method by using chitin, chitosan and vermiculite resulted with the immobilization yields of 84.3%, 81.2% and 54.8%, respectively.

The binding capacities of the protease to different water-insoluble carriers containing ion-exchange residues were obtained by applying the ionic binding method. The highest immobilization yield was achieved as 26.5% with the anion exchanger of Ecteola23 Cellulose. The other immobilization yields obtained by using Dowex 50W-X8(H), Amberlite IR-120, Dowex 1X8 Cl, DEAE-Cellulose and BD-Sephadex were %13.7, %10.4, %13.8, %11.9 ve %10.7, respectively.

In the covalent binding method, the stability of the enzyme is higher in comparison to other binding methods due to the strong crosslinked covalent linkages between the enzyme and the carrier. For that reason, the parameters of optimum pH, pH stability, optimum temperature, temperature stability, storage stability, operational stability and detergent stability were studied for the characterization of the protease enzyme immobilized by covalent binding.

The immobilized enzymes on chitin, chitosan and vermiculite which supply the enzyme to bind covalently, shifted the optimal temperature of the enzyme from 50°C to 60°C. By the immobilization of protease on chitin, chitosan and vermiculite temperature stability was improved. Covalently immobilized enzymes increased the optimum pH, improved the pH stability and also exhibited good storage stability and durability for repeated use. Furthermore, all the enzymes immobilized on chitin,

chitosan and vermiculite exhibited good detergent stability with the commercial detergents.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen, farklı maddeler içeren, belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen ya da kolaylaştıran, kendisi reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen protein molekülleridir [1]. Enzimler biyokimyasal reaksiyonların hızını kimyasal katalizli reaksiyonlara kıyasla 1 milyon kez artırır. Enzimlerin etki ettikleri maddeye veya madde karışımına bu enzimin substratı denir. Substratlarına karşı çok iyi spesifite gösterdikleri için kendine özgü ve uyumlu tek bir substratla bağlanarak tek bir ürün oluştururlar [2].

Proteazlar, proteinlerin polipeptit yapıları içerisindeki amit bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir [3]. Fizyolojik proseslerdeki ve endüstriyel alanlardaki önemli rolleriyle çok önemli enzim türlerinden biridir. Endüstride kullanılan enzimlerin %75'i hidrolitik enzimlerdir. Dünya' daki enzim satışlarının %60' ını oluşturan proteazlar, çok sayıda endüstriyel proseste geniş bir uygulama alanına sahiptir. Proteazlar, hücresel boyuttan organ ve organizma boyutuna kadar birçok reaksiyonda görev yaparlar. Proteazların endüstriyel uygulamaları ise özellikle besin ve deterjan endüstrilerinde çok eskiye dayanmaktadır [4].

Canlı hücrelerin fonksiyon ve özelliklerini düzenleme görevinden, endüstriyel ölçekli birçok reaksiyona kadar geniş bir alanda görev yapabilen enzimlerin yararlı özelliklerinin yanında bazı sorunları da mevcuttur. Enzimlerin kararsız oluşları, üretim maliyetlerinin yüksek olması ve dar bir substrat spesifitesine sahip olmaları sentetik katalizörler olarak kullanılmalarındaki en önemli sorunlardır [5]. Kimyasal reaksiyonlarda serbest enzimlerin kullanılırken, katalizledikleri reaksiyondan sonra ürünü kontamine etmeleri ve tekrar elde edilme proseslerinin yüksek maliyetli olması gibi problemler de gözönüne alınmalıdır. Ayrıca, enzimlerin doğal ortamlarından izole edilmelerinden sonra aktivitelerinde düşüş gözlenir [6].

İmmobilize enzimler, katalitik aktivitelerini koruyarak, sınırları belli bir bölgeye fiziksel olarak hapsedilmiş, tekrarlı ve sürekli kullanılabilen enzimler olarak tanımlanabilir [7]. İmmobilize enzimler serbest enzimlerin dezavantajlarını ortadan

kaldırarak daha kararlı olmalarına olanak sağlar. İmmobilizasyon prosesinin en önemli avantajı, enzimin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilmesidir [8]. İmmobilize enzimler, filtrasyon ve santrifüjleme prosesleri ile tekrar kullanılmak üzere kolayca geri kazanılabilmeleri ve sabit yatak, akışkan yatak ve karıştırılmalı tank reaktör gibi sürekli proseslerde kullanılabilmeleri gibi klasik heterojen katalizörlerin sağladığı avantajların tümüne sahiptirler. İmmobilize enzimlerin diğer avantajları tekrarlı kullanılabilir olmaları, enzimin reaksiyon ortamından çekilmesiyle reaksiyonun hızlı bir şekilde sonlanması (ya da tam tersi) ve reaksiyonlardan sonra aktivitelerindeki kaybın az olmasıdır [9].

Diğer fiziksel ve kimyasal proseslerde olduğu gibi, immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, konsantrasyona, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır [9].

Bu çalışmada, proteaz enzimi farklı yöntemler kullanılarak değişik taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiştir. Proteaz enzimi çitin, çitosan ve vermikulit taşıyıcıları üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle; Dowex 50W-X8(H), Amberlite IR-120 katyon taşıyıcıları ve Dowex 1x8 Cl, Ecteola23 Cellulose, DEAE-Cellulose, BD-Sephadex anyon taşıyıcıları üzerine iyonik bağlanma yöntemiyle ve muamele görmemiş çitin ve tanin-çitosan üzerine ise fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, proteaz enziminin farklı taşıyıcılar üzerine farklı yöntemlerle bağlanabilme kapasitesinin tespit edilmesi ve immobilize edilmiş enzimlerin serbest enzimlerle kıyaslanabilmeleri için karakteristiklerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH'ı, pH kararlılığı, optimum sıcaklığı, sıcaklık kararlılığı, raf ömrü kararlılığı, operasyonel kararlılığı ve deterjan uyumluluğu incelenmiştir.

2. ENZİMLER VE PROTEAZLAR

2.1. Enzimler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen, farklı maddeler içeren spesifik bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen ya da kolaylaştıran, kendisi reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen protein molekülleridir [1]. Zorlu proses koşulları altındaki katalitik aktiviteleri sentetik katalizörlerden çok daha etkili olan enzimlerin, üç boyutlu yapıları lineer polipeptit zincirlerinin kendiliklerinden belli bir düzen içerisine girecek şekilde kıvrılmaları sonucunda çok karmaşıktır [8].

Enzimlerin bazıları katalitik etki gösterebilmek için proteinden başka bir metal iyonuna, protein olmayan organik bir bileşiğe ya da bunların her ikisine ihtiyaç duyarlar [2]. Enzimlerin sahip oldukları bu iyon veya bileşiğe Kofaktör adı verilirken, bu kofaktörlere sahip enzimlere ise Koenzim adı verilir. Enzimlerin protein kısmına ise Apoenzim denir. Her ikisine birden de Haloenzim adı verilir. Düzenleyici yeteneğe sahip spesifik enzim grubuna Düzenleyici enzimler (regülatör enzimler) denir. Düzenleyici enzimler canlı hücrelerin fonksiyon ve özelliklerini düzenleme görevini yaparlar [8].

Enzimler spesifik aktiviteye sahip proteinler oldukları için, enzimin bu spesifitesi substratla geçici olarak enzim-substrat kompleksini kurmaya yarar. Bu geçici kompleks sayesinde ürünler oluşur, daha sonra enzim substrattan ayrılarak tekrar eski haline geri döner. Substratın enzimin üzerinde bağlandığı aktif bölgeye ise katalitik bölge denir. Substratın enzime bağlanması anahtarın kilide uyması gibi bir uyum gösterir. Enzimler substratlarına karşı çok iyi spesifite gösterdikleri için kendine özgü ve uyumlu tek bir substratla bağlanarak tek bir ürün oluştururlar [8].

Enzimler reaksiyonların hızlarını önemli miktarda artırır ve zorlu proses şartlarında çalışabilirler. Enzimlerin kararsız oluşları, üretim maliyetlerinin yüksek olması ve dar bir substrat spesifitesine sahip olmaları sentetik katalizörler olarak kullanılmalarındaki en önemli sorunlardır. Kimya ve biyolojideki yeni gelişmeler ve endüstrideki yeni gereksinimler enzimlerin bu dezavantajlarını ortadan kaldırmaya

yönelik birçok çalışma yapılmasını sağlamıştır. Enzimlerin seçiciliklerini artırarak doğal ya da doğal olmayan substratları faydalı ara ürünlere ya da son ürünlere dönüştürecek çok sayıda enzimatik reaksiyonun varlığı kanıtlanmıştır. Enzimatik reaksiyonların kapasitelerinin büyütülmesi amacıyla, enzimlerin kararlılıklarının artırılması ve tekrar kullanılmak üzere geri kazanımlarının kolaylaştırılması için yeni teknikler geliştirilmiştir [3].

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri, kataliz ettikleri reaksiyonlara göre altı sınıfa ve bu altı sınıfı da kendi içinde alt sınıflara ayırmıştır [1,2].

- 1) Oksidoredüktazlar: İki substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2) Transferazlar: İki substrat arasındaki aldehit, keton, açıl, fosfat ve kükürt içeren grupların transferlerini katalizleyen enzimlerdir.
- 3) Hidrolazlar: Substratın çeşidine göre ester, eter, peptit, glikozid, anhidrit, C-halojenür ya da P-N bağlarının bir su molekülünün katılmasıyla hidrolizlerini katalizleyen enzimlerdir.
- 4) Liyazlar: Bir organik moleküldeki grupların hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 5) İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.
- 6) Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir [1,2].

2.2. Proteaz Enzimi ve Sınıflandırılması

Proteazlar proteinlerin polipeptit yapıları içerisindeki amit bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir [8]. Proteazlar, fizyolojik proseslerdeki ve endüstriyel alanlardaki önemli rolleriyle çok önemli enzim türlerinden biridir. Memelilerin sindirim sistemlerinde çok önemli bir role sahip olan proteaz enzimi, mide ve pankreasta bol miktarda üretilerek besinlerdeki protein içeriğinin yapıtaşlarına ayrılmasını sağlar [9].

Diğer proteazların üretiminde bakteriler, mayalar, mantarlar ve bitkiler kullanılır.

Proteazlar, katalizledikleri reaksiyonlara, katalitik bölgelerinin kimyasal yapısına ve kaynaklarına göre üç ana grupta sınıflandırılırlar [8, 10].

Proteazlar, katalitik aktiviteyi sağlayan aktif bölgelerine göre şu şekilde gruplara ayrılırlar:

- 1) Serin (Ser) proteazlar
- 2) Sistein (Cys) proteazlar
- 3) Metalloproteazlar
- 4) Aspartil (Asp) proteazlar

Proteazlar katalitik aktivitelerine göre ise aşağıdaki şekilde gruplara ayrılırlar:

- 1) Endoproteazlar
- 2) Ekzoproteazlar

Ekzoproteazlar bir peptit substratının ayırdığı ucuna göre aminopeptidaz ve karboksipeptidaz olarak ikiye ayrılırlar. Endo peptidazlar ise substratın peptit zincirini uçtan uzakta bir yerde ayırmaktadırlar [8, 10].

2.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları

Endüstride kullanılan enzimlerin %75'i hidrolitik enzimlerdir. Dünya' daki enzim satışlarının %60'ını oluşturan proteazlar, çok sayıda endüstriyel proseste geniş bir uygulama alanına sahiptir. Proteazlar, hücresel boyuttan organ ve organizma boyutuna kadar birçok reaksiyonda görev yaparlar. Proteazların endüstriyel uygulamaları ise özellikle besin ve deterjan endüstrilerinde çok eskiye dayanmaktadır [9].

2.3.1. Deterjan endüstrisi

Çamaşır deterjanlarında kullanılabilecek enzimler yüksek etki, düşük spesifite, pH 9-11 arasında bir saat boyunca 95°C'ye ulaşan sıcaklıklarda çalışabilme, en az bir yıl boyunca aktivitesini kayıp olmadan koruyabilme gibi özelliklere sahip olmalıdırlar. Bu özelliklere en uygun enzim mikrobiyel serin proteazlardır [11].

Günümüzde bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanların tüketiciler ve çevre için güvenli olmaları gerekmektedir. Bulaşık makinesi deterjanları metasilika kaynaklı

oldukları için yüksek alkaliniteye ve temizleme yeteneğine sahiptirler. Yıkama çözeltisinin pH'ı 11.5'in altına düştüğü takdirde bu temizleme özelliği ciddi bir şekilde azalmaktadır. Bu yüzden bulaşık deterjanlarına proteaz enzimi katkısı alkaliniteyi yükselterek deterjanın yıkama performansını iyileştirir [4].

2.3.2. Deri endüstrisi

Deri üretiminde hayvanların post ve derilerinin işlenmesinde proteaz enzimlerinin kullanılma sebebi, kıl ve derinin proteinlerden oluşmasıdır. Epidermal bazal membranın yapısında bulunan proteinler ile saç ve kılların yapısındaki keratinler, alkaliler ve sülfürler kullanılarak kolayca yok edilebilir. Bu sebeple kıl ve yünden arındırma proseslerinde geleneksel olarak kalsiyum oksit ve sodyum sülfür kullanılmaktadır. Hayvan derilerinin özellikle taze kısımlarının kalsiyum oksit ve sodyum sülfürle muameleleri elle yapılır. Bu sayede kıl ve yünler hızlı bir şekilde temizlenir. Fakat atık suda biriken organik maddelerin oksitlenmesi işleminin maliyeti yüksektir ve sülfürler atık sudan oksidasyon ve çöktürme ile azaltılmalarına rağmen tamamen uzaklaştırılamayan sülfürler ciddi tehlikeler yaratmaktadır. Enzimlerin bu proseslerde kullanılmaları gerekli kalsiyum oksit miktarını yarıya indirmektedir. Gerekli olan enzim miktarı ise derinin tipine ve kalitesine bağlıdır [12].

2.3.3. Peynir üretimi

Beslenmedeki öneminden dolayı süt proteinleri, üzerinde en çok çalışılan proteinlerden biridir. Proteaz enzimi peynir üretiminde sütün kesilmesi veya pıhtılaşması için kullanılmaktadır [11].

2.3.4. Etin işlenmesi

Et işleme proseslerinde küçük et parçaları bağ dokuya ve kemiklere bağlı olarak kalmaktadır. O'Meara ve Munro tarafından tanımlanan prosese göre, alkalik bakteriyel proteaz kullanılarak pH 8.5'te ve 55°-60° arasındaki sıcaklıklarda küçük et parçalarının %94'ü çözündürülebilmektedir [11].

2.3.5. Fırıncılık

Proteazlar yüksek gluten içeren hamurların yumuşatılmasında, kraker ve bisküvi üretiminde kullanılmaktadır [11].

2.3.6. Bira yapımı

Proteinler düşük kaliteli malt içerisinde yetersiz oranda sindirilirler. Bu da bira mayalarının besinleri olan amino asitlerin yetersiz miktarda olmasına yol açar. Bununla beraber amino asitlere indirgenmemiş proteinler, biranın kalitesini bozar ve stabilite problemleri yaratırlar. Sorenson ve Fullbrook, bira proseslerinde alkalın bakteriyel proteazların kullanımı üzerinde çalışarak iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Proteazların bira yapımında kullanımlarıyla bira kalitesi önemli ölçüde artmıştır [11].

2.3.7. Cilt bakım ürünleri

Papaya (papain, E.C. 3.4.22.2) ve ananas (bromelain, E.C. 3.4.22.4) gibi bitki kaynaklı proteazlar yüz bakımı ürünlerinde hassas cilt soyma etkisi sağlamak için kullanılırlar [4].

2.3.8. Membran temizlenmesi

Subtilisin proteazlar (E.C. 3.4.21.62), membranların üzerinde biriken ve film tabakası oluşturarak membranın çalışmasını engelleyen protein moleküllerini temizleyen alkalın membran temizleme formülasyonlarının performanslarını iyileştirirler [4].

2.3.9. Atık işleme

Alkalın proteazlar, gıda endüstrisindeki çeşitli proseslerden ortaya çıkan atıkların ve evsel atıkların işlenmesinde potansiyel uygulamalara sahiplerdir. Bunun yanında, alkalın proteazlar boynuz, kıl, tırnak ve saç gibi doğada atık olarak bol miktarda bulunan lifli proteinleri de yararlı biyokütle haline dönüştürebilmektedirler [10,12].

2.3.10. Hayvan yemi üretimi

Proteazlar, hayvanların beslenmesini engelleyecek faktörlerin ortadan kaldırılması için diğer enzimlerle birlikte hayvan yemlerine eklenmektedirler. Proteazlar

proteinleri peptit ve amino asit içeriklerine ayırarak hayvanların sindirim sistemleri tarafından bu küçük moleküllerin absorblanabilmesini kolaylaştırırlar [4].

2.3.11. D,L-Amino asitlerin sentez ve çözündürülmelerinde

Amino asitler, insanlar ve evcil hayvanların beslenmelerinde giderek artan bir öneme sahiptir. Sadece canlı organizmalar tarafından üretilen L-amino asitlerin sindirilebilmesi ve amino asitlerin kimyasal sentezlerle elde edilmesiyle rasemik karışımların meydana gelmesi izomerlerin ticari kullanımdan önce ayrılmasını gerekli kılmaktadır. Optik olarak saf, doğal olmayan amino asit üretiminin en iyi yollarından biri çözme işlemidir. Sutar ve arkadaşları, *C. coronatus* kültüründen saflaştırdıkları düşük molekül ağırlıklı proteazı, D,L-fenil alanin ve D,L-fenil glisin'i rasemik karışımların çözülmesinde kullanmışlardır [13].

N-korumalı aminoasit esterlerinin kinetik çözünmeleri alkalın proteaz (Alkalaz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Serin alkalın proteazların ise aromatik ve hidrofobik amino asit esterlerini çözündürdükleri rapor edilmiştir [13].

2.3.12. İlaç endüstrisi

Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteaz enzimleri kullanılmaktadır [12].

2.3.13. Tekstil endüstrisi

Proteazlar, tekstil endüstrisinde yün ve ham ipeğin işlenmesi proseslerinde kullanılmaktadır [12].

2.3.14. Klinik uygulamalar

Proteazlar kan ve dokulardaki uyuşturucu madde tanısında kullanılmaktadır. Uyuşturucu maddelerin ara ürünleri vücuttaki proteinleri bağladıkları için, kan ve doku örneklerine proteaz enzimi uygulandığında proteinlerin yıkılmasını sağlayarak uyuşturucu maddeler açığa çıkmaktadır [12].

2.3.15 Gümüşün geri kazanılması

Alkalın proteazlar, kullanılmış X-Röntgen filmlerinden gümüş eldesi proseslerinde kullanılmaktadır. Kullanılmış X-Röntgen filmleri jelatin tabakalarında ağırlıkça ortalama %1.5-2 gümüş içermektedir. Geleneksel uygulamalarda, filmin yakılarak

gümüşün geri kazanılması çevre kirliliğine yol açmaktadır. Bu sebeple jelatin tabakanın enzimatik hidrolizi tercih edilmekte ve bu yolla gümüşün yanında polyester filmin de geri kazanımı sağlanmaktadır [10].

3. ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU

Katalizör olarak kullanılan enzimler, şu özelliklere sahiptirler: (a) enzimler ortam sıcaklığında, basıncında ve nötral bir pH değeri civarındaki reaksiyonları katalizleyebilirler, (b) enzimler değişmez substrat spesifitesine, stereospesifiteye, regiospesifiteye ve reaksiyon spesifitesine sahiptirler. Enzimlerin bu özellikleri enerji kullanımını azaltan, kaynak kullanımını azaltan ve daha az kirletici etkilere sahip olan proseslerin dizayn edebileceğini gösterir. Çünkü bu prosesler relatif olarak düşük sıcaklık ve basınçta yürütülür, ayrıca az miktarda yan ürün oluşumunu sağlarlar. Bununla birlikte, enzimlerin katalitik aktiviteleri için çok büyük öneme sahip moleküler yapıları, yüksek sıcaklık, çok yüksek ya da çok düşük pH ve organik çözücülerin varlığı gibi zorlu proses koşullarında yıkılmaya eğilim gösterir. Reaksiyonlarda serbest enzimlerin kullanılması, katalizledikleri reaksiyondan sonra ürünü kontamine etmeleri ve tekrar elde edilme proseslerin pahalı oluşu gibi problemlere sebep olur. Ayrıca, enzimler doğal ortamlarından izole edildikten sonra aktivitelerinde düşüş gözlenir. İmmobilizasyon, enzimlerin doğasında mevcut olan bu sorunları ortadan kaldırma metotlarından bir tanesidir [4].

İmmobilize enzimler, katalitik aktivitelerini koruyarak, sınırları belli bir bölgeye fiziksel olarak hapsedilmiş, tekrarlı ve sürekli kullanılabilen enzimler olarak tanımlanabilir. İmmobilize enzimler serbest enzimlerin daha önce bahsedilen sorunlarını ortadan kaldırır [5].

3.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi

1916 yılında Nelsen ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertaz enziminin sukrozun hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu gelişmenin ardından fizyolojik olarak aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu konusunda çok sayıda rapor yayınlanmıştır. Bütün bu çalışmalara rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi enzimleri kovalent bağlanma metoduyla diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine immobilize etmelerine kadar immobilizasyon pratik

olarak kullanılmamıştır. Daha sonra, 1956 yılında katalaz enziminin DEAE-cellulose üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonu, 1963 yılında tripsin, papain, amilaz ve ribonükleazın, tutuklama yöntemiyle poliakrilamit jel içerisine immobilizasyonu, 1964 yılında karbosipectidaz A enziminin gluteraldehitte çapraz bağlanması ve karbonik anhidraz enziminin mikrokapsüllenmesi, 1971 yılında ise amiloglukozidaz içeren lipozomların hazırlanması çalışmaları yapılmıştır [4].

1969 yılında fungal amino açılaz enzimini DEAE Sephadex üzerine iyonik bağlanma metodu ile immobilize eden Chibata ve arkadaşları, immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında başarılı olan ilk kişilerdir. 1973 yılında da Chibata ve arkadaşları mikrobiyel hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Yüksek aktiviteye sahip aspartaz içeren *Escherichia coli* hücrelerinin poliakrilamit jel içine tutuklanmasını sağlayarak, amonyum fumarattan L-aspartat üretmişlerdir [4].

3.2. İmmobilizasyonun Avantajları

İmmobilizasyon prosesinin en önemli avantajı enzimin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilmesidir. Böylece enzim kontamine olmaktan korunur ve enzimi saflaştırma işlemleri azalır [6].

İmmobilize enzimler klasik heterojen katalizörlerin sağladığı avantajların tümüne sahiptir. Bunlar, filtrasyon ve santrifüjleme prosesleri ile tekrar kullanılmak üzere kolayca geri kazanılabilmeleri ve sabit yatak, akışkan yatak ve karıştırmalı tank reaktör gibi sürekli proseslerde kullanılabilmeleridir. İmmobilize enzimlerin diğer avantajları tekrarlı kullanılabilir olmaları, enzimin reaksiyon ortamından çekilmesiyle reaksiyonun hızlı bir şekilde sonlanması (ya da tam tersi) ve reaksiyonlardan sonra aktivitelerindeki kaybın az olmasıdır [7].

3.3. İmmobilizasyon Parametreleri

Diğer fiziksel ve kimyasal proseslerde olduğu gibi, immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, konsantrasyona, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır [7].

Çözünmez gözenekli taşıyıcılar kullanılarak enzim bağlanması yöntemi, laboratuvar çalışmaları ve endüstriyel uygulamalar için standart bir yöntemdir. Enzim dış yüzeyinin ve taşıyıcının fonksiyonel gruplarının özellikleri taşıyıcılara kimyasal bağlanma esnasında çok önemli rol oynar. Adsorpsiyon, yüzeyin hidrofilik ve hidrofobik olma karakteristiğine bağlıdır. Hakim olan iyonik gruplar ve bu grupların amino asitlerle olan etkileşimleri çözeltinin pH'ıyla değişen ve tüm yüzeyin karakteristiğini belirleyen elektriksel yüke ve iyonik grupların yoğunluğuna bağlıdır [7].

Kovalent bağlanma metodunda, protein yüzeyine erişebilir olan çok sayıda fonksiyonel grup kullanılabilir. Bununla beraber, özellikle lizin ve arjininin amino grupları, aspartik ve glutamik asitin karboksil grupları gibi az sayıda amino karboksil grup pratik olarak kullanılabilir [7].

Enzim ile taşıyıcı yüzeyi arasındaki iyonik, hidrofilik veya hidrofobik ve hidrojen bağlarıyla olan güçlü etkileşimler enzimin kararlılığını etkiler. Çok sayıdaki güçlü etkileşimler (ve bunların kooperatif etkileri) taşıyıcı yüzeyinde istenmeyen tersinmez adsorpsiyona neden olabilir, bu da enzim aktivitesinde kayba neden olur. Bu ayrıca proteinin üçüncül yapısında da konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Bu etkiler özellikle katı taşıyıcı yüzeylerindeki çoklu etkileşimlerde gözlenebilir [7].

Bazı durumlarda uygun bir miktarda boşluk yaratıcı ajan olarak bilinen kimyasalların kullanılması taşıyıcıyı immobilizasyona elverişli hale getirerek enzimi korur ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Enzime belli bir miktarda pasif ve ucuz bir proteinin adsorbe edilmesi enzim immobilizasyonundaki koruyucu ön aşamalardan biridir [7].

3.4. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar

İmmobilize enzimlerin özellikleri hem enzimin hem de taşıyıcı maddenin özelliklerine bağlıdır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimler, immobilize edilmiş enzimin pratik uygulamaları için enzimin tespit edilmesi gereken fizikokimyasal ve kinetik özellikleri hakkında kesin yargılara varmak için katkıda bulunur. İmmobilize enzimin operasyonel performansını önemli ölçüde artırabilecek olan taşıyıcı çok akıllıca seçilmelidir [7,15].

Tüm enzimler ve enzim uygulamaları için genel bir taşıyıcı bulunmamasına rağmen, taşıyıcı olarak kullanılacak maddelerde aranılan bir çok özellik olmalıdır. Bunlar:

- Proteinlere karşı yüksek ilgi
- Kimyasal modifikasyonlar ve enzimle direkt olarak reaksiyona girebilmesi için gerekli fonksiyonel grupların varlığı
- Hidrofiliklik
- Yenilenebilirlik
- Mekanik kararlılık ve rijitlik
- Seçilen biyotransformasyon için farklı geometrik şekillerde ve istenilen yüzey alanlarında hazırlanabilme kolaylığı
- Geniş yüzey alanı
- Kimyasal kararlılığının yüksek olması
- Uygun tanecik çapı / boyutu (0.2-1 mm / 30-60 nm)
- İyon değiştirebilme kapasitesinin yüksek olması
- Şişme kabiliyetinin düşük olması
- Mikrobiyel kararlılığının yüksek olması
- İnsan ve çevre sağlığına zarar vermemesi
- Elastikiyetinin yeterli olması
- Maliyetinin düşük olması
- Doğal ortamlara zarar vermeyecek maddelere indirgenebilmesi [7,15].

3.4.1. İmmobilizasyonda genel olarak kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması

Enzim immobilizasyonunda yukarıdaki özelliklerin büyük bir kısmına sahip inorganik, doğal kaynaklardan elde edilen organik ve organik sentetik taşıyıcılar gibi çok çeşitli taşıyıcılar kullanılabilir [7].

İnorganik taşıyıcılar:

- Gözenekli cam, SiO₂
- Gözenekli silika, SiO₂ (Deloxan)

- Alümosilika

Doğal kaynaklı organik taşıyıcılar:

- Polisakkaritler: agaroz (türevleri)
- Çaprazlanmış dekstranlar (Sephrose, Cellulose)
- Proteinler: Jelatin, biyokütle (örneğin bakteriler)

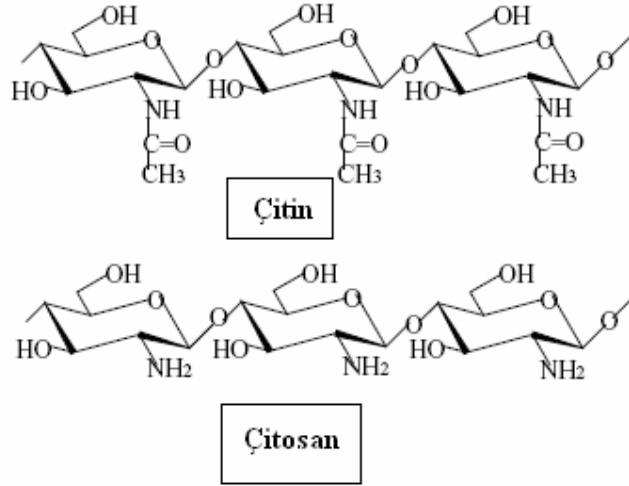
Organik sentetik taşıyıcılar:

- (Metil-) Akrilat-türevleri (Eupergit)
- Akrilamit türevleri
- Vinilasetat türevleri
- Maleik asit anhidrit-türevleri
- Poliamitler (Nylon)
- Polistiren türevleri
- Polipropilen
- Sepatanecikleri (Sepabeads) [7].

3.4.2. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılardan bazıları

3.4.2.1. Çitin ve çitosan

Son yıllarda çitin ve çitosan biyopolimerlerine olan ilgi artmıştır. Çitin ve çitosan immobilizasyonda çok sık kullanılan taşıyıcılardandır. Çitin ve çitosan polisakkaritleri eter tipi bağlarla birbirine bağlanmış monosakkarit moleküllerinden oluşan yüksek molekül ağırlıklı biyopolimerlerdir [14]. Çitin ve çitosanın kimyasal yapıları Şekil 3.1’de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Çitin ve Çitosanın Kimyasal Yapısı [15]

Çitin, β -(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz, lineer bir polisakkarit olup N-asetil-glukozamin yan zincirlerine sahiptir. Çitinin ana türevi olan çitosan, β -(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz, çitin gibi lineer bir polisakkarit olup N-glukozamin yan zincirlerine sahiptir. Çitosan çitin deasetilasyonu sonucunda elde edilir [14].

Çitin hayvan ve bitkilerde bol miktarlarda bulunur. En yoğun hayvansal çitin kaynakları, yengeç ve karides gibi deniz kabukluları, yumuşakçalar sınıfından bazı hayvanlar, kalamarın omurgası ve böceklerin kabuklarıdır. Bitkilerde ise deniz algleri, protozoa ve çok sayıda mantar türlerinin hücre duvarlarında çitine rastlanır [14].

Çitin ve çitosan taşıyıcılarının sahip oldukları özellikler şunlardır:

- Biyouyumluluk,
- Zararsız ürünlere indirgenebilme,
- Fizyolojik inertlik,
- Proteinlere karşı yüksek ilgi,
- İnsan sağlığına ve doğal çevreye zararsız maddelere indirgenebilme [14].

3.4.2.2. Vermikulit

Vermikulit görünüşte mikaya benzeyen katmanlı yapıya sahip filosilikat grubu bir mineraldir [16]. Hindistan'da bol bulunan vermikulit iyon değiştirme ve absorpsiyon kapasitelerinin yüksek olması, geniş yüzey alanı ve düşük maliyeti sebebiyle enzim immobilizasyonunda kullanılan inorganik taşıyıcılardan biridir [17].

3.4.2.3. İyon değiştiriciler

İyon değiştiriciler sentetik polimerlerden meydana gelir. İyon değiştirici taşıyıcıların teknik olarak uygun ve ekonomik oldukları kanıtlanmıştır. Geniş bir yelpazeye sahip iyon değiştiriciler, yüksek kapasiteleri ve endüstriyel ölçekli proseslere uygun olmalarıyla enzim immobilizasyonu için elverişli taşıyıcılardandır. İyon değiştiricilerin geniş gözenekleri, enzimin partikül içerisine difüze olmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca yüksek mekanik dayanıklılığa ve yenilenebilme özelliğine sahiptirler [7].

3.5. İmmobilizasyon Metotları

Enzimlerin immobilizasyondan sonra istenilen aktiviteyi ve karakteristikleri gösterebilmeleri biyokatalizörlerin immobilizasyonlarındaki en önemli konudur [4].

İmmobilizasyon için, enzime uygun bir taşıyıcının ve immobilizasyon yönteminin seçilmesi gereklidir. Farklı katalizörler için dizayn edilen immobilizasyon metotları için sistematik bir yöntem mevcut değildir. Yöntemler kendi ilerinde avantajlara ve dezavantajlara sahip oldukları için taşıyıcı ve yöntem seçimi, tasarlanan amaca, enzimin ve reaksiyonun çeşidine göre yapılır [4].

Taşıyıcı maddeler biyokatalizörlerin immobilizasyonu için gerekli özelliklere sahip fonksiyonel grupları içermeli, bunun yanında yeterli mekanik dayanıklılık; fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılık ve zehirsizlik gibi özelliklere sahip olmalıdır [4].

Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

A. Taşıyıcı içine immobilizasyon

1. Çapraz bağlanma
2. Taşıyıcıya bağlanma
 - a) Fiziksel adsorpsiyon
 - b) İyonik bağlanma
 - c) Kovalent bağlanma
 - d) Kompleks bağlanma

B. Tutuklama

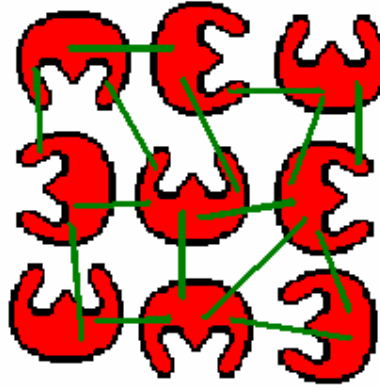
1. Mikrokapsülleme
2. Fiber tutuklama [4].

3.5.1. Taşıyıcı içine immobilizasyon yöntemi

Enzimler, kimyasal olarak reaktif gruplar, iyonik gruplar ya da hidrofobik gruplar içeren amino asit yan zincirlerine sahiptir. Bu amino asit yan zincirleri ve hidrofobik gruplar enzimlerin kovalent bağlanma, iyonik bağlanma, çapraz bağlanma ya da fiziksel adsorpsiyonla bağlanmalarında rol oynarlar. Suda çözünmeyen çok sayıda taşıyıcı uygun modifikasyon ve aktivasyon işlemlerinden sonra immobilizasyonda kullanılır [4].

Taşıyıcı içine immobilizasyon yöntemi kendi içerisinde çapraz bağlanma ve taşıyıcıya bağlanma şeklinde iki alt gruba ayrılır [4].

Enzimlerin immobilizasyonu diğer protein moleküllerine ya da çözünmez bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara olabildiği gibi proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla da sağlanabilir. Bu yönteme çapraz bağlanma yöntemi denir [18]. Çapraz bağlanma yönteminin temsili çizimi Şekil 3.2’de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Temsili Çapraz Bağlanma

Bir enzimin kendisine çaprazlanması hem pahalı hem de yetersizdir. Çünkü kaçınılmaz olarak proteinin bir kısmı taşıyıcı gibi davranmaktadır. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer yöntemlerden biriyle kullanılması daha elverişlidir. Çapraz

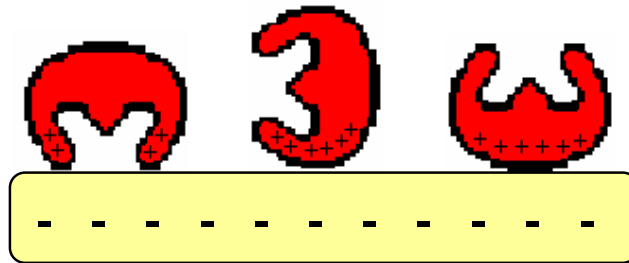
bağlanma yönteminin kovalent bağlanmayla birlikte uygulanması çok sık yapılan çalışmalardan biridir. Enzim taşıyıcı matrise bağ ajanları aracılığıyla çapraz kovalent bağlarla bağlanmış olduğundan, desorpsiyon çok az olur. Çapraz bağlanma için en çok kullanılan bağ ajanı glutaraldehittir. Çapraz bağ ajanı olarak kullanılan diğer kimyasallar toluen diizosiyanat, hekzametilen diizosiyanat, hekzametilen diamin, siyanojen bromür ve karbo diimitlerdir [4,6].

Çapraz bağlanma reaksiyonları zor koşullarda gerçekleşir. Bu zor koşullar enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açabilir. Bu da önemli miktarda aktivite kaybı ile sonuçlanabilir. Fakat çapraz bağlanmada enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlar çok kuvvetli olduğundan pH, sıcaklık ve iyon şiddetindeki değişimler sonucunda enzim taşıyıcıdan sızmaz ve kararlılığını korur [4].

Taşıyıcıya bağlanma yöntemi ise enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması esasına dayanır. Taşıyıcıya bağlanma yöntemi enzimler için en eski immobilizasyon tekniğidir. Bu metotta bir miktar enzim taşıyıcıya bağlanır ve immobilizasyondan sonraki enzim aktivitesi, taşıyıcının özelliklerine bağlıdır. Taşıyıcı seçimi enzimin kendi özelliklerine ve taşıyıcının partikül boyutu, yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı, kimyasal bileşim gibi özelliklerine göre yapılır. Genellikle, hidrofilik grupların oranındaki ve bağlanmış enzimlerin konsantrasyonundaki artış, immobilize enzimlerin aktivitelerinin yükselmesine neden olur [18].

3.5.1.1. Fiziksel adsorpsiyon

Bu immobilizasyon metodu, enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcı yüzeyine bağlanması esasına dayanmaktadır [18]. Fiziksel adsorpsiyon yönteminin temsili çizimi Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Fiziksel Adsorpsiyon ile İmmobilizasyonun Temsili Gösterimi

Enzim, taşıyıcıya hidrojen bağları, hidrofobik etkileşim ve van der Waal's kuvvetleri veya bunların tümünün birleşimi gibi fiziksel etkileşimlerle bağlanır. Bu kuvvetler çok zayıftır fakat kayda değer bir bağlanmanın gerçekleşebilmesi için yeterli sayıdadır [19].

Adsorpsiyonun en büyük avantajı genellikle hemen hemen hiç bağ ajanına ihtiyaç duymaması ve aktivasyon basamaklarının minimum olmasıdır. Bağlanma fiziksel kuvvetlerle olduğu için enzimin konformasyonel yapısında daha az değişikliğe neden olur. Eğer uygun bir taşıyıcı bulunursa, bu metot basit ve ucuz bir şekilde uygulanabilir. Çok sayıda sentetik reçine ve doğal materyaller taşıyıcı olarak kullanılabilir. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcı yenilenerek tekrar kullanılabilir [19].

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir. Enzimin taşıyıcıya zayıf bağlarla bağlanmasından dolayı sıcaklık, pH ve iyonik şiddetteki değişimler ya da ortama substrat ilave edilmesi enzimin taşıyıcıdan sızmasına ve ürünü kontamine etmesine yol açabilir. Fiziksel adsorpsiyonda bağlanma spesifik değildir, immobilizasyon esnasında protein olmayan maddeler ya da diğer proteinler de taşıyıcıya bağlanabilir. Bunun sonucunda immobilize enzimin özellikleri değişebilir ya da adsorplanan madde eğer bir substrat ise immobilizasyon reaksiyonunun hızı düşebilir. Taşıyıcı üzerine aşırı yüklenme ve taşıyıcıdaki sterik engellemeler ise fiziksel adsorpsiyon metodunun diğer dezavantajlarıdır [18,19].

3.5.1.2. İyonik bağlanma

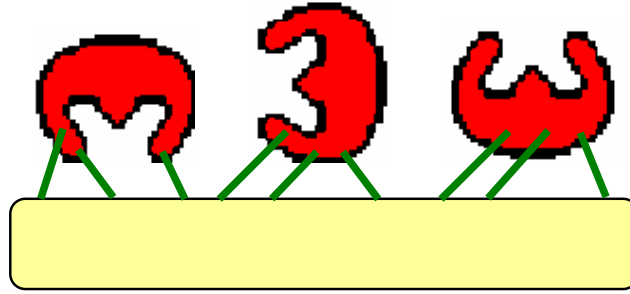
İyonik bağlanma metodu, enzimin iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Genellikle iyon-değiştirici merkezlere sahip olan polisakkaritler ve sentetik polimerler taşıyıcı olarak kullanılır. Enzimin taşıyıcıya bağlanması kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Ayrıca iyonik bağlanma yöntemindeki immobilizasyon koşulları kovalent bağlanmaya göre daha ılımlı olduğu için enzimin konformasyonel yapısında ve aktif bölgelerinde çok az değişiklik gözlenir. Bu yüzden immobilize olmuş enzimin aktivitesi çoğu durumda yüksektir. İyonik bağlanma metodunda kullanılan taşıyıcılar yenilenebilirlerdir [19,20].

İyonik bağlanma ile fiziksel adsorpsiyon arasındaki ana fark iyonik bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağların fiziksel adsorpsiyona göre daha güçlü olmasıdır. Bunun yanında iyonik bağlar kovalent bağlanma yöntemindeki bağlara

kıyasla ise daha zayıftır. Kovalent bağlanmaya kıyasla bağların daha zayıf olması, yüksek iyonik şiddet ya da pH değişimi gibi durumlarda enzimin taşıyıcıdan sızmasına neden olur [20].

3.5.1.3. Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma metodu enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara kovalent bağlarla bağlanması esasına dayanır. Enzimin katalitik aktiviteyi ve substrat bağlanmasını sağlayacak aktif bölgelerinin dışında kalan amino asit yan zincirleri ile taşıyıcının fonksiyonel grupları arasında Şekil 3.4'te gösterildiği gibi kovalent bağlar oluşur [4].



Şekil 3.4. Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonun Temsili Gösterimi

Bu amino asit yan zincirleri lizinin ϵ -amino grubu, glutamik asidin γ -karboksil grubu, sisteinin merkapt grubu, aspartik asidin β -karboksil grubu, tirozinin fenolik hidroksil grubu ya da serin ve treoninin hidroksil gruplarıdır. Hidroksil, karboksil ve amino grupları enzim üzerindeki sayılarının çok olması sebebiyle immobilizasyon için çok iyi hedeflerdir. Bu gruplar taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplarla birleşerek immobilizasyonu sağlarlar [4].

Kovalent bağlanma metodunda çok sayıda taşıyıcı kullanmak mümkündür. Taşıyıcı çeşidinin bu kadar fazla olması kovalent bağlanma yöntemi için tek bir ideal taşıyıcının olmadığı gerçeğini yansıtmaktadır. Taşıyıcı seçilirken immobilize edilecek enzimin özellikleriyle beraber taşıyıcının sağladığı avantajlar ve dezavantajlar da gözönünde bulundurulmalıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, taşıyıcıya immobilize edilmiş enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörün taşıyıcının hidrofiliği olduğunu göstermiştir. Yüksek hidrofilik özelliğe sahip polisakkarit polimerler kovalent bağlanma metodu için ideal taşıyıcılardır. Bu amaçla selüloz, dekstran (Sephadex), nişasta ve agaroz (Sephrose) kullanılabilir. Kovalent

bağlanma metodunda kullanılan diğer popüler taşıyıcılar ise silika ve gözenekli cam malzemelerdir [19].

Kovalent bağlanma metodu genellikle çapraz bağlanmayla birlikte uygulanır. Böylece enzim ile taşıyıcı arasında oluşmuş kovalent bağlar çapraz bağlanma sonucunda daha kararlı hale gelir. Bu amaçla ilk olarak taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplar daha önce bahsedilen bir bağ ajanı kullanılarak aktive edilir. İkinci olarak ise enzimin bu aktive olmuş taşıyıcıyla birleştirilmesiyle immobilizasyon işlemi gerçekleştirilir. Aktivasyon işlemi taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grupların elektrofilik hale gelmesi için yapılır. Daha sonra immobilizasyon reaksiyonunda, bu gruplar enzim yüzeyindeki belli amino asitlerin amino (NH_2)⁺ fonksiyonel gruplarıyla kovalent bağ oluşturur [19].

Kovalent bağlanma yöntemi bir çok avantaja sahiptir [4]:

- Kovalent bağlanmadaki bağlar çok sıkı olduğu için, immobilize edilmiş enzim kullanım sırasında substrat ya da yüksek iyonik karakterli çözücü varlığında dahi taşıyıcıdan sızmaz.
- Enzim, taşıyıcı yüzeyindeki belli bölgelere lokalize olduğundan dolayı enzim ile substratın karşılaşma ihtimali artar.
- Enzim molekülleri ile taşıyıcı arasındaki güçlü etkileşimden dolayı enzimin sıcaklık kararlılığında artış gözlenir.

Kovalent bağlanma yönteminin dezavantajları ise aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Kısmi modifikasyondan dolayı enzim moleküllerinin aktif yapıları bozulmaya eğilim gösterir.
- Enzim molekülleri ile taşıyıcı arasındaki güçlü etkileşim, enzim moleküllerinin serbest hareket etmesini engelleyerek enzim aktivitesinin düşmesine neden olabilir.
- Immobilizasyon için optimum koşulları bulmak zordur.
- Genellikle taşıyıcılar yenilenebilir değildir [4].

Dezavantajlarına rağmen kovalent bağlanma metodu analitik amaçlı yapılan immobilize enzim uygulamalarında çok sık kullanılır [4].

3.5.1.4. Kompleks bağlanma

Protein moleküllerinin metal iyonlarıyla kovalent olmayan bağlarla bağlanması yöntemine kompleks bağlanma denir. DNA moleküllerinin metal kompleksleriyle etkileşimleri son yıllarda çok ilgi çekmektedir. Bağlanma yolları metal komplekslerinin boyutlarına ve stereokimyasal özelliklerine bağlıdır [21].

3.5.2. Tutuklama yöntemi

Tutuklama metodu ile immobilizasyon, enzimin, polimer bir matrise ya da membrana lokasyonuna dayanır [18]. Tutuklama yöntemi adsorpsiyon ve kovalent bağlanmadan farklıdır, çünkü çözelti içerisinde serbest bulunan enzim molekülleri, taşıyıcının mikroyapısı içerisinde hareketsiz olarak yer almaktadır. Taşıyıcı kafesin gözenekliliğinin enzimin dışarıya sızmasını engelleyecek kadar sıkı olması, aynı zamanda substratın ve ürünün ise hareket etmesine olanak verecek şekilde olması istenir [19].

Tutuklama yöntemi bazı avantajlara sahiptir [4]:

- Tutuklama yöntemleri ile birçok enzim, hücresel organeller ve mikroorganizmalar temel olarak aynı prosedürler kullanılarak immobilize edilebilir.
- Enzimler immobilizasyon sonucunda değişikliğe uğramaz.
- Yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkilerini elimine eder [4].

Tutuklama yöntemi ile immobilizasyon bazı dezavantajlara sahiptir [4]:

- Yüksek molekül ağırlıklı substratların tutuklanmış biyokatalizörlerle temasa gelmeleri zor olur.
- Taşıyıcılar yenilenebilir değildir [4].

Tutuklama yöntemiyle immobilizasyon mikrokapsülleme ve fiber tutuklama olarak ikiye ayrılır.

3.5.2.1. Mikrokapsülleme yöntemi

Mikrokapsülleme enzimlerin çeşitli şekillerdeki yarı geçirgen membranlar içerisine konularak kaplanmalarıyla gerçekleştirilir [19]. Mikrokapsülleme yönteminin temsili gösterimi Şekil 3.5'te görülmektedir. Şimdiye kadar çok sayıda materyal kullanılarak

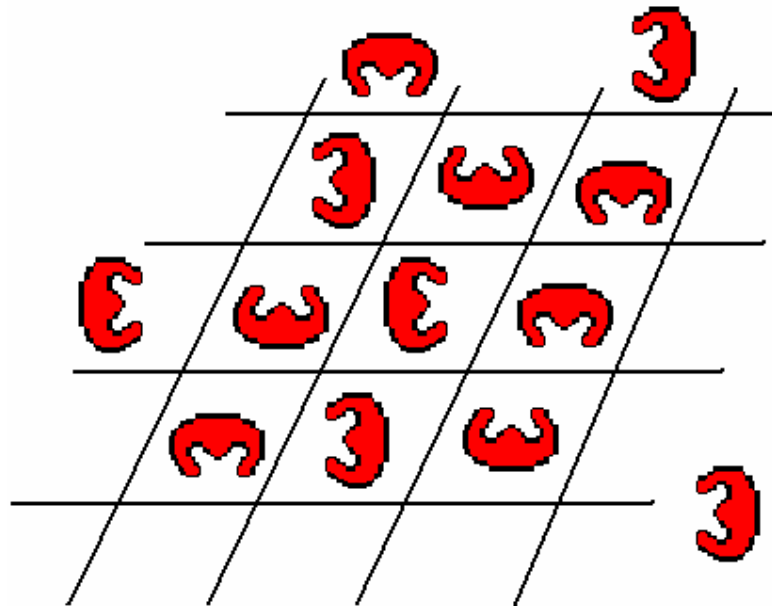
10-100 µm arasında değişen çapa sahip mikrokapsüller üretilmiştir. Bunların arasında en popüler olanları naylon ve selüloz nitrattır. Mikrokapsülleme metoduyla yapılan bir çok çalışmada küçük gözenek boyutu ve gözeneklerin kapalı durumda olması yüzünden enzimin spesifik aktivitesinin serbest enziminkinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir [22].



şekil 3.5. Mikrokapsülleme Yöntemi ile İmmobilizasyonun Temsili Gösterimi

3.5.2.2. Fiber tutuklama yöntemi

Enzimlerin boşluklu fiber membran kullanılarak immobilize edilmesi, boşluklu fiber membranların immobilizasyon için ideal bir geometri gibi farklı özelliklerinden dolayı çok ilgi çekmektedir [23]. Enzim suda çözünmez bir taşıyıcı matrisin yapısı içerisine şekil 3.6'da gösterildiği gibi tutuklanmaktadır.



şekil 3.6. Fiber Tutuklama Yöntemi ile İmmobilizasyonun Temsili Gösterimi

4. PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

Abdel-Naby ve arkadaşları, *Bacillus mycoides* kültüründen elde edilen alkalın proteazı farklı taşıyıcılar üzerine fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma, iyonik bağlanma ve tutuklama yöntemlerini kullanarak immobilize etmişlerdir. Kovalent bağlanma metoduyla yaptıkları immobilizasyon deneylerinde glutaraldehit bağ ajanı varlığında farklı taşıyıcıları denemeleri sonucunda en yüksek immobilizasyon verimlerini çitin ve çitosan kullanarak immobilize ettikleri enzimlerde %79.29 ve %77.41 olarak tespit etmişlerdir. Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon sonucunda en yüksek verim çitosan ile %18.8 olarak, iyonik bağlanma yöntemiyle immobilizasyon sonucunda en yüksek verim Amberlite IR-120 ile %15.02 olarak, tutuklama yöntemiyle immobilizasyon deneyinde ise en yüksek verim toplam monomer içeriğinin %2'si kadar çaprazlama ajanı kullanılmasıyla %76.55 olarak tespit edilmiştir. Serbest enzimin optimum pH'ı 9.0 iken, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı 8.7, Amberlite IR-120 üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı 10.0, çitin üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı 8.71 ve poliakrilamid üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı ise 9.7 olarak bulunmuştur. Serbest enzimin optimum sıcaklığı 50°C iken, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı 55°C, Amberlite IR-120 üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı 55°C, çitin üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı 50°C ve poliakrilamid üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı 55°C olarak tespit edilmiştir. Serbest enzim, 70°C sıcaklıkta 6 saatlik ısı uygulanması sonucunda orijinal aktivitesinin %21'ini korurken, immobilize enzimler aynı işlem sonrasında orijinal aktivitelerinin %39-81.9 aralığında değişen bir kısmını korumuşlardır. Serbest enzim ve immobilize enzimlerin, 5°C sıcaklıkta 5-6 ay süreyle saklanmaları sonucunda sırasıyla orijinal aktivitelerinin %50 ve %88-100 arasında değişen bir kısmını korumuşlardır [24].

Hayashi ve Ikada, proteaz enziminin papain, fisin ve bromelayin türlerini, değişik uzunluklara sahip boşluk yaratıcı ajanlar kullanarak gözenekli çitosan tanecikleri

üzerine immobilize etmişlerdir. Proteaz enzimleri küçük bir ester substrat olan N-benzil-L-arjinin'le yüksek bir aktivite gösterirlerken, yüksek molekül ağırlıklı bir substrat olan kazeinle düşük bir aktivite göstermişlerdir. Proteaz enzimlerinin boşluk yaratıcı ajan kullanılarak farklı konsantrasyonlarda immobilize edilmeleri sonucunda substrat hidrolizinin hemen hemen sabit değer verdiği tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda dahi, immobilize papainin serbest papainden daha kararlı olduğu görülmüştür. Daha kısa bir uzunluğa sahip boşluk yaratıcı ajan kullanılarak çitosan tanecikleri üzerine immobilize edilmiş papainin, papain molekülünün taşıyıcı üzerinde çok noktalı tutunması ve moleküler hareketliliğinin azalması sonucunda, daha uzun bir boşluk yaratıcı ajan kullanılmış durumuna göre, biraz daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. İmmobilize papainin serbest enzimle aynı pH değerine (pH 8.0) sahip olduğu, fakat pH profilinde bir genişleme olduğu ve yine immobilize olan enzimin serbest enzime kıyasla yüksek pH değerlerinde daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. İmmobilize enzimin 10 kez ardarda tekrarlı kullanımı ve 4°C sıcaklıkta 6 ay boyunca saklanması sonucunda da aktivitesinde ciddi bir kayıp gözlenmemiştir [25].

α -kimotripsinin porlu çitosan tanecikleri üzerine immobilize edildiği bir başka çalışmada, immobilize enzimlerin organik çözücüler içerisinde ester ve peptit sentezlerindeki katalizör aktiviteleri incelenmiştir. İmmobilize enzimlerin amino asit esterleşmesinde birçok hidrofilik organik çözücü varlığında, serbest enzimlere göre daha yüksek bir katalitik aktivite gösterdikleri saptanmıştır [26].

Chellapandian, alkalın proteaz enzimini vermikulit minerali üzerine glutaraldehit bağ ajanı kullanarak kovalent bağlanma yoluyla immobilize etmiştir. İmmobilize enzimin spesifik aktivitesinin yüksek molekül ağırlıklı bir substrat olan kazein varlığında %36.25'ini, düşük molekül ağırlıklı hemoglobin varlığında ise %52.25'ini koruduğu tespit edilmiştir. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş alkalın proteazın optimum pH'nın 1 ünite arttığı ve serbest enzime kıyasla pH aralığının (5-11) genişlediği gözlemlenmiştir. İmmobilize alkalın proteazın optimum sıcaklığının (60°C) serbest alkalın proteazinkine aynı olduğu, fakat serbest enzimin yapısındaki zayıf iyonik güçlerin ve hidrojen bağlarının immobilizasyon prosesi sonucunda kararlı hale gelmesiyle serbest enzime kıyasla termal kararlılığının arttığı gözlemlenmiştir. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş alkalın proteazın 60 gün boyunca 4°C ve 25°C sıcaklıklarda saklanması neticesinde ilk aktivitesinin sırasıyla

%84'ünü ve %66'sını, ayrıca 5 kez ardarda tekrarlı kullanımı sonucunda da orijinal aktivitesinin %78'ini koruduğu saptanmıştır [17].

Chae ve arkadaşları, proteaz enzimini farklı taşıyıcılar üzerine glutaraldehit varlığında kovalent bağlanma metoduyla immobilize ederek optimizasyon çalışmasını yürütmüşlerdir. Glutaraldehitte aktive olmuş Lewatit R258-K (benzilamin fonksiyonel grubuna sahip küresel tanecik formunda büyük gözenekli bir polimer) üzerine immobilize edilmiş proteazla en yüksek immobilizasyon verimine ulaşılmıştır. %1'den daha yüksek glutaraldehit konsantrasyonlarının immobilize enzimin aktivitesini artırmadığı sonucuna varılmıştır. Serbest ve immobilize enzim, fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) içine inkübe edilerek 65°C sıcaklıkta 15 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonucunda immobilize enzimin aktivitesinde ciddi bir kayıp gözlenmezken, serbest enzim aktivitesinin %38'den daha büyük bir kısmını kaybetmiştir [27].

Yine Chae ve arkadaşları, proteazın glutaraldehitte aktive ettikleri Lewatit R258-K reçinesi üzerine immobilizasyon verimini artırmak amacıyla koruyucu ajanlar kullanmışlardır. Bir önceki çalışmada enzimin, taşıyıcının bağlanmamış komşu aldehit grupları (-CHO) tarafından inaktive edildiği saptanmıştır. Enzim ile bağlanmamış artık aldehit gruplarının rastgele birleşmeleri inaktivasyona sebep olduğu için, aktive edilmiş taşıyıcının aldehit gruplarıyla enzimin amin gruplarının spesifik olmayan birleşmelerini sınırlamak suretiyle enzimin kararlılığının artacağı düşünülmüştür. Bu amaçla soya peptiti ve polietilen glikol, koruyucu ajanlar olarak immobilizasyon ortamına eklenmiş ve enzim moleküllerinin artık aldehit gruplarıyla karşılaşma olasılıkları düşürülmeye böylece de enzimin kararlılığının artırılmasına çalışılmıştır. Soya peptiti eklenmiş immobilizasyon sonrasında, eklenmemiş duruma göre aktivite geri kazanımı %20, etkinlik oranı ise %38 oranında bir artış göstermiştir. Bu artışın sebebi, soya peptidinin bağlantı bölgeleri aracılığıyla enzimle bağlanarak enzim-substrat kompleksini oluşturmuş ve enzimin boşluk yaratıcı ajanın oluşturduğu artık aldehit gruplarıyla spesifik olmayan bağlanmalarından dolayı oluşan konformasyonel değişiklikleri engellemiş olmasıdır. Polietilen glikol kullanımı ise su moleküllerinin enzim molekülünün hidrofobik öz bölgesinden uzaklaşması sonucunda enzimin daha kompakt ve sabit hale gelmesi sebebiyle yine aktivite geri kazanımında ve etkinlik oranında artışa sebep olmuştur [28].

Oh ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* K-187'den elde edilen proteazın polimerik bir taşıyıcıya kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonu sonucunda %82 verim elde edilmiştir. Immobilizasyon sonucunda enzimin optimum pH'ı değişmemiştir, fakat kararlı pH aralığı genişlemiştir. Serbest enzimin optimum sıcaklığı 60°C iken, immobilize enzimin optimum sıcaklığı 50°C'ye gerilemiş, buna karşılık immobilize enzimin sıcaklık kararlılığında artış gözlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin 4°C sıcaklıkta saklanmaları sonucunda orijinal aktivitelerinin %50'sini kaybetmeleri serbest enzim için 8 gün, immobilize enzim için ise 12 gün sürmüştür. Bu durum immobilize enzimin raf ömrü kararlılığının serbest enziminkinden daha yüksek olduğunu göstermiştir [29].

Tanksale ve arkadaşlarının *Conidiobolus macrosporus*'dan elde ettikleri proteazın glutaraldehit kullanılarak poliamit üzerine immobilizasyonu çalışmaları sonucunda, optimum koşullardaki (pH 8.0, sıcaklık 50°C) immobilizasyon verimi %58 olarak tespit edilmiştir. Immobilize ve serbest enzimin 30°C-70°C sıcaklık aralığında pH 10.0 iken 20 dakika muamele edilmeleri sonucunda, immobilize proteazın optimum sıcaklığı 50°C, serbest proteazın optimum sıcaklığı ise 40°C olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimler 40°C-80°C sıcaklık aralığında pH 7.5'te 1 saat boyunca ısıya maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda immobilize enzim 60°C sıcaklıkta serbest enzime kıyasla 10 kat daha yüksek aktivite göstermiş, ve termokararlılığı da artmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılığı, pH 5-12 aralığında pH'lara sahip 0.05 M tampon çözelti içerisinde 25°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilerek hem serbest enzimin hem de immobilize enzimin kararlı pH aralığı 5-12 olarak tespit edilmiştir. Serbest enzim pH 7.5'te, immobilize enzim pH 8.0'de maksimum kararlılık göstermiştir. Serbest enzimin optimum pH'ı 10 iken, immobilize enzimin optimum pH'ı 8.0-9.0 aralığında bulunmuştur. Immobilize enzimin 22 kez ardarda tekrarlı kullanımı sonucunda aktivitesinde kayıp gözlenmemiştir [30].

Magnin ve arkadaşları, taşıyıcı olarak çitozan (çitosan ve ksantan biyopolimerlerinin arasında meydana gelen iyonik bağlar ve van der Waal's etkileşimleriyle oluşan bir poliyonik hidrojel) kullanarak PRO XIX = *Aspergillus sojae* fungal tip proteaz XIX ve TRY = tripsin II.S porsin pankreas (EC 3.4.21.11) enzimlerinin immobilizasyonunu çalışmışlardır. Immobilize PRO XIX enziminin immobilizasyon verimini %77.2, immobilize TRY enziminin immobilizasyon verimini ise %80.2

olarak saptamışlardır. İmmobilize PRO XIX enziminin 7 gün saklanması sonucunda relatif aktivitesinin serbest enzimin relatif aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmüştür [31].

Ferreira ve arkadaşları, *Subtilisin carlsberg* mikroorganizması kullanılarak üretilen ticari bir proteaz olan Alcalase 2T enzimini kovalent bağlanma yöntemiyle silika taşıyıcılar üzerine immobilize etmişlerdir. Bu çalışmada, ortalama gözenek çapı ile yüzey kimyasının enzimin kazeini hidroliz reaksiyonuna uğratmasıyla tespit edilen aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Termal amino gruplarına (S_{APTES}) ve hidroksil gruplarına ($S_{TESPM-pHEMA}$) sahip kimyasal olarak birbirinden bağımsız, iki farklı taşıyıcı kullanılmıştır. S_{APTES} üzerine immobilize olan enzim yüzdesinin (%31-39), $S_{TESPM-pHEMA}$ üzerine immobilize olan enzim yüzdesinden (%62-71) daha az olmasına rağmen S_{APTES} üzerine immobilize edilmiş enzimin daha yüksek spesifik ve toplam aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Enzimin immobilizasyonunu sağlayacak bağlanma noktalarının sayısının çok olmasından dolayı $S_{TESPM-pHEMA}$ taşıyıcısı üzerine daha fazla miktarda enzimin tutunduğu belirlenmiştir. S_{APTES} taşıyıcısı üzerine immobilize edilmiş enzim aktivitesinin $S_{TESPM-pHEMA}$ taşıyıcısı üzerine immobilize olmuş enziminkinden daha düşük olmasının nedenleri sterik engellemelere (immobilize enzimin içeriğinin yüksek olması ya da pHEMA ağının kompleksliği sonucunda) ve enzimin taşıyıcı üzerine bağlanması sonucunda uğradığı konformasyonel değişikliklere (enzimin taşıyıcı üzerine çok noktada tutunması) bağlanmıştır. Büyük gözenek hacmine sahip silikaların (S_{1000} , 130/1200 Å) üzerine immobilize edilen enzimlerin daha küçük gözenek hacmine sahip silikalar (S_{300} , 130/550 Å) üzerine immobilize edilen enzimlere kıyasla daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. $S_{1000}S_{APTES}$ üzerine immobilize edilmiş proteazın optimum pH'ı 8.0 olarak tespit edilmiş, serbest ve immobilize enzimlerin pH profillerinin benzer olduğu saptanmıştır. Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunurken, immobilize enzimin serbest enzimden termal olarak daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. $S_{1000}S_{APTES}$ üzerine immobilize edilmiş proteaz bir ayın sonunda orijinal aktivitesinin %86'sını korurken, serbest enzim bir ay sonunda orijinal aktivitesinin %32'sini koruyabilmiştir [32].

Nouaimi ve arkadaşları, tripsin enzimini direkt olarak ve polietilen glikol-diamin (PEG-diamin), aldehit dekstran, amino dekstran ve bovin serum albümini (BSA) boşluk yaratıcı ajanlarını kullanarak polyester örtü üzerine immobilize etmeyi

denemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan boşluk yaratıcı ajanlardan biri olan aldehit dekstran iyi sonuçlar vermemiştir. Diğer boşluk yaratıcı ajanlar PEG-diamin, amino-dekstran ve BSA kullanılarak immobilize edilen enzimler, ekstrem sıcaklık, basınç ve düşük polarite gibi koşullar altında benzer aktivite göstermişlerdir. Dekstran ve PEG proteolitik ataklara karşı inert olduklarından dolayı proteaz immobilizasyonu için kısmi olarak daha uygun şeklinde düşünülürken, BSA'nın daha etkili bir boşluk yaratıcı ajan olduğu sonucuna varılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılıklarının incelenmesi sonucunda, serbest enzimin relatif aktivitesinde ciddi bir düşüş gözlenirken, immobilize enzimlerin relatif aktivitelerinde hemen hemen değişiklik gözlenmemiştir. Immobilize enzimler geniş bir pH aralığında (4-11) kararlı davranmışlar ve pH 12'de bile aktivitelerinin %50'sini koruyabilmişlerdir. Buna karşılık serbest enzimin kararlı pH aralığı 4-6 iken, pH 9.0'dan sonra da serbest enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Tripsinin boşluk yaratıcı ajan kullanılmadan polyester örtü üzerine direkt immobilizasyonu sonucunda, immobilize enzim aktivitesinin ve raf ömrü kararlılığının düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, enzimle daha az polar olan örtü yüzeyinin direkt olarak temasa geçirilmesi sebebiyle oluştuğu düşünülmüştür. Boşluk yaratıcı ajanların kullanıldığı durumlarda immobilize enzim aktivitesinin haftalar boyunca, hatta bazen aylar boyunca sabit kaldığı görülmüştür [33].

Afaq ve Igbal, papain enzimini Cu^{2+} iyonlarıyla aktive edilen selat sefaroze üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon sonucunda aktivite geri kazanımını %78, immobilizasyon verimini ise %98 olarak saptamışlardır. Immobilize enzimi taşıyıcıdan desorbe ettikten sonra, taşıyıcıyı yenilemişler ve tekrar metal iyonuyla aktivasyon yapmışlardır. Bunun sonrasında aynı taşıyıcıyla tekrar bir immobilizasyon prosesi daha gerçekleştirmişlerdir. İkinci, üçüncü ve dördüncü işlemlerde aktivite geri kazanımı sırasıyla %75, %72 ve %74 olarak tespit edilirken, immobilizasyon verimleri ise sırasıyla %98, %96 ve %95 olarak bulunmuştur. Çapraz bağlanmayla birlikte yapılan kovalent bağlanma metodlarında genellikle yenilenme yapılamazken, bu çalışma ekonomik açıdan büyük öneme sahip olan taşıyıcı matrisin başarılı bir şekilde yenilenebildiğini göstermiştir. Çözünebilir ve immobilize papainin 65°C sıcaklıkta belli sürelerde ısıya maruz bırakılarak sıcaklık kararlılıkları araştırılmıştır. 1 saat sonunda immobilize papain orijinal aktivitesinin %87'lik bir kısmını muhafaza ederken, serbest enzim ise orijinal aktivitesinin

%75'ini korumuştur. İmmobilize papainin daha yüksek kararlılık göstermesinin sebebinin, enzimin taşıyıcıya sabitlenmesi sonucunda otolizinin azalması olduğu düşünülmüştür. Yüksek kararlılık için bir diğer açıklama ise enzim moleküllerinin taşıyıcıya bağlanmasından dolayı yapısının daha dayanıklı hale gelmesi şeklinde yapılmıştır [34].

Roy ve arkadaşları, *Carica papaya* öz suyundan elde edilen endolitik sistein proteazı süksinik anhidrit kullanarak modifiye etmişlerdir. Bu reaktan enzimin lizin amino gruplarıyla reaksiyona girerek net elektrik yükü pozitiften negatife çevirmiştir. Modifiye edilmiş papain ve işlem görmemiş papain, yüksek pH değerlerinde ve saklama koşulları altındaki kararlılıklarının artırılması için kalsiyum aljinat üzerine immobilize edilmiştir. Kalsiyum aljinat tanecikleri üzerine immobilize edilmiş enzimin 6 kez tekrarlı kullanımı sonucunda hala aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Modifiye ve modifiye olmayan immobilize enzimlerin oda sıcaklığında 6 gün boyunca saklanması sonucunda modifiye immobilize enzim orijinal aktivitesinin %67'sini, modifiye olmayan immobilize enzim ise %79'unu korumuştur [35].

Sangeetha ve Abraham'ın birlikte yürüttüğü bir diğer benzer çalışmada, papainin alkalik ortamlarda kullanılabilir hale gelmesi için kimyasal modifikasyonlar yapılmış daha sonra papain, adsorpsiyon yöntemiyle inert matrisler üzerine ve tutuklama yöntemiyle polisakkarit polimerik jelleri içine immobilize edilmiştir. Modifiye ve modifiye olmayan papain enzimi, adsorpsiyon metoduyla selit ve kaolinit kil üzerine, tutuklama metoduyla ise amber çiçeği yaprağından elde edilen zambak (glukomannan) ve mısır nişastası içine immobilize edilmiştir. Selit üzerine adsorbe olmuş enzim immobilizasyon sonrasında aktivitesinin %61'ini korurken, mısır nişastası içine immobilize edilmiş enzim ise aktivitesinin %98.14'ünü koruyarak en yüksek bağlantı kapasitelerini sağlayan örnekler olarak seçilmişlerdir. Mısır nişastası içine immobilize edilmiş papainin optimum pH ve sıcaklığı incelenmiş, optimum pH'ın alkalik bölgesine doğru kaydığı ve 60°C-70°C gibi yüksek sıcaklık aralığındaki sıcaklık kararlılığının daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır [36].

Tang ve arkadaşları, jelatin iyonlaşma metoduyla hazırladıkları çitosan nanopartikülleri üzerine nötral proteaz enzimini immobilize ettikten sonra immobilize enzimin karakterizasyonunu çalışmışlardır. Serbest enziminkine benzer olarak immobilize enzim en yüksek aktiviteyi pH 7.5'te gösterirken, immobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH aralığı serbest enziminkinden daha yüksek olarak

tespit edilmiştir. İmmobilize ve serbest enzimlerin 40°C ve 50°C sıcaklıklardaki su banyolarında 2 saat bekletilmeleriyle farklı zaman aralıklarında aktiviteleri ölçülmüştür. İmmobilize enzim 40°C’de aktivitesinin %5’inden, 50°C’de ise %10’undan daha az bir kısmını kaybederken, serbest enzim 40°C’de orijinal aktivitesinin %30.1’ini ve 50°C’de %35.7’sini kaybetmiştir. Enzimin konformasyonel esnekliğinin immobilizasyondan etkilendiği, nötral proteazın çitosan nano-partikülleri üzerine immobilize edilmesinin enzimin dayanıklılığında bir artışa sebep olduğu ve enzimin bozunmasını engellediği, böylece immobilize enzimin termal kararlılığının arttığı rapor edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin 0.020 mol/l fosfat tampon çözeltisi (pH 7.5) içerisine inkübe edilerek 30°C-55°C sıcaklık aralığında bekletilmelerinin sonucunda serbest enzimin maksimum aktivitesinin ve maksimum aktivite gösteren sıcaklık aralığının, immobilize enziminkinden daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Serbest ve immobilize enzimler 4°C ve 25°C sıcaklıklarda saklanarak raf ömrü kararlılığı incelenmiştir. 8 gün sonra 25°C’de saklanan immobilize enzim aktivitesinin %80’ini, serbest enzim ise aktivitesinin %25’ini korumuştur. 4°C’de de immobilize enzimin aktivitesinin serbest forma göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Buradan immobilize enzimin raf ömrü kararlılığının yüksek olduğu ve ayrıca immobilize enzimin 9 kez tekrarlı kullanımı sonucunda orijinal aktivitesinin %88’ini koruduğu rapor edilmiştir [37].

Zhao ve arkadaşları, papain enzimini mezoporlu moleküler elek MCM-48 üzerine glutaraldehit kullanarak immobilize etmiş ve immobilize papainin karakterizasyonunu çalışmışlardır. İmmobilizasyon için optimum koşullar: 20 mg serbest enzim/g MCM-48 taşıyıcısı, %0.75 glutaraldehit, pH 7.0’da, 10°C-20°C sıcaklıklar arasında 2 saat olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullar altında, immobilize enzimin aktivite geri kazanımı %70 civarında çıkmıştır. Enzim konsantrasyonunun aktivite geri kazanımına etkisi incelenmiş, papain konsantrasyonunun artmasıyla aktivitenin belli bir değere kadar arttığı, daha sonra düşmeye başladığı saptanmıştır. Bunun sebebi, MCM-48 taşıyıcısı üzerindeki kanalların kapasitesiyle ilgili olduğu, kanallardaki enzim doygunluğa ulaştıktan sonra aktivitenin maksimum olduğu, fakat daha sonra enzim konsantrasyonunun artmaya devam etmesinin kanalları tıkadığı, yani kanallara tutuklanan enzim moleküllerinin aktivitelerini gösteremediği bunun da immobilize enzimin aktivitesinde düşüşe neden olduğu şeklinde açıklanmıştır. Sıcaklığın serbest ve immobilize enzimlerin

aktiviteleri üzerindeki etkisi çalışılmış, immobilize enzim 55°C’ de maksimum aktivitesine ulaşırken, serbest enzim ise 35°C’de maksimum aktivite göstermiştir. Ayrıca 65°C’den sonra serbest enzimin aktivitesi hızla düşerken immobilize enzimin aktivitesi yavaş bir şekilde azalmıştır. Serbest ve immobilize papainin termal kararlılığı 50°C’de optimum immobilizasyon koşulları altında, 0.1 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde inkübe edilmek suretiyle incelenmiş, 120 dakika sonra immobilize enzim orijinal aktivitesinin %90’ını korurken, serbest enzim 40 dakika sonra orijinal aktivitesinin ancak %60’ını koruyabilmiştir. Serbest enzimin optimum pH’ı 6.5, immobilize enzimin optimum pH’ı 7.0 olarak saptanmış ve immobilizasyon prosesisinin enzimin kararlı olduğu pH aralığını genişlettiği gözlenmiştir. Papainin termal ve pH kararlılıklarının iyileşmesi sonucunda operasyonel kararlılığı da iyileşmiştir. 12 gün boyunca devam ettirilen sürekli operasyon sonucunda ortam sıcaklığı 25°C iken immobilize enzim ilk aktivitesinin %76.5’ini korumuştur. Serbest ve immobilize enzimlerin 4°C’de 50 gün tutulmaları sonucunda immobilize enzimin ilk aktivitesinin %90’ından daha büyük bir kısmını koruduğu, serbest enzimin ise sadece %56’sını koruyabildiği rapor edilmiştir [38].

Enzim immobilizasyonunda, Teflon polimeri ilk kez 2000 yılında Afrin ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Araştırmacılar, Teflon partiküller üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin sulu çözeltideki katalitik aktivitesini çalışmışlardır. Bu amaçla α -Kimotripsini politetrafloro etilen (PTFE) partikülleri üzerine tutuklama metoduyla immobilize etmişler, immobilize enzimin sulu çözelti içerisindeki amino asit ester hidrolizinde, serbest enzimden iki misli daha fazla katalitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. PTFE partikülleri üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin sulu çözeltideki peptit sentezini %14 verimle katalizlediği tespit edilmiştir. Tutuklanmış enzimin hem sentetik hem de hidrolitik aktiviteleri serbest enzimle kıyaslandığında artış göstermiştir [39].

Kiatkamjornwong ve arkadaşları, redoks başlatıcısı olarak amonyum persülfat, *N,N,N',N'*-tetraetilmetilendiamin kullanarak süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenen yüksek oranda porlu bir yapıya sahip poliakrilamit ve poli(akrilamit-co-metakrilik asit) hidrojel tanecikleri içine alkalın proteaz enzimini immobilize etmişlerdir. Serbest enzimin enzimatik aktivitesinin immobilize enzimlerin aktivitelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. İmmobilize olan enzim miktarı ne olursa olsun, immobilize enzimlerin daha iyi bir performans ve termal kararlılık

gösterdikleri, bunun yanında poliakrilamitin enzimatik aktivitesinin poli(akrilamit-co-metakrilik asit) hidrojel taneciklerinininkinden daha yüksek olduğu görülmüştür. İmmobilize alkalın proteazların protein sindirimleri ve boyamaları, birkaç yıkama sonrasında enzimatik aktivitenin hiç azalmaması, enzimin polimerik hidrojeller içinde tutunmuş olması gerektiğini göstermiştir ayrıca immobilize enzim, serbest enzimden daha yüksek bir raf ömrü kararlılığı sergilemiştir [40].

Haensler ve arkadaşları, donmuş haldeki peptit sentezinin yüksek potansiyeli ile immobilize proteazların uygulama avantajlarını birleştirmek hedefiyle taşıyıcıya bağlanmış α -kimotripsin (CT, EC 3.4.21.1) enziminin donmuş sulu reaksiyon karışımları içerisinde peptit bağları oluşturma kapasitesini araştıran bir çalışma yürütmüşlerdir. İmmobilize α -kimotripsin enzimi donmuş sulu çözeltiler içerisindeki peptit sentezinde başarıyla kullanılabilmiştir. Hidrofobik taşıyıcılara bağlanan α -kimotripsin, peptit bağlarını oluşturmada serbest enzim kadar yetenekli davranabilmiştir. Ayrıca çoklu tekrar kullanımının mümkün olması ve organik çözücülerin çıkarılması nedenlerinden dolayı donmuş sulu çözeltiler içerisindeki peptit sentezini katalizleyen immobilize α -kimotripsin enzimi, organik reaksiyon karışımlarında daha az su sarfiyatı açısından cazip bir alternatif sunmaktadır [41].

Beshay, tutuklama metodunu kullanarak kalsiyum aljinat tanecikleri içine immobilize ettiği *Teredinobacter turnirae* hücrelerinden alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada farklı türlerdeki kısıtlamaların *Teredinobacter turnirae* hücrelerinin fizyolojisi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için biyokatalizör tanecikleri elde etmek amacıyla değişen konsantrasyonlarda aljinat çözeltileri hazırlanmıştır. Matrisin supramakromoleküler yapısındaki varyasyonlar immobilize *Teredinobacter turnirae* hücrelerinin morfolojisine ve fizyolojik davranışına etki etmiştir. Aljinat konsantrasyonundaki 25g/l'den daha büyük bir artış proteaz aktivitesinin düşmesine yol açmıştır. Bu durum, yüksek aljinat konsantrasyonlarında tanecik dayanıklılığının iyileştirilebildiği, fakat dayanıklı jel yoğunluğuna bağlı olarak difüzyona sınırlamalar getirmesinden dolayı enzim verimlerinin düşmüş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. İmmobilize hücrelerden elde edilen alkalın proteazın aynı fermentasyon süresi içerisinde daha yüksek hacimsel aktivitelerin oluşmasına öncülük etmesi sebebiyle, serbest hücrelerden elde edilen alkalın proteaza göre daha üstün olduğu rapor edilmiştir. İmmobilize mikroorganizmaları kullanarak enzim üretmeye imkan veren bu tekniğin, uzun süreli saklama kararlılığı,

tekrar kullanılabilirlik ve yenilenebilme olasılığı gibi yararları nedeniyle elde edilen deneysel sonuçların büyütme proseslerine adapte edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, her 48 saatte bir taze besin ortamı sağlanarak sürdürülen tekrarlı kesikli bakteriyel büyüme prosesinde, serbest hücrelerden üretilen proteaza göre 3.2 kat daha yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği açıklanmıştır [42].

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1. Malzemeler

5.1.1. Taşıyıcılar

Kovalent bağlanma ile yapılan proteaz immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılan çitin (chitin from crab shells, practical grade), çitosan (chitosan from crab shells, minimum 85% deacetylated) Sigma Chemical Co, ABD'den, vermikulit (vermiculite Typ micron 0-1 mm/Art. VB53) Almanya'dan temin edilmiştir. İyonik bağlanma deneylerinde ise kation olarak kullanılan Dowex-50W-X8(H) standart cins (50-100 mesh), Dowex 1x8 Cl (20-50 mesh) BDH Chemicals Ltd. İngiltere'den, anyon olarak kullanılan Amberlite IR-120, Ecteola23 Cellulose, DEAE-Cellulose, Fluka Chemicals Ltd. ABD'den ve BD-Sephadex , Pharmacia Fine Chemicals, İsveç'ten temin edilmiştir.

5.1.2. Enzim ve diğer malzemeler

Proteaz enzimi (Protease Pellucit FS) Cognis Türkiye'den, Glutaraldehit (GA) BDH Chemicals Ltd. İngiltere'den, Epiklorhidrin ve Hekzametilen diamin (1,6-Diaminohexane) Fluka Chemicals Ltd. ABD'den, Tanik asit (Tannic acid powder pure), sodyum borohidrür ve trikloroasetikasit Merck & Co., Inc. Almanya'dan temin edilmiştir.

5.1.3. Tampon çözeltiler

5.1.3.1. Britton-Robinson (B-R) tampon çözeltileri

Çözelti A: 2.71 ml % 85'lik H_3PO_4 (Riedel-de Häen), 2.36 ml asetik asit (Merck), 2.47 g H_3BO_3 (Labkim) karıştırılır ve distile suyla 1 l'ye tamamlanır.

Çözelti B: 8 g NaOH (Carlo Erba) tartılır, distile su ile çözüldükten sonra 1 l'ye tamamlanır.

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

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

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

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

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

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

B-R Tampon Çözelti; pH 12: 100 ml çözelti A, 95 ml çözelti B ile karıştırılır.

5.1.3.2. Sitrat-fosfat tampon çözeltileri

Çözelti A: 7.11 g sodyum fosfat (J.T. Baker) tartılır ve distile suda çözülerek 200 ml'ye tamamlanır (0.2 M).

Çözelti B: 4.2 g sitrik asit (Carlo Erba) tartılır ve distile suda çözülerek 200 ml'ye tamamlanır (0.1 M).

Sitrat-fosfat tampon çözeltisi; pH 4.0: 38.5 ml A çözeltisine 61.5 ml B çözeltisi eklenerek pH 4'e getirilir.

Sitrat-fosfat tampon çözeltisi; pH 7.0: 82.4 ml A çözeltisine 17.6 ml B çözeltisi eklenerek pH 7'ye getirilir [43].

5.1.3.3. Tris-HCl tampon çözeltileri

Tris-HCl tampon çözeltisi (0.5 M, pH 7.2): 78.8 g Tris-HCl (Merck) tartılır, distile su ile çözüldükten sonra 0.1 N NaOH ile pH'ı 7.2'ye ayarlanır. Distile su ile 1 l'ye tamamlanır.

Tris-HCl tampon çözeltisi (0.1 M, pH 9.0): 15.76 g Tris-HCl (Merck) tartılır, distile su ile çözüldükten sonra 10 N NaOH ile pH'ı 9.0'a ayarlanır. Distile su ile 1 l'ye tamamlanır.

5.1.3.4. Asetat tampon çözeltileri

Asetat tampon çözeltisi (1 N, pH 5.0): 13.6 g sodyum asetat (Merck) tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır (1 N). 2.86 ml asetik asit (Merck) distile su ile 50 ml'ye tamamlanır (1 N). 30 ml sodyum asetat çözeltisi alınır ve asetik asit çözeltisiyle pH 5.0'e ayarlanır.

Asetat tampon çözeltisi (0.1 M, pH 5.0): 0.68 g sodyum asetat tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır (0.1 M). 0.29 ml asetik asit distile su ile 50 ml'ye tamamlanır (0.1 M). 30 ml sodyum asetat çözeltisi alınır ve asetik asit çözeltisiyle pH 5.0'e ayarlanır.

5.1.3.5. Borat tampon çözeltisi

Çözelti A: 1.55 ml borik asit (Labkim) distile su içerisinde çözülür ve distile su ile 250 ml'ye tamamlanır (0.1 M).

Çözelti B: 4 g sodyum hidroksit (Carlo Erba) tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır (1 M).

Borat tampon çözeltisi; pH 8.5: Belirli hacimde A çözeltisinden alınır pH'ı, B çözeltisi kullanılarak 8.5'e ayarlanır.

5.1.4. Enzim aktivitesi tayininde ve taşıyıcı aktivasyonunda kullanılan diğer çözeltiler

Kazein çözeltisi (%0.6, pH 7.2): 0.6 g kazein (Sigma) 10 ml 0.1 N NaOH çözeltisi içinde bir süre karıştırılır daha sonra 40 ml distile su ilave edilerek kazeinin tamamı çözününceye kadar karıştırılır. Kazein tamamen çözüldükten sonra 4 ml Tris-HCl (0.5 M, pH 7.2) tampon çözeltisi eklenir. Karışım 1 N HCl kullanılarak pH 7.2'ye getirildikten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Kazein çözeltisi (%1.5, pH 9.0): 1.5 g kazein (Sigma) 30 ml 0.1 N NaOH çözeltisi içinde bir süre karıştırılır daha sonra 40 ml distile su ilave edilerek kazeinin tamamı çözününceye kadar karıştırılır. Kazein tamamen çözüldükten sonra 4 ml Tris-HCl (0.1 M, pH 9.0) tampon çözeltisi eklenir. Karışım 1 N HCl kullanılarak pH 9.0'a getirildikten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Kazein çözeltisi (%2, pH 9.0): 2 g kazein 30 ml 0.1 N NaOH çözeltisi içinde bir süre karıştırılır daha sonra 40 ml distile su ilave edilerek kazeinin tamamı çözününceye kadar karıştırılır. Kazein tamamen çözüldükten sonra 4 ml borat tampon çözeltisi (pH 8.5) eklenir. Karışım 1 N HCl kullanılarak pH 8.5'e getirildikten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

TCA karışım çözeltisi: 8.99 g trikloroasetik asit (Fluka) ve 14.97 g sodyum asetat (Merck) tartılarak distile suda çözüldükten sonra üzerine 15.7 ml asetik asit eklenerek distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

TCA çözeltisi (%15): 15 g trikloroasetik asit tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

TCA çözeltisi (%30): 30 g trikloroasetik asit tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

NaOH çözeltisi (0.25 N): 1 g sodyum hidroksit (Carlo Erba) tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

NaOH çözeltisi (0.1 N): 0.4 g sodyum hidroksit tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

NaOH çözeltisi (1 N): 4 g sodyum hidroksit tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

NaOH çözeltisi (5 N): 20 g sodyum hidroksit tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

NaOH çözeltisi (10M): 40 g sodyum hidroksit tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

NaCl çözeltisi (1 M): 58.5 g sodyum klorür (Merck) tartılır, distile suda çözüldükten sonra 1 l'ye tamamlanır.

HCl çözeltisi (1 N): 8.29 ml %37' lik HCl (Merck) distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

HCl çözeltisi (6 N): 49.74 ml %37' lik HCl distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum bikarbonat çözeltisi (0.1M): 2.1 g sodyum bikarbonat (Carlo Erba) tartılır, distile suda çözülür. Distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

Hekzametilen diamin çözeltisi (0.6 M): 3.49 g hekzametilen diamin (Fluka) tartılır, distile suda çözüldükten sonra 50 ml'ye tamamlanır.

Hekzametilen diamin çözeltisi (%2): 2 g hekzametilen diamin tartılır, distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

Aseton-su çözeltisi (%20): 100 ml aseton (Carlo Erba) distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Tanin çözeltisi (pH 7.0): 0.39 g tanik asit ve 7.5 mg sodyum borohidrür tartılır ve distile suda çözülür. Çözelti, 5 N NaOH ile pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 15 ml'ye tamamlanır.

Sodyum karbonat çözeltisi (%2): 2 g sodyum karbonat (Merck) tartılır, distile suda çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Alüminyum klorür çözeltisi (1 M): 48.31 g alüminyum klorür (Merck) tartılır, distile suda çözüldükten sonra distile su ile 200 ml'ye tamamlanır.

Metanol-su çözeltisi (%80): 80 ml metanol (Riedel-de Haën) distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5.1.5. Laboratuvar Ekipmanları

UV Spektrofotometre: UV mini 1240 SHIMADZU

Çalkalamalı su banyosu: Yamato Shaking Bath BW 400

Mini santrifüj: HERAPUS CHRISTH

Hassas terazi: AND GR-200

Manyetik karıştırıcı: IKAMAY Janke-Kunkel

pH metre: Inolab

Cam Malzemeler

5.2. Metotlar

5.2.1. Kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyon

5.2.1.1. Proteaz enziminin çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu

0.4 g taşıyıcı (çitin/çitosan) % 2.5 glutaraldehit (GA) içeren 5.0 ml asetat tampon çözeltisinde (0.1 M, pH 5.0) 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca 160 rpm hızla çalkalanır. Bu işlem bittikten sonra taşıyıcı filtrasyonla toplanır. Glutaraldehit fazlasını uzaklaştırmak için taşıyıcı 6 ml distile su ile 3 kez yıkanır. GA ile aktive edilmiş taşıyıcıya 400 U proteaz içeren (0.5 M, pH 7.2 Tris-HCl çözeltisi içerisinde çözülmüş) 1 ml enzim çözeltisi eklenerek 30°C' deki çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca immobilizasyon prosesi yürütülür. Immobilizasyondan sonra bağlanmamış enzimin uzaklaştırılması için taşıyıcı 6 ml distile su ile 3 kez yıkanır. İmmobilize olmuş enzimin ve yıkama çözeltisi içerisindeki bağlanmamış

enzimin aktiviteleri birinci enzim aktivitesi tayin yöntemi uygulanarak tespit edilir [24].

5.2.1.2. Proteaz enziminin vermikulit üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu

0.25 g vermikulit 10 ml asetat tampon çözeltisi (1 N, pH 5.0) içerisinde 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 1 saat boyunca 160 rpm hızla çalkalanır. Fazla miktardaki tampon çözeltinin uzaklaştırılması için taşıyıcı süzülür. Vermikulit organik maddelerden arındırılmak için 10 ml %30'luk hidrojen peroksit çözeltisi içerisine konulur ve 1 saat çalkalanır. Serbest amorf silisin ve alüminyum oksitin uzaklaştırılması için taşıyıcı (vermikulit) 10 ml %2'lik sodyum karbonat çözeltisi içerisinde kaynatılır. Bu işlem bittikten sonra taşıyıcı distile su ile yıkanır. Katyonik vermikulitin elde edilmesi için vermikulit, 15 ml 1 M alüminyum klorür çözeltisiyle 2 saat muamele edilir. Alüminyum klorür fazlasının uzaklaştırılması için taşıyıcı hiç klorür kalmayınca kadar %80 metanol çözeltisi ile yıkanır [44]. Alüminyumla doyunlaştırılmış vermikulit 3.75 ml sitrat-fosfat tampon çözeltisi (pH 4.0) ve 1.25 ml %2'lik hekzametilen diamin (HMD) çözeltisi ile karıştırılarak 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca muamele edildikten sonra hekzametilen diaminin fazlası distile su ile tekrarlı yıkamalarla uzaklaştırılır. Vermikulit-HMD bileşiği %2.5 glutaraldehit içeren 5 ml sitrat-fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ile 30 dakika yüksek hızda çalkalamayla muamele edilir. Daha sonra taşıyıcı GA fazlasını uzaklaştırmak için distile su ile yıkanır. Vermikulit-HMD-GA bileşiğine, 88 U proteaz içeren (pH 8.5 borat tampon çözeltisi içerisinde çözölmüş) 5 ml enzim çözeltisi eklenerek 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca immobilizasyon prosesi yürütölür. Proteaz enziminin fazlası taşıyıcının 1 M sodyum klorür, distile su ve borat tampon çözeltisi ile yıkanmasıyla uzaklaştırılır. İmmobilize olmuş enzimin ve yıkama çözeltisi içerisindeki bağlanmamış enzimin aktiviteleri ikinci enzim aktivitesi tayin yöntemi uygulanarak tespit edilir [17].

5.2.2. İyonik bağlanma yöntemiyle immobilizasyon

İyonik bağlanma yönteminde katyon taşıyıcılar olarak Dowex 50W-X8(H), Amberlite IR-120, anyon taşıyıcılar olarak ise Dowex 1x8 Cl, Ecteola23 Cellulose, DEAE-Cellulose ve BD-Sephadex kullanılmıştır. 0.4 g katyon / anyon taşıyıcı dengeye gelene kadar Tris-HCl tampon çözeltisi içerisinde (0.1 M pH 9.0) 4°C

sıcaklıkta bekletilir. pH 9.0 değerine ulaşmış taşıyıcıya 400 U proteaz içeren 1 ml enzim çözeltisi (pH 9.0 Tris-HCl tampon çözeltisi içerisinde çözölmüş) eklenerek 4°C sıcaklıkta 12 saat boyunca immobilizasyon işlemi yürütölür. Immobilizasyon tamamlandıktan sonra taşıyıcıya bağlanmamış enzim fazlası 6 ml Tris-HCl çözeltisi ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılır. İmmobilize olmuş enzimin ve yıkama çözeltisi içerisindeki bağlanmamış enzimin aktiviteleri üçüncü enzim aktivitesi tayin yöntemi uygulanarak tespit edilir [24].

5.2.3. Fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon

Proteaz enziminin fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunda çitosanın muamele edilmesiyle hazırlanmış tanin-çitosan ve muamele edilmemiş çitin kullanılmıştır.

5.2.3.1. Epiklorhidrin yöntemiyle tanin-çitosan hazırlanması

0.3 g (kuru tartım) çitosan 60 ml distile su içerisinde 25°C'deki çalkalamalı su banyosunda 16 saat boyunca karıştırılır. Su ile şişmiş çitosan filtrasyonla toplanır. Çitosan, 30 ml distile su ile 3 kez yıkandıktan sonra, 30 ml 1 N sodyum hidroksit çözeltisinin içerisinde konulur. Süspansiyona 0.75 ml epiklorhidrin eklendikten sonra karışım 60°C'deki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılır. Epiklorhidrinle aktive olmuş matris filtrasyonla toplanarak hiç epiklorhidrin kalmayınca dek distile su ile yıkanır. Aktive olmuş matrise, 6 N HCl asitle pH 11'e ayarlanmış 9 ml 0.6 M heksametilen diamin çözeltisi eklenerek 60°C'deki çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca karıştırılır. Aminohekzil matrisi, filtrasyonla toplandıktan sonra 60 ml distile su ve 60 ml sodyum bikarbonat çözeltisiyle yıkanır. Aminohekzil matrisine, 15 ml 0.25 N sodyum hidroksit ve 1.5 ml epiklorhidrin çözeltileri eklenerek 60°C'deki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca karıştırılır. Reaksiyondan sonra, epiklorhidrinle aktive olmuş çitosan filtrasyonla toplanarak hiç epiklorhidrin kalmayınca dek distile su ile yıkanır. Toplanan çitosana 15 ml tanin çözeltisi (pH 7.0) eklenerek 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 4 saat boyunca karıştırılır. Reaksiyondan sonra aktive olmuş çitosan filtrasyonla toplanır ve hiç tanin kalmayınca kadar %20 aseton-su yıkama çözeltisi ile yıkanır [45].

5.2.3.2. Proteaz enziminin tanin-çitosan ve çitin üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonu

Bu metotta proteaz enzimi, tanin-çitosan ve muamele görmemiş çitin üzerine aynı şekilde immobilize edilir. 0.3 g taşıyıcıya (tanin-çitosan / çitin) 300 U proteaz içeren (0.1 M, pH 9.0 Tris-HCl çözeltisi içerisinde çözölmüş) 1 ml enzim çözeltisi eklenir, 4°C sıcaklıkta bir gece immobilizasyona bırakılır. Immobilizasyondan sonra taşıyıcı bağlanmamış enzimin uzaklaştırılması için 5 ml Tris-HCl tampon çözeltisi (0.1 M, pH 9.0) ile 3 kez yıkanır. Immobilize olmuş enzimin ve yıkama çözeltisi içerisindeki bağlanmamış enzimin aktiviteleri birinci enzim aktivitesi tayin yöntemi uygulanarak tespit edilir [24].

5.2.4. Enzim aktivitesi tayin yöntemleri

5.2.4.1. Enzim aktivitesi tayin yöntemi 1

İmmobilize olmuş ve bağlanmamış enzimlerin aktiviteleri UV Absorpsiyon yöntemiyle tespit edilir. 1 ml enzim çözeltisi ya da 1 ml enzimin immobilize edilmiş olduğu taşıyıcı miktarındaki immobilize enzim, 5 ml %0.6'lık kazein çözeltisi (pH 7.2) içerisinde konulur 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 10 dakika boyunca karıştırılır. 5 ml trikloroasetik asit karışım çözeltisi eklenerek 20 dakika daha karıştırılmaya devam edilir (böylece reaksiyon sonlandırılmış olur). Reaksiyon karışımı Whatman no.1 filtre kağıdı kullanılarak süzölür. Çözeltideki tirozin miktarı UV spektrofotometrede 275 nm'deki absorbans değeriine bakılarak belirlenir. 1 U (ünite) enzim aktivitesi, 30°C ve pH 7.2 koşullarında dakikada 1 µg tirozini açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanır.

5.2.4.2. Enzim aktivitesi tayin yöntemi 2

0.5 ml enzim çözeltisi ya da 0.5 ml enzimin immobilize edilmiş olduğu taşıyıcı miktarındaki immobilize enzim, 2 ml %2'lik kazein (pH 8.5) ve 2 ml borat tampondan (pH 8.5) oluşan çözelti içerisinde konulur 40°C'deki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca karıştırılır. 4 ml %30'luk trikloroasetik asit çözeltisi eklenerek 30 dakika daha karıştırılmaya devam edilir. Reaksiyon karışımı Whatman no.1 filtre kağıdı kullanılarak süzölür. Çözeltideki tirozin miktarı UV spektrofotometrede 275 nm'deki absorbans değeriine bakılarak belirlenir. 1 U (ünite) enzim aktivitesi, 40°C ve pH 8.5 koşullarında dakikada 1 µg tirozini açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanır [17].

5.2.4.3. Enzim aktivitesi tayin yöntemi 3

1 ml enzim çözeltisi ya da 1 ml enzimin immobilize edilmiş olduğu taşıyıcı miktarındaki immobilize enzim, 2 ml %1.5'luk kazein (pH 9.0) çözeltisi içerisine konulur, 37°C' deki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca karıştırılır. 3 ml %15'lik trikloroasetik asit çözeltisi eklenerek 30 dakika daha karıştırılmaya devam edilir. Reaksiyon karışımı Whatman no.1 filtre kağıdı kullanılarak süzülür. Çözeltideki tirozin miktarı UV spektrofotometrede 275 nm'deki absorbans değerine bakılarak belirlenir. 1 U (ünite) enzim aktivitesi, 37°C ve pH 9.0 koşullarında dakikada 1 µg tirozini açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanır [24].

5.2.5. Protein konsantrasyonu tayin yöntemi

İmmobilizasyondan sonra taşıyıcı, bağlanmamış enzimin uzaklaştırılması için yıkanır. Taşıyıcının yıkama çözeltisi içerisindeki bağlanmamış enzimin konsantrasyonunu belirlemek için UV-spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda okuma yapılır. Bir kalibrasyon eğrisi yardımıyla bağlanmamış enzimin protein konsantrasyonu tespit edilir. Protein konsantrasyonunun tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi Şekil A.2'de gösterilmiştir.

5.2.6. Serbest proteaz enziminin karakterizasyonu

5.2.6.1. pH' ın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

Serbest enzimin optimum pH'ının belirlenebilmesi için enzim ile farklı pH değerlerine (7-12) sahip %0.6'luk kazein çözeltileri birinci enzim aktivitesi tayin yöntemine göre hidroliz reaksiyonuna uğratılır. 200 µl proteaz enzime 800 µl Tris-HCl tampon çözeltisi (0.5 M, pH 7.2) eklenir, daha sonra farklı pH'lardaki kazein çözeltileriyle aktivite tayini yapılır. Tespit edilen relatif aktivitelerin grafiğe geçirilmesiyle serbest enzimin optimum pH'ı belirlenmiş olur.

Serbest enzimin pH kararlılığı relatif aktivitelerin ölçülmesiyle belirlenir. 200 µl enzime farklı pH değerlerinde (7-12) hazırlanmış 600 µl Britton-Robinson (B-R) tampon çözeltileri eklenerek 30°C sıcaklıkta 20 saat bekletilir. Daha sonra 0.5 M pH 7.2 Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak 1 ml'ye tamamlanır. Referans için 200 µl enzime 600 µl Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7.2) eklenerek 4°C sıcaklıkta 20 saat bekletilir ve 0.5 M pH 7.2 Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak 1 ml'ye

tamamlanır. 20 saat sonunda tüm enzimlerin birinci enzim aktivitesi tayin yöntemine aktiviteleri tespit edilir. Enzimlerin absorbands değerleri referans değere göre okunur.

5.2.6.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

Serbest enzimin optimum sıcaklığının belirlenebilmesi için enzimle 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilerek relatif aktiviteleri ölçülür. Bunun için 100 µl enzime 900 µl Tris-HCl tampon çözeltisi (0.5 M, pH 7.2) eklenir, %0.6'lık kazein çözeltisi (pH 7.2) kullanılarak farklı sıcaklıklarda hidroliz reaksiyonu uygulanır. Tespit edilen relatif aktivitelerin grafiğe geçirilmesiyle serbest enzimin optimum sıcaklığı belirlenmiş edilmiş olur.

Serbest enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenebilmesi için 100 µl proteaz enzimine 900 µl Tris-HCl tampon çözeltisi (0.5 M, pH 7.2) eklenir. Enzim çözeltisi 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda 30 dakika bekletilir daha sonra birinci enzim aktivitesi tayin yöntemine göre aktivite tespit edilir.

5.2.7. İmmobilize proteaz enziminin karakterizasyonu

5.2.7.1. pH' ın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

Çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH' ının belirlenebilmesi için enzim ile farklı pH değerlerine (7-12) sahip %0.6'lık kazein çözeltileri birinci enzim aktivitesi tayin yöntemine göre hidroliz reaksiyonuna uğratılır. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH' ının belirlenebilmesi için ise enzim ile farklı pH değerlerine (7-12) sahip %2'lik kazein çözeltileri ikinci enzim aktivitesi tayin yöntemine göre hidroliz reaksiyonuna uğratılır. Tespit edilen relatif aktivitelerin grafiğe geçirilmesiyle immobilize enzimin optimum pH' ı belirlenmiş olur.

İmmobilize enzimin pH kararlılığı relatif aktivitelerin ölçülmesiyle belirlenir. İmmobilize olmuş enzimin tamamına farklı pH değerlerinde (7-12) hazırlanmış 3 ml Britton-Robinson (B-R) tampon çözeltileri eklenerek 30°C sıcaklıkta 20 saat bekletilir. Referans için immobilize enzime, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmişse 3 ml Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7.2), vermikulit üzerine immobilize edilmişse 3 ml borat tampon çözeltisi (pH 8.5) eklenerek 4°C sıcaklıkta 20 saat bekletilir. 20 saat sonunda çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin aktiviteleri birinci enzim aktivitesi tayin yöntemine göre, vermikulit üzerine

immobilize edilmiş enzimin aktivitesi ise ikinci enzim aktivitesi tayin yöntemine göre tespit edilir. Enzimlerin absorbans değerleri referans değere göre okunur.

5.2.7.2. Sıcaklığın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

İmmobilize enzimin optimum sıcaklığının tespit edilebilmesi için immobilize enzimle 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerde birinci enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimde ise ikinci enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilir. Elde edilen relatif aktiviteler grafiğe geçirilerek immobilize enzimin optimum sıcaklığı belirlenir.

İmmobilize enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenebilmesi için immobilize enzim, 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda 30 dakika bekletilir. Daha sonra buza konularak aniden soğutulur. Aktiviteler ölçüldükten sonra relatif aktiviteler hesaplanır. Relatif aktivitelerin grafiğe geçirilmesiyle immobilize enzimin kararlı olduğu sıcaklık aralığı tespit edilir.

5.2.7.3. İmmobilize enzimin raf ömrü kararlılığı

İmmobilize enzimin raf ömrü kararlılığının belirlenebilmesi için, belirli sayıda taşıyıcıya immobilize edilmiş enzimler 4°C sıcaklıkta uygun koşullarda 8 hafta saklanır. Her hafta bu enzimlerden biri kullanılarak aktivite ölçümü yapılır. 8 hafta sonunda relatif aktiviteler hesaplanarak enzimin ne kadar aktivite kaybettiği tespit edilir.

5.2.7.4. İmmobilize enzimin operasyonel kararlılığı

Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması uzun süren ve çok çaba gerektiren prosesler olduğu için enzim immobilizasyonundaki en önemli amaçlardan biri taşıyıcıya immobilize edilmiş olan enzimin bir proseste kullanıldıktan sonra geri kazanımı ve tekrar kullanılabilmesidir.

İmmobilize olmuş enzimin, immobilizasyon işleminden hemen sonra aktivitesi ölçülür. Daha sonra immobilize enzim, immobilizasyon prosesi esnasında kullanılan uygun tampon çözelti ile yıkanır ve tekrar aktivite ölçümü yapılır. Bu işlemler ardarda tekrarlanarak enzimin kaçınıcı operasyonda ne kadar aktivite kaybettiği tespit edilir.

5.2.7.5. İmmobilize enzimin deterjan uyumluluğu

İmmobilize enzimlerin deterjan uyumluluklarının belirlenmesinde piyasada mevcut çamaşır deterjanları kullanarak %0.7'lik deterjan çözeltisi hazırlanır. İmmobilize enzimlere 5 ml deterjan çözeltisi eklenir. Deterjan özeltisi içerisindeki immobilize enzimler 60°C sıcaklıkta 0, 1, 2 ve 3'er saat çalkalanır. Bu sürelerin sonunda immobilize enzimlerin aktivitesi tespit edilir. Deterjan uyumluluğunda referans olarak kullanılacak immobilize enzimlere deterjan çözeltisi eklenmeden aynı işlemler uygulanır [53].

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1. Proteaz Enziminin Farklı Metotlar Kullanılarak İmmobilize Edilmesiyle Elde Edilen Verimler

6.1.1 Kovalent bağlanma metodu ile immobilize edilmiş proteazın immobilizasyon verimleri

Kovalent bağlanma metodu, enzimin yüzeyindeki katalitik aktiviteyi ve substrat bağlanmasını sağlayacak aktif bölgelerinin dışında kalan amino asit yan grupları ile taşıyıcının fonksiyonel grupları arasında kovalent bağların oluşması şeklinde tanımlanabilir [4]. Taşıyıcıların glutaraldehit bağ ajanı ile aktive edilmesi enzim immobilizasyonunda kullanılan en popüler tekniklerden biridir. Gayet basit ve etkili olan bu metot, enzimin taşıyıcıya çok noktada bağlanmasına ve taşıyıcıyla enzim arasında çapraz bağlar oluşturarak enziminin kararlılığının artmasına yardımcı olur [46].

Proteaz enziminin kovalent bağlanma metodu ile farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu sonucunda elde edilen immobilizasyon verimleri Tablo 6.1’de görülmektedir.

Tablo 6.1: Proteaz enzimin çitin, çitosan ve vermikulit üzerine immobilizasyon verimleri

Taşıyıcı	Eklenen enzim (A) (U/g taşıyıcı)	Bağlanmamış enzim (B) (U/g taşıyıcı)	İmmobilize enzim (C) (U/g taşıyıcı)	İmmobilizasyon verimi $= C / (A-B)\%$
Çitin	1000	681.6	268.4	84.3
Çitosan	1000	697.4	245.6	81.2
Vermikulit	350	176.7	94.9	54.8

Deneyisel analizler glutaraldehitte muamele edilen çitin ve çitosan üzerine bağlanmış proteaz enziminin immobilizasyon verimlerinin iyi olduğunu göstermektedir. Tablo 6.1’de gösterildiği gibi çitin kullanılarak yapılan proteaz immobilizasyonu %84.3 verimle sonuçlanırken, çitosan ile yapılan proteaz immobilizasyonu sonucunda ise %81.2 verim elde edilmiştir. Elde edilen immobilizasyon verimleri literatürdeki benzer çalışmalarda tespit edilen verimlerden daha yüksektir. *Bacillus mycoides* mikroorganizmasından üretilen alkalın proteaz enziminin çitin ve çitosan üzerine glutaraldehit bağ ajanı kullanılarak immobilize edildiği bir çalışmada çitin üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi %79.3 ve çitosan üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi ise %77.4 olarak tespit edilmiştir [24].

Deneyisel bir çalışmada, glutaraldehit bağ ajanı ile muamele edilerek aktivasyonları sağlanan taşıyıcıların daha kararlı bir enzim aktivitesi sergiledikleri rapor edilmiştir [27].

Çitin ve çitosan üzerine glutaraldehit bağ ajanı kullanılarak keratinaz enzimin immobilize edildiği deneyisel çalışmada immobilizasyon verimleri sırasıyla %59.16 ve %59.54 olarak bulunmuştur [47].

Çitozan (çitosan ve ksantan biyopolimerlerinin arasında meydana gelen iyonik bağlar ve van der Waal’s etkileşimleriyle oluşan bir poliiyonik hidrojel) üzerine immobilize edilmiş PRO XIX = *Aspergillus sojae* fungal tip proteaz XIX ve TRY = tripsin II.S porsin pankreas (EC 3.4.21.11) enzimlerinin immobilizasyonu sonucunda immobilizasyon verimleri sırasıyla %77.2 ve %80.2 olarak tespit edilmiştir [31].

Görünüşte mikaya benzeyen, yüksek iyon ve adsorpsiyon kapasitelerine ve geniş yüzey alanına sahip filosilikat (katmanlı mineral yapısı) grubu bir mineral olan vermikulit üzerine glutaraldehit bağ ajanı aracılığıyla immobilize edilen proteaz enziminin immobilizasyon verimi Tablo 6.1’den de görüldüğü gibi %54.8 olarak tespit edilmiştir. Vermikulit kullanılarak elde edilen immobilizasyon verimi literatürde yer alan benzer bir çalışmadakinden daha yüksektir. Glutaraldehit kullanılarak aktive edilmiş vermikulit üzerine bağlanan alkalın proteaz enziminin immobilizasyon verimi yüksek molekül ağırlıklı bir substrat olan kazein varlığında aktivite ölçümü neticesinde %36.3 olarak tespit edilmiştir [17].

Vermikulitle yapılan immobilizasyon deneyinde çitin ve çitosanla yapılan immobilizasyon deneylerine göre daha düşük verim elde edilmesinin nedeni birçok parametreye bağlı olabilir. Taşıyıcı matrise bağlanan enzimin korunan aktivitesi enzimin özgülüğüne, substratın çeşidine ve immobilizasyon metoduna bağlıdır. Vermikulit üzerine immobilize edilen alkalın proteazın düşük molekül ağırlıklı bir substrat olan hemoglobin ile aktivite ölçümü sonrasında immobilizasyon verimi %52.25 olarak tespit edilmiştir [17].

Bu çalışmada enzim aktiviteleri sadece kazein substratı kullanılarak ölçüldüğü için vermikulitle yapılan immobilizasyon sonucunda çitin ve çitosanla yapılan immobilizasyon verimlerine göre daha düşük verim elde edilmiş olabilir.

6.1.2. İyonik bağlanma metodu ile immobilize edilmiş proteazın immobilizasyon verimleri

İyonik bağlanma metodu enzimin iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Genellikle iyon-değiştirici merkezlere sahip olan polisakkaritler ve sentetik polimerler taşıyıcı olarak kullanılır.

İyonik bağlanma metodu, diğer metotlara göre daha düşük bağlanma kapasitesine sahip olmasına rağmen, kolay uygulanabilirlik, taşıyıcıların yenilenebilirliği ve enzimin aktif bölgelerini değişikliğe uğratmama gibi faydalarından dolayı immobilizasyon çalışmalarında uygulanan bir yöntemdir [4].

Bu çalışmada proteazın iyonik bağlanma metoduyla immobilizasyonu deneylerinde, katyon taşıyıcılar olarak Dowex 50W-X8(H), Amberlite IR-120, anyon taşıyıcılar olarak ise Dowex 1x8 Cl, Ecteola23 Cellulose, DEAE-Cellulose ve BD-Sephadex gibi farklı iyon değiştiriciler kullanılmıştır. Proteazın iyonik bağlanması sonucunda elde edilen immobilizasyon verimleri Tablo 6.2.'de görülmektedir.

Deneyisel analizler Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 9.0) ile dengeye gelmesi sağlanan iyon değiştiriciler üzerine bağlanmış proteaz enziminin immobilizasyon verimlerinin çok iyi olmadığını göstermektedir. İyonik bağlanma deneylerindeki en yüksek verim Ecteola23 Cellulose anyon taşıyıcısıyla %26.5 olarak tespit edilmiştir. Tablo 6.2'den görüldüğü gibi Dowex 50W-X8(H) ile yapılan immobilizasyon sonucunda %13.7, Amberlite IR-120 ile yapılan immobilizasyon sonucunda %10.4, Dowex 1x8 Cl ile yapılan immobilizasyon sonucunda %13.8, DEAE-Cellulose ile yapılan immobilizasyon sonucunda %11.9 ve BD-Sephadex ile yapılan immobilizasyon

sonucunda ise %10.7 verim tespit edilmiştir. Elde edilen verimler çok yüksek olmamasına rağmen literatürde yer alan benzer çalışmadakilere göre daha yüksektir. *Bacillus mycoides* mikroorganizmasından üretilen alkalın proteaz enziminin iyon değiştiriciler üzerine immobilize edildiği bir çalışmada DEAE-Sephadex A 25 üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi %7.34, Dowex-50W üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi %8.86, Amberlite IR-120 üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi %15.02, Dowex 1x4 (Cl) üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi %5.42, DEAE-Cellulose üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi %6.23 ve Ecteola-Cellulose üzerine immobilize edilen alkalın proteazın immobilizasyon verimi ise %5.2 olarak tespit edilmiştir [24].

Tablo 6.2: Proteaz enzimin farklı iyon-değiştiriciler üzerine immobilizasyon verimleri

Taşıyıcı	Eklenen enzim (A) (U/g taşıyıcı)	Bağlanmamış enzim (B) (U/g taşıyıcı)	İmmobilize enzim (C) (U/g taşıyıcı)	İmmobilizasyon verimi $= C / (A-B)\%$
Dowex 50W-X8(H)	1000	710.9	39.5	13.7
Amberlite IR-120	1000	674.7	34.0	10.4
Dowex 1x8 Cl	1000	724.0	38.1	13.8
Ecteola23 Cellulose	1000	771.9	60.5	26.5
DEAE-Cellulose	1000	665.1	39.8	11.9
BD-Sephadex	1000	656.8	36.9	10.7

Görüldüğü gibi iki çalışmadaki hemen hemen aynı taşıyıcılarla yapılan deneylerde en yüksek verimler farklı taşıyıcılarda elde edilmiştir. Enzimlerin taşıyıcılara bağlanmaları, kullanılan tampon çözeltiler, ortamın pH'ı, iyonik kuvvetler ve sıcaklık gibi birçok parametreden etkilendiği için sonuçlar farklı çalışmalarda farklı şekilde elde edilmiştir.

6.1.3. Fiziksel adsorpsiyon metodu ile immobilize edilmiş proteazın immobilizasyon verimleri

Fiziksel adsorpsiyon metodu bir enzimin, suda çözünmeyen bir taşıyıcı yüzeyine bağlanması esasına dayanmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon metodunda enzim taşıyıcıya hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve van der Waal's kuvvetleri ya da bunların birlikte etkileşimi ile bağlanmaktadır [4].

Fiziksel adsorpsiyon yönteminde, epiklorhidrin metoduyla aktive edilmiş tanin-çitosan ve muamele görmemiş çitin kullanılmıştır. Tablo 6.3'te görüldüğü gibi muamele görmemiş çitin kullanılarak yapılan proteaz immobilizasyonu sonucunda verim %44.2, tanin-çitosan kullanılarak yapılan proteaz immobilizasyonu sonucunda elde edilen verim ise %77.8'dir.

Tablo 6.3: Proteaz enzimin çitin ve tanin-çitosan üzerine immobilizasyon verimleri

Taşıyıcı	Eklenen enzim (A) (U/g taşıyıcı)	Bağlanmamış enzim (B) (U/g taşıyıcı)	İmmobilize enzim (C) (U/g taşıyıcı)	İmmobilizasyon verimi = $C / (A-B) \%$
Çitin	1000	636.1	160.8	44.2
Tanin-çitosan	1000	765.4	182.4	77.8

Çitosanla yapılan fiziksel adsorpsiyon deneyinde immobilizasyon prosesinden önce çitosan biyopolimerinin adsorpsiyon kapasitesinin artırılması amacıyla deneysel bölümde ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi bir aktivasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla proteinler için spesifik bir adsorban olan, metal iyonu hariç başka organik ve inorganik bileşikler adsorbe etmeyen, tanin kullanılmıştır [48].

Suda çözünmeyen bir biyopolimer olan çitosan önce epiklorhidrin ve heksametilen diaminle muamele edilerek üzerinde taninin tutunmasını sağlayacak bölgeler oluşturulmuştur. Hekzametilen diamin boşluk yaratıcı ajan olarak kullanılmıştır. Çitosanın üzerinde boşluklar oluşturulduktan sonra epiklorhidrin bağ ajanı ile muamele edilerek üzerinde tanin ile çapraz bağlanmaya olanak verecek bölgeler meydana getirilmiştir. Epiklorhidrinle yapılan işlemde sonra aktive olmuş aminoheksil matrisi tanin çözeltisiyle muamele edilmiş ve taninin aminoheksil

matrisi üzerine adsorbe olması sağlanmıştır. Ayrıca bu işlemlerden önce çitosanın ilk olarak sodyum hidroksit alkali çözeltisi ile muamele edilmesi, çitosan ile tanin arasındaki kovalent bağlanmaya olanak sağlayacak kimyasal grupların artmasına yol açmaktadır.

Bu yüzden, iyi bir protein adsorbantı olan tanin kullanılmasıyla hazırlanmış tanin-çitosan üzerine yapılan proteaz immobilizasyonu, çitinle yapılan immobilizasyondan daha iyi sonuç vermiştir. Literatürde yer alan benzer bir çalışmadaki immobilizasyon verimlerinden daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus mycoides* mikroorganizmasından elde edilen alkalın proteazın fiziksel adsorpsiyon metoduyla çitin ve tanin-çitosan üzerine immobilizasyonları sonucunda elde edilen verimler %3.93 ve %3.11'dir [24].

6.2. İmmobilize Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

Kovalent bağlanma metodunda enzim ile taşıyıcının bağlanması çaprazlanmış kovalent bağlarla sağlandığı için enzimin kararlılığı daha yüksektir. Bu sebeple kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş proteaz enziminin karakterizasyonu için, enzimin optimum pH, pH kararlılığı, optimum sıcaklık, sıcaklık kararlılığı, raf ömrü kararlılığı, tekrar kullanılabilme kararlılığı ve deterjan uyumluluğu incelenmiştir. Bu çalışmalarda immobilize enzimlerin optimum pH ve sıcaklıklarıyla, sıcaklık ve pH kararlılıkları serbest enziminkiyle kıyaslanacaktır.

6.2.1. pH' ın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

6.2.1.1. Optimum pH

Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'ları, 7-12 pH aralığında farklı pH'lara sahip kazein çözeltileri kullanılarak tespit edilmiştir.

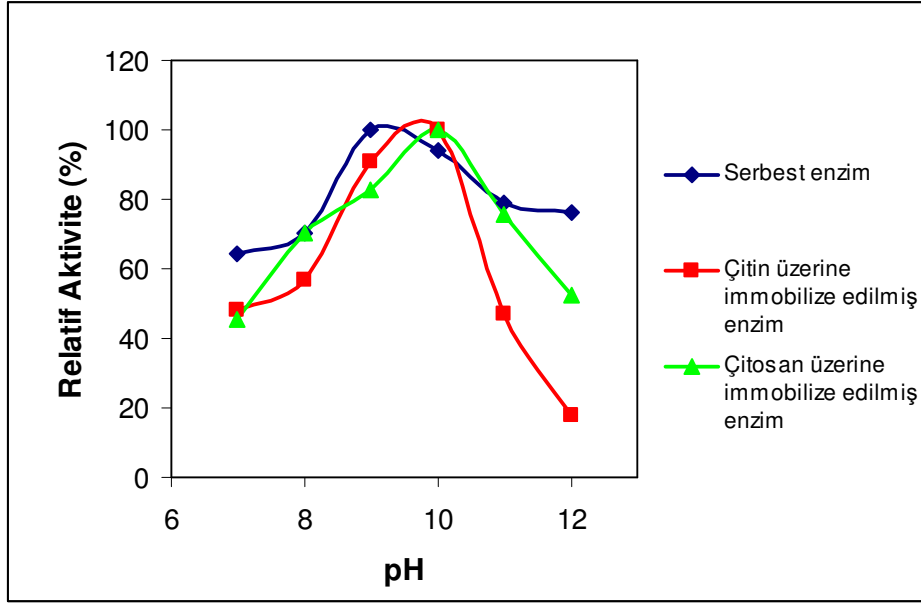
Serbest enzim ile çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin relatif aktiviteleri Tablo 6.4'te verilmiştir.

Tablo 6.4: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH'ları

pH	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim	Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
7.0	64.1	48.0	45.6
8.0	70.3	57.0	70.4
9.0	100.0	91.1	82.7
10.0	93.9	100.0	100.0
11.0	78.7	46.8	75.7
12.0	76.4	17.9	52.2

Şekil 6.1'den daha net bir şekilde görülebildiği gibi serbest enzimin optimum pH'ı 9.0 olarak, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin optimum pH'ı ise 10.0 olarak bulunmuştur.

Proteazın kovalent bağlanmayla immobilizasyonu sonucunda enzimin optimum pH'ı her iki taşıyıcıda da artış göstermiştir. Bunun sonucunda enzimin kararlı olarak çalışabileceği pH bölgesi genişlemiştir. İmmobilize enzimlerin optimum pH'larındaki bu değişim, sağlayabileceği teknolojik faydalar açısından çok büyük önem taşımaktadır. İmmobilize edilmiş enzimin bu özelliği, bir proste reaktanların ve ürünlerin kararlılıklarına ve çözünübilirliklerine daha uygun ve serbest enzimin optimum pH'ından farklı bir pH değerinde prosesin yürütülmesine ve enzimin benzer pH bölgelerine sahip olmayan enzimler ile birlikte çalışmasına olanak sağlayabilir [6].



Şekil 6.1: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH'ları

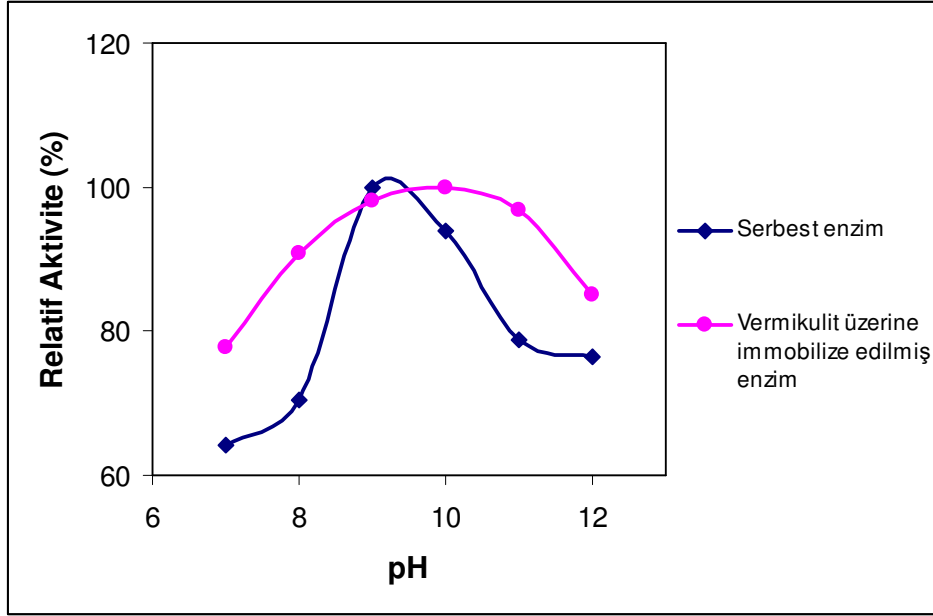
Vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin optimum pH'ı, 7-12 pH aralığında farklı pH değerlerine sahip kazein çözeltileri ile hidroliz reaksiyonları sonucunda yapılan aktivite ölçümü ile tespit edilmiştir.

Serbest enzim ve vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimlerin relatif aktiviteleri Tablo 6.5'te gösterilmektedir.

Tablo 6.5: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı

pH	Relatif Aktivite (%)	
	Serbest Enzim	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
7.0	64.1	77.8
8.0	70.3	90.7
9.0	100.0	98.2
10.0	93.9	100.0
11.0	78.7	96.9
12.0	76.4	85.0

Şekil 6.2’den daha net bir şekilde görülebildiği gibi serbest enzimin optimum pH’ı 9.0 olarak, vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin optimum pH’ı ise 10.0 olarak bulunmuştur.



Şekil 6.2: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin optimum pH’ı

Proteazın her üç taşıyıcıya kovalent bağlanmayla immobilizasyonu sonucunda enzimin optimum pH’ı artmıştır.

Enzimin optimum pH’ındaki bu artışın nedeni immobilize olmuş proteazın mikroçevresindeki hidrojen iyonu konsantrasyonunun değişimi olabilir. İmmobilize enzim-taşıyıcı arayüzeyindeki hidrojen iyonu konsantrasyonu, immobilize enzimin mikroçevresindeki hidrojen iyonu konsantrasyonuna kıyasla daha yüksek olabilir. Bu durumda her iki ortamdaki hidrojen iyonu konsantrasyonlarının dengeye gelmesi için hidrojen iyonları immobilize enzim-taşıyıcı arayüzeyinden enzimin mikroçevresine doğru hareket ederler. Bu da immobilize enzimin optimum pH’ının artmasına neden olur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara karşın, literatürdeki çalışmalarda genellikle immobilize enzimin optimum pH’ında bir artış olmadığı açıklanmıştır. Papain enziminin gözenekli çitosan tanecikleri üzerine immobilize edildiği bir deneysel çalışmada, papainin serbest enzimle aynı pH değerine (pH 8.0) sahip olduğu tespit edilmiştir [25]. *Bacillus mycoides*’den elde edilen alkalın proteazın çitin ve çitosan

üzerine immobilize edilmesi sonucunda optimum pH'lar serbest enzimin optimum pH'ından (9.0) daha asidik bir bölgede, sırasıyla 8.71 ve 8.7 olarak belirlenmiştir [24]. *Pseudomonas aeruginosa* K-187'den elde edilen proteazın polimerik bir taşıyıcıya kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonu sonucunda ise immobilize enzimin optimum pH'ında bir değişiklik gözlenmemiştir [29]. Fakat alkalın proteazın vermikulit üzerine immobilize edildiği deneysel çalışmada serbest enzimin optimum pH'ı 8.5-9.0 aralığında tespit edilirken, immobilize enzimin optimum pH'ı 10.0 olarak belirlenmiştir [17].

6.2.1.2. pH kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılıkları pH 7-12 aralığında farklı pH değerlerine sahip Britton-Robinson çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir. Serbest enzim ile çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin relatif aktiviteleri Tablo 6.6'da verilmiştir. Bu relatif aktiviteler Şekil 6.3'te görüldüğü gibi grafiğe geçirilerek kararlı pH bölgeleri tespit edilmiştir.

Serbest enzim pH 8-11 arasında kararlı bir davranış gösterirken, çitin üzerine immobilize edilmiş enzim pH 8-11, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim ise pH 9-11 arasında kararlılık göstermiştir.

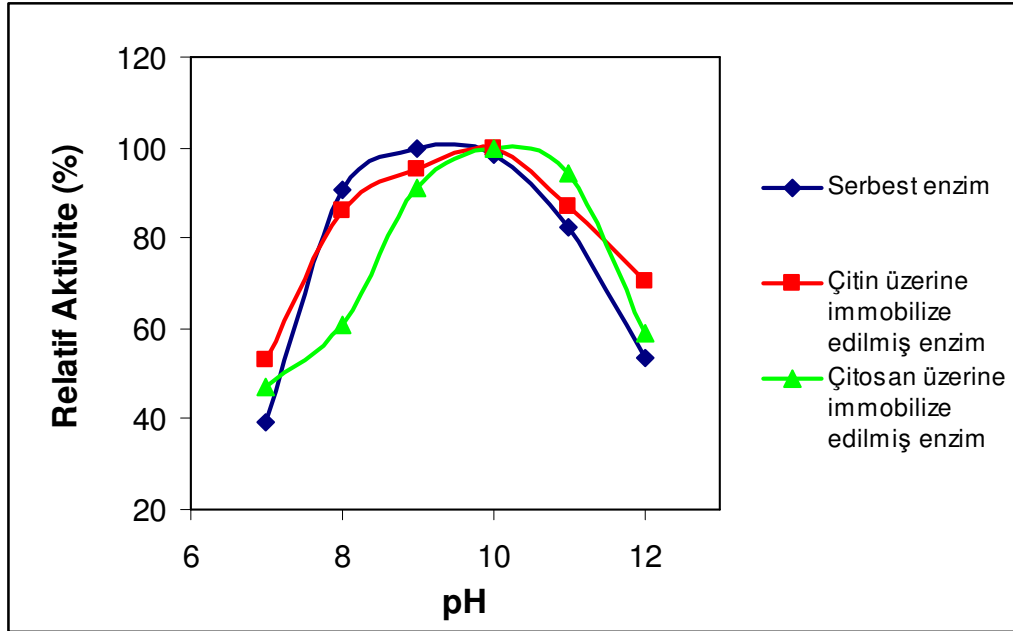
Tablo 6.6: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin pH kararlılıkları

pH	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim	Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
7.0	39.1	52.9	47.2
8.0	90.4	86.3	61.0
9.0	100.0	95.3	91.0
10.0	98.3	100.0	100.0
11.0	82.2	87.0	94.1
12.0	53.5	70.2	59.0

Şekil 6.3'ten daha net görülebildiği gibi çitin üzerine immobilize edilmiş enzimle, serbest enzimin kararlı olduğu pH aralığı (8-11) aynıdır. Fakat çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimin kararlı olduğu pH aralığı (9-11) serbest enziminkine kıyasla daralmıştır.

Düşük bir pH değeri olan pH 7.0'de serbest enzimin relatif aktivitesi %39.1 olarak immobilize enzimlerin aynı pH değerindeki relatif aktivitelerine göre daha düşük bir aktivite göstermiştir. Çitin üzerine immobilize edilen enzimin pH 7.0'deki relatif aktivitesi %52.9, çitosan üzerine immobilize edilen enzimin pH 7.0'deki relatif aktivitesi ise %47.2'dir.

pH 12'de ise serbest enzimin relatif aktivitesi %53.5, çitosan üzerine immobilize edilmiş proteazın relatif aktivitesi %70.2 ve çitin üzerine immobilize edilmiş proteazın relatif aktivitesi ise %59'dur.



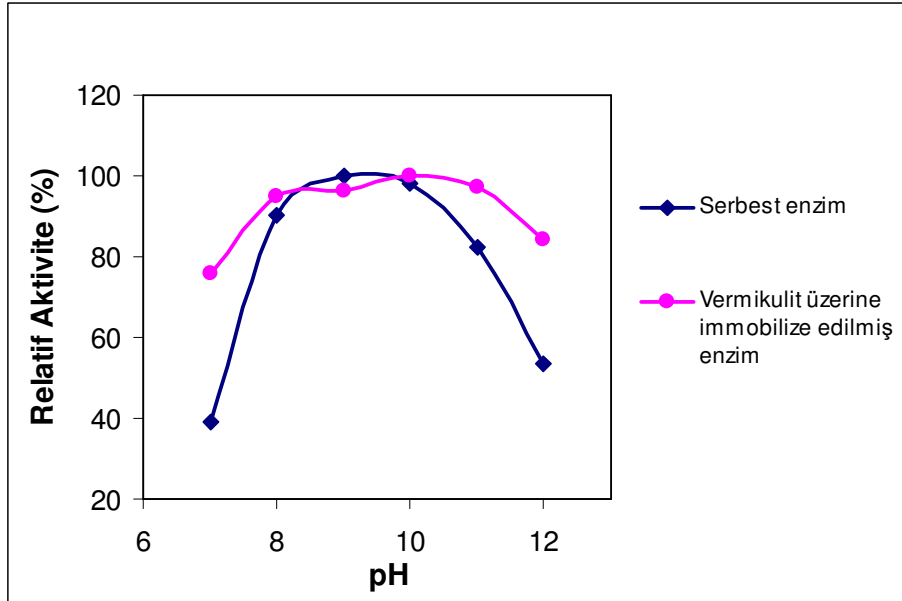
Şekil 6.3: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin pH kararlılıkları

Serbest enzim ve vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin relatif aktiviteleri Tablo 6.7'de verilmiştir. Bu relatif aktiviteler Şekil 6.4'te görüldüğü gibi grafiğe geçirilerek kararlı pH bölgeleri tespit edilmiştir.

Tablo 6.7: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin pH kararlılığı

pH	Relatif Aktivite (%)	
	Serbest Enzim	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
7.0	39.1	75.9
8.0	90.4	95.0
9.0	100.0	96.2
10.0	98.3	100.0
11.0	82.2	97.3
12.0	53.5	84.3

Şekil 6.4'ten daha net görülebildiği gibi serbest enzim ile vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin kararlı olduğu pH aralığı aynıdır (8-11). Fakat pH 7'de serbest enzimin relatif aktivitesi %39.1 iken, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin relatif aktivitesi %75.9'dur. pH 12'de ise serbest enzim %53.5 relatif aktiviteye, immobilize enzim ise %84.3 relatif aktiviteye sahiptir.



Şekil 6.4: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin pH kararlılığı

Düşük ve yüksek pH değerlerinde immobilize enzimin serbest enzimden daha yüksek relatif aktiviteye sahip olması, immobilizasyon prosesinin enzimin pH kararlılığını artırdığını göstermektedir. Daha önce yapılmış benzer çalışmalarda taşıyıcıya, immobilizasyon metoduna ve daha önceki bölümlerde anlatılan diğer immobilizasyon parametrelerine bağlı olarak, bazı immobilizasyon prosesleri sonucunda enzimin pH kararlılığı artarken, bazılarında ise serbest enzime kıyasla bir değişiklik gözlenmemiştir. Papainin gözenekli çitosan tanecikleri üzerine immobilize edildiği çalışmada, pH profilinde bir genişleme olduğu ve immobilize edilmiş enzimin serbest enzime kıyasla yüksek pH değerlerinde daha kararlı olduğu tespit edilmiştir [25]. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen keratinaz enziminin immobilizasyonu sonucunda immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığında (3.6-10.7) serbest enzime kıyasla bir değişiklik olmamıştır [47]. *Pseudomonas aeruginosa* K-187'den elde edilen proteazın polimerik bir taşıyıcıya kovalent bağlanma metoduyla immobilizasyonu sonucunda immobilize enzimin kararlı pH bölgesi 7-9'dan 6-9'a genişlemiştir [29]. *Bacillus licheniformis*'den elde edilen proteazın silika türevleri üzerine immobilizasyonu sonucunda pH kararlılığında kayda değer bir değişiklik olmamıştır [32]. Alkalın proteazın vermikulit üzerine immobilize edildiği çalışmada pH kararlılığının tespiti için serbest ve immobilize enzimler farklı pH değerlerinde 30°C'de 2 saat bekletilmiştir. Bunun sonucunda immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığının 5-11 aralığına genişlediği ve ayrıca serbest enzimin 8'in altındaki pH değerlerinde daha az aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [17].

6.2.2. Sıcaklığın immobilize enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

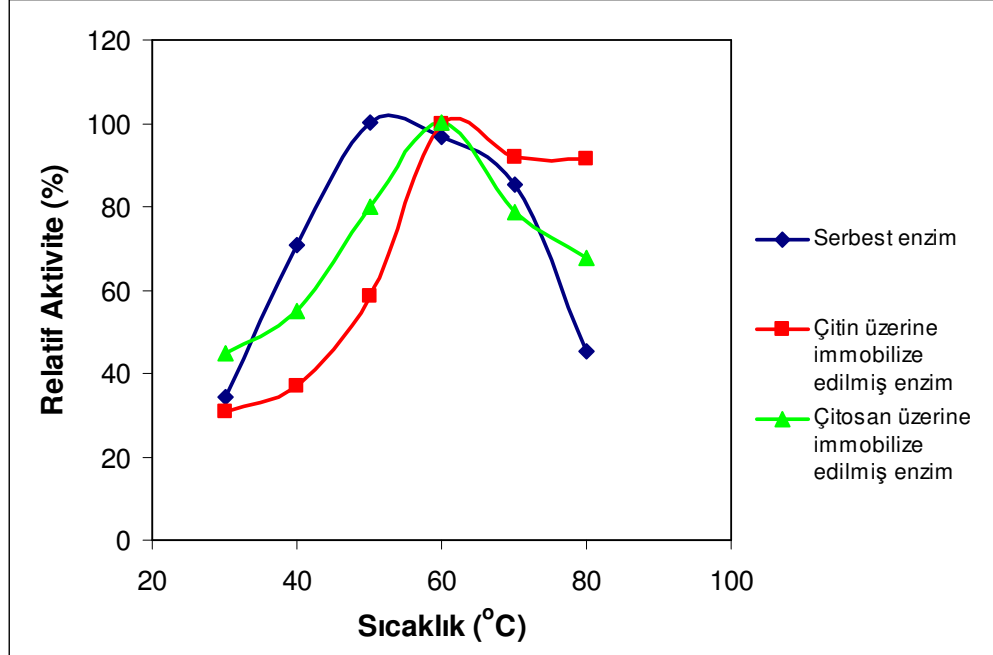
6.2.2.1. Optimum sıcaklık

Sıcaklığın immobilize enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkisi endüstriyel uygulamalar açısından çok önemlidir. Immobilize enzimin optimum sıcaklığının tespit edilebilmesi için immobilize enzimle 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklıklarda hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tablo 6.8 optimum sıcaklığın tespiti amacıyla serbest enzim, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin farklı sıcaklıklarda elde edilen relatif aktivitelerini göstermektedir.

Tablo 6.8: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum sıcaklıkları

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitin Üzerine Immobilize Edilmiş Enzim	Çitosan Üzerine Immobilize Edilmiş Enzim
30	34.2	30.8	44.9
40	70.8	36.8	54.9
50	100.0	58.4	80.1
60	96.7	100.0	100.0
70	85.1	91.7	78.6
80	45.4	91.6	67.5

Tablo 6.8’de görüldüğü gibi serbest enzimle en yüksek aktivite 50°C sıcaklıkta, çitinle ve çitosanla immobilize edilmiş enzimlerle ise 60°C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6.5: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin optimum sıcaklıkları

Şekil 6.5'te de görülebildiği gibi, çitin ve çitosan kullanılarak yapılan immobilizasyon sonucunda enzimin optimum sıcaklığı 10°C artmıştır.

Tablo 6.9 optimum sıcaklığın tespiti amacıyla, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin farklı sıcaklıklarda elde edilen relatif aktivitelerini göstermektedir. Serbest enzim 50°C'de maksimum aktivite verirken, vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz 60°C'de maksimum aktivite göstermiştir.

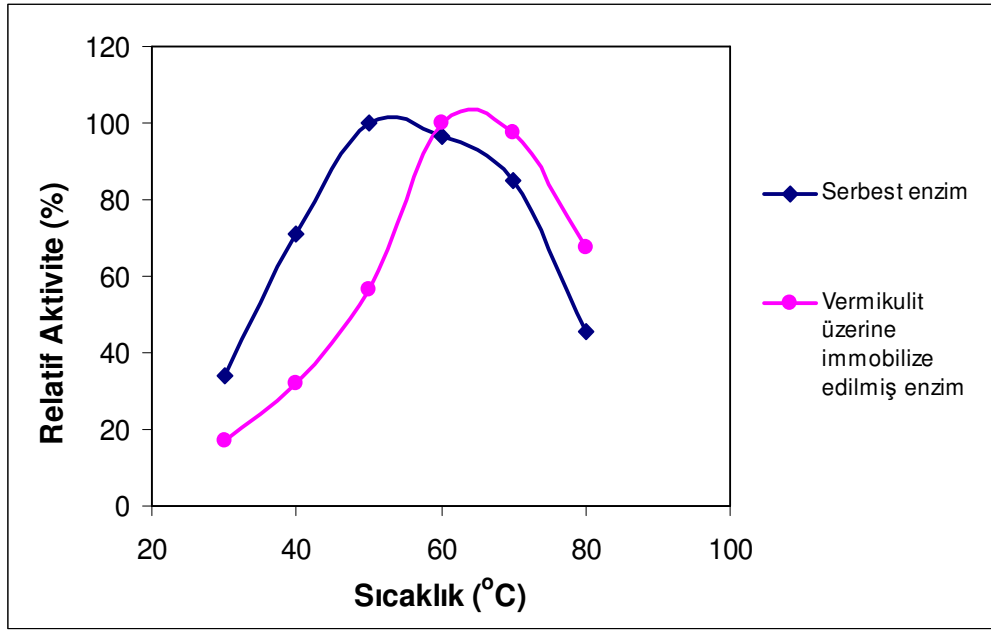
Tablo 6.9: Vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)	
	Serbest Enzim	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
30	34.2	17.1
40	70.8	31.9
50	100.0	56.7
60	96.7	100.0
70	85.1	97.7
80	45.4	67.4

Şekil 6.6'dan da görüldüğü gibi proteazın vermikulit üzerine immobilizasyonu sonucunda optimum sıcaklık 10°C artmıştır.

Çitin, çitosan ve vermikulit taşıyıcıları üzerine kovalent bağlanma metodu ile immobilize edilmiş proteazın optimum sıcaklığı her üç taşıyıcıda da 10°C artmıştır.

Kovalent bağlarla bağlanan enzimlerin serbest enzimlere kıyasla yüksek ısılara karşı daha dayanıklı olmalarının sebebi enzimle taşıyıcı arasındaki kovalent bağlarla sağlanan konformasyonel bütünlüktür [49].



Şekil 6.6: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığı

Optimum sıcaklıktaki, yüksek sıcaklıklara doğru olan bu artış, enzimin immobilizasyon prosesiyle taşıyıcıya bağlanması sonucunda taşıyıcının belli bölgelerine lokalize olmasından dolayı enzim-substrat bileşiğinin oluşmasında, substratın enzimin aktif bölgelerine ulaşmasındaki engellerin ortadan kalkmasıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda yine immobilizasyon parametrelerine bağlı olarak değişik sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus mycoides*'den elde edilen alkalın proteazın optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuş, çitin üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklığında bir değişiklik gözlenmezken, çitosan üzerine immobilize edilmiş alkalın proteazın optimum sıcaklığı 55°C'ye yükselmiştir [24]. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş alkalın proteazın optimum sıcaklığının (60°C) serbest alkalın proteazinkiyle aynı olduğu saptanmıştır [17]. *Pseudomonas aeruginosa* K-187'den elde edilen proteazın polimerik bir taşıyıcıya kovalent bağlanma metoduyla immobilizasyonu sonucunda serbest enzimin optimum sıcaklığı 60°C iken, immobilize enzimin optimum sıcaklığı 50°C'ye gerilemiştir [29]. *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen proteazın optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuş, glutaraldehit kullanarak poliamit üzerine immobilize edilmiş proteazın optimum sıcaklığı ise 50°C olarak tespit edilmiştir [30].

6.2.2.1. Sıcaklık kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimlerin sıcaklık kararlılıklarının belirlenebilmesi için 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Tablo 6.10 sıcaklık kararlılığının tespiti amacıyla serbest ve immobilize enzimlerin farklı sıcaklıklarda elde edilen relatif aktivitelerini göstermektedir.

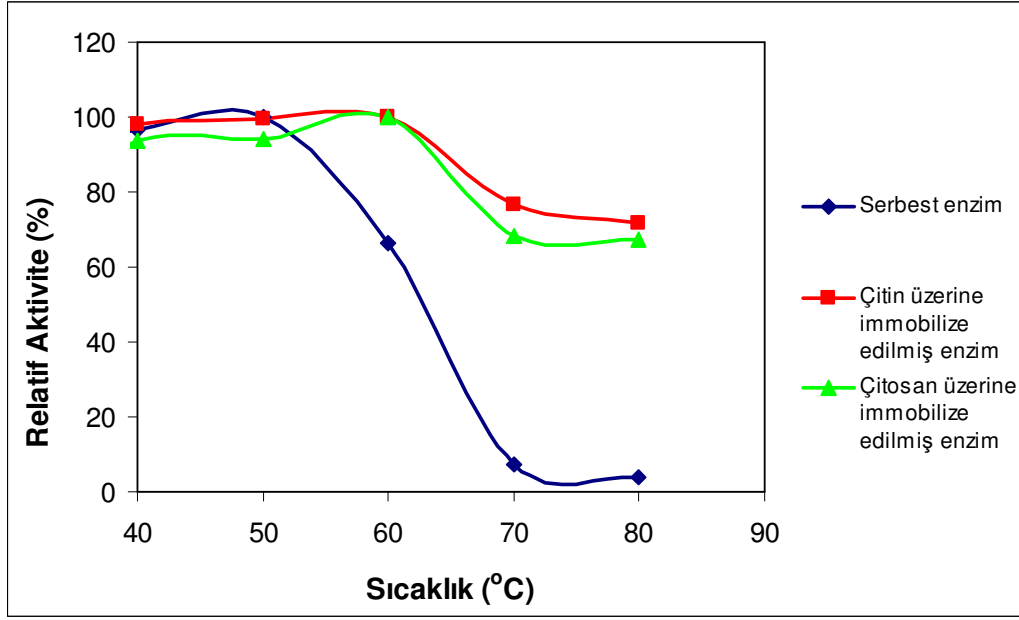
Tablo 6.10: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin sıcaklık kararlılıkları

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)		
	Serbest Enzim	Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim	Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
30	90.2	90.8	70.7
40	96.8	98.2	93.8
50	100.0	99.4	94.2
60	66.1	100.0	100.0
70	7.1	76.6	68.1
80	3.7	71.6	67.4

Tablodaki değerlerden ve Şekil 6.7’den de görülebildiği gibi kovalent bağlanmayla immobilizasyon sonucunda çitin ve çitosan üzerine immobilize olmuş enzimlerin sıcaklık kararlılıkları açık şekilde artmıştır.

Serbest enzimin relatif aktivitesi 50°C’den sonraki sıcaklıklarda hızla düşerken, çitin ve çitosan üzerine immobilize olmuş enzimler 80°C’ye kadar olan sıcaklıklarda hala aktivitelerini korumaktadırlar. Serbest enzim 40°C-50°C arasındaki sıcaklık aralığında kararlı iken, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin kararlı oldukları sıcaklık aralığı 40°C-60°C’ye genişlemiştir.

70°C’de serbest enzim orijinal aktivitesinin %7.1’ini korurken, çitin üzerine immobilize edilmiş enzim orijinal aktivitesinin %76.6’sını, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim ise orijinal aktivitesinin %68.1’ini korumuştur.



Şekil 6.7: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin sıcaklık kararlılıkları

Sıcaklık kararlılığı deneylerinde çalışılan en yüksek sıcaklık olan 80°C’de ise serbest enzim orijinal aktivitesinin %3.7’sini, çitin üzerine immobilize edilmiş enzim %71.6’sını, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim ise %67.4’ünü korumuştur.

Tablo 6.11 vermikulit üzerine immobilize edilen proteazın sıcaklık kararlılığı deneyleri sonucunda elde edilen relatif aktivitelerini göstermektedir.

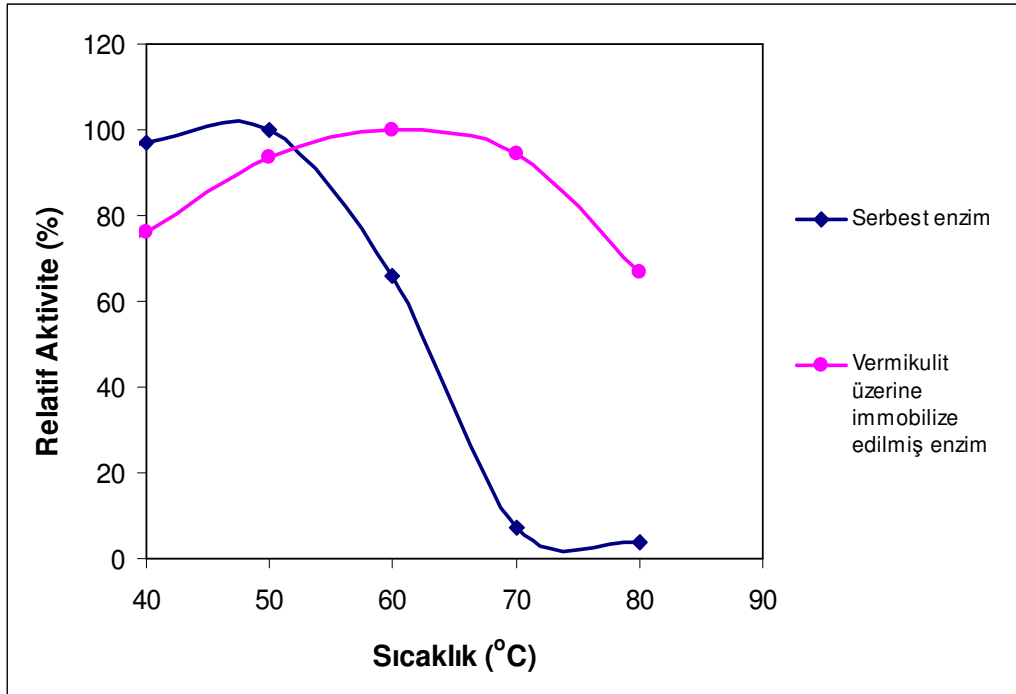
Tablo 6.11: Vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin sıcaklık kararlılığı

Sıcaklık (°C)	Relatif Aktivite (%)	
	Serbest Enzim	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
30	90.2	61.3
40	96.8	76.2
50	100.0	93.4
60	66.1	100.0
70	7.1	94.3
80	3.7	66.8

Tablo 6.11’den görülebildiği gibi proteazın kovalent bağlanma metoduyla vermikulit üzerine immobilize edilmesi enzimin farklı sıcaklıklarda daha kararlı hale gelmesine olanak sağlamıştır. Şekil 6.8’den net bir şekilde görülebildiği gibi serbest enzim 40°C-50°C arasındaki sıcaklık aralığında kararlı iken, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin kararlı olduğu sıcaklık aralığı 50°C-70°C aralığına genişlemiştir.

70°C’de serbest enzim orijinal aktivitesinin %7.1’ini korurken, vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz orijinal aktivitesinin %94.3’ünü korumuştur.

En yüksek sıcaklık değeri olan 80°C’de ise serbest enzimin relatif aktivitesi %3.7 iken, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin relatif aktivitesi %66.8’dir. Bu sonuçlardan yola çıkarak immobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla sıcaklık kararlılığını artırdıkları söylenebilir.



Şekil 6.8: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin sıcaklık kararlılığı

Çitin, çitosan ve vermikulit taşıyıcıları üzerine kovalent bağlanma metoduyla immobilize edilmiş proteaz enzimi, her üç taşıyıcıyla birlikte sıcaklık kararlılığında artış göstermiştir.

İmmobilize enzimlerin sıcaklık kararlılıklarındaki artışların sebebi, enzimlerin suda çözünmeyen dayanıklı taşıyıcılara çok noktada iyi bir şekilde bağlanmalarıdır. Daha

önceki bölümlerde bahsedildiği gibi bağ ajanı olarak kullanılan glutaraldehit enzim ile taşıyıcı arasında oluşan kovalent bağların çaprazlanmasını sağlayarak enzimin taşıyıcı üzerindeki kararlılığını daha da artırmaktadır. Protein molekülü taşıyıcıya bağlandığında yapısal olarak da daha dayanıklı hale gelmektedir.

Ayrıca termal kararlılıktaki bu artış enzimin taşıyıcıya bağlanmasından dolayı hareketliliğinin kısıtlanması bir başka deyişle, konformasyonel esnekliğinin azalmasından dolayı yüksek sıcaklıklardaki termal inaktivasyona karşı daha dayanıklı hale gelmesine olanak sağlar [50,51].

Literatürde, bu çalışmadakilere benzer sonuçlar elde edilmiştir. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş alkalın proteazın sıcaklık kararlılığı, serbest enzimin yapısındaki zayıf iyonik güçlerin ve hidrojen bağlarının immobilizasyon prosesi sonucunda kararlı hale gelmesiyle artmıştır [17]. *Pseudomonas aeruginosa* K-187'den elde edilen proteazın polimerik bir taşıyıcıya kovalent bağlanma metoduyla immobilizasyonu sonucunda immobilize enzimin sıcaklık kararlılığında artış gözlenmiştir [29]. *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen proteazın glutaraldehit kullanılarak poliamit üzerine immobilizasyonu sonucunda immobilize enzim 60°C sıcaklıkta serbest enzime kıyasla 10 kat daha yüksek aktivite göstermiş, ve termokararlılığı da artmıştır [30]. *Serratia marcescens*'den elde edilen alkalın proteazın interpolimer kompleksler üzerine immobilizasyonu sonucunda kararlı olduğu sıcaklık aralığı serbest enziminkine kıyasla genişlemiştir [52].

6.2.3. İmmobilize enzimin raf ömrü kararlılığı

İmmobilize enzimlerin endüstriyel kullanışlılıklarının araştırılması için düşük sıcaklıklardaki enzimatik aktivite kayıplarının ölçülmesi raf ömrü kararlılığı olarak tanımlanabilir. Raf ömrü kararlılığı immobilize enzimlerin en önemli karakterizasyon parametrelerinden biridir.

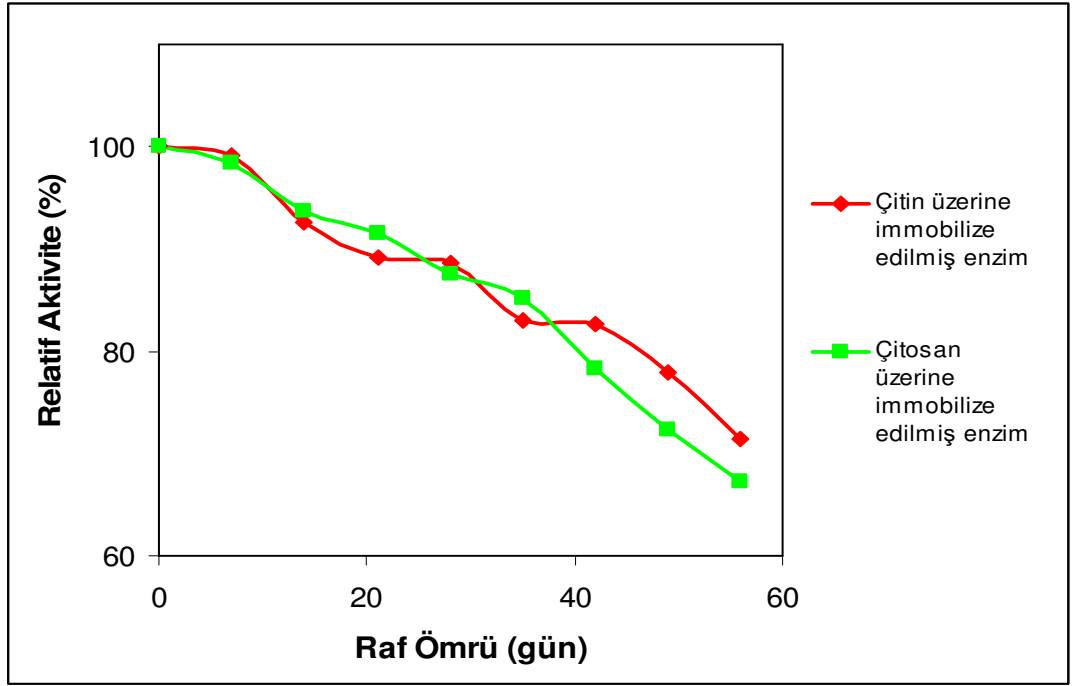
Tablo 6.12 çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanma metoduyla immobilize edilmiş enzimlerin raf ömrü kararlılıklarını göstermektedir.

İmmobilize enzimlerin 4°C sıcaklıkta 56 gün boyunca saklanmaları sonucunda çitin üzerine immobilize edilmiş enzim orijinal aktivitesinin %71.4'ünü, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim ise %67.3'ünü korumuştur.

Tablo 6.12: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin raf ömrü kararlılıkları

Raf Ömrü (gün)	Relatif Aktivite (%)	
	Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim	Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
0	100.0	100.0
7	99.1	98.4
14	92.5	93.8
21	89.1	91.4
28	88.6	87.5
35	83.0	85.2
42	82.7	78.2
49	78.0	72.4
56	71.4	67.3

Şekil 6.9’da relatif aktivitedeki azalma gün bazında daha net olarak görülmektedir. Grafikten de anlaşıldığı gibi 2 aylık bir saklama sonucunda çitin ve çitosan üzerine immobilize olmuş enzimler orijinal aktivitelerinin %50’sinden daha büyük bir kısmını korumaktadırlar. Bu da çitin ve çitosan üzerine immobilize olmuş proteazın 4°C gibi düşük bir sıcaklıkta ve 2 ay bekletilmesi sonucunda kararlı bir raf ömrüne sahip olduğunu göstermektedir.



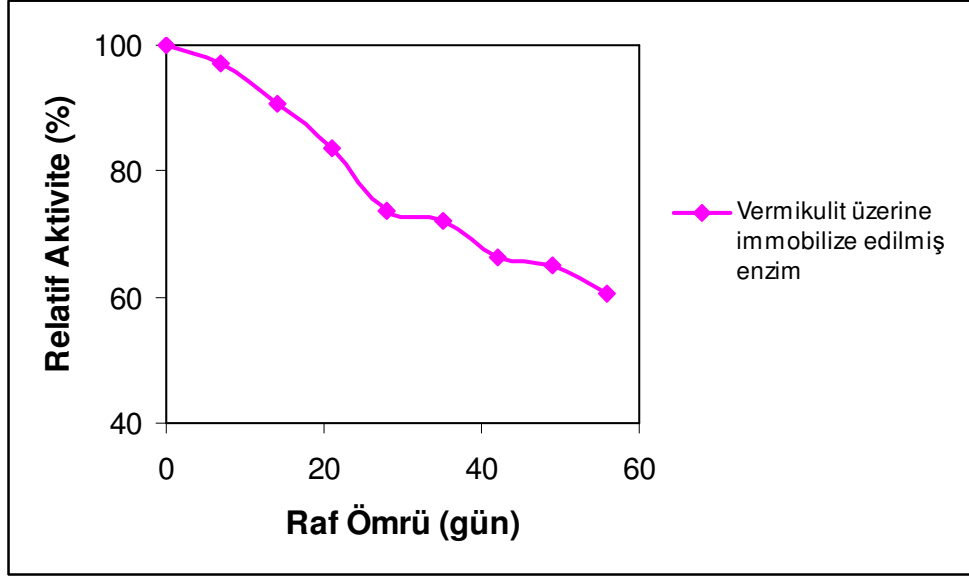
Şekil 6.9: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin raf ömrü kararlılıkları

Tablo 6.13'te vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin raf ömrü kararlılığı deneyi sonucunda elde edilen relatif aktiviteleri görülmektedir.

Tablo 6.13: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin raf ömrü kararlılığı

Raf Ömrü (gün)	Relatif Aktivite (%)
	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
0	100.0
7	97.1
14	90.9
21	83.7
28	73.6
35	72.1
42	66.4
49	65.0
56	60.4

Vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz 4°C’de 2 ay boyunca saklandıktan sonra orijinal aktivitesinin %60.4’ünü koruyabilmiştir. Şekil 6.10’da da görülebildiği gibi vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin 2 ay sonundaki relatif aktivitesi %50’den büyük olmasına rağmen, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş proteazların 2 ay sonunda tespit edilen aktivitelerinden daha düşüktür. Bu da vermikulitle bağlanan proteazın raf ömrü kararlılığının, çitin ve çitosan üzerine bağlanan proteazlarınkinden daha zayıf olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.10: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin raf ömrü kararlılığı

İmmobilize enzimlerin pH ve sıcaklık kararlılıklarının iyileşmesi sonucunda raf ömrü kararlılığı da iyileşmiştir.

Literatürde raf ömrü kararlılığı ile ilgili olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus mycoides*’den elde edilen alkalın proteazın çitin ve çitosan dahil olmak üzere farklı taşıyıcılara immobilize edilerek 5°C sıcaklıkta 5-6 ay süreyle saklanması sonucunda orijinal aktivitenin %88-100 arasında değişen bir kısmı korunmuştur [24]. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş alkalın proteazın 60 gün boyunca 4°C ve 25°C sıcaklıklarda saklanması neticesinde, ilk aktivitesinin sırasıyla %84’ünü ve %66’sını koruduğu saptanmıştır [17].

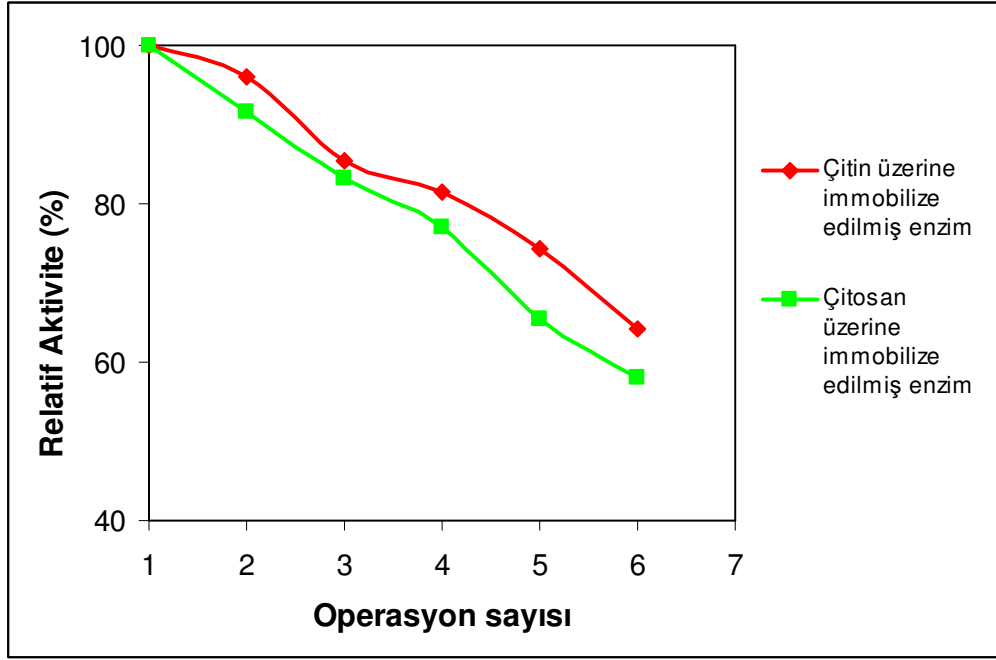
6.2.4. İmmobilize enzimin operasyonel kararlılığı

Enzimlerin üretimleri ekonomik açıdan maliyetli olduğu için enzimlerin ziyan olmasını engellemek amacıyla taşıyıcıya immobilize edilmiş olan enzimler tekrarlı olarak kullanılmak istenirler. Bu amaçla çitin ve çitosan immobilize olan enzimlerin ardarda tekrarlı hidroliz reaksiyonları sonucunda ölçülen relatif aktiviteleri Tablo 6.14'te görülmektedir.

Tablo 6.14: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin operasyonel kararlılıkları

Operasyon Sayısı	Relatif Aktivite (%)	
	Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim	Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
1	100.0	100.0
2	96.1	91.6
3	85.4	83.2
4	81.6	77.2
5	74.3	65.4
6	64.1	58.1

Çitin ve çitosan üzerine immobilize olmuş enzim 3. kullanımda hala ilk aktivitesinin %85.4'ünü ve %83.2'sini korumaktadır. 6. kullanım sonucunda dahi, çitin üzerine immobilize olan enzim ilk aktivitesinin %64.1'ini, çitosan üzerine immobilize olan enzim ise %58.1'ini korumuştur. Şekil 6.11'den görülebildiği gibi bu relatif aktivitelerin %50'den daha yüksek olması immobilize enzimlerin tekrarlı kullanımlarının mümkün olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.11: Çitin ve çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimlerin operasyonel kararlılıkları

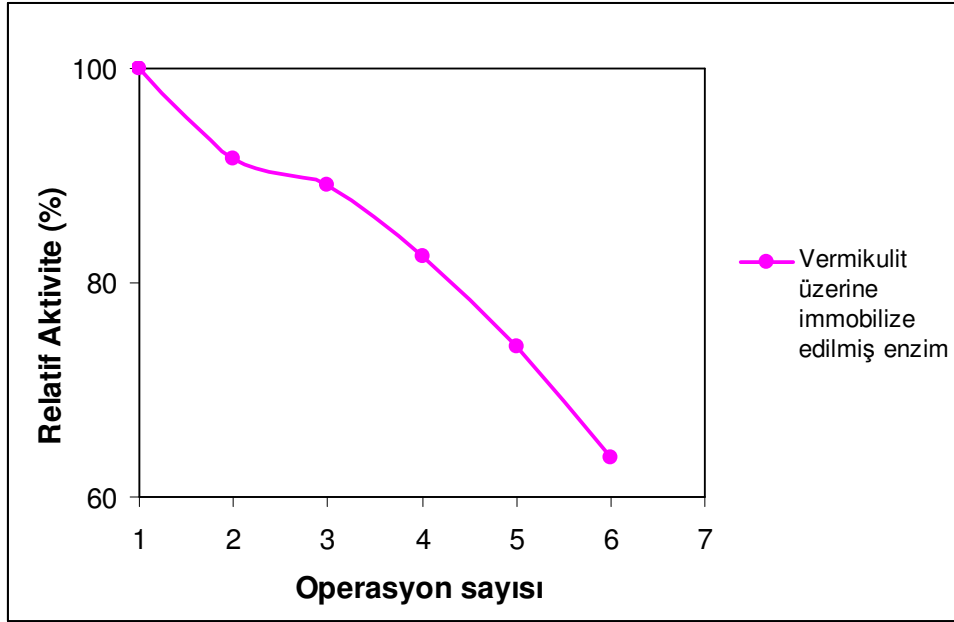
Vermikulit üzerine immobilize olan proteaz enziminin ardarda tekrarlı hidroliz reaksiyonları sonucunda ölçülen relatif aktiviteleri Tablo 6.15'te görülmektedir.

Tablo 6.15: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin operasyonel kararlılığı

Operasyon Sayısı	Relatif Aktivite (%)
	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Enzim
1	100.0
2	91.5
3	89.2
4	82.5
5	74.0
6	63.7

Vermikulit üzerine immobilize olmuş enzim 3. kullanımda hala ilk aktivitesinin %89.2'sini korumaktadır. 6. kullanım sonucunda ise %63.7'sini korumuştur. Şekil 6.12'den de görülebildiği gibi relatif aktivitenin %50'den daha yüksek olması

vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin tekrarlı kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.12: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin operasyonel kararlılığı

Literatürde, immobilize enzimlerin operasyonel kararlılıkları deneylerinde benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Jelatin iyonlaşma metoduyla hazırlanan çitosan nano-partikülleri üzerine immobilize edilen nötral proteaz enziminin 9 kez tekrarlı kullanımı sonucunda orijinal aktivitesinin %88'ini koruduğu rapor edilmiştir [37]. *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen proteaz glutaraldehit kullanılarak poliamit üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimin 22 kez ardarda tekrarlı kullanımı sonucunda aktivitesinde kayıp gözlenmemiştir [30]. Chellapandian çalışmasında, vermikulit üzerine immobilize ettiği alkalın proteazın 5. kullanımı sonucunda relatif aktivitesinin %78 olduğunu tespit etmiştir [17].

6.2.5. İmmobilize enzimin deterjan uyumluluğu

Çözünebilir enzimlerin kullanıldığı endüstriyel uygulama alanlarının en önemlilerinden biri proteaz, lipaz ve selülaz enzimlerinin katkı maddeleri olarak deterjan formülasyonlarına eklendiği deterjan endüstrisidir [7]. Çamaşır deterjanları farklı iplik dokumalarına sahip kumaşlardaki kompleks kirleri çıkarabilir özellikte olmalıdır [4]. Suda çözünebilirlikleri yüksek olan kir ve lekeler yıkama prosesi

esnasında kolayca uzaklaştırılabilmektedirler. Diğer çoğu lekeler bir deterjanın yüzey aktif madde/temizlemeyi artırıcı madde/beyazlatıcı madde sistemi tarafından kısmi olarak uzaklaştırılmasına rağmen sonuç genellikle yıkama koşullarına bağlı olarak tatmin edici değildir. Çoğu durumda uygun enzimlerin deterjanlara ilave edilmesiyle kir ve lekelerin uzaklaştırılması kolaylaştırılmaktadır. Deterjan formülasyonlarındaki bileşenler sadece fizyokimyasal bir işlem sağlarlarken, enzimler kirleri küçük ve daha fazla çözünebilir fragmanlara indirgeme rolü oynarlar.

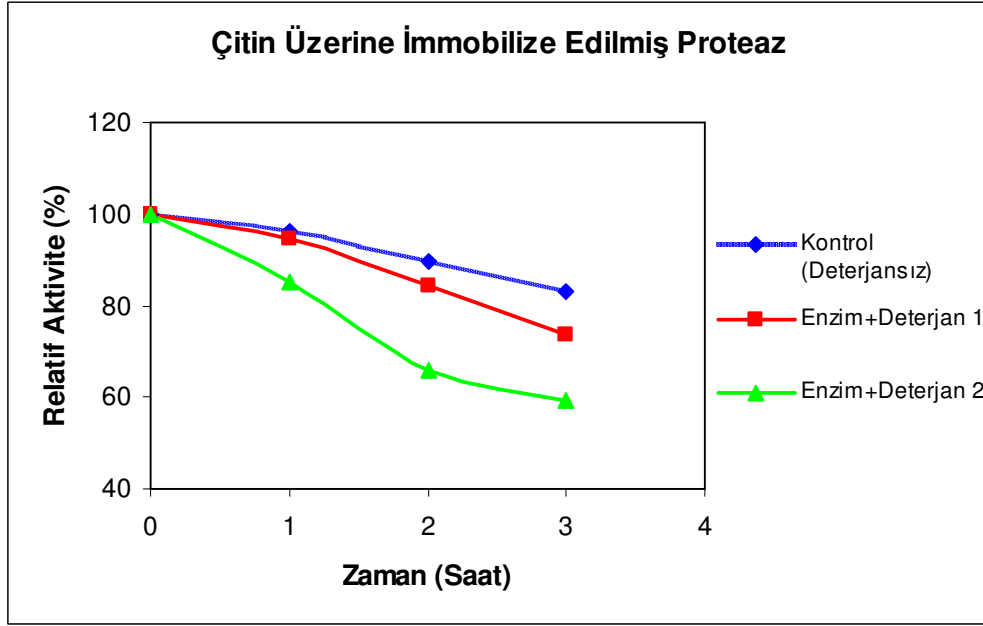
Bu çalışmada çitin, çitosan ve vermikulit taşıyıcıları kullanılarak glutaraldehit varlığında kovalent bağlanma metoduyla immobilize edilmiş proteazların deterjan uyumlulukları incelenmiştir. Bu deneyler için, iki farklı ticari deterjan kullanılarak %0.7'lik deterjan çözeltileri hazırlanmıştır.

Çitin üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin iki farklı deterjanla hazırlanan deterjan çözeltileri içerisinde farklı sürelerde bekletilmesi sonucunda elde edilen relatif enzim aktiviteleri Tablo 6.16'da gösterilmektedir.

Tablo 6.16: Çitin üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu

Zaman (Saat)	Çitin Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteazın 60°C'de Relatif Aktivitesi (%)		
	Kontrol (Deterjansız)	Deterjan 1	Deterjan 2
0	100.0	100.0	100.0
1	96.1	94.6	85.1
2	89.6	84.5	65.8
3	83.1	73.5	59.2

Deterjan çözeltisi eklenmeden 60°C sıcaklıkta farklı sürelerde muamele edilmiş immobilize enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %83.1'ini korumuştur. Şekil 6.13'ten daha net bir şekilde görülebildiği gibi 60°C sıcaklıkta farklı sürelerde iki farklı ticari deterjanla hazırlanmış çözeltiler içerisinde bekletilen immobilize enzimlerden Deterjan 1 ile muamele gören enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %73.5'ini, Deterjan 2 ile muamele gören enzim ise %59.2'sini koruyabilmiştir.



Şekil 6.13: Çitin üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu

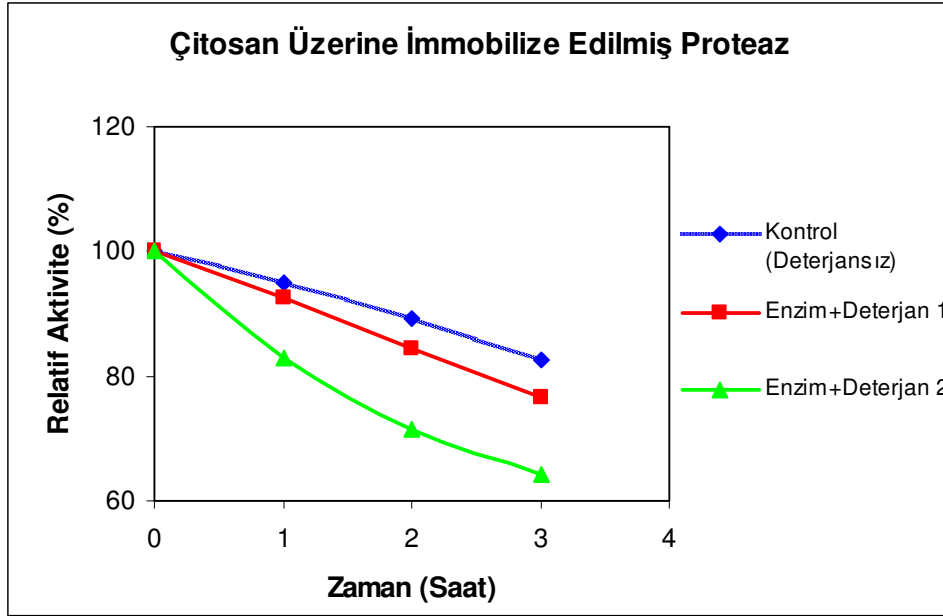
Çitosan kullanılarak immobilize edilmiş proteazın iki farklı ticari deterjanla hazırlanmış deterjan çözeltileri içerisinde farklı sürelerde bekletilmesi sonucunda elde edilen relatif enzim aktiviteleri Tablo 6.17'de gösterilmektedir.

Tablo 6.17: Çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu

Zaman (Saat)	Çitosan Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteazın 60°C'de Relatif Aktivitesi (%)		
	Kontrol (Deterjansız)	Deterjan 1	Deterjan 2
0	100.0	100.0	100.0
1	95.0	92.4	82.8
2	89.3	84.3	71.5
3	82.7	76.7	64.4

Deterjan çözeltisi eklenmeden 60°C sıcaklıkta farklı sürelerde muamele edilmiş immobilize enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %82.7'sini korumuştur. Şekil 6.14'ten de görülebildiği gibi 60°C sıcaklıkta farklı deterjanlarla hazırlanmış çözeltiler içerisinde bekletilen immobilize enzimlerden Deterjan 1 ile muamele gören

enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %76.7'sini, Deterjan 2 ile muamele gören enzim ise %64.4'ünü koruyabilmiştir.



Şekil 6.14: Çitosan üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu

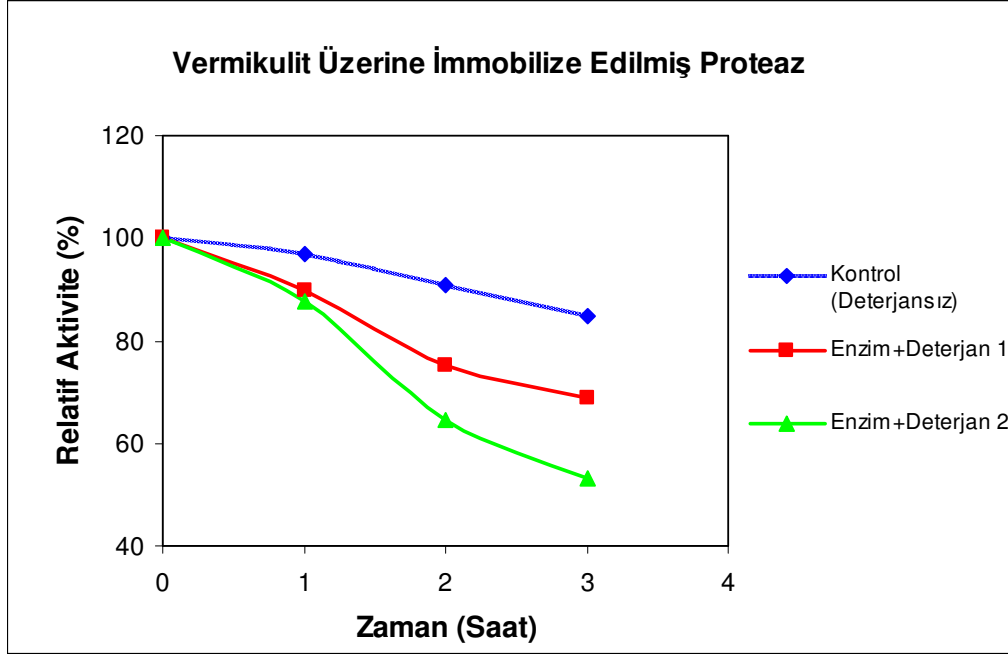
Vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteazın deterjan çözeltileri içerisinde farklı sürelerde bekletilmesi sonucunda elde edilen relatif enzim aktiviteleri Tablo 6.18'de verilmiştir.

Tablo 6.18: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş enzimin deterjan uyumluluğu

Zaman (Saat)	Vermikulit Üzerine İmmobilize Edilmiş Proteazın 60°C'de Relatif Aktivitesi (%)		
	Kontrol (Deterjansız)	Deterjan 1	Deterjan 2
0	100.0	100.0	100.0
1	97.0	89.9	87.5
2	90.9	75.1	64.4
3	84.7	68.8	53.0

Deterjan çözeltisi eklenmemiş immobilize enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %84.7'sini korumuştur. Şekil 6.15'ten de görülebildiği gibi 60°C

sıcaklıkta deterjan çözeltileri içerisinde bekletilen immobilize enzimlerden Deterjan 1 ile hazırlanmış deterjan çözeltisi içerisinde bekletilmiş immobilize enzim 3. saatin sonunda orijinal aktivitesinin %68.8'ini, Deterjan 2 ile hazırlanmış deterjan çözeltisi içerisinde bekletilmiş immobilize enzim ise %53.0'unu koruyabilmiştir.



Şekil 6.15: Vermikulit üzerine kovalent bağlanmayla immobilize edilmiş proteazın deterjan uyumluluğu

Çitin, çitosan ve vermikulit taşıyıcıları kullanılarak immobilize edilmiş proteaz enziminin iki farklı ticari deterjan kullanılarak incelenen deterjan uyumluluğu deneylerinin sonucunda tüm relatif enzim aktivitelerinin %50'den yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ise farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş proteazın bu iki deterjanla uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

Deterjan katkısı olarak kullanılabilecek bir enzimin 7-11 pH aralığında ve 4°C'den 60°C'ye kadar olan yıkama sıcaklıklarında aktif olması gerekir [4]. Kovalent bağlanma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon prosesleri neticesinde proteaz enziminin optimum pH ve sıcaklığının yükseldiği, pH ve sıcaklık kararlılığının ise iyileştiği gözlenmiştir. Proteaz immobilize edildikten sonra optimum sıcaklık 50°C'den 60°C'ye yükselirken, optimum pH ise 9.0'dan 10.0'a yükselmiştir. Tüm bu sonuçlar proteazın immobilizasyon sonrasında daha kararlı hale geldiğini göstermektedir, bundan dolayı serbest proteaz enzimi immobilizasyon

prosesi sayesinde deterjan katkısı olarak kullanılabilmek için daha elverişli hale gelmiştir. Deterjan uyumluluğu deneyleri de bu durumu doğrulamıştır.

İmmobilize enzimlerin deterjan uyumluluğu deneyleriyle ilgili benzer sonuçlar daha önceden rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uyum içindedir. Tanksale ve arkadaşları *Conidiobolus macrosporus*'dan elde ettikleri proteazı glutaraldehit kullanarak poliamit üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin deterjan uyumluluklarının incelenmesi amacıyla Ariel, Rin Shakti ve Surf Excel gibi ticari deterjanlar kullanılmıştır. İmmobilize enzimin Rin Shakti deterjanıyla hazırlanmış çözelti içerisinde 28°C sıcaklıkta 1 saat bekletilmesi sonucunda immobilize enzimin aktivitesinin %84'ünü koruduğu gözlenirken, benzer koşullar altında muamele gören serbest enzimin ise aktivitesinin %76'sını koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize enzimlerin Ariel ve Surf Excel deterjanları varlığında aktivitelerinin %50'sinden daha fazlasını koruduğu gözlenmiştir. İmmobilize enzimin kararlılığının artması, poliamitle kovalent bağlanmanın enzimi bozunmaya karşı daha fazla korumasının sonucu olarak yorumlanmıştır [30].

7. VARGILAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, proteaz enzimi farklı yöntemler kullanılarak değişik taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş ve kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmiş enzimlerin özellikleri incelenmiştir. Yapılan deneyler neticesinde aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- 1) Proteaz enziminin kovalent bağlanma metoduyla immobilizasyonu sonucunda elde edilen verimler, iyonik bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metodlarına kıyasla daha yüksektir. Proteaz enziminin farklı taşıyıcılar üzerine kovalent bağlanma metoduyla immobilizasyonunda, çitin üzerine immobilizasyon sonucunda immobilizasyon verimi %84.3, çitosan üzerine immobilizasyon sonucunda immobilizasyon verimi %81.3 ve vermikulit üzerine immobilizasyon sonucunda immobilizasyon verimi ise %54.8 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar proteaz enziminin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu için çitin ve çitosanın daha uygun taşıyıcılar olduğunu göstermiştir.
- 2) Proteaz enziminin iyon değiştirici ajanlar içeren taşıyıcılar üzerine iyonik bağlanma metodu ile immobilize edilmesi sonucunda elde edilen immobilizasyon verimlerinin kovalent bağlanmada elde edilen immobilizasyon verimlerinden daha düşük olduğu görülmüştür. İyonik bağlanma deneylerindeki en yüksek verim Ecteola23 Cellulose taşıyıcısında %26.5 olarak tespit edilmiştir. Dowex 50W-X8(H), Amberlite IR-120, Dowex 1X8 Cl, DEAE-Cellulose ve BD-Sephadex üzerine proteaz immobilizasyonu sonucunda elde edilen verimler ise sırasıyla, %13.7, %10.4, %13.8, %11.9 ve %10.7'dir.
- 3) Proteaz enzimi, muamele görmemiş çitin ve taninle aktive edilmiş çitosan üzerine fiziksel adsorpsiyon metodu kullanılarak immobilize edilmiştir. Bunun sonucunda çitin kullanılarak elde edilen immobilizasyon verimi %44.2 olarak tespit edilirken, tanin-çitosan kullanılarak yapılan immobilizasyon sonucunda ise verimin %77.8 olduğu görülmüştür. Tanin-çitosanla yapılan

immobilizasyonun daha yüksek verimle sonuçlanması, çitosanın, enzimin bağlanmasını kolaylaştıran tanin adsorbantıyla önceden muamele edilmiş olmasıdır.

- 4) Enzimlerin optimum pH'ları incelenerek kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda serbest enzimin optimum pH'ı 9.0 olarak, çitin, çitosan ve vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteaz enziminin optimum pH'ı ise 10.0 olarak bulunmuştur. Proteazın kovalent bağlanmayla immobilizasyonu sonucunda enzimin optimum pH'ı her üç taşıyıcıda da artmıştır. Bunun sonucunda enzimin kararlı olarak çalışabileceği pH bölgesi genişlemiştir.
- 5) Serbest ve immobilize enzimlerin pH kararlılıkları pH 7-12 aralığında incelenmiştir. Serbest enzim pH 8-11 arasında kararlı bir davranış gösterirken, çitin üzerine immobilize edilmiş enzim pH 8-11, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim pH 9-11, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzim ise pH 8-11 arasında kararlılık göstermiştir. pH 12'de serbest enzimin relatif aktivitesi %53.5, çitosan üzerine immobilize edilmiş proteazın relatif aktivitesi %70.2, çitin üzerine immobilize edilmiş proteazın relatif aktivitesi %59 ve vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteazın relatif aktivitesi ise %84.3'tür. Yüksek pH değerlerinde immobilize enzimlerin daha yüksek relatif aktiviteye sahip olmaları, immobilizasyonun, enzimin pH kararlılığını artırdığını göstermektedir.
- 6) Enzimlerin optimum sıcaklıklarının tespit edilebilmesi için 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklık aralığında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda serbest enzimin optimum sıcaklığı 50°C, çitin, çitosan ve vermikulit üzerine immobilize edilmiş proteazın optimum sıcaklığı 60°C olarak tespit edilmiştir. Çitin, çitosan ve vermikulit üzerine kovalent bağlanma metodu ile immobilize edilmiş proteazın optimum sıcaklığı her üç taşıyıcıda da 10°C artmıştır. Kovalent bağlarla bağlanan enzimlerin serbest enzimlere kıyasla yüksek ısılara karşı daha dayanıklı olmalarının sebebi, enzimle taşıyıcı arasındaki kovalent bağlarla sağlanan konformasyonel bütünlüktür [49].

- 7) Enzimlerin sıcaklık kararlılıklarının tespit edilebilmesi için 30°C ile 80°C arasında değişen sıcaklık aralığında deneyler yapılmıştır. Serbest enzimin relatif aktivitesi 50°C'den sonraki sıcaklıklarda hızla düşerken, çitin ve çitosan üzerine immobilize olmuş enzimler 80°C'ye kadar olan sıcaklıklarda hala aktivitelerini korumaktadırlar. Serbest enzim 40°C-50°C arasındaki sıcaklık aralığında kararlı iken, çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimlerin kararlı oldukları sıcaklık aralığı 40°C-60°C'ye genişlemiştir. Vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzimin kararlı olduğu sıcaklık aralığı ise 50°C-70°C aralığına ötelenmiştir. Çitin, çitosan ve vermiculit taşıyıcıları üzerine kovalent bağlanma yoluyla immobilize edilmiş proteaz enzimi, her üç taşıyıcıyla birlikte sıcaklık kararlılığında artış göstermiştir. Immobilize enzimlerin sıcaklık kararlılıklarındaki bu artışlar suda çözünmeyen dayanıklı taşıyıcılara çok noktada iyi bir şekilde bağlanmalarından kaynaklanmaktadır.
- 8) Çitin, çitosan ve vermiculit üzerine kovalent bağlanma yoluyla immobilize edilmiş enzimlerin raf ömrü kararlılıkları incelenmiştir. Immobilize enzimlerin 4°C sıcaklıkta 56 gün boyunca saklanmaları sonucunda çitin üzerine immobilize edilmiş enzim orijinal aktivitesinin %71.4'ünü, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim %67.3'ünü ve vermiculit üzerine immobilize edilmiş proteaz ise orijinal aktivitesinin %60.4'ünü korumuştur. Bu da çitin, çitosan ve vermiculit üzerine immobilize olmuş proteazın 4°C gibi düşük bir sıcaklıkta 2 ay bekletilmesi sonucunda kararlı bir raf ömrüne sahip olduğunu göstermektedir.
- 9) Çitin, çitosan ve vermiculit üzerine immobilize olan enzimlerle ardarda tekrarlı hidroliz reaksiyonları yapılarak operasyonel kararlılık test edilmiştir. Deneyler sonucunda çitin ve çitosan üzerine immobilize edilmiş enzimler 3. kullanımda hala ilk aktivitelerinin %85.4'ünü ve %83.2'sini korumaktadır. 6. kullanım sonucunda dahi çitin üzerine immobilize olan enzim ilk aktivitesinin %64.1'ini, çitosan üzerine immobilize olan enzim ise %58.1'ini korumuştur. Vermiculit üzerine immobilize edilmiş enzim 3. kullanımdan sonra ilk aktivitesinin %89.2'sini, 6. kullanımdan sonra ise %63.7'sini korumuştur. Relatif aktivitelerin %50'den daha yüksek olması immobilize enzimlerin tekrarlı kullanımlarının mümkün olduğunu göstermektedir.

10) Çitin, çitosan ve vermikulit kullanılarak glutaraldehit varlığında kovalent bağlanma metoduyla immobilize edilmiş proteazların deterjan uyumlulukları incelenmiştir. 60°C sıcaklıkta deterjan çözeltisi eklenmeden bekletilmiş, çitin üzerine immobilize edilmiş enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %83.1'ini korumuştur. 60°C sıcaklıkta farklı sürelerde iki farklı ticari deterjanla hazırlanmış çözeltiler içerisinde bekletilen immobilize enzimlerden Deterjan 1 ile muamele gören enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %73.5'ini, Deterjan 2 ile muamele gören enzim ise %59.2'sini koruyabilmiştir. Deterjan çözeltisi eklenmeden muamele edilmiş, çitosan üzerine immobilize edilmiş enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %82.7'sini korumuştur. 60°C sıcaklıkta deterjanlarla muamele edilmiş immobilize enzimlerden Deterjan 1 ile muamele gören enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %76.7'sini, Deterjan 2 ile muamele gören enzim ise %64.4'ünü koruyabilmiştir. Deterjan çözeltisi eklenmemiş, vermikulit üzerine immobilize edilmiş enzim 3. saatin sonunda relatif aktivitesinin %84.7'sini korumuştur. 60°C sıcaklıkta deterjan çözeltileri içerisinde bekletilen immobilize enzimlerden Deterjan 1 ile hazırlanmış deterjan çözeltisi içerisinde bekletilmiş immobilize enzim 3. saatin sonunda orijinal aktivitesinin %68.8'ini, Deterjan 2 ile hazırlanmış deterjan çözeltisi içerisinde bekletilmiş immobilize enzim ise %53.0'ünü koruyabilmiştir. Çitin, çitosan ve vermikulit kullanılarak immobilize edilmiş proteaz enziminin iki farklı ticari deterjan kullanılarak incelenen deterjan uyumluluğu deneylerinin sonucunda tüm relatif enzim aktivitelerinin %50'den yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ise farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş proteazın bu iki deterjanla uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] **Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ.**, 2004. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- [2] **Kaya, N.**, 1993. Biyokimya, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum.
- [3] **Bugg, T.**, 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Great Britain.
- [4] **Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V.**, 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62(3)**, 597-635.
- [5] **Wong, C.H., and Whitesides, G.M.** (1994). Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Pergamon, Great Britain.
- [6] **Aehle, W.**, 2004. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, USA.
- [7] **Worsfold, P.J.**, 1995. Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes, *Pure & Appl. Chem*, **67(4)**, 597-600.
- [8] **Chaplin, M.F., and Bucke, C.**, 1990. Enzyme Technology, Cambridge University Press, Cambridge.
- [9] **Buchholz, K., Kasche, V., and Bornscheuer, U.T.**, 2005. Biocatalysts and Enzyme Technology, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, USA.
- [10] **Öztürk, M.H.**, 2004. Partial Purification and Characterization of Alkaline Proteases from Isolated *Bacillus* Strains, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [11] **Uhlig, H.**, 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, John Wiley&Sons, Inc., USA.
- [12] **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.
- [13] **Anwar, A., and Saleemuddin, M.**, 1998. Alkaline Proteases: A Review, *Bioresource Technology*, **64**, 175-183.

- [14] **Khor, E.**, 2001. Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise, Elsevier, UK.
- [15] **Krajewska, B.**, 2004. Application of Chitin- and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 126-139.
- [16] <http://www.vermiculite.net/> (18.12.2005)
- [17] **Chellapandian, M.**, 1998. Preparation and Characterization of Alkaline Protease Immobilized on Vermiculite, *Process Biochemistry*, **33(2)**, 169-173
- [18] <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech- Environ/IMMOB/carrier.htm>
(14.03.2006)
- [19] **Bickerstaff, G.F.**, 1997. Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- [20] <http://www.chemeng.mcmaster.ca/courses/che3bk3/Lecture%207.pdf>
(21.04.2006).
- [21] **Vijayalakshmi, R., Kanthimathi, M., Parthasarathi, R., and Nair, B.U.**, 2006. Interaction of Chromium(III) Complex of Chiral Binaphthyl Tetradentate Ligand with DNA, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, **14**, 3300-3306.
- [22] **Lei, C., Shin, Y., Liu, J., and Ackerman, E.J.**, 2002. Entrapping Enzyme in a Functionalized Nanoporous Support, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11242-11243.
- [23] <http://www.eng.nus.edu.sg/EResnews/9705/may97p9.html> (11.04.2006).
- [24] **Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.-M.S., Ahmed, S.A., and Fattah, A.F.**, 1998. Production and Immobilization of Alkaline Protease from *Bacillus Mycoides*, *Bioresource Technology*, **64**, 205-210.
- [25] **Hayashi, T., and Ikada, Y.**, 1991. Protease Immobilization onto Porous Chitosan Beads, *Journal of Applied Polymer Science*, **42**, 85-92.
- [26] **Kise, H., and Hayakawa, A.**, 1991. Immobilization of Proteases to Porous Chitosan Beads and Their Catalysis for Ester and Peptide Synthesis in Organic Solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 584-588.
- [27] **Chae, H.J., Kim, E.Y., and In, M.-J.**, 1999. Improved Immobilization Yields by Addition of Protecting Agents in Glutaraldehyde-Induced Immobilization of Protease, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89(4)**, 377-379.

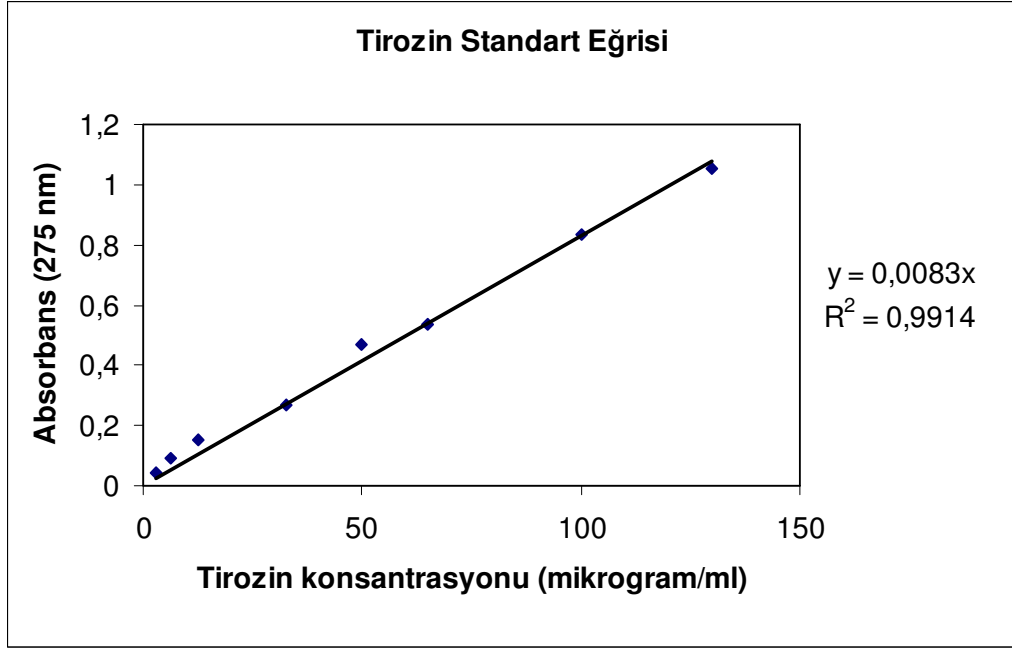
- [28] **Chae, H.J., In, M.-J., and Kim, E.Y.,** 1998. Optimization of Protease Immobilization by Covalent Binding Using Glutaraldehyde, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **73**, 195-204.
- [29] **Oh, Y.-S., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., and Wang, S.-L.,** 2000. Protease Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* K-187 and Its Application in the Deproteinization of Shrimp and Crab Shell Wastes, *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 3-10.
- [30] **Tanksale, A., Chandra, P.M., Rao, M., and Deshpande, V.,** 2001. Immobilization of Alkaline Protease from *Conidiobolus Macroporus* for Reuse and Improved Thermal Stability, *Biotechnology Letters*, **23**, 51-54.
- [31] **Magnin, D., Dumitriu, S., and Chornet, E.,** 2003. Immobilization of Enzymes into Polyionic Hydrogel: ChitoXan, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **18**, 355-373.
- [32] **Ferreira, L., Ramos, M.A., Dordick, J.S., and Gil, M.H.,** 2003. Influence of Different Silica Derivatives in the Immobilization and Stabilization of a *Bacillus Licheniformis* Protease (Subtilisin Carlsberg), *Journal of Molecular Catalysis*, **21**, 189-199.
- [33] **Nouaimi, M., Möschel, K., and Bisswanger, H.,** 2001. Immobilization of Trypsin on Polyester Fleece via Different Spacers, *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, 567-574.
- [34] **Afaq, S., and Iqbal, J.,** 2001. Immobilization and Stabilization of Papain on Chelating Sepharose: A Metal Chelate Regenerable Carrier, *Electronic Journal of Biotechnology*, **4(3)**, 120-124.
- [35] **Roy, J.J., Sangeetha, K., and Abraham, T.E.,** 2005. Chemical Modification and Immobilization of Papain, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 184-188.
- [36] **Sangeetha, K., and Abraham, T.E.,** 2006. Chemical Modification of Papain for Use in Alkaline Medium, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **38**, 171-177.
- [37] **Tang, Z.-X., Qian, J.-Q., and Shi, L.-E.,** 2006. Characterizations of Immobilized Neutral Proteinase on Chitosan Nano-Particles, *Process Biochemistry*, **41**, 1193-1197.
- [38] **Zhao, B., Shi, B., and Ma, R.,** 2005. Immobilization of Papain on the Mesoporous Molecular Sieve MCM-48, *Eng. Life. Sci.*, **5(5)**, 436-441.

- [39] **Afrin, R., Haruyama, T., Yanagida, Y., Kobatake, E., and Aizawa, M.,** 2000. Catalytic Activity of Teflon Particle-Immunized Protease in Aqueous Solution, *Journal of Molecular Catalysis*, **9**, 259-267.
- [40] **Kiatkamjornwong, S., Siwarungson, N., and Nganbunsri, A.,** 1999. *In Situ* Immobilization of Alkaline Protease During Inverse Suspension Polymerization of Polyacrylamide and Poly(acrylamide-co-methacrylic) Hydrogel Beads, *Journal of Applied Polymer Science*, **73**, 2273-2291.
- [41] **Haensler, M., Gerisch, S., Rettelbusch, J., and Jakubke, H.-D.,** 1997. Application of Immobilized α -Chymotrypsin to Peptide Synthesis in Frozen Aqueous Systems, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **68**, 202-208.
- [42] **Beshay, U.,** 2003. Production of Alkaline Protease by *Teredinobacter Turnirae* Cells Immobilized in Ca-alginate Beads, *African Journal of Biotechnology*, **2(3)**, 60-65.
- [43] **Snell, F.D., and Hilton, C.L.,** 1966. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis, John Wiley & Sons, Inc. USA.
- [44] **Chellapandian, M., and Sastry, C.A.,** 1992. Immobilization of Microbial Protease on Vermiculite, *Bioprocess Engineering*, **8**, 33-38.
- [45] **Watanabe, T., Matuo, Y., Mori, T., Sano, R., Tosa, T., and Chibata, I.,** 1978. Preparation of Immobilized Tannins for Protein Adsorption, *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, **3(3)**, 161-174.
- [46] **Fogarty, W.M., and Kelly, C.T.,** 1990. Microbial Enzymes and Biotechnology, Elsevier Applied Science, England.
- [47] **Farag, A.M., and Hassan, M.A.,** 2004. Purification, Characterization and Immobilization of a Keratinase from *Aspergillus Oryzae*, *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 85-93.
- [48] **Chibata, I., Tosa, T., Mori, T., Watanabe, T., and Sakata, N.,** 1986. Immobilized Tannin-a Novel Adsorbent for Protein and Metal Ion, *Enzyme Microbial Technology*, **8**, 130-136.
- [49] **Tümtürk, H., Aksoy, S., and Hasırcı, N.,** 2000. Covalent Immobilization of α -Amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene -2-hydroxyethyl methacrylate) Microspheres and the Effect of Ca^{+2} Ions on the Enzyme Activity, *Food Chemistry*, **68**, 259-266.

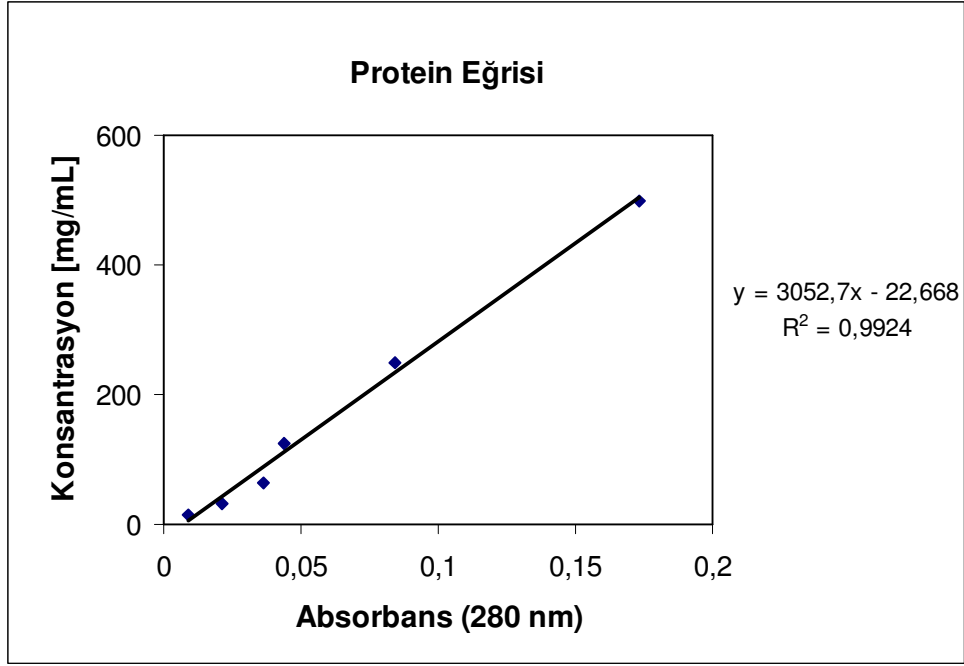
- [50] **Chen, J.-P.**, 1998. Immobilization of α -Chymotrypsin to a Temperature-Responsive Reversibly Soluble-Insoluble Oligomer Based on *N*-Isopropylacrylamide, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **73**, 137-143.
- [51] **Chang, M.-Y., and Juang, R.-S.**, 2005. Activities, Stabilities, and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan-Clay Composite Immobilized Enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 75-82.
- [52] **Wang, H., Liu, S., and Wang, Y.**, 2001. Alkaline Protease Production by Immobilized Growing Cells of *Serratia Marcescens* with Interpolymer Complexes of P(TM-co-AAm)/PAA, *Journal of Applied Polymer Science*, **84**, 178-183.
- [53] **Adirayana, K., Ellaiah, P., and Prasad, D.S.**, 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11, *AAPS PharmSciTech*, **56(4)**, 1-9.

EKLER

EK A

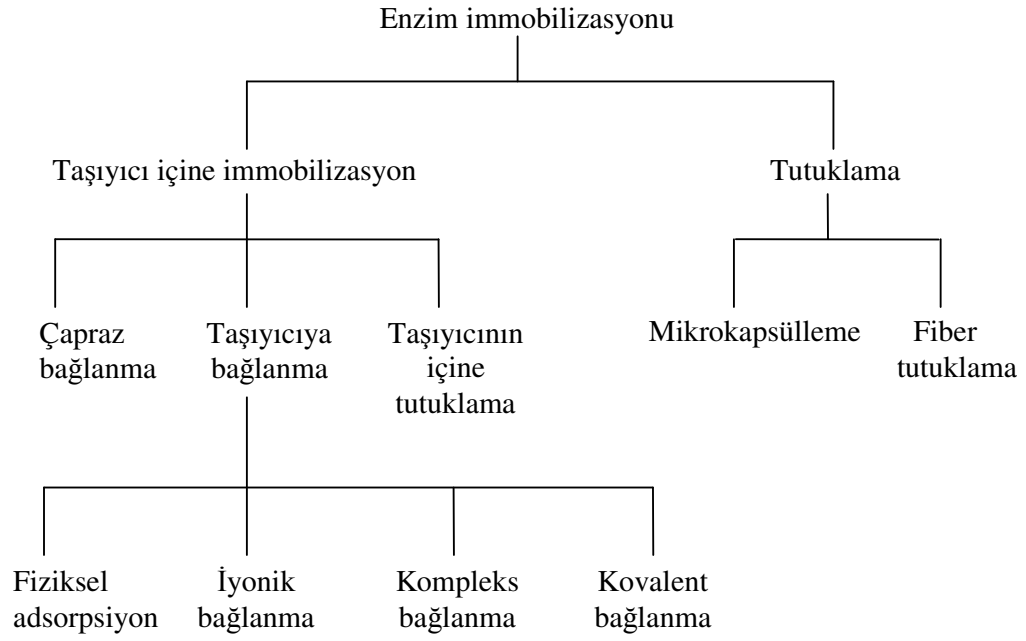


Şekil A.1. Tirozin Standart Eğrisi



Şekil A.2. Standart Protein Eğrisi

EK B



Şekil B.1. İmmobilizasyon Metotlarının Sınıflandırılması

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem TAŞDELEN 1981 yılında İstanbul’da doğdu. 1999 yılında Haydarpaşa Lisesi’nden mezun oldu. Liseden mezun olduğu yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Jeofizik Mühendisliği Bölümü’ne girdi. 2000 yılında aynı üniversitenin Kimya Mühendisliği Bölümü’ne yatay geçiş yapmaya hak kazandı. 2003 yılında Kimya Mühendisliği Bölümü’nden mezun olduktan sonra aynı bölümde yüksek lisansa başladı. 2004 yılından itibaren İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.