

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β -GALACTOSIDASE ENZİMİNİN KABAK LİFİ VE PİRİNÇ
KABUĞUNA İMMOBİLİZASYONUNUN OPTİMİZASYONU:
LAKTOZ HİDROLİZİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Betül AKGÜL TANER

DOKTORA TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Belma ÖZBEK

Ocak, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β -GALACTOSIDASE ENZİMİNİN KABAK LİFİ VE PİRİNÇ
KABUĞUNA İMMOBİLİZASYONUNUN OPTİMİZASYONU:
LAKTOZ HİDROLİZİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Betül AKGÜL TANER tarafından hazırlanan tez çalışması 18.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Belma ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Belma ÖZBEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN, Üye
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Elçin YILMAZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Tuğba GÜRKAYNAK ALTINÇEKİÇ, Üye
İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa

Danışmanım Prof. Dr. Belma ÖZBEK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “ β -Galactosidase Enziminin Kabak Lifi ve Pirinç Kabuğuna İmmobilizasyonunun Optimizasyonu: Laktoz Hidrolizinin İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fatma Betül AKGÜL TANER

İmza

Aileme

ve

kızlarıma,

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımda tez konumu belirleyen, ders ve tez döneminde değerli görüş ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, beni her zaman destekleyen, eşsiz ve değerli danışman hocam Prof. Dr. Belma ÖZBEK'e,

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Elçin DEMİRHAN YILMAZ'a,

İş ve tez sürecini yönetmemde bana destek veren yöneticilerim; Tübitak Bilgem Enstitü Müdür Yardımcısı Dr. Aziz Ulvi ÇALIŞKAN'a, YİTAL üretim sorumlusu Sema İMRAHORİLYAS'a,

FTIR ve SEM analizleri için emeğini esirgemeyen değerli meslektaşım Dr. Alican VATANSEVER'e, anne sütü ile yaptığım çalışmalarda yardımcı olan arkadaşım Ayşe DABAN ADIGÜZEL'e,

Tüm özveri ve emeği ile maddi ve manevi olarak yanımda olan başta annem, babam ve kardeşlerim, olmak üzere kocaman ailemin tüm bireylerine,

Varlıkları ile enerjimi yükselten kızlarım Sıla ve Mina'ya,

En umutsuz zamanlarımda varlıkları ve enerjileri ile bana destek olan sevgili arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Fatma Betül AKGÜL TANER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xxi
ABSTRACT	xxiii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	1
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Enzimler	4
2.1.1 Enzimlerin Genel Özellikleri	4
2.1.2 Enzim İnhibisyonu.....	12
2.2 Enzim İmmobilizasyonu	14
2.2.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	15
2.2.2 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri	22
2.3 Glutaraldehit.....	23
2.4 β -Galactosidase Enzimi ve Genel Özellikleri	27
2.5 Laktoz.....	29
2.5.1 Laktoz İntoleransı	30
2.5.2 Laktozun Hidrolizi.....	31
2.5.3 Laktozun Kullanım Alanları	33
2.6 Anne Sütü.....	34
2.7 Kabak Lifi	39
2.7.1 Kabak Lifi Yapısı	39
2.7.2 Kabak Lifinin Kullanım Alanları	42
2.8 Pirinç Kabuğu	42

2.8.1 Pirinç Kabuğunun Yapısı	43
2.8.2 Pirinç Kabuğunun Kullanım Alanları.....	45
3 LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	46
3.1 β -Galactosidase Enzimi ile Yapılan İmmobilizasyon Çalışmaları	46
3.2 Kabak Lifi ile Yapılan Enzim İmmobilizasyon Çalışmaları.....	55
3.3 Pirinç Kabuğu ile Yapılan Enzim İmmobilizasyon Çalışmaları	59
4 MATERYAL VE METODLAR	62
4.1 Kimyasallar	62
4.2 Cihazlar	63
4.2.1 Çalkamalı İnkübatör	63
4.2.2 UV Spektrofotometre	65
4.2.3 Su Banyosu	65
4.2.4 Hassas Terazî	66
4.2.5 pH Metre.....	67
4.2.6 Etüv.....	67
4.2.7 Otoklav	68
4.2.8 Fourier transform infrared (FTIR) spektrometresi	68
4.2.9 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu).....	69
4.3 β -Galactosidase Enzim İmmobilizasyon Metotları.....	70
4.4 Analiz Yöntemleri.....	76
4.4.1 β -Galactosidase Enzim Aktivite Tayini.....	76
4.4.2 Protein Miktarı Tayini	78
4.4.3 β -Galactosidase Enzim İmmobilizasyon Değerlerinin Hesaplanması	79
4.4.4 Laktoz Hidrolizi.....	81
4.4.5 İstatistiksel Hesaplamalar	82
4.5 Deneysel Çalışmalar	83
4.5.1 Serbest β -Galactosidase Enzimi ile Yapılan Çalışmalar	85
4.5.2 İmmobilize β -Galactosidase Enzimleri ile Yapılan Çalışmalar	86
4.6 İmmobilize β -Galactosidase Enzimine ait Karakterizasyon Çalışmaları.....	89
4.6.1 FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre)	90
4.6.2 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu).....	92
5 DENEYSEL BULGULAR	93
5.1 Serbest β -Galactosidase Enzimi ile Yapılan Çalışmalar	96

5.1.1 Serbest β -Galactosidase Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	96
5.1.2 Serbest β -Galactosidase Enzimi Üzerine pH'ın Etkisi	97
5.1.3 Serbest β -galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi	98
5.1.4 Serbest β -galactosidase Enzim Stabilitesine pH'ın Etkisi	99
5.2 Kabak Lifi Üzerine β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyon Çalışmaları .	100
5.2.1 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu	100
5.2.2 Kabak Lifi Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu	105
5.3 Pirinç Kabuğu Üzerine β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu Çalışmaları	111
5.3.1 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu	111
5.3.2 Pirinç Kabuğu Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu	116
5.4 Serbest ve İmmobilize β -Galactosidase Enzim Numunelerinin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi	121
5.5 İmmobilize β -Galactosidase Enzim Numunelerinin Tekrarlı Kullanımının İncelenmesi	125
5.6 Serbest ve İmmobilize β -Galactosidase Enzim Numunelerine Ait Kinetik Verilerin Hesaplanması	126
5.7 Laktoz Hidrolizi	132
5.7.1 Kabak Lifi Üzerine İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi	133
5.7.2 Pirinç Kabuğu Üzerine İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi	143
5.8 Karakterizasyon Çalışmaları	154
5.8.1 FTIR Analizi	154
5.8.2 SEM Analizi	159
5.9 Genel Değerlendirme	161
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	190
KAYNAKÇA	200
A EK DENEYSEL SONUÇLAR	208

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
$\text{\AA}$	Angstrom
β	Beta
pH	Hidrojen Konsantrasyonunun Eksi Logaritması
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

A_s	Serbest Enzim Aktivitesi
A_{im}	İmmobilize Enzim Aktivitesi
BSA	Sığır Serum Albümin
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
E	Enzim
EO_A	Aktivite Cinsinden Etkinlik Oranı
ES	Enzim-Substrat Kompleksi
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
g	Gram
GK	Geri Kazanım
GK_a	Aktivite Cinsinden Geri Kazanım
GK_p	Protein Cinsinden Geri Kazanım
K_m	Michealis Menten Sabiti
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
N	Normalite
nm	Nanometre
ONP	Orto-Nitrophenol
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside
rpm	Karıştırıcının Dakikadaki Devir Hızı
S	Substrat Konsantrasyonu
S_0	Başlangıç Substrat Konsantrasyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
T	Sıcaklık
t	Süre
UV	Ultraviyole
Ü	Ürün
V	Reaksiyon Hızı
V_{max}	Maksimum Reaksiyon Hızı
V_0	Reaksiyonun Başlangıç Hızı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.....	7
Şekil 2.2	Substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızının değişimi	7
Şekil 2.3	Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisinin şeması [1].....	8
Şekil 2.4	Michaelis-Menten grafiği [5].....	9
Şekil 2.5	Linewear Burke grafiği [5]	10
Şekil 2.6	Rekabetçi inhibitör [7].....	12
Şekil 2.7	Rekabetçi olmayan inhibitör [7].....	13
Şekil 2.8	Yarı rekabetçi inhibitör [7].....	13
Şekil 2.9	Enzim immobilizasyon yöntemleri [4].....	15
Şekil 2.10	Adsorpsiyon metodu ile katalizörün taşıyıcıya bağlanması [14].....	16
Şekil 2.11	Katalizör ve taşıyıcı arasındaki iyonik bağlanma [14]	17
Şekil 2.12	Katalizörün taşıyıcıya kovalent bağlanması [15]	17
Şekil 2.13	Enzimin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu [16]	18
Şekil 2.14	Enzimin polimerler arasında tutuklanması [16]	19
Şekil 2.15	Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu [16].....	19
Şekil 2.16	Çözünen formda enzim immobilizasyonu [19]	20
Şekil 2.17	İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [19]	21
Şekil 2.18	Glutaraldehit kimyasal yapısı [23]	24
Şekil 2.19	Glutaraldehitin su içerisindeki halkalı yapısı [24].....	24
Şekil 2.20	Selüloz ile glutaraldehit arasında gerçekleşen çapraz bağlanma mekanizması [24]	25
Şekil 2.21	İmmobilizasyon matrisine β -galactosidase enziminin glutaraldehit ile bağlanmasının şematik gösterimi [23].....	26
Şekil 2.22	Laktoz molekülü [27]	29
Şekil 2.23	Laktozun enzimatik hidrolizi [32]	33
Şekil 2.24	Kabak bitkisi [37]	40
Şekil 2.25	Kabak lifinin kurumuş hali [37]	40
Şekil 2.26	Pirinç kabuğunun görüntüsü	43
Şekil 4.1	KS 4000 ic control çalkalamalı inkübatör [84]	64
Şekil 4.2	Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınli spektrofotometre	65
Şekil 4.3	PolyScience marka su banyosu	66
Şekil 4.4	Scaltec marka hassas tartı cihazı	66
Şekil 4.5	WTW marka pH metre cihazı.....	67
Şekil 4.6	Memmert marka etüv.....	67
Şekil 4.7	OT O12 marka otoklav cihazı	68
Şekil 4.8	Perkin Elmer Spectrum One marka FTIR cihazı.....	69
Şekil 4.9	Tescan Vega3 marka SEM cihazı.....	69
Şekil 4.10	Taşıyıcılara uygulanan ön işlemin şematik gösterimi	71
Şekil 4.11	1 Nolu immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi	73
Şekil 4.12	2 Nolu immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi.....	75
Şekil 4.13	ONPG'nin hidroliz işlemine ait reaksiyon	76
Şekil 4.14	β -Galactosidase enzim aktivite tayininin şematik diyagramı	77
Şekil 4.15	Farklı ONPG konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri.....	77
Şekil 4.16	Farklı BSA konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri.....	79
Şekil 4.17	Serbest β -galactosidase enzimi ile yapılan çalışmalara ait akış şeması	83
Şekil 4.18	İmmobilize β -galactosidase enzim numuneleri ile yapılan çalışmalara ait akış şeması.....	84

Şekil 4.19	Kabak lifi üzerine β -galactosidase enzim immobilizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmalara ait FTIR analiz şeması.....	91
Şekil 4.20	Pirinç kabuğu üzerine β -galactosidase enzim immobilizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmalara ait FTIR analiz şeması.....	92
Şekil 5.1	Taşıyıcı olarak kullanılan kabak lifi	94
Şekil 5.2	Taşıyıcı olarak kullanılan pirinç kabuğu	95
Şekil 5.3	Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri (pH = 7, 300 rpm).....	97
Şekil 5.4	Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki relatif enzim aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	98
Şekil 5.5	Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri	99
Şekil 5.6	Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri	100
Şekil 5.7	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri	101
Şekil 5.8	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri	102
Şekil 5.9	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri	103
Şekil 5.10	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri	104
Şekil 5.11	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri	105
Şekil 5.12	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri	106
Şekil 5.13	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri	107
Şekil 5.14	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri	108
Şekil 5.15	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri	109
Şekil 5.16	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri	110
Şekil 5.17	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri	112
Şekil 5.18	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri	113
Şekil 5.19	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri	114

Şekil 5.20	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri.....	115
Şekil 5.21	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri.....	116
Şekil 5.22	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri	117
Şekil 5.23	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri.....	118
Şekil 5.24	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki relatif enzim aktivite değerleri.....	119
Şekil 5.25	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri.....	120
Şekil 5.26	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan aktivite değerleri.....	121
Şekil 5.27	Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin depolama süreleri sonrasında relatif enzim aktivite değerleri.....	122
Şekil 5.28	Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin tekrarlı kullanımları sonrasında kalan enzim aktivite değerleri.....	126
Şekil 5.29	Serbest β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Linewear-Burke grafiği	127
Şekil 5.30	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Linewear-Burke grafiği.....	128
Şekil 5.31	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Linewear-Burke grafiği.....	129
Şekil 5.32	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Linewear-Burke grafiği.....	130
Şekil 5.33	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Linewear-Burke grafiği.....	131
Şekil 5.34	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T=37 °C, 300 rpm).....	135
Şekil 5.35	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	135

Şekil 5.36	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm).....	137
Şekil 5.37	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	137
Şekil 5.38	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	139
Şekil 5.39	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	140
Şekil 5.40	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm).....	142
Şekil 5.41	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	142
Şekil 5.42	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	145
Şekil 5.43	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	145
Şekil 5.44	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm).....	147
Şekil 5.45	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	148
Şekil 5.46	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	150
Şekil 5.47	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	150
Şekil 5.48	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm).....	152
Şekil 5.49	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	153
Şekil 5.50	Ön işlem görmüş kabak lifine ait FTIR analizi	155

Şekil 5.51	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi 155
Şekil 5.52	Glutaraldehit ile muamele edilmiş kabak lifine ait FTIR analizi 156
Şekil 5.53	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi 156
Şekil 5.54	Ön işlem görmüş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi 157
Şekil 5.55	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi 158
Şekil 5.56	Glutaraldehit ile muamele edilmiş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi 158
Şekil 5.57	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi..... 159
Şekil 5.58	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait SEM görüntüleri..... 160
Şekil 5.59	Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri..... 168
Şekil 5.60	Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan aktivite değerleri..... 170
Şekil 5.61	Kabak lifi ile yapılan çalışmalara ait FTIR analizleri 1) Ön işlem görmüş kabak lifi, 2) Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, 3) Glutaraldehit ile muamele edilen kabak lifi, 4) Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi..... 182
Şekil 5.62	Pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalara ait FTIR analizleri 1) Ön işlem görmüş pirinç kabuğu, 2) Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, 3) Glutaraldehit ile muamele edilen pirinç kabuğu, 4) Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi 186

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması [19].....	22
Tablo 2.2	Enzim immobilizasyon destekleri [22].....	23
Tablo 2.3	Farklı kaynaklı β -galactosidase enzimleri [25, 26]	28
Tablo 2.4	Bazı besinlerin laktoz içerikleri [29]	32
Tablo 2.5	Anne sütünde bulunan enerji ve besin öğeleri [35]	35
Tablo 2.6	Süt türlerinin ortalama bileşimi (%) [34]	36
Tablo 2.7	Bazı doğal fiberlerin yoğunlukları [38]	41
Tablo 2.8	Kabak lifinin kimyasal özellikleri [38].....	41
Tablo 2.9	Pirinç kabuğunun kimyasal bileşimi [48].....	44
Tablo 2.10	Pirinç kabuğunun fiziksel özellikleri [48]	44
Tablo 2.11	Pirinç kabuğunun organik bileşenleri [49]	44
Tablo 3.1	Literatürde yer alan β -galactosidase enzimi ile yapılan immobilizasyon çalışmaları.....	52
Tablo 3.2	Literatürde yer alan kabak lifi üzerine immobilize edilen çeşitli enzimler ve immobilizasyon yöntemleri	58
Tablo 3.3	Literatürde yer alan pirinç kabuğu üzerine immobilize edilen çeşitli enzimler ve immobilizasyon yöntemleri	61
Tablo 4.1	KS 4000 ic control çalkalamalı inkübatöre ait teknik bilgiler [84]	64
Tablo 5.1	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri	101
Tablo 5.2	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri	106
Tablo 5.3	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri	111
Tablo 5.4	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri	116
Tablo 5.5	Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin depolama süreleri sonrasında relatif enzim aktivite deneysel verilerine uyan matematiksel ifadeler ve istatistik veriler	124
Tablo 5.6	Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri	132
Tablo 5.7	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	134
Tablo 5.8	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	138
Tablo 5.9	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	140

Tablo 5.10	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	143
Tablo 5.11	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	146
Tablo 5.12	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	148
Tablo 5.13	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	151
Tablo 5.14	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 prm).....	153
Tablo 5.15	İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait % geri kazanım değerleri.....	162
Tablo 5.16	Ansari ve Husain 2012 [90] tarafından yapılan çalışmada elde edilen % geri kazanım değerleri ile bu çalışmadan elde edilen değerlerin karşılaştırılması.....	164
Tablo 5.17	Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numuneleri için elde edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri	165
Tablo 5.18	Serbest ve immobilize β -galactosidase enzimlerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri	167
Tablo 5.19	Serbest ve immobilize β -galactosidase enzimlerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri.....	169
Tablo 5.20	İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrarlı kullanımları sonrasında % kalan enzim aktivite değerleri.....	172
Tablo 5.21	Farklı kaynaklı β -galactosidase enzimlerine Ca^{2+} iyonunun etkisi.....	173
Tablo 5.22	Serbest β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları	173
Tablo 5.23	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları	174
Tablo 5.24	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları	174
Tablo 5.25	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları	175
Tablo 5.26	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları	175

Tablo 5.27	İmmobilize β -galactosidase enzimleri kullanılarak laktoz çözeltisindeki ve anne sütündeki laktozun 30 dakikalık hidrolizi sonrasında % kalan laktoz miktarları	177
Tablo 5.28	Laktoz hidroliz prosesleri sonucunda elde edilen % laktoz hidroliz dereceleri	178
Tablo 5.29	Laktoz hidroliz prosesleri sonucunda β -galactosidase enzimine ait % kalan aktivite değerleri	179
Tablo 5.30	Kabak lifi ile yapılan çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları	183
Tablo 5.31	Pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları	187
Tablo 6.1	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler	190
Tablo 6.2	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler	191
Tablo 6.3	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler	192
Tablo 6.4	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler	193
Tablo A.1	Farklı ONPG konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri	208
Tablo A.2	Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri	208
Tablo A.3	Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 7, 300 rpm)	209
Tablo A.4	Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	209
Tablo A.5	Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 7)	210
Tablo A.6	Serbest β -galactosidase enzim stabilitelere ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 37 °C)	210
Tablo A.7	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 6, 300 rpm)	211
Tablo A.8	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	211
Tablo A.9	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelere ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH =6)	212
Tablo A.10	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelere ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 37 °C)	212
Tablo A.11	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 8)	213
Tablo A.12	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 40 °C)	213
Tablo A.13	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelere ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 8)	214

Tablo A.14	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 40 °C).....	214
Tablo A.15	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 8, 300 rpm).....	215
Tablo A.16	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 40 °C, 300 rpm)	215
Tablo A.17	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 8)	216
Tablo A.18	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 40 °C).....	216
Tablo A.19	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 8, 300 rpm).....	217
Tablo A.20	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)	217
Tablo A.21	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 8)	218
Tablo A.22	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 37 °C).....	218
Tablo A.23	İmmobilize enzim numunelerinin depolama kararlılığına ait değerler ...	219
Tablo A.24	İmmobilize enzim numunelerinin tekrar kullanımları sonucu elde edilen % kalan enzim aktivite değerleri.....	219
Tablo A.25	Serbest β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler.....	220
Tablo A.26	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler.....	220
Tablo A.27	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler.....	221
Tablo A.28	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler.....	221
Tablo A.29	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler.....	222

Tablo A.30	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri	222
Tablo A.31	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri ...	223
Tablo A.32	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri	223
Tablo A.33	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri ...	223
Tablo A.34	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri	224
Tablo A.35	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri ...	224
Tablo A.36	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri	224
Tablo A.37	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri ...	225

β -Galactosidase Enziminin Kabak Lifi Ve Pirinç Kabuğuna İmmobilizasyonunun Optimizasyonu: Laktoz Hidrolizinin İncelenmesi

Fatma Betül AKGÜL TANER

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Belma ÖZBEK

Bu çalışmada gıda sektöründe laktozu parçalayarak glukoz ve galaktoz monosakkaritlerinin oluşmasını sağlamak amacıyla kullanılan *Klyveromyces marxianus*'tan elde edilen ticari β -galactosidase [E.C.1.2.23] enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon prosesi fiziksel bağlama metodu ve taşıyıcının % 2.5'lik (v/v) glutaraldehit ile muamalesinden sonra fiziksel bağlama metodu olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı olarak ucuz, toksik özellik barındırmayan ve doğada oldukça bol miktarda bulunan atıklardan kabak lifi ve pirinç kabuğu kullanılmıştır.

İmmobilizasyon proseslerinden sonra elde edilen dört farklı immobilize β -galactosidase enzim numuneleri için aktivite cinsinden % geri kazanım değerleri, protein cinsinden % geri kazanım değerleri, aktivite cinsinden etkinlik oran değerleri, depolama kararlılıkları ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin tekrar kullanımları sonrasında % kalan enzim aktivite değerleri hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize edilen β -galactosidase enzim numuneleri için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri saptanmış ve Linewear-Burke grafiği kullanılarak enzim numunelerine ait V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisinde ve 72.8 g/L başlangıç laktoz konsantrasyonuna sahip anne sütünde laktoz hidroliz prosesleri gerçekleştirilmiş ve proses sonunda immobilize β -galactosidase enzimlerine ait % kalan enzim aktivite değerleri, % laktoz hidroliz dereceleri ve kalan laktoz miktarları hesaplanmıştır. Immobilize β -galactosidase enzimleri ile gerçekleştirilen hidroliz prosesleri sonunda laktoz çözeltisinde bulunan laktozun % 65-75 aralığında, anne sütündeki laktozun ise % 97-100 aralığında hidrolizlendiği görülmüştür.

İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin depolama süreleri sonrasında elde edilen relatif enzim aktivite değerleri, hidroliz prosesleri ile elde edilen laktoz konsantrasyonu, hidroliz derecesi ve enzim aktivite değerlerine ait elde edilen deneysel veriler kullanılarak ilgili matematiksel modeller kurulmuştur.

Sonuç olarak immobilizasyon prosesinde kullanılan kabak lifi ve pirinç kabuğunun doğada kolay bulunması ve atık olarak değerlendirilmesi, elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrar kullanılabilir olması, laktozu hidrolizlemesi gibi avantajları sebebiyle bu çalışmada elde edilen immobilize β -galactosidase enziminin gıda endüstrisinde laktozsuz gıda ürünlerinin üretiminde kullanılabilirliği görülmüştür. Böylece laktoz intoleransına sahip kişilerin tüketebileceği gıda çeşitliliğinin artmasına katkı sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: β -galactosidase enzimi, kabak lifi, pirinç kabuğu, enzim immobilizasyonu, laktoz hidrolizi

Optimization Studies on the Immobilization of β -Galactosidase Enzyme onto Loofa Sponge and Rice Husk: Application for Lactose Hydrolysis

Fatma Betül AKGÜL TANER

Department of Chemical Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Belma ÖZBEK

In the present study, the immobilization of commercial β -galactosidase enzyme [E.C.3.2.1.23] was obtained by utilizing *Kluyveromyces marxianus* which is used to break down lactose in the food sector. The immobilization process was carried out in two different ways: physical bonding method and physical bonding method after activated the carriers by 2.5 % (v/v) glutaraldehyde. Loofa sponge and rice husk were used as carriers since they are cheap, abundant in nature as a waste material and have non-toxic properties.

After immobilization processes, % recovery values in terms of protein and activity for four different immobilized enzymes were calculated. Additionally, efficiency rate values in terms of activity, the storage and % enzyme activity values were determined after the re-use of immobilized enzymes.. Optimum pH and temperature values were specified for free and immobilized β -galactosidase enzyme and via Lineweaver-Burke graph V_{max} and K_m values were calculated.

The lactose hydrolysis processes were in lactose solution prepared in 50 g/L concentration and in breast milk which has 72.8 g/L lactose concentration by using immobilized β -galactosidase enzymes and the remaining activity ratios (%), hydrolysis degrees (%) and

remaining lactose amounts were calculated. Immobilized β -galactosidase enzyme hydrolyzed 65-75 % of lactose in lactose solution and 97-100 % of lactose in breast milk.

Mathematical modelling studies were carried out for experimental values of relative enzyme activities after storage periods of immobilized β -galactosidase enzymes, lactose concentration, hydrolysis degree, enzyme activation.

To sum up, since loofah sponge and rice husk used in immobilization process are easy to find in nature and can be utilized as waste material and immobilized β -galactosidase enzyme obtained in this study is reusable, the products of this study are suitable to be used in lactose-free food production. In this way, this study can contribute to lactose-free food variation for persons having lactose intolerance.

Keywords: β -galactosidase enzyme, loofah sponge, rice husk, enzyme immobilization, lactose hydrolysis

1.1 Literatür Özeti

Enzim immobilizasyon teknolojisinin günümüz yeşil ve sürdürülebilir avantajları sebebiyle biyoteknolojik alandaki gelişimi hızla ilerlemektedir. Kimyasal ya da çevresel potansiyel kirleticiler sınıfında olan malzemelerin yerine, tekrar kullanılabilen, endüstriyel amaçlı kullanıma uygun olan stabilize enzimlerin kullanılması immobilize enzimleri daha çekici hale getirmiştir. Enzimlerin immobilize edilebileceği doğal ya da sentetik polimerler, inorganik materyaller gibi değişik destek materyalleri bulunmaktadır.

β -Galactosidase enzimi gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Bazı kişilerde süt ve süt ürünleri vücuda alındığında bedendeki enzimlerin yetersizliği sebebi ile sütteki laktozu sindirememekte, bu nedenle şişkinlik, ağrı, diare gibi sağlık sorunları ile karşılaşmaktadırlar. β -Galactosidase enzimi gıda endüstrisinde süt ve süt ürünlerindeki laktozu hidrolizlemek amacıyla kullanılır. Literatürde β -galactosidase enziminin çeşitli taşıyıcılar üzerinde immobilize edilerek, üretim maliyetlerinin düşürülmesini, raf ömrünün uzatılmasını, tekrar kullanılabilirliğinin artırılmasını, ortam şartlarına daha dayaklı olabilmesini sağlamak amacıyla hazırlanmış çalışmalar mevcuttur. Farklı taşıyıcılar kullanılarak immobilize β -Galactosidase enzimi elde ederek, daha avantajlı özelliklere sahip immobilize β -Galactosidase enzim üretimi sağlamak mümkün olabilecektir.

1.2 Tezin Amacı

Enzimler reaksiyon hızını ve spesifikliğini belirten, çoğunluğu protein yapısında olan organik katalizörlerdir. Enzimlerin endüstriyel alanlardaki kullanımın günden güne artması, enzimlerin maddi anlamda daha hesaplı ve daha etkin yöntemlerle üretilmesine vesile olmuştur. Kimyasal reaksiyonlarla karşılaştırıldığında, enzimatik reaksiyonlar herhangi bir ön işleme gerek duymaksızın, son ürünün bozulmadan kalması ve besinin yapısında ve içeriğinde herhangi bir kayba yol açmaması gibi sebeplerden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha fazla tercih edilmektedir. Bunun yanında, enzimatik reaksiyonlar daha ılımlı şartlarda gerçekleştiğinden proses için gerekli enerji maliyetlerini

düşürmekte ve gerekli ham madde ihtiyacını da azaltmaktadır. Enzimatik reaksiyonların en büyük dezavantajı ise enzimlerin maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak ancak enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini sağlamak ve raf ömrünü uzatmakla sağlanabilir. Enzimlerin bu denli kararlı hale getirilerek, enzim maliyetlerini azaltmak ise enzim immobilizasyonu ile sağlanabilir.

Enzimlerin immobilizasyonu, su içerisinde çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir ürün oluşturulmasıyla sağlanır. İmmobilize enzimlerin reaksiyon sonunda santrifüjleme, filtrasyon gibi yöntemlerle kolayca uzaklaştırılabilmesi, ürünlerin enzim tarafından kirletilmemesi, pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına daha dayanıklı olması, uzun süreli tekrar kullanılabilir olması ve raf ömrünün daha uzun olması gibi özellikleri immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri olarak söylenebilir.

Bu çalışmada; gıda endüstrisinde laktoz hidrolizinde kullanılan laktaz enzim grubundan β -galactosidase enziminin doğada oldukça bol miktarda bulunan atıklardan kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi; hazırlanan laktoz çözeltisi ve anne sütündeki laktozun hidrolizi için uygulanması hedeflenmiştir. Bu amaçla;

- Çalışmanın birinci aşamasında; kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine farklı immobilizasyon yöntemleri uygulanarak *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzimi immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon verimleri aktivite cinsinden ve protein cinsinden hesaplanarak, immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri incelenmiştir. Ayrıca, immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait K_m ve V_{max} değerleri, inhibitörsüz ortam ve % 5 $CaCl_2$ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için ayrı ayrı hesaplanmıştır.
- Çalışmanın ikinci aşamasında; immobilize edilen *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzim numunelerinin tekrar kullanılabilirlikleri ve depolama kararlılıkları incelenmiştir. Bu amaçla, inek sütünde bulunan % 5 oranındaki laktoz miktarı göz önünde bulundurularak, 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisinde ve başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütünde laktoz hidrolizi deneyleri gerçekleştirilerek hidroliz prosesi boyunca

laktoz konsantrasyonu, laktoz hidroliz derecesi değerleri ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

- Çalışmanın üçüncü aşamasında; immobilize edilen *Klyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzim numunelerinin karakterizasyon çalışmaları için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisi içerisinde bulunan laktozu en yüksek derece ile hidrolizleyen immobilize β -galactosidase enzimine ait immobilizasyon prosesi öncesi ve sonrası SEM analizi ile elde edilen yüzey morfolojileri incelenmiştir.

1.3 Hipotez

Doğal polimerler, anorganik polimerler ya da sentetik materyaller, enzim immobilizasyonu prosesleri için kullanılan materyallerdir. Serbest enzimler ile kıyaslandığında ortamdan uzaklaştırılmalarının kolay olması, tekrar kullanılabilir olmaları, daha kararlı olmaları, daha yüksek aktiviteye sahip olmaları gibi avantajlarından dolayı immobilize enzimlerin kullanımları tercih edilmektedir. Bu çalışmada; selülozik maddelerden oluşan ve doğada oldukça bol miktarda bulunan atıklardan kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine *Klyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzimi immobilize edilerek:

- Serbest β -galactosidase enzimine göre daha avantajlı immobilize β -galactosidase enziminin oluşturulması,
- Immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile süt ve süt ürünlerindeki laktozun hidrolizlenerek glukoz ve galaktoza dönüşmesini sağlayarak laktoz intoleransına sahip insanların laktozsuz ürünleri tüketebilmeleri için katkı sağlanması,
- Doğuştan laktoz intoleransına sahip bebeklerin anne sütü tüketimlerini sağlamak için anne sütündeki laktozun immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile hidrolizinin gerçekleştirilmesi ile bebeklerin anne sütünü tüketmeleri,

hedeflenmiştir.

2

GENEL BİLGİLER

2.1 Enzimler

Dokuların yenilenmesi, harabiyete uğraması, hücre solunumu, adele kontraksiyonu gibi birçok önemli fizyolojik faaliyetler enzimler tarafından gerçekleştirilmekte ve dolayısıyla hayatın idamesi bir dizi biyokimyasal reaksiyonların meydana gelmesi ile sağlanmaktadır. Laboratuvar ortamında kimyasal reaksiyonların gerçekleştirilebilmesi için yüksek ısı, yüksek pH ve bazı kimyasal maddelere ihtiyaç duyulurken, hayatın idamesi için gerekli olan kimyasal reaksiyonlarda 37-38 °C gibi düşük sıcaklıklara, atmosferik basınca ve nötral pH ortamına gerek duyulmaktadır. İşte bu kimyasal reaksiyonların olması enzim olarak adlandırılan biyolojik katalizörlerle sağlanabilmektedir [1].

Enzimler, kimyasal reaksiyonlarda aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar, bu sebeple hücre içerisinde tekrar tekrar kullanılabilirler, reaksiyon sonunda ise bozunmadan kalırlar. Bütün enzimler protein yapılıdır. Enzimler sayesinde gerçekleşen reaksiyonlar çok hızlı cereyan eder. Enzimler sayesinde kimyasal reaksiyonlar 10^8 - 10^{11} defa daha fazla hızlandırılabilir [2].

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en büyük farkı, enzimlerin kendilerine özgü olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize eden doğal katalizörler olarak adlandırılırlar.

2.1.1 Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimlerin genel özellikleri aşağıda sıralanmıştır [3]:

- Enzimler protein yapısında doğal katalizörlerdir.
- Etki ettiği maddenin sonuna “-az” eki getirilerek veya katalizlediği reaksiyonun türüne göre isimlendirilirler.
- Su içerisinde veya sulandırılmış tuz çözeltileri içerisinde çözülebilirler.

- Substrat enzimin etki ettiği bileşik olarak tanımlanır. Bazı enzimler spesifikliğinden dolayı sadece bir substrata etki edebilirken, bazı enzimler birden fazla substrata etki edebilirler.
- Enzimler hücrede bir takım halinde çalışırlar. Bir enzimden elde edilen son ürün, kendinden sonraki enzimin substratını oluşturur.
- Enzimatik reaksiyonlar kuramsal olarak dönüşlüdür. Enzim, reaksiyonun yönünü değil dengenin oranını saptar. Denge noktası, yani reaksiyonun hangi yöne gideceği termodinamik yasalara göre saptanır.

Enzimler çoğunlukla protein yapısındaki moleküllerdir. Fakat çoğu durumlarda söz konusu proteine, protein olmayan daha küçük yapılı organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla olmuş proteid yapısı gözlenir. Bu durumda enzimin protein kısmı “Apoenzim” protein olmayan kısmı ise “Prostetik Grup” veya “Koenzim” olarak adlandırılır.

Enzimlerin protein kısmı yirmi aminoasitten meydana gelir. Ancak çoğu enzimin protein zincirinde bulunan amino asitlerin R gruplarında bazı kimyasal değişiklikler oluşabilmektedir. Bazen de protein zincirine karbonhidrat, lipit, bazı organik moleküller ya da metal iyonları bağlanabilir.

Enzimlerin amino asit dizilim sırasının belirlenmesi ile enzimlerin primer yapısı aydınlatılabilir. Çoğu enzim uzun polipeptit zincirlerinden oluştuğu için amino asit dizilimlerinin belirlenmesi çok zaman alabilir. Bu durumda en iyi yöntem o enzimin yapı genini ve onun DNA dizisini belirlemek ve dolaylı olarak primer yapıya ulaşmaktır.

Enzimlerin yapılarının belirlenmesinde ikinci adım sekonder yapının belirlenmesidir. Sekonder yapı, bir protein zincirindeki aminoasitlerin R grupları dikkate alınmaksızın zincirin uzaydaki konformasyonunu ifade eder.

Enzimlerin yapılarının belirlenmesinde üçüncü adım, üç boyuttaki yapının oluşumunda etkili olan tersiyer yapının belirlenmesidir. Enzimin protein zincirinde yer alan amino asitlerin hem R gruplarının dikkate alınması ile hem de uzaydaki konformasyonunun belirlenmesi ile tersiyer yapı belirlenir.

Enzimlerin yapılarının belirlenmesinde dördüncü adım ise kuaterner yapının aydınlatılmasıdır. Pek çok enzim polipeptit zincirlerinden meydana gelir. Bunlar

arasındaki ilişki ve toplam molekülün uzaydaki konformasyonu onun kuaterner yapısını oluşturur [4].

Enzimatik reaksiyon hızına etki eden faktörler aşağıda sıralanmıştır [1]:

- Enzim konsantrasyonu
- Substrat konsantrasyonu
- pH (Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması)
- Sıcaklık
- Reaksiyonda meydana gelen ürünler
- Işık ve diğer fiziksel faktörler
- Zaman

Enzimatik reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yani enzim miktarı ne kadar fazla ise tepkimenin hızı da o denli fazladır. Örneğin enzim miktarı iki katına çıkarılırsa reaksiyon hızı da iki katına çıkar. Bu açıklama Denklem 2.1 ile formüle edilmiştir.

Burada;

$$V = \frac{\text{Son ürün miktarı}}{\text{Reaksiyon süresi}} = K \times E \quad (2.1)$$

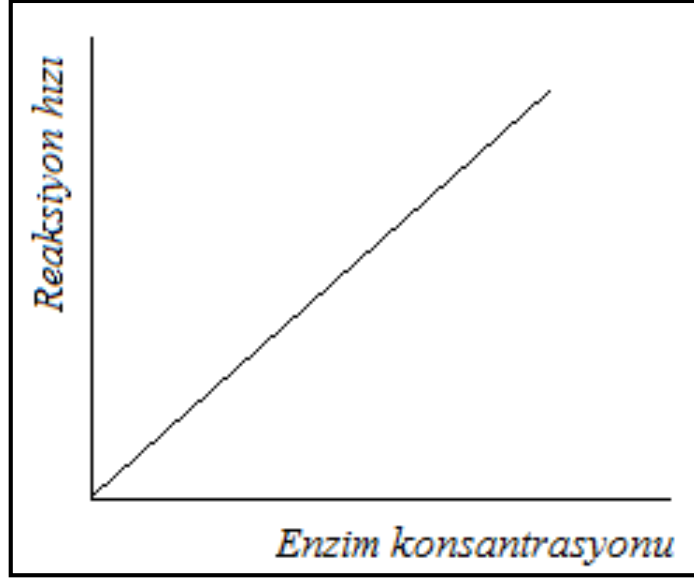
V = Reaksiyon hızı

K = Orantı sabiti

E = Enzim konsantrasyonu

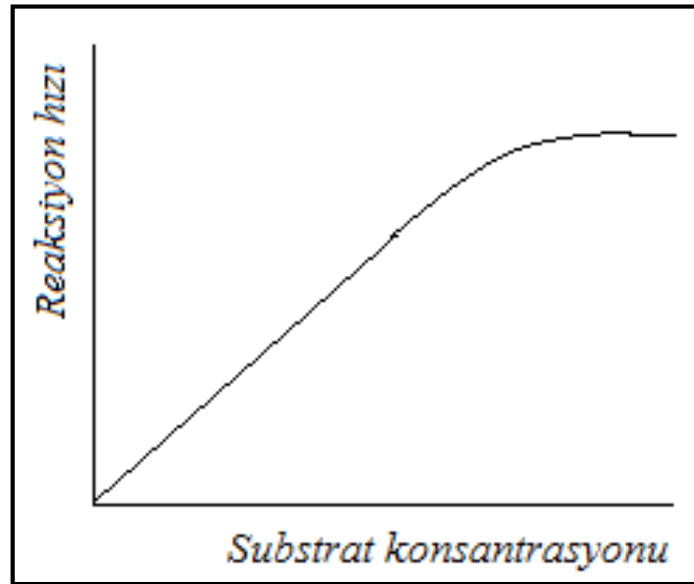
olarak tanımlanmıştır.

Reaksiyon başlangıcında sağlanan bu orantı reaksiyon sonunda bu şekilde devam etmez. Bunun sebebi enzimin saf olmamasıdır. Belli bir noktadan sonra enzim konsantrasyonu ne kadar artırılırsa artırılın, reaksiyon hızı değişmeyecektir. Şekil 2.1’de enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi gösterilmiştir.



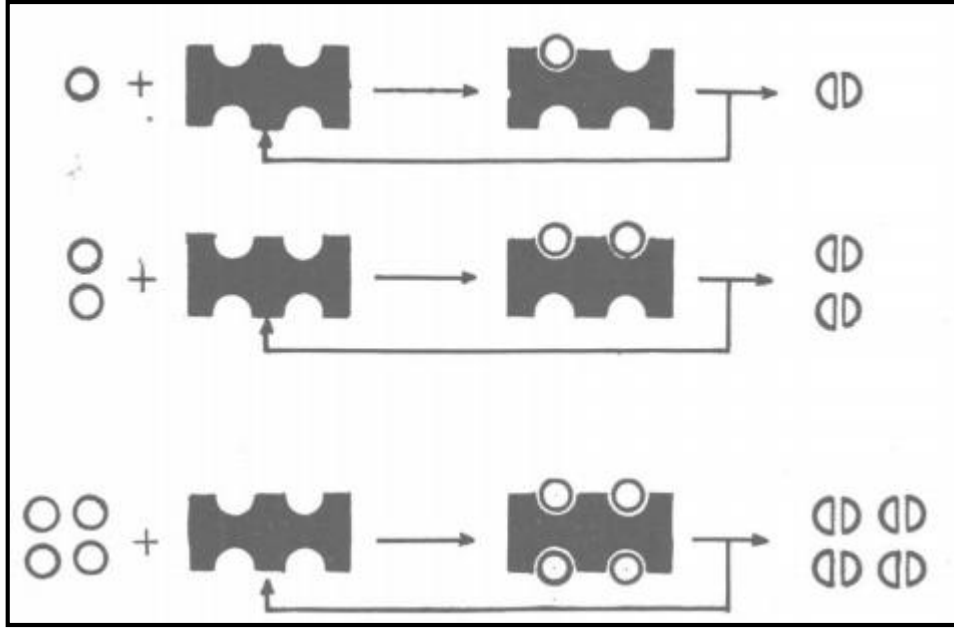
Şekil 2.1 Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi

Enzim miktarı sabit kaldığı sürece reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı olarak artar. Başlangıçta lineer bir artış gözlenirken, belli bir noktadan sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artırılırsa arttırılsın, reaksiyon hızı değişmeyecektir ve reaksiyon hızı hiperbolik bir grafik ile ifade edilecektir. Şekil 2.2 reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



Şekil 2.2 Substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızının değişimi

Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi şematik olarak Şekil 2.3'te gösterilmiştir [1]. Şekil 2.3'te dört aktif yüzlü bir enzimin üç farklı konsantrasyondaki substrat ile etkileşiminden sonra, her substratın çift parçalara bölündüğü görülmektedir. Üstteki şekilde en düşük konsantrasyondaki substrat enzimin aktif yüzündeki yalnız bir kısım ile etkileşmektedir. Substrat konsantrasyonunun artması ile enzimin aktif yüzündeki bağlanma artmakta ve bu durum enzimin aktif yüzünün artan substrat ile doyunlaşmasına kadar devam etmektedir. Üst ve alt kısımdaki şekiller Şekil 2.3'teki diyagramın lineer bir şekilde yükselen kısmına tekabül etmektedir.

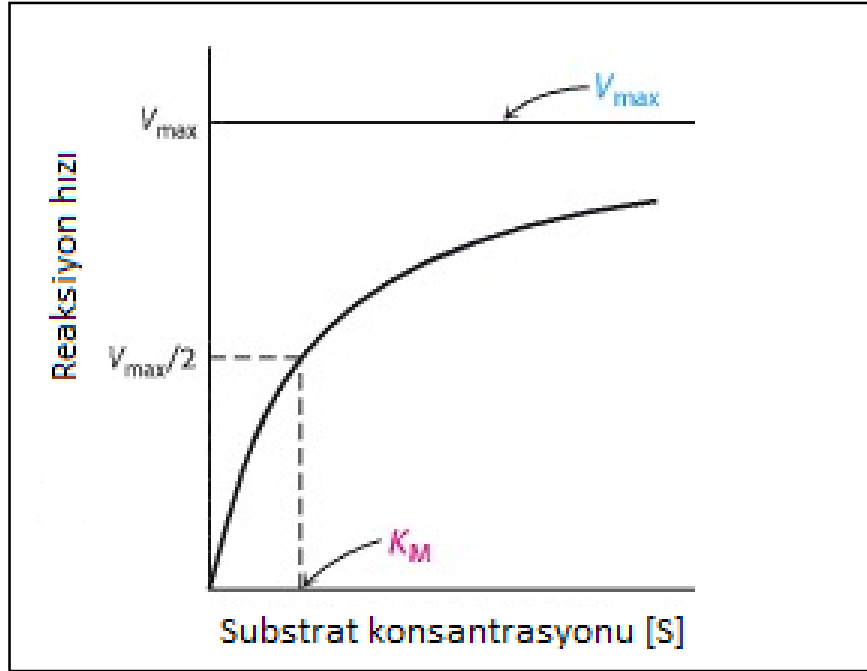


Şekil 2.3 Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisinin şeması [1]

Şekil 2.4; enzimin aktif yüzünün substrat ile tamamen doymasından sonra artık substrat miktarı daha da artırılırsa reaksiyon hızının artmadığını göstermektedir. Yani reaksiyon bu doyunluktan sonra aynı hızda devam edecektir. Şekil 2.4'te bulunan eğrinin ilk lineer kısmı enzim etki hızının substrat ile doğru bir orantı gösterdiği kısımdır. Burada belirli bir zamandaki reaksiyon hızı o anda ortamda bulunan substrat konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu orantıya göre substrat konsantrasyonu azalır ise reaksiyon hızı da azalır. Bu orantı desimal logaritmaya çevrilirse, verilen herhangi bir zamandaki (t) substrat konsantrasyonu (S) ile sıfır zamandaki substrat konsantrasyonu (S_0) arasında Denklem 2.2 oluşturulmuştur. Bu denkleme göre substrat konsantrasyonu zamanla logaritmik olarak azalmaktadır [1].

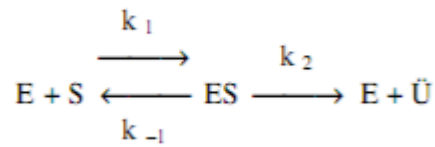
$$\log(S) = \log(S_0) \frac{-kt}{2.303} \quad (2.2)$$

Enzimin reaksiyon hızına karşı (V) substrat konsantrasyonu (S) çizilirse hiperbolik bir eğri ortaya çıkar. Michealis-Menten grafiği Şekil 2.4'te gösterilmiştir [5].



Şekil 2.4 Michaelis-Menten grafiği [5]

Enzim-substrat (ES) kompleksine ait reaksiyon,



Burada;

E = Enzim

S = Substrat

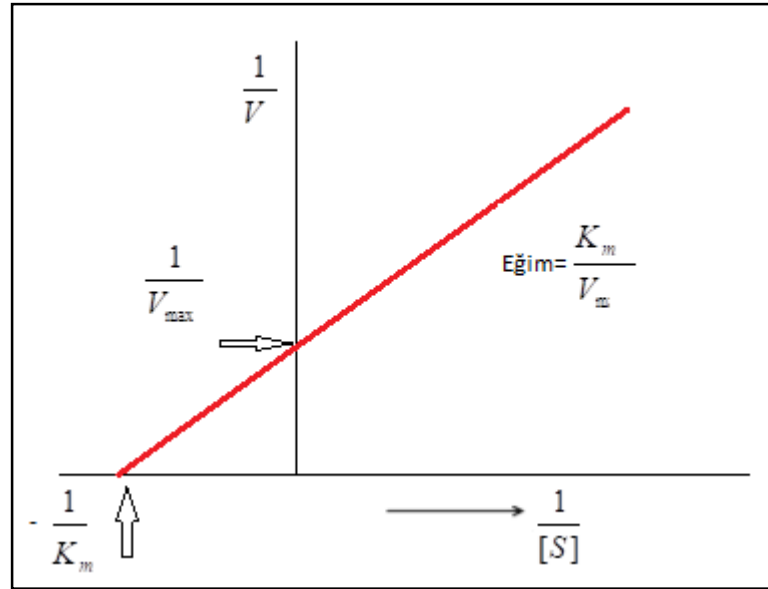
ES = Enzim-Substrat kompleksi

$\ddot{U}$ = Ürün

olarak tanımlanmıştır. Enzimin tepkime hızı Michaelis-Menten eşitliği ile Denklem 2.3'te verilmiştir.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.3)$$

V_{max} değerini belirlemek için Michealis Menten eşitliğinin her iki tarafı 1'e bölünerek Lineweaver-Burk eşitliği olarak adlandırılan bir doğru denklemi elde edilir (Şekil 2.5) [4-5].



Şekil 2.5 Linewear Burke grafiği [5]

Lineweaver-Burk denklemi aşağıda verilen denklemlerdeki adımlarla ortaya çıkarılmıştır. Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen Lineweaver-Burk denklemi K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında en sık kullanılan denklemdir.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.4)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} \quad (2.5)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad (2.6)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.7)$$

Burada;

V_0 = Başlangıç hızı

V_{max} = Maksimum hız

K_m = Michaelis-Menten sabiti

S = Substrat konsantrasyonu

olarak tanımlanmıştır.

Enzimin reaksiyon hızı, ortam pH'ına bağlıdır. Belirli bir pH aralığında enzimin etkisi daha fazladır. Bir enzim için aktivitenin en fazla olduğu pH'a enzimin optimum pH'ı denir [6].

Enzimatik reaksiyonlarda başlangıçta sıcaklık artışı ile aktivitede artış gözlenir. Fakat belirli bir sıcaklık değeri aşıldıktan sonra enzimler de proteinler gibi denatüre olur ve aktivitelerini kaybederler. Her enzimin birim zamanda substrat ile ES kompleksini oluşturduğu optimum bir sıcaklık değeri vardır.

Enzimatik reaksiyonlarda meydana gelen ürünler aktivatör ya da inhibitör olarak davranış sergileyebilirler. Herhangi bir ürün enzimin aktif merkezine bağlanarak reaksiyon hızını artırabilir ya da azaltabilir.

Fiziksel faktörler ile örneğin karıştırıcı hızının artışı ile enzim aktivitesi olumsuz etkilenmektedir. Bazı enzimlerin yapısı ışık altında zarar görebilmektedir.

Enzim katalizli reaksiyon yürürken tepkimenin hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında tepkimeye girerek ters yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu inhibe eden maddelerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir [5].

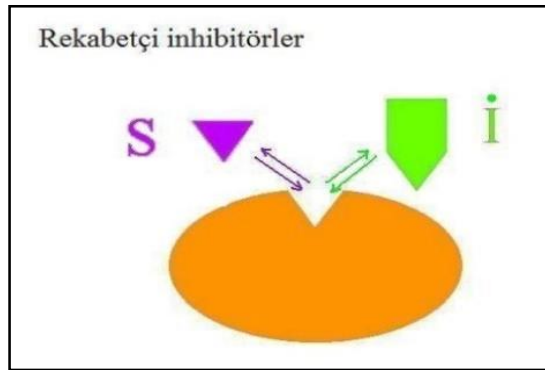
2.1.2 Enzim İnhibisyonu

Enzim katalizli reaksiyonun hızını azaltan maddelere inhibitör denir. Enzim inhibisyonu, enzimatik bir reaksiyona ait hızın inhibitörler tarafından azaltılması veya durdurulmasıdır.

2.1.2.1 Kompetetiv (Yarışmalı) İnhibisyon

Yarışmalı inhibitör, substrat bağlanmasını engelleyecek bir tarzda serbest enzimle bağlanan bir maddedir. Gerçek substratın metabolize olmayan bir benzeri veya bir türevi, bir başka substrat veya reaksiyon ürünü olabilir.

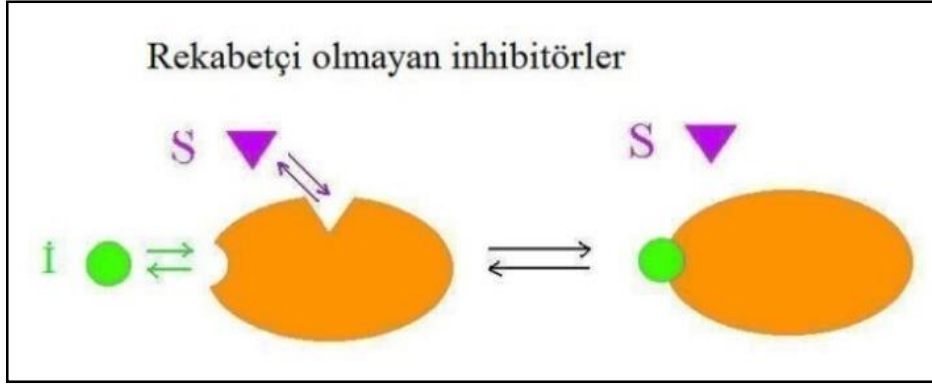
Kompetetiv inhibitörün etki şekli farklı şekillerde gerçekleşebilir; tek bir bağlanma merkezi için substratla yarışabilir, sterik bir etki oluşturarak substrat bağlanmasını engelleyebilir, ortak bir bağlanma merkezi için sterik etki veya rekabet oluşturabilir, allosterik etki ile enzim konformasyonunda değişiklik yapabilir [4]. Yarışmalı enzim inhibisyon kinetiğinde enzimin substrata olan ilgisi azalmaktadır. Artan substrat konsantrasyonu ile inhibisyon geri dönmektedir. K_m değeri artarken V_{max} değerinde herhangi bir değişme gözlenmez [6].



Şekil 2.6 Rekabetçi inhibitör [7]

2.1.2.2 Nonkompetetiv (Yarışmasız) İnhibisyon

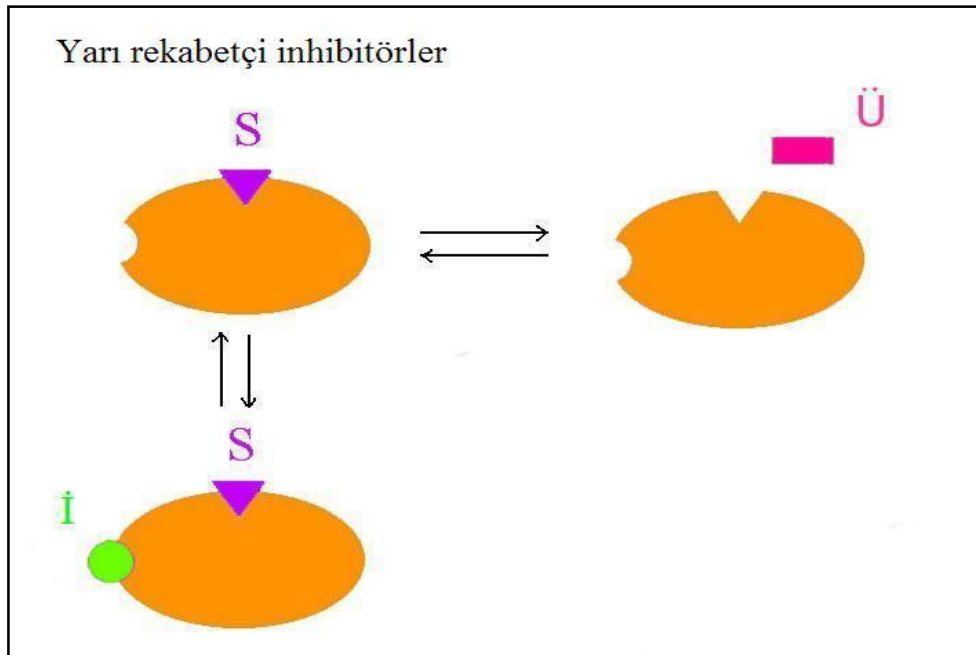
Eğer bir inhibitör enzime aktif merkezin dışındaki bir bölgesinden bağlanarak inhibisyona neden oluyorsa bu tip inhibitöre nonkompetetiv inhibitör, meydana gelen inhibisyona nonkompetetiv inhibisyon denir. Nonkompetetiv inhibisyonun bir kısmı geriye dönüşlü bir kısmı ise geriye dönüşsüzdür. Nonkompetetiv enzim inhibisyonunda V_{max} değeri azalırken, K_m değeri değişmez [5]. Şekil 2.7’de rekabetçi olmayan inhibitörün reaksiyon içindeki hareketi gösterilmiştir [7].



Şekil 2.7 Rekabetçi olmayan inhibitör [7]

2.1.2.3 Unkompetetiv (Yarı Rekabetçi) İnhibisyon

Yarı rekabetçi inhibitörler enzim substrat kompleksine bağlanırlar. İnhibitör serbest enzime bağlanamadığından tek substratlı sistemlerde unkompetetiv inhibisyona nadiren rastlanır. Daha çok substratlı enzimler için geçerlidir. Çünkü tek substratlı sistemlerde ES kompleksi oluşumu ile enzim üzerindeki bağlanma merkezleri dolmuş olur [4]. Şekil 2.8’de yarı rekabetçi inhibitörün reaksiyon içindeki hareketi gösterilmiştir [7].



Şekil 2.8 Yarı rekabetçi inhibitör [7]

2.2 Enzim İmmobilizasyonu

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Bununla birlikte, serbest enzimin yeniden kullanımı da söz konusu değildir. Bu durum ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükseltmektedir. Serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Tüm bu sorunları çözümleyebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır [4, 8-10].

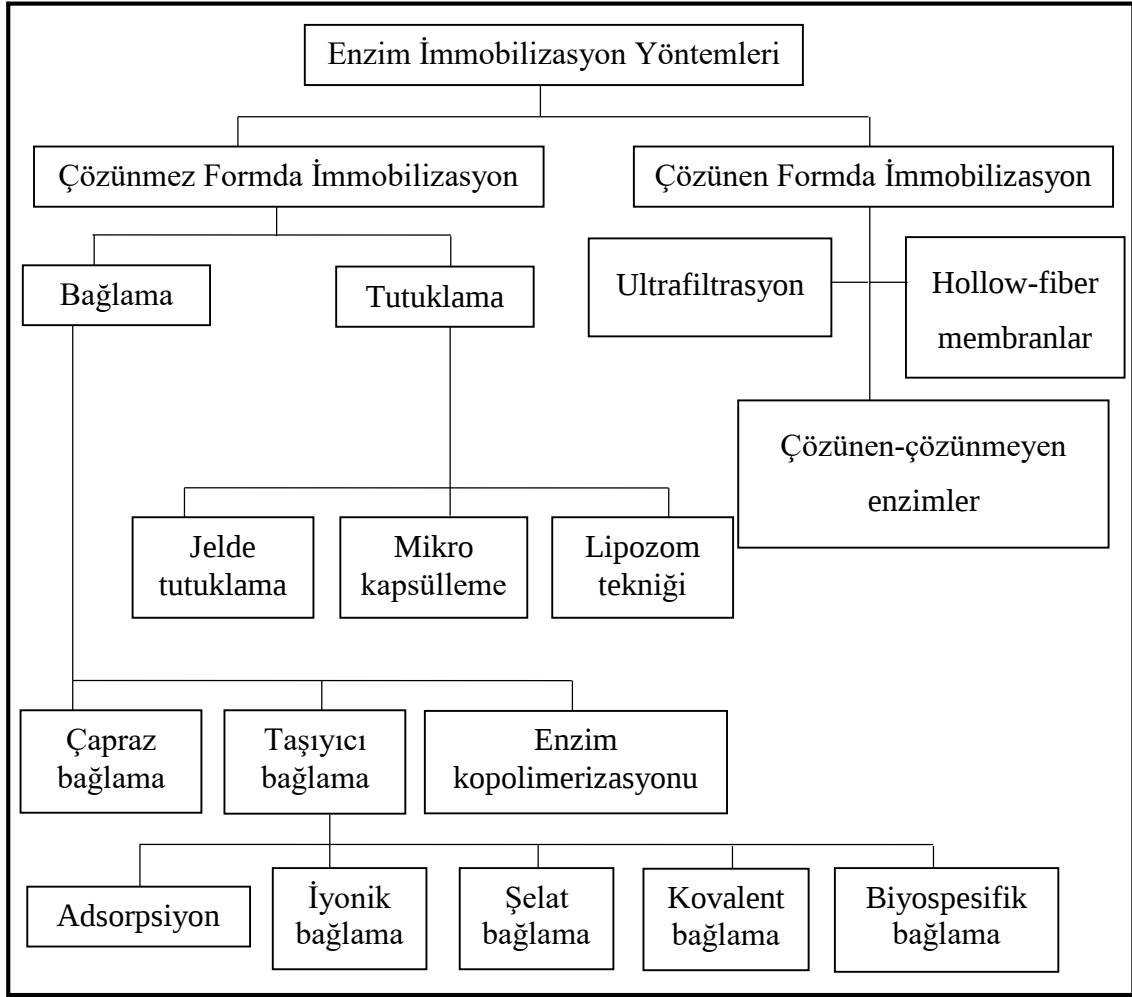
Suda çözünen ve çözeltide serbest halde hareket edebilen enzim moleküllerinin; suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya bağlanarak, suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılara adsorplanarak, bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matriste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılması olayına immobilizasyon denir. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere olan üstünlükleri [4, 9, 11];

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmesi ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşturmaması
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık, vb.) karşı daha dayanıklı olması
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilmesi
- Doğal enzime kıyasla daha kararlı olması
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir olması
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygun olması
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilmesi
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığının azalması
- Mekanistik çalışmalar için uygun olması

olarak sıralanabilir.

2.2.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimin immobilizasyonu sırasında enzimlerin aktif merkezlerinin kapatılmamasına dikkat edilmeli, substrat ve ürün difüzyonları da göz önüne alınarak en uygun yöntem seçilmelidir. En yaygın enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.9'da verilmiştir [4].



Şekil 2.9 Enzim immobilizasyon yöntemleri [4]

2.2.1.1 Çözünmez Formda İmmobilizasyon

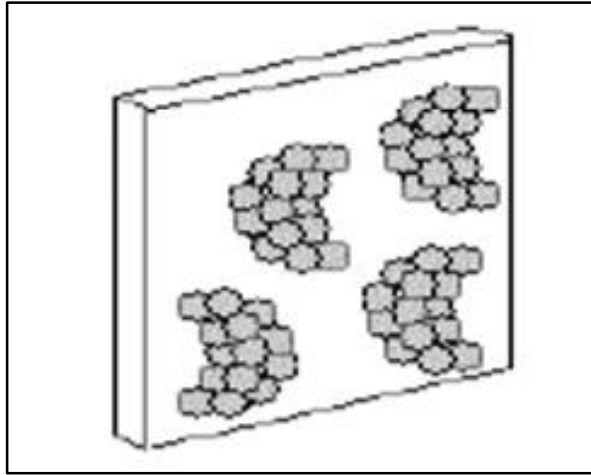
Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri, bağlama ve tutuklamadan oluşmaktadır. Çözünmez formda immobilizasyon yöntemlerinden bağlama yöntemi; çapraz bağlama, taşıyıcı bağlama veya enzim kopolimerizasyonu ile gerçekleştirilir. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifi glutaraldehitir [4].

Çapraz bağlama küçük moleküllü bir veya multifonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Bu yöntemle enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir. Bunlar;

- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer ile reaksiyonu

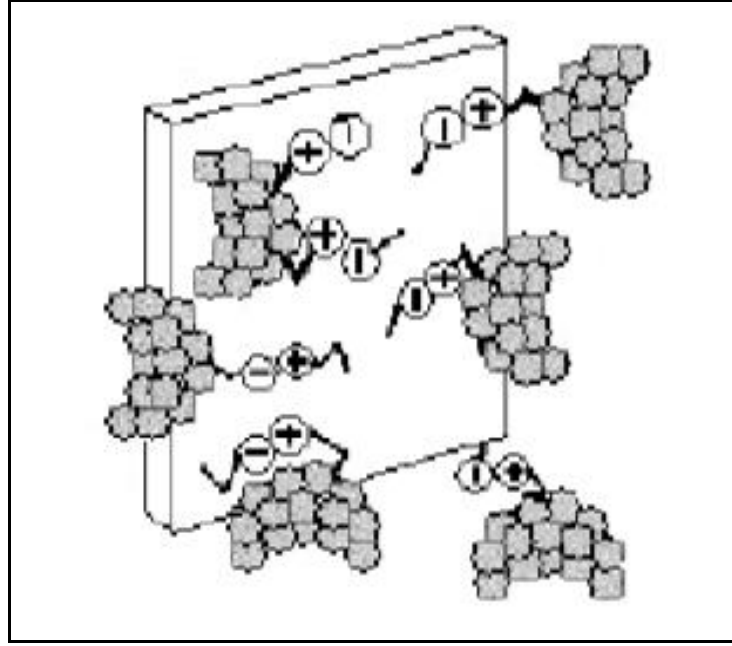
olarak sıralanabilir.

Taşıyıcı bağlama ile enzim immobilizasyonu adsorpsiyon, iyonik bağlama ve kovalent bağlama ile gerçekleştirilebilir. Adsorpsiyon yöntemi enzimlerin yakalanmasında en uygun metottur. İlk kez invertaz enzimi aktif kömür üzerine adsorbe edilerek özellikleri incelenmiştir. Bu yöntem enzimlerin taşıyıcı yüzeyinde adsorblanması prensibine dayanır. Adsorban olarak aktif karbon, bentonit, silikatlı bileşikler, cam, bazı metal tuzları, metal oksitler, organik polimerler, selüloz ve türevleri kullanılır [4, 12, 13]. Şekil 2.10'da adsorpsiyon metodu ile katalizörün taşıyıcıya bağlanması gösterilmiştir [14].



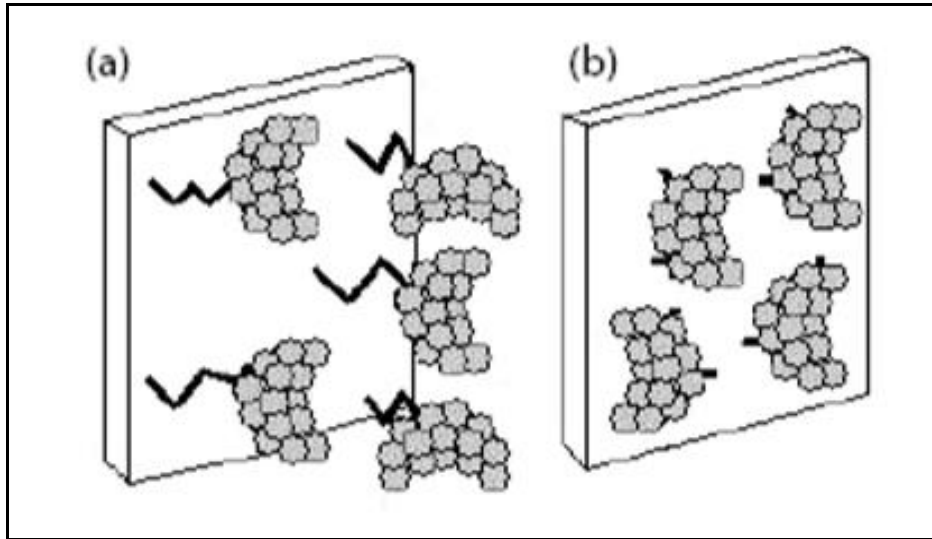
Şekil 2.10 Adsorpsiyon metodu ile katalizörün taşıyıcıya bağlanması [14]

İyonik bağlama yöntemi iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanır. Şekil 2.11'de katalizör ve taşıyıcı arasındaki iyonik bağlanma gösterilmiştir [14].



Şekil 2.11 Katalizör ve taşıyıcı arasındaki iyonik bağlanma [14]

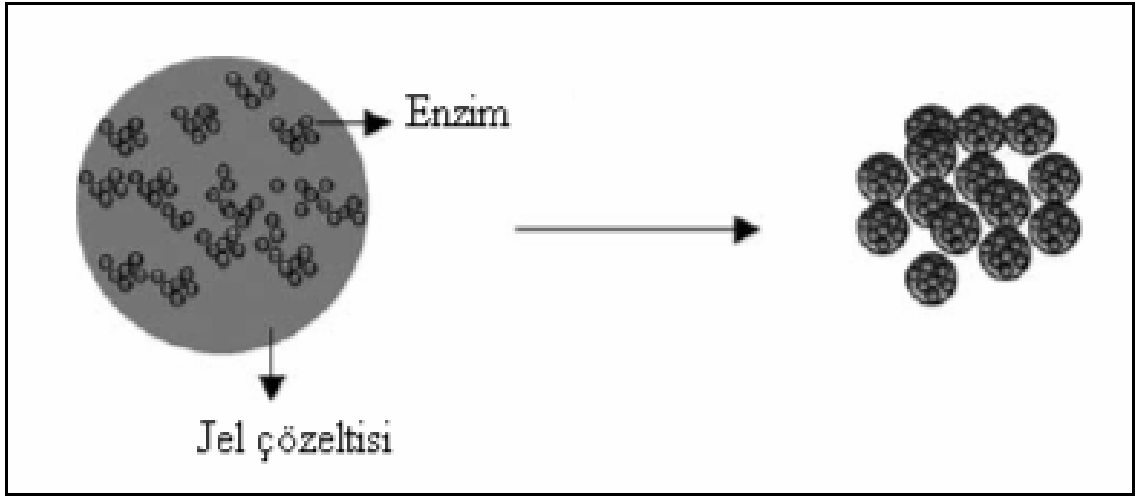
Kovalent bağlama yöntemi ile enzimler çeşitli taşıyıcılara genellikle organik moleküllere kovalent olarak bağlanırlar. Kovalent bağlanma enzim proteinlerindeki çeşitli gruplar sayesinde olur [4, 14]. Şekil 2.12'de katalizör taşıyıcıya kovalent bağlanması gösterilmiştir.



Şekil 2.12 Katalizörün taşıyıcıya kovalent bağlanması [15]

Enzim kopolimerizasyonu ile enzim immobilizasyonu yönteminde enzimler kopolimerizasyon sırasında kopolimerin bir kısmını oluştururlar. Kopolimerizasyon için maleikasit anhidrit ve etilen gibi düşük molekül ağırlıklı monomerlerden faydalanılır [4].

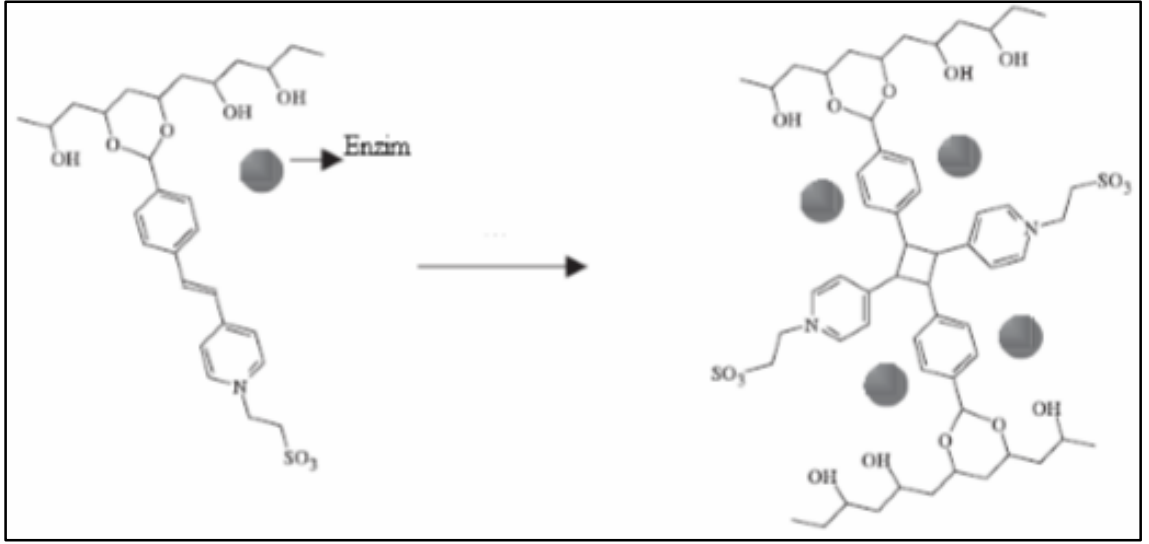
Çözünmez formda immobilizasyon yöntemlerinden tutuklama yönteminde enzim molekülü belirli bir ortamda durmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matris içindeki kafeslerde gerçekleştiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir [4]. Şekil 2.13'te enzimin tutuklama yöntemiyle immobilizasyon şeması verilmiştir [16].



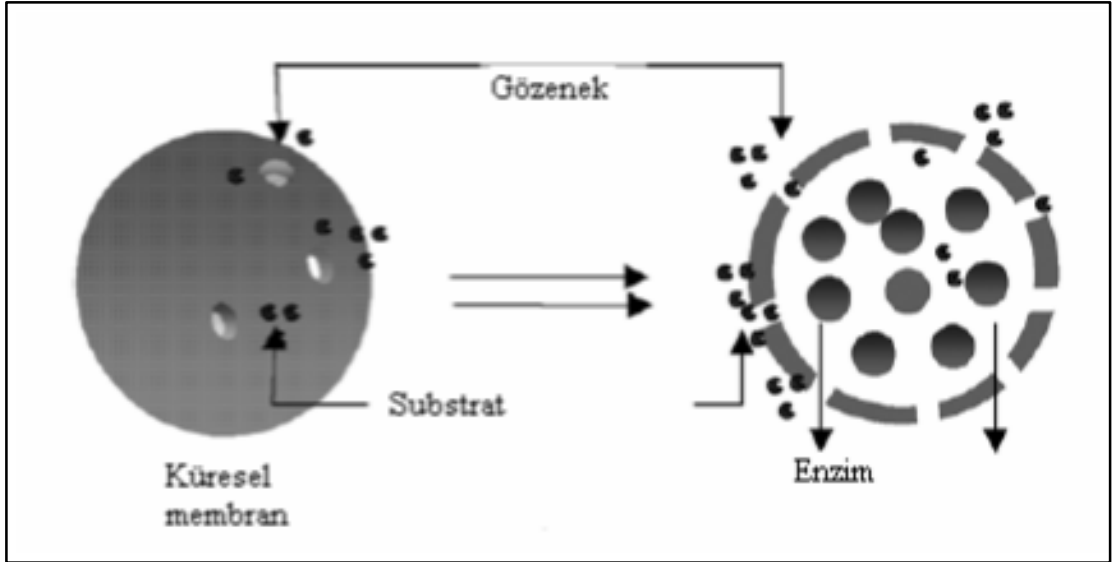
Şekil 2.13 Enzimin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu [16]

Tutuklama yöntemi polimer matriste tutuklama ve mikrokapsülleme ile gerçekleştirilebilir. Bunlardan polimer matriste tutuklama yönteminde enzimler yapay ya da doğal polimerler içerisindeki kafesler içerisine sokularak tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer poliakrilamidir. Yöntem yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır [4, 17]. Şekil 2.14'te enzimin polimerler arasında tutuklanması gösterilmiştir [16].

Tutuklama yöntemlerinden mikrokapsülleme yönteminde ise enzimlerin çevresinde çapı 1 mikron ya da daha büyük genellikle 5 ile 300 mikron arasında olan polimer yapıları zarlar (membran kapsüller) oluşturulur. Kapsül zarı enzimlerin çözeltiye geçmelerini önler. Zarın geçirgenliği reaksiyona girecek küçük molekülü substratlar ile oluşan ürünlerin kolaylıkla geçmesine elverişlidir [4]. Şekil 2.15'te mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir [16].



Şekil 2.14 Enzimin polimerler arasında tutuklanması [16]

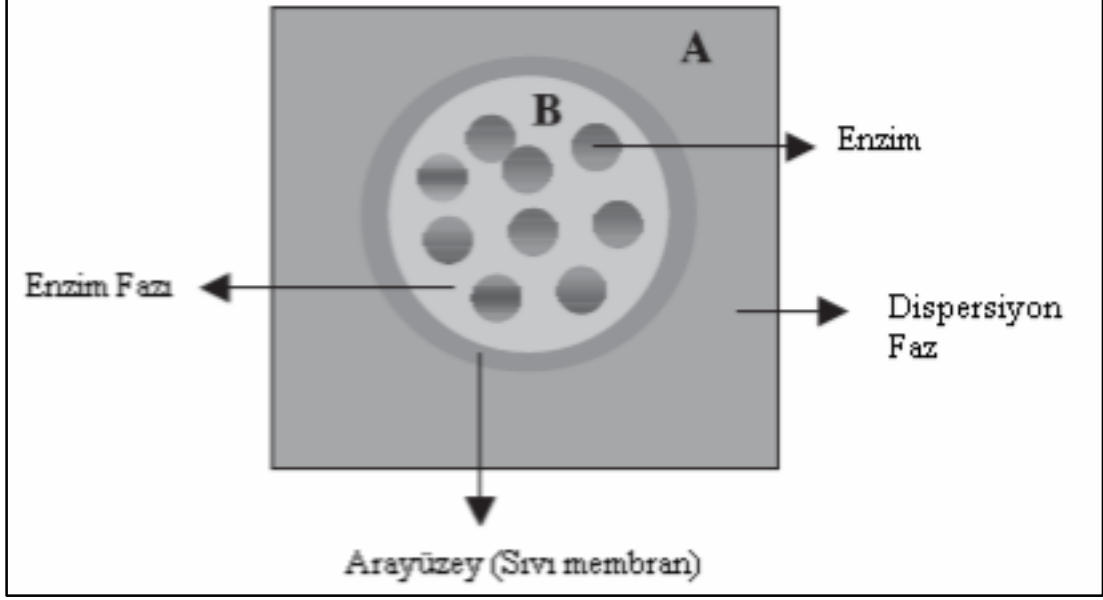


Şekil 2.15 Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu [16]

2.2.1.2 Çözünen Formda İmmobilizasyon

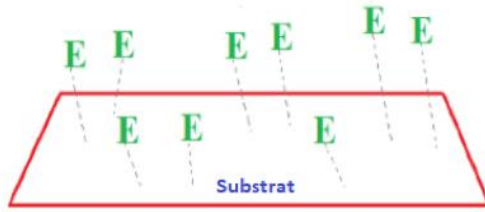
Çözünen formda immobilizasyon prosesinde enzim, fiziksel ya da kimyasal olarak bir taşıyıcı ile etkileşir. Bu etkileşim, enzime geçirgen bir zar ile çevrelenme özelliği sağlayarak, enzimin hareket alanının genişletilmesini sağlar. Enzim taşıyıcıya herhangi bir noktadan bağlanmaz. Bu nedenle enzimin moleküler geometrisi, esnekliği ve katalitik etkinliği değişmez. Fakat substrat enzime ulaşırken, membrandan geçerken zorluk yaşayabilmektedir. Bu sebeple, çözünen formda immobilizasyon yöntemini uygulamak için, substratın küçük moleküllerden oluşması avantaj sağlayacaktır [18].

Şekil 2.16'da çözünen formda enzim immobilizasyon yöntemi gösterilmiştir [16]. İmmobilizasyon yöntemlerinde enzim substrat ilişkisinin görsel olarak karşılaştırılması Şekil 2.17'de verilmiştir [19]. İmmobilizasyon yöntemlerinin hazırlama, enzim aktivitesi, substrat spesifikliğı, bağlanma gücü, genel uygulanabilirlik ve rejenerasyon açısından karşılaştırılması Tablo 2.1'de verilmiştir [19].

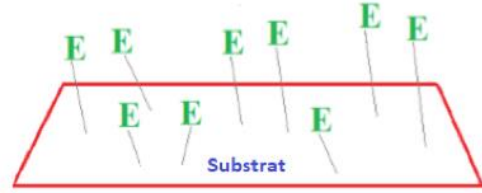


Şekil 2.16 Çözünen formda enzim immobilizasyonu [19]

Fiziksel Yöntem ile İmmobilizasyon



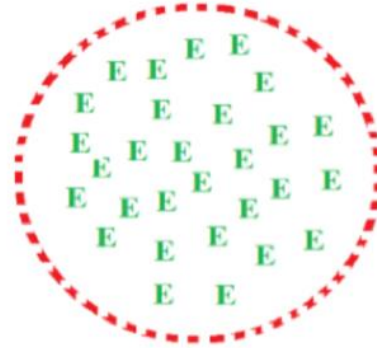
Kovalent Bağlama
Metodu ile İmmobilizasyon



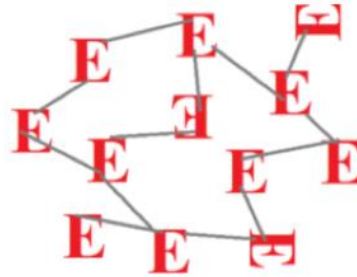
Tutuklama Yöntemi ile
İmmobilizasyon



Kapsülleme Yöntemi ile
İmmobilizasyon



Çapraz Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon



Şekil 2.17 İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [19]

Tablo 2.1 İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması [19]

Özellik	İmmobilizasyon yöntemi				
	Fiziksel bağlama	Kapsülleme	Kovalent bağlama	Çapraz bağlama	Hapsetme
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Enzim aktivitesi	Düşük	Yüksek	Yüksek	Değişken	Yüksek
Substrat spesifikliğı	Değişken değil	Değişken değil	Değişken	Değişken	Değişken değil
Bağlanma gücü	Zayıf	Orta	Güçlü	Güçlü	Güçlü
Rejenerasyon	Mümkün	Mümkün	İmkansız	İmkansız	İmkansız
Genel uygulanabilirlik	Düşük	Orta	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon maliyeti	Düşük	Düşük	Yüksek	Orta	Düşük

2.2.2 Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Proteinler, doğal ya da sentetik polimerler, aktif karbonlar, organik immobilizasyon destekleri olarak gruplandırılabilirler. Polisakkarit türevlerinin kullanılması, hidroksil grupları içermesi sebebiyle avantaj sağlamaktadır. Çünkü enzimlerdeki elektrofilik gruplar, hidroksil gruplarla etkileşim sağlayarak immobilizasyonu gerçekleştirirler [20, 21]. Enzim immobilizasyon destekleri doğal polimerler, anorganik polimerler ve sentetik malzemeler olmak üzere Tablo 2.2'de verilmiştir [22].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan özellikler aşağıda sıralanmıştır [20]:

- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme

- Gözenekli yapı
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal stabilite
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Ucuzluk
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

Tablo 2.2 Enzim immobilizasyon destekleri [22]

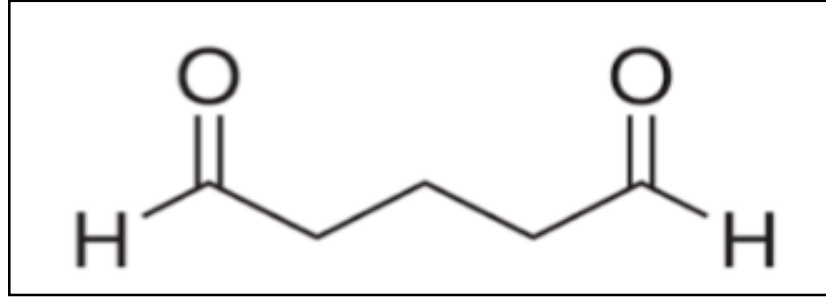
Doğal polimerler	Anorganik polimerler	Sentetik malzemeler
Selüloz	Cam	Naylon
Jelatin	Kil	Polistiren türevleri
Nişasta	Bentonit	Poliakrilamit
Kitosan	Nikel oksit	Vinil alil polimeri
Dekstran	Hidroksiapatit	Maleik-Anhidrit polimeri
Agaroz	Aktif karbon	Oksiranlar
İpek	Metaller	Metakrilat
Albümin	Ponza taşı	-

2.3 Glutaraldehit

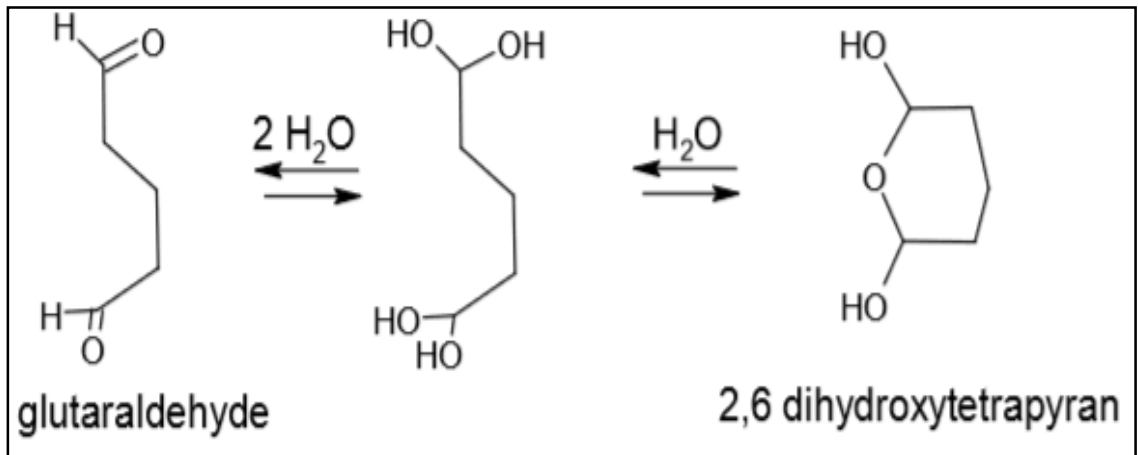
Glutaraldehit $[\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2]$, su, alkol ve organik çözücülerde tüm oranlarda mükemmel çözünürlük sergileyen beş karbonlu bir dialdehittir. Keskin yağlı bir sıvı olan glutaraldehitin sulu çözeltiler halinde farklı konsantrasyonlarda (ağırlıkça % 2-70) ticari türleri mevcuttur. Şekil 2.18’de glutaraldehitin kimyasal yapısı gösterilmiştir [23]. Şekil 2.19’da glutaraldehitin su içerisindeki halkalı yapısı gösterilmiştir [24].

Glutaraldehit; nişasta, dekstran, kitosan, polivinil alkol ve selülozu çapraz bağlamaya uygun bir malzemedir. Glutaraldehit, selüloz ile çapraz bağlanma yeteneğine sahiptir. Glutaraldehit ve selüloz asetalleri, halkalı yapısı nedeniyle hidrolize karşı yüksek bir dirence sahip olabilir. Glutaraldehit, asetile edilebilen ve yüksek termal stabiliteye sahip ürünler oluşturabilen poliglutaraldehitler, sulu çözeltilerde kolayca polimerize olabilir. Destek materyali olarak selüloz kullanıldığında selüloz ile glutaraldehit arasında gerçekleşen çapraz bağlanma mekanizması Şekil 2.20’de verilmiştir [24].

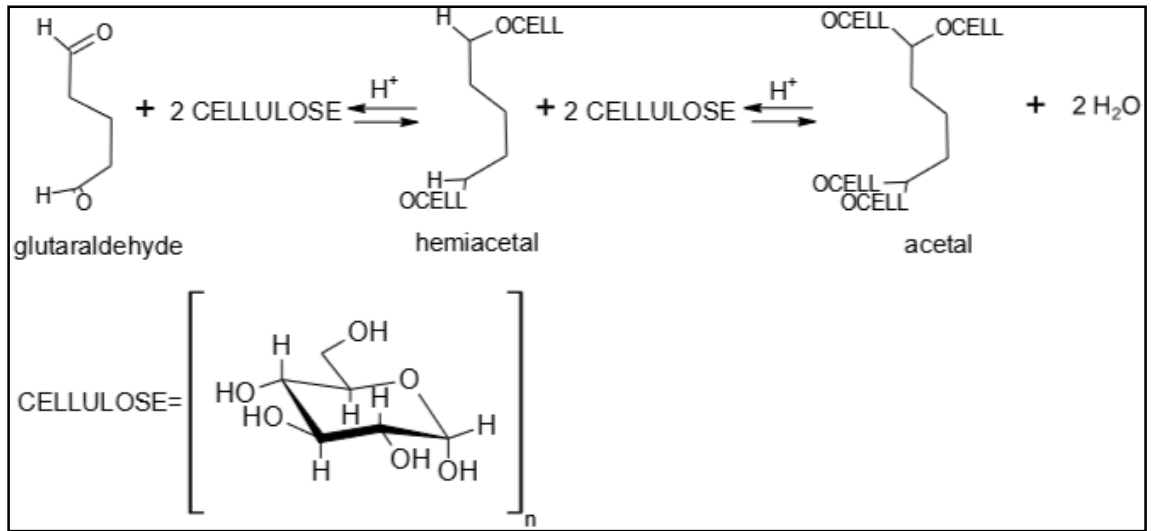
Glutaraldehit, immobilize β -galactosidase enzim elde etmek için immobilizasyon matrisleri üzerinde çapraz bağlayıcı olarak kullanılır. Immobilizasyon matrisine β -galactosidase enziminin glutaraldehit ile bağlanmasının şematik gösterimi Şekil 2.21’de gösterilmiştir [23].



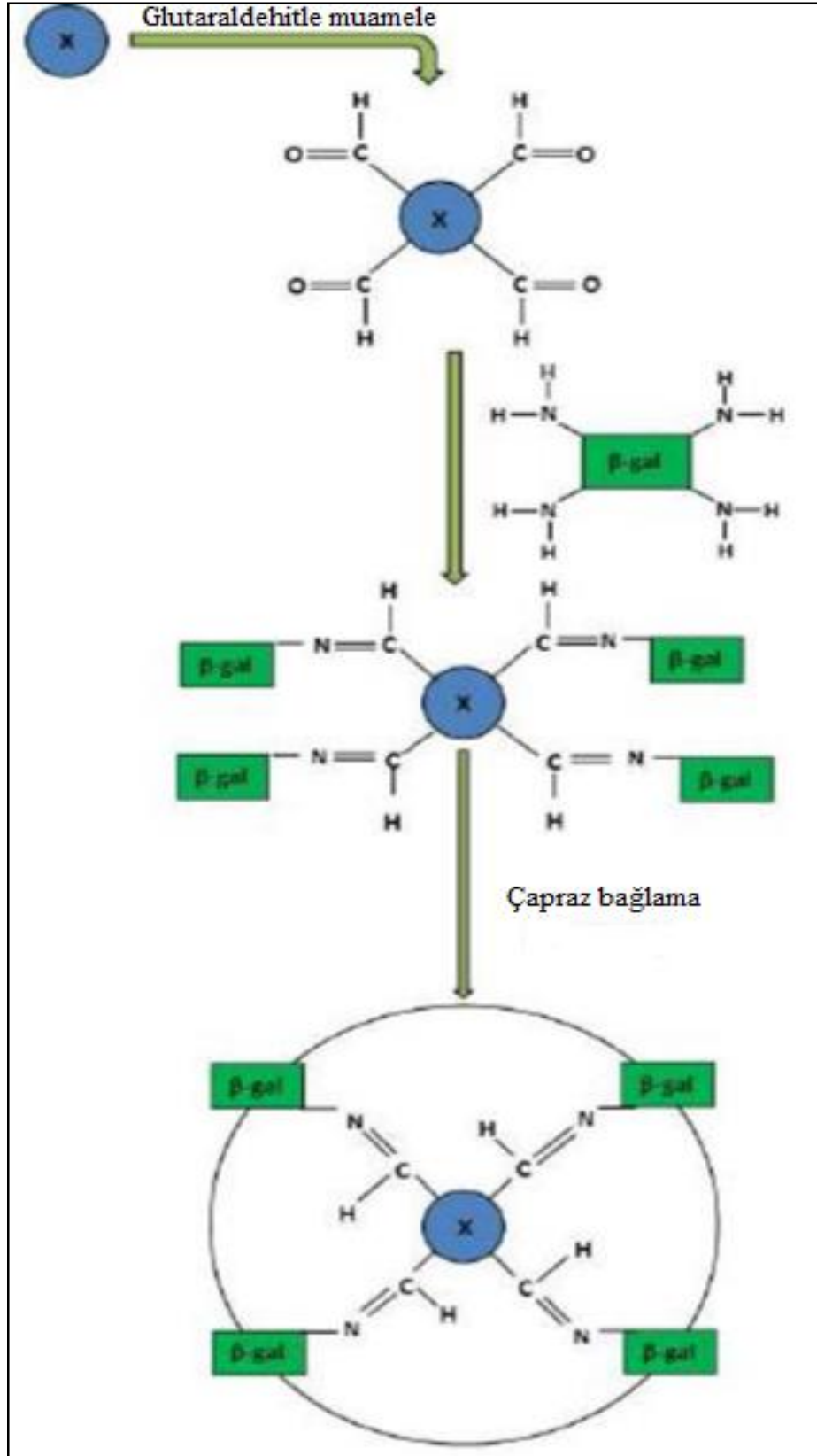
Şekil 2.18 Glutaraldehit kimyasal yapısı [23]



Şekil 2.19 Glutaraldehitin su içerisindeki halkalı yapısı [24]



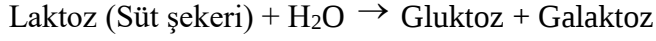
Şekil 2.20 Selüloz ile glutaraldehit arasında gerçekleşen çapraz bağlanma mekanizması [24]



Şekil 2.21 İmmobilizasyon matrisine β -galactosidase enziminin glutaraldehit ile bağlanmasının şematik gösterimi [23]

2.4 β -Galactosidase Enzimi ve Genel Özellikleri

β -Galactosidase, oligosakkaritler ya da ikincil metabolitlerden D-galactosil kalıntılarını hidrolizleyen enzimdir [25]. Süt şekeri olarak da ifade edilen laktozu, glukoz ve galaktoz olmak üzere iki monosakkarite hidrolizler. β -Galactosidase enziminin katalizlediği hidroliz tepkimesi aşağıda gösterilmiştir.



Bu reaksiyon esnasında, bir molekül H_2O tüketilir ve şeker molekülü bağlanır. Optimum pH aralığı 6-8'dir. β -Galactosidase enzimi suda çözünen bir formda olup, açık kahverengi renge sahip viskoz bir sıvıdır.

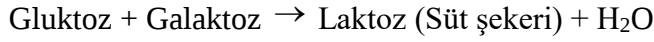
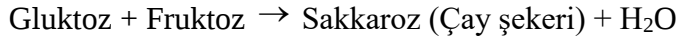
β -Galactosidase enzimleri genellikle mikroorganizmalarda (bakteri, fungi, maya), bitkilerde özellikle badem, şeftali, kayısı, elma ve yüksek canlıların organlarında bulunur. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan β -galactosidase enzimleri yaygın olarak *Aspergillus sp.*, *Kluyveromyces sp.* ve *Kluyveromyces lactis* kaynaklıdır. Farklı kaynaklı β -galactosidase enzimleri Tablo 2.3'te verilmiştir [25, 26].

Tablo 2.3 Farklı kaynaklı β -galactosidase enzimleri [25, 26]

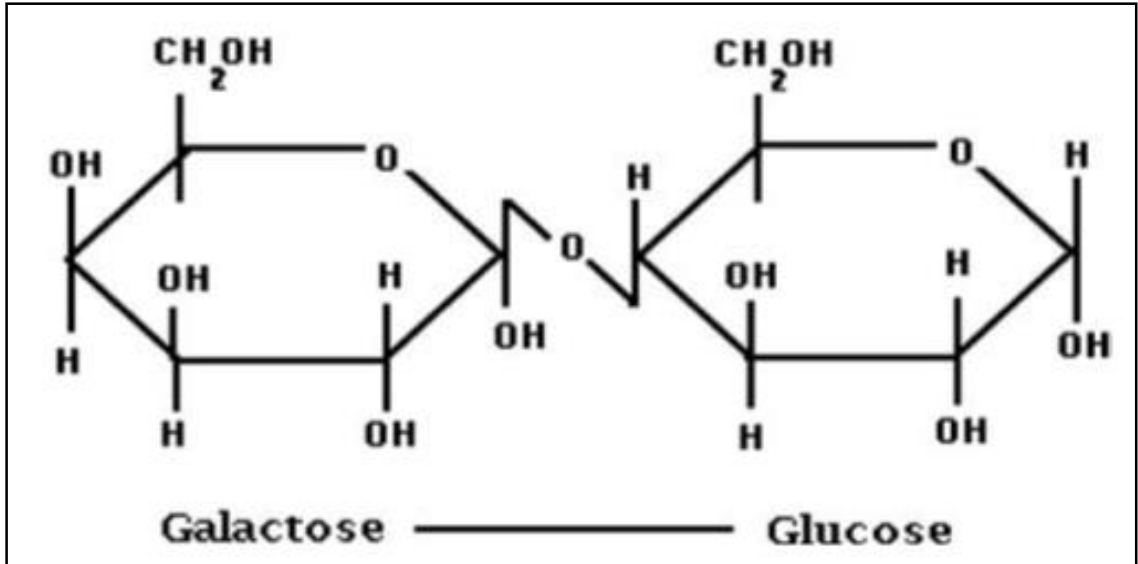
Fungi kaynaklı	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. carbonarius</i>
	<i>Alternaria alternate</i> , <i>A. palmi</i>
	<i>Auerobasidium pullulans</i>
	<i>Curvularia inaequalis</i>
	<i>Fusarium monilliforme</i> , <i>F. oxysporum</i>
	<i>Mucor meihei</i> , <i>M. pusillus</i>
	<i>Neurospora crassa</i>
	<i>Penicillium canescens</i>
	<i>Saccharopolyspora rectivergula</i>
Bakteri kaynaklı	<i>Lactic acid bacteris (LAB)</i>
	<i>Bifidobacterium sp.</i>
	<i>Lactobacillus sp.</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii</i>
	<i>Arthrobacter sp.</i>
	<i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterum</i>
	<i>Colostridium acetobutylicum</i>
Maya kaynaklı	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Guehomyces pullulans</i>
	<i>Bullera singularis</i>
	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. fragilis</i>
Bitki Kaynaklı	Domates, papaya, çilek, turp, arpa, havuç, acı bakla, elma, kavun, badem,

2.5 Laktoz

Karbonhidratlar; karbon, hidrojen ve oksijen atomlarından oluşurlar. Yeryüzünde en çok bulunan organik bileşikler olup en fazla enerji kaynağını verirler. Canlılarda fotosentez veya kemosentez sonucu sentezlenen karbonhidratlar tüm canlı hücrelerde bulunur. Tabiatta genellikle büyük moleküller halinde bulunduğundan vücuda alındığında, sindirilmesi ya da uygun molekül büyüklüğüne ulaşana dek parçalanması gerekmektedir. Karbonhidratların hücre zarından geçebilecek büyüklükte olanları monosakkarit olarak adlandırılır. Sindirime uğramadan geçen monosakkaritlerin karbon sayısı 3 ile 8 arasında değişmektedir. Disakkaritler ise iki adet 6 karbonlu monosakkaritin dehidrasyon tepkimesi sonucu birleşmesi ile oluşur. Disakkaritler, monosakkariler gibi hücre zarından geçemezler.



12 karbonlu bir disakkarit olan laktoz, glukoz ve galaktozun aralarında glukozit bağı ile bağlanmaları ile meydana gelir. Laktoz molekülünün yapısı ve kimyasal formülü Şekil 2.22’de gösterilmiştir [27].



Şekil 2.22 Laktoz molekülü [27]

2.5.1 Laktoz İntoleransı

Laktoz intoleransı, süt şekeri olan laktozun sindirilmesindeki yetersizliktir. Dünya üzerinde yaşayan her on insandan birinin laktoz sindirimine ilişkin problemi olduğu tahmin edilmektedir. Laktoz intoleransı ince bağırsak hücrelerinin doğal olarak ürettiği β -galactosidase enziminin eksikliği sonucu oluşur. Sütle alınan laktozu sindirmeye yetecek kadar β -galactosidase yoksa genellikle kişiyi rahatsız edici bazı bulgular ortaya çıkar. Bu bulgular bulantı, karında kramp şeklinde ağrılar, şişkinlik, gaz ve ishal şeklinde olabilmektedir. Bulgular laktoz içeren besin yenmesi ya da içilmesinden 30 dakika ile 2 saat sonra başlamaktadır.

Laktozsuz ürünlere göre tatlılığı daha az olan süt ürünlerinin içerdiği farklı laktoz konsatrasyonları insanlar üzerinde farklı etkiler ortaya çıkarabilir. Dünyada laktoza karşı var olan intolerans, toleranstan daha fazladır. Laktoz intoleransı Afrika, Asya ve Latin ülkelerinde % 15-100 oranında değişmektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde de laktoz intoleransı oldukça fazladır. Kuzey Amerikalı yetişkinlerde, laktoz intoleransı yerli Amerikalıların % 79'unda, siyah ırkın % 75'inde, Kızılderililerin %51'inde ve beyaz ırkın % 21'inde görülmektedir.

Laktoz intoleransı Amerikan Kızılderilileri, Eskimolar, Yeni Dünya melezleri, bazı Afrika toplumları ve bunların deniz aşırı ülkelerde yaşayan torunları, orjini Hint olan toplumlar, Fiji ve Yeni Gine'de yaşayan Pasifik grupları ve Avusturalya toplumlarında % 60-100, Kuzey ve Batı Avrupalılar, bunların deniz aşırı ülkelerde yaşayan torunları, Akdeniz ve Yakın Doğu'nun bazı grupları, Afrika'daki Fulani, Hima ve Tussu grupları ve Hindistan'ın batısında yaşayan bazı toplumlarda % 0-30 oranında, Yunanistan'daki farklı bölgelerde % 30-100 oranında, Kıbrıs Rumlarında % 67, İran'da ise % 68'dir [28, 29, 30].

Ülkemizde ise değişik çalışmalarda laktoz intoleransı % 24, % 37, % 50 ve % 66 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu durumu süttan kesildikten sonra, süt içme alışkanlığının olmamasına ve süt yerine yoğurt ve peynir tüketilmesine bağlamışlardır. Yoğurdu laktoz içeriğı düşüktür ve yoğurt yapan bakteriler aynı zaman da laktaz da üretir. Bu enzim de süttan laktoz içeriğini düşürerek kolay sindirilmesini sağlar [28].

A.B.D.'deki Cheddar ve Swiss peynirlerinin yapımı sırasında laktozca zengin olan kesilmiş süt suyu ayrılır ve peynirden uzaklaştırılır. Geri kalan laktoz ise fermentasyon

sırasında hidrolizlenir. Bu nedenle laktoz intoleransı olan bireylerin bu tür peynirleri tercih etmesi önerilmektedir.

Laktoz intoleransını gidermenin birkaç yöntemi vardır. Bu yöntemler aşağıda sıralanmıştır [28]:

- Laktoz intoleransının başlangıç noktasını belirlemek ve buna bağlı olarak laktoz tüketimini azaltmak
- Süt kullanımını azaltarak buna alternatif olarak peynir ve yoğurt tüketimini sağlamak
- Süt tüketiminden önce süte laktaz enzimi eklemek.

Laktoz intoleransına sahip kişilere gıda endüstrisinin katkıları aşağıda sıralanmıştır [28]:

- Laktoz intoleransına sahip kişilerin tolerans eşiğini belirlemek amacıyla gerekli testlerin yapılması
- İşlenmiş ya da doğal olarak sunulan gıdaların ambalajlarında laktoz içeriğinin bildirilmesi
- İşlenmiş gıdalarda laktoz miktarı az olan sütlerin kullanılması
- Günlük tüketim için laktozu az ya da laktozsuz süt üretimi
- Süte tüketimden önce laktaz enziminin katılması
- Gıda üreticilerinin tüketicilere laktoz veya süt içermeyen ürünleri liste halinde vermesi

2.5.2 Laktozun Hidrolizi

Sütün yapısında bulunan laktoz β -galactosidase eksikliği ya da yetersizliği sebebi ile birçok insan tarafından tam olarak sindirilememektedir. Sindirilemeyen laktoz insanlarda gaz, mide ağrısı ve diare gibi sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle laktoz içermeyen gıdaların tüketilmesi gerekmektedir. Tüketilen çoğu süt ürünlerinde laktoz bulunmaktadır. Tablo 2.4'te bazı besinlerin laktoz içerikleri verilmiştir [29].

Tablo 2.4 Bazı besinlerin laktoz içerikleri [29]

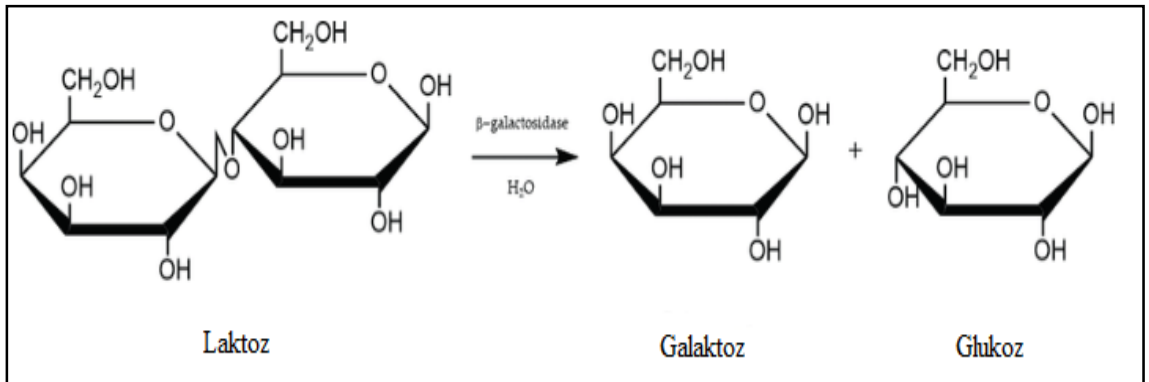
Besin	Miktar	Laktoz (g)
Süt tozu	5 g	0.8
Sütlaç	200 g	5.8
Dondurma	75 g (3 top)	3.0
Yoğurt	100 g (1 kase)	3.0
Kefir	½ su bardağı	4.8
Labne peynir	30 g	0.8
Mozeralla/otlu peynir	30 g	0
Kaşar peyniri	100 g	0
Beyaz peynir	30 g	0
Keçi peyniri	35 g	0
Lor peynir	30 g	0

Laktoz diğer şekerlerle karşılaştırıldığında tat oranı daha az olup aroma ve kokuyu hapsedmeye elverişli bir yapısı vardır. Bu yüzden dondurulmuş gıdalar iyi muhafaza edilmediğinde bozulmalara neden olabilmektedir. Hidroliz işleminin asıl amacı laktozu parçalayarak, sindirimin kolaylaştırılması olup endüstriyel boyutta incelendiğinde hidroliz işleminin amacı enerji maliyetlerinin düşürülmesi ve gıda çeşitliliğinin artırılması olarak değerlendirilebilir [30].

Laktozun hidrolizlenmesinde asidik ve bazik olmak üzere iki farklı yöntem kullanılır. Laktozun asit ile hidrolizinde, asit çözeltisi ya da asidik iyon değiştirici reçineler kullanılır. Proses 150 °C’de ve pH 1-2’de gerçekleştirilir. Reaksiyon çok hızlı gerçekleşir. Fakat hidroliz işlemi çok yüksek sıcaklıklarda yapıldığından, asitler, proteinler ve yağlar arasında sekonder reaksiyonlar oluşur. Bu durum, koku ve aromada istenmeyen değişimler meydana getirebilir ve sütün bileşiminde bulunan besin değerlerinin azalmasına neden olur.

Enzimatik hidrolizleme yönteminde ise, elde edilen son üründe istenmeyen koku ve tat görülmez. Proses koşulları ılıman şartlarda gerçekleştirilir. Sıcaklık ve pH koşullarının elverişli olması da maliyet açısından yarar sağlar. Ancak, avantajlarının yanında dezavantajları da mevcuttur. Enzimlerin elde edilmesi kolay değildir. Endüstriyel boyutta incelendiğinde, sadece mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Enzim maliyetlerinin çok yüksek olması ve üretimin az olması enzimatik hidrolizlemede problem teşkil etmektedir. Bu nedenle, enzim maliyetlerini düşürmek ve daha kararlı enzimler kullanmak gerekmektedir.

Asit ile hidrolizleme ve enzimatik hidrolizleme yöntemleri karşılaştırıldığında, enzimatik hidrolizlemede son ürünün bozulmadan kalması ve besin değerlerinde herhangi bir değişimin olmaması, yüksek enerji maliyetine ihtiyaç duyulmaması ve ılıman koşullarda prosesin gerçekleştirilmesi sebebi ile enzimatik hidrolizleme teknik açıdan daha uygun görülmektedir [30, 31]. Laktozun enzimatik hidrolizine ait reaksiyon Şekil 2.23'te gösterilmiştir [32].



Şekil 2.23 Laktozun enzimatik hidrolizi [32]

2.5.3 Laktozun Kullanım Alanları

Laktozun en geniş kullanım alanı gıda sektörüdür. Şekerlemeler, hazır çorbalar, soslar, hazır içecekler, bebek mamaları bunlardan bazılarıdır. Şekerlemelerde şeker tadını dengelemek amacıyla kullanılır. Koku, tat ve renk maddelerini de hapsettiğinden tat farklarını gidermek maksadıyla asıl ürün tadını ortaya çıkarmak için kullanılır. Laktoz; kraker, bisküvi gibi gıdalarda proteinlerle tepkimeye girerek istenen kahverengimsi rengi oluşturduğundan fırıncılık ürünlerinde de kullanılmaktadır.

Karaciğerde yağ birikmesini engelleyen laktoz aynı zamanda B vitaminin sentezlenmesini de kolaylaştırır. Bu da diyet ürünlerinde tercih edilmesini sağlar. İnce bağırsakta bulunan β -galactosidase enzimi laktozu glikoz ve galaktoza parçalamaktadır. Oluşan bu ürünler dolaşım sistemine verilir ve galaktoz kısa sürede glikoza dönüştürülür.

Galaktoz beyin gelişiminde etkin bir faktördür. Diğer şekerler ile beslenen çocuklara oranla laktoz ile beslenen çocukların daha iyi geliştikleri bilimsel çalışmalarla ispatlanmıştır. Laktoz kalsiyum emilimini artırır; böylece kemik ve diş oluşumunda etkin rol oynar. Anne sütü alamayan bebeklerde inek sütüne laktoz eklenerek karbonhidrat oranının anne sütüne yakın olması sağlanır. İlaç sanayinde laktoz, antibiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalar için karbon kaynağı olarak kullanılır. Çeşitli ilaçların hazırlanmasında da dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır [33].

2.6 Anne Sütü

Anne sütü bebeklerin beslenmesinde kullanıldığı için büyük önem taşımaktadır. Kuru madde açısından inek sütüne yakındır. İnek sütünden farklı olarak laktoz oranı yüksek, mineral madde ve protein oranı düşüktür. Asitlik derecesi inek sütünün yarısı kadardır. Asit ve peynir mayasıyla pıhtılaşma yetenekleri iyi değildir. Proteinin % 53'ü kazeinden, % 47'si albüminden oluşmuştur. Büyük bir kısmını serum proteinleri oluşturur ve albüminli sütlerdendir. Yağ globüllerinin çapı daha küçüktür. Midede daha yumuşak ve küçük taneli pıhtı oluşturduğu için sindirimi kolaydır [34].

Anne sütündeki besin öğelerinin miktarı; laktasyon süresince bireyler arasındaki biyokimyasal farklılıklara, annenin diyetinin içeriğine, laktasyon dönemlerine ve emzirme zamanının uzunluğuna, ön süt/son süt olmasına, adet görmeye göre değişebildiği için anne sütünün makro ve mikro besinsel değerlerinin miktarları oldukça geniş bir dağılım göstermektedir. Anne sütü; yağda ve suda çözünebilen 200'den fazla bileşik içeren kompleks bir bileşiktir. Bileşimin büyük çoğunluğunu (% 88 ve daha fazla) su oluşturmaktadır. Besin öğeleri bu ortam içinde değişik şekillerde dağılmış haldedir. Emzirmenin ilk evresinde gelen süt, yani önsüt, su bakımından oldukça zengindir. Bu nedenle, bebeğin gereksinimi olan tüm su, bu ön süttten karşılanmaktadır. Tablo 2.5'te anne sütünde bulunan enerji ve besin öğeleri verilmiştir [34]. Tablo 2.6'da anne sütü, inek, manda, koyun ve keçi sütü gibi çeşitli süt türlerinin kuru madde, süt yağı, protein, laktoz ve kül açısından ortalama bileşimi (%) verilmiştir [34].

Tablo 2.5 Anne sütünde bulunan enerji ve besin öğeleri [35]

Enerji ve besin öğeleri	Anne sütündeki miktar (100 mL)
Enerji (kkal)	69
Protein (g)	1.3
Laktoz (g)	7.0
Yağ (g)	4.1
Protein (%)	7.0
Laktoz (%)	42.0
Yağ (%)	51.0
Vitaminler	Anne sütündeki miktar (100 mL)
Retinol (µg)	60
β karoten (µg)	27
D (IU)	0.42
E (mg)	0.34
K (µg)	0.21
Tiamin (mg)	0.02
Riboflavin (mg)	0.03
Nikotinik asit (mg)	0.22
B12 (µg)	0.10
B6 (mg)	0.01
Folat (µg)	5.0
Pantotenik asit (mg)	0.25
Biotin (µg)	0.7
C (mg)	3.7

Tablo 2.5 Anne sütünde bulunan enerji ve besin öğeleri [35] (devamı)

Mineraller	Anne sütündeki miktar (100 mL)
Sodyum (mg)	14
Potasyum (mg)	58
Klor (mg)	42
Kalsiyum (mg)	34
Fosfor (mg)	14
Magnezyum (mg)	3.0
Demir (mg)	0.07
Bakır (mg)	0.04
Çinko (mg)	0.28
İyot (µg)	3.0
Manganez (µg)	0.1
Selenyum (mg)	14
Taurin (mg)	4.6
Kükürt (mg)	14
Böbrek solüt yükü (mmol/L)	75-80

Tablo 2.6 Süt türlerinin ortalama bileşimi (%) [34]

Süt Türü	Kuru madde	Süt yağı	Protein	Laktoz	Kül
Anne sütü	12.4	3.8	1.0	7.0	0.2
İnek	12.6	3.7	3.4	4.7	0.7
Manda	17.2	7.4	3.5	5.4	0.8
Koyun	19.3	7.4	5.5	4.8	1.0
Keçi	13.2	4.5	3.2	4.1	0.8

Anne sütünün özellikleri aşağıda sıralanmıştır [36]:

- Anne sütündeki proteinlerin % 60-80'i biyolojik değeri ve kullanımı yüksek olan peyniraltı suyu proteindir. Anne sütü proteinlerinin vücut proteinlerine dönüşüm oranı % 100'dür. Bu özelliğe sahip başka bir besinin olmaması, anne sütünü diğer sütlerden farklı kılmaktadır.
- Protein konsantrasyonu inek sütünden azdır. Fakat bebeğin protein gereksinimi için bu protein ilk 6 ay için tek başına yeterlidir.
- Anne sütü probiyotik özelliklere sahiptir. İçerisinde bulunan *Laktobasillus bifidus* ile bebeği *E. coli* gibi enfeksiyonlara karşı korur.
- Anne sütünde 20'den fazla enzim bulunur. Bunlardan;
Lipaz; yağ sindirim ve emiliminde,
Lipoprotein lipaz; meme bezlerinde süt lipidlerinin sentezinde,
Galaktozil transferaz; laktoz sentezinde,
Sülfidril oksidaz; disülfid bağlarının oluşumunda,
Laktoperoksidaz; bakteriyostatik etki oluşumunda görev alır.
- Anne sütünün yağ miktarı emzirmenin sonuna doğru artar. Bu da bebeğe doygunluk hissi verir. Böylece fazla besin tüketim yoluyla oluşabilecek obezite gelişmesini önler. Bu nedenle anne sütü ile beslenen bebeklerdeki obezite oranı, diğer sütlerle beslenen bebeklere nazaran daha azdır.
- Anne sütündeki elzem yağ asitleri miktarı inek sütündekinden beş kat daha fazladır.
- Anne sütündeki Ca/P oranı 2:1'dir. Bu oran kalsiyumun emilimini ve vücutta kullanımını arttırmaktadır.
- Anne sütündeki demir emilimi de farklılık gösterir. İnek sütündeki demirin % 5-10'u emilirken anne sütünde % 50-60'sı emilir. Bu da anne sütündeki demirin biyoyararlılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir.
- Anne sütü ile beslenen bebeklerde gastrointestinal enfeksiyonlar, menenjit, pnömoni, bakteriyemi sıklığı daha azdır.

- Anne sütü ile beslenen bebeklerde allerji ve kronik hastalık, insüline bağılı diyabet görölme riski, apandisit, invajinasyon, hipertrofik pilor stenozu görölme riski daha azdır.
- Solunum sistemi enfeksiyonlarının sıklığı ve astım görölme durumu azalır.
- Anne sütü ile beslenen bebeklerdeki diş çürüğü sayısı inek sütü ile beslenen bebeklere oranla daha azdır.

Süt, yoğurt, peynir, ayran ve kefirde yüksek miktarda bulunan laktoz bu yiyeceklerin dışında tereyağı, krema, kaymak ve dondurmada da oldukça fazla bulunur. Yiyecekler ile alınan laktoz, ince bağırsağa gelinceye kadar vücutta sindirim işlemine uğramaz. İnce bağırsağa ulaşan laktoz molekülünün, bağırsak içi epitel hücrelerinin fırçamsı kenarlarında bulunan ve buradan salınan özel bir enzim olan laktaz enzimi ile parçalanmaya başlar.

Laktaz enzimi annenin hamileliğinin son döneminde bebeğin bağırsaklarında oluşmaya başlar ve çocukluk döneminde en yüksek seviyeye çıkar ve yaşam boyu bağırsaklarda salınır. Bebekler doğumdan sonra anne sütünde var olan laktozu, bağırsaklarında hazır bulunan laktaz enzimi ile çok rahat bir şekilde parçalar. Fakat bazı bebeklerde bu enzim bağırsaklarda çok az salgılanırsa sindirilmeyen laktoz, ince bağırsak ve kolondaki bazı bakteriler tarafından parçalanmaya başlar. Bu parçalanma ile hidrojen, karbondioksit ve metan gazları oluşur. Bu da erken bebeklik döneminde çocukta gaz, karın ağrısı, kramp, şişkinlik, bulantı, kusma ve ishal gibi sorunlara neden olur.

Bazı bebeklerdeki laktoz intoleransı anne sütü tüketimlerine engel olabilmektedir. Bu nedenle ilaç formunda β -galactosidase enziminin bebeğin anne sütünü almasından yaklaşık 10-20 dakika önce ağzına damlatılması doktorlar tarafından tavsiye edilmektedir. Böylece anne sütündeki laktoz bebek tarafından kolaylıkla sindirilebilir hale getirilebilmektedir.

Laktoz intoleransı bulunan bebekler düşünüldüğünde, ilaç formunda enzime alternatif olarak, anne sütündeki laktozun dışarıda parçalanması sağlanabilir. Süt sağıldıktan sonra içerisindeki laktozun glikoz ve galaktoza parçalandıktan sonra bebeğin tüketimine sunulması alternatif bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

2.7 Kabak Lifi

Halk arasında kabak lifi olarak adlandırılan *Luffa cylindrica* kabakgiller familyasına ait olan meyveleri çok lifli tropikal bir bitkidir. Dünyada yağmurlu ve ılıman iklim şartlarına sahip yerlerde oldukça fazla yetişir. Genellikle Çin’de, Japonya’da ve Asya, Orta Amerika, Güney Amerika’daki bazı ülkelerde rastlanır. Bitki boyutu bulunduğu lokasyona göre 15 cm’den 1 m’ye kadar değişebilir. Bazı bölgelerde 1 m’den daha uzun boya sahip olanlarına da rastlanmıştır. Şekil 2.24’te kabak bitkisi gösterilmiştir [37].

2.7.1 Kabak Lifi Yapısı

Temel yapısı selüloz olan kabak lifi, tek yıllık ve boyuna uzayan bir bitkidir. Meyveleri silindir biçimindedir ve olgunlaştıkça içi kurur [38]. Kurumuş kabak lifinin damar yapısı Şekil 2.25’de gösterilmiştir [37]. Kabak liflerinin kimyasal bileşimi; bitki kökeni, iklim şartları ve toprağın cinsi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Örneğin; selüloz içeriği % 55’ten % 90’a kadar değişebilirken, lignin içeriği % 10’dan % 23’e değişiklik gösterebilir. Hemiselüloz miktarı % 8-22 arasında iken, ekstraktif miktar yaklaşık % 3.2 ve kül miktarı yaklaşık % 0.4’tür. Kabak liflerinin yoğunluğu 0.8-0.92 g/cm³ arasında değişmektedir. Tablo 2.7’de bazı doğal fiberlerin yoğunlukları verilmiştir [38].



Şekil 2.24 Kabak bitkisi [37]



Şekil 2.25 Kabak lifinin kurumuş hali [37]

Tablo 2.7 Bazı doğal fiberlerin yoğunlukları [38]

Doğal fiber	Yoğunluk (g/cm ³)
Sabır ağacı lifi	1.26-1.45
Kenevir lifi	1.48
Hindistan cevizi lifi	1.25
Rami	1.50
Pamuk lifi	1.51-1.60
Kabak lifi	0.8-0.92

Tablo 2.7’de görüldüğü gibi kabak fiberlerin yoğunluğu diğer fiberlere göre daha düşüktür. Bu nedenle kabak liflerinin kompozit materyallerde kullanımı diğer fiberlere göre daha fazla avantaj sağlayabilir. Kabak lifinin kimyasal özellikleri Tablo 2.8’de gösterilmiştir [38].

Tablo 2.8 Kabak lifinin kimyasal özellikleri [38]

Kabak lifi	%*
Soğuk su çözünürlüğü	4.50 (0.09)
Sıcak su çözünürlüğü	3.30 (0.11)
%1 NaOH çözünürlüğü	16.38 (0.19)
Alkol-benzen çözünürlüğü	0.25 (0.04)
Holoselüloz	84.84 (0.41)
Lignin	14.04 (0.24)
α -selüloz	62.34 (0.7)
Kül	0.37 (0.07)

*Parantez içindeki değerler standart sapmaları ifade eder.

2.7.2 Kabak Lifinin Kullanım Alanları

Halk arasında banyo lifi olarak kullanılan kabak lifinin, çevreye duyarlı biyolojik materyal olması, kokusuz, ucuz olması, kolay bulunabilirliği ve geri dönüşüm kapasitesine sahip olması gibi özellikleri ticari olarak kullanımının artmasını sağlamıştır. Kabak lifleri kurutulduğunda, fiber ağ yapısı sünger gibi davranış göstererek, insan yapımı bir materyalin doğadaki alternatifi olarak rol oynamaktadır. Kabak lifi gibi biyolojik materyallerin önemi, yeni malzemeler kullanarak yapılan araştırmalar ile günden güne artmaktadır [39].

Doğal fiber ve doğal kompozit kaynağı olarak kabak lifi, bilimsel çalışmalarda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Liv vd. 2008 [40] yaptıkları çalışmada *Penicillium simplicissimum*'u, Pazzetto vd. 2011 [41] *Bacillus firmus*'u, Meleighty ve Khalaf 2009 [42] *Fusarium moniliforme*'yi kabak lifi üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Oboh vd. 2011 [43] kabak lifini sulu çözeltilerden çift değerlikli metal gideriminde, Iqbal ve Edyvean 2005 [44] kadmiyum ve suda çözünen diğer metallerin gideriminde, Mazali vd. 2005 [45] alternatif ambalaj materyali olarak, Demir vd. 2006 [46] ise suyun kabak lifi üzerine adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Ajwe vd. 2005 [47] kabak lifinden yağ ekstrakte etmiş ve elde ettikleri yağı biyodizel üretiminde kullanmışlardır.

2.8 Pirinç Kabuğu

Pirinç dünyada 75 ülkede, yılda yaklaşık 80 milyon ton üretilen temel bir gıdadır. Bolluk, yerel mevcudiyet, taneli yapı, düşük maliyet, suda çözünmezlik, yüksek kimyasal stabilite ve mekanik dayanım gibi özellikler pirinç kabuğunun potansiyel bir biyosorbent olarak kullanılmasını sağlamıştır. İşlenmiş her pirinç tonunun yaklaşık % 23'ü pirinç kabuğu içerir; bu da tarım sahasının yanması sonucu karbondioksitle beraber diğer kirleticileri meydana getirir. Pirinç kabuğunun kullanılması ile biyosorbent üretimi büyük miktarda yönetilebilir ve ikincil kirleticilerin oluşumu önlenabilir. Hayvan yemi, enerji kaynağı (biyoyakıt), organik gübre katkısı, tuğla yapımı, biyoetanol üretimi ve kompozitler, pirinç kabuğunun diğer uygulamalarıdır [48].

Adsorpsiyon için pirinç kabuğunun ana bileşenleri karbon ve silikadır. Pirinç çeşidi, gübreleme türü, toprak kimyası, iklim ve coğrafi konum farklılıkları nedeniyle pirinç kabuğunun bileşimi bir numuneden diğerine değişmektedir.

Her ne kadar diğ er biyosorbanlar gibi pirinç kabuğunun doğrudan kullanımı organik bileşiklerinin sulu ortama sızmasına neden olsa da, bu bileşim ve istenen özellikler onu uygun bir adsorban olarak kullanılması konusunda ilgi çekici hale getirmektedir [48]. Şekil 2.26’da pirinç kabuğunun görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.26 Pirinç kabuğunun görüntüsü

2.8.1 Pirinç Kabuğunun Yapısı

Pirinç kabuğunun kimyasal bileşimi incelendiğinde içerisinde selüloz, hemiselüloz, lignin, ekstaktif, su ve mineral k l bulunduğ u görülmektedir. Pirinç kabuğunun kimyasal bileşimi Tablo 2.9 [48], fiziksel özellikleri Tablo 2.10 [48] ve içerdiği organik bileşenler ise Tablo 2.11’de [49] verilmiştir.

Tablo 2.9 Pirinç kabuğunun kimyasal bileşimi [48]

Bileşen	Miktar (%)
Selüloz	32.24
Hemiselüloz	21.34
Lignin	21.44
Ekstaktiv	1.82
Su	8.11
Mineral kül	15.05 (% 96.34'ü silika)

Tablo 2.10 Pirinç kabuğunun fiziksel özellikleri [48]

Fiziksel özellik	Değerler
Uzunluk	4-10 mm
Genişlik	2.0-2.5 mm
Kalınlık	0.1-0.15 mm
Hacim	96-160 m ³

Tablo 2.11 Pirinç kabuğunun organik bileşenleri [49]

Organik Bileşen	% Değerler (ağırlıkça)
C	39.8
N	37.4-36.6
H	5.7-6.1
O	0.5-0.6

2.8.2 Pirinç Kabuğunun Kullanım Alanları

Ülkemizde yılda atık olarak ele geçen yaklaşık 200 bin ton pirinç kabuğu tavuk çiftliklerinde tavukların altına serilerek değerlendirilmeye çalışılmaktadır. Pirinç kabuğunun önemi dikkate alındığında ülkemiz açısından endüstriyel bazda büyük avantajlar elde edilebilecektir.

Ummah vd. 2015 [50] yaptıkları çalışmada pirinç kabuğunu deniz suyu arıtmada adsorban olarak kullanmışlardır. Pirinç kabuklarını yüksek sıcaklıklarda yakarak pirinç kabuğu kristalleri elde etmişlerdir.

Biyosorpsiyon alışmaları incelendiğinde Vadivelan ve Kumar 2005 [51], Chandrasekhar ve Pramada 2006 [52], Chen vd. 2012 [53] metilen mavisi biyosorpsiyonu için, Mane vd. 2007 [54] parlak yeşil biyosorpsiyonu için, Chakraborty vd. 2011 [55] kristal violet biyosorpsiyonu için pirinç kabuğu kullanmışlardır. Kontamine biyosorpsiyon çalışmaları incelendiğinde; Tarley vd. 2004 [56] Cd (II) giderimi, Akhtar vd. 2011 [57] Cd (II), Zn (II) Cu(II) giderimi için çalışmalarında pirinç kabuğu kullanmışlardır.

Gıda endüstrisinde laktozun hidrolizlenmesi amacıyla kullanılan β -galactosidase enziminin elde edilmesinin zor ve pahalı olması nedenleri ile suda çözünmeyen, tekrar kullanılabilen, daha uzun ömürlü, ortam şartlarına daha dayanıklı ve serbest enzime göre daha kararlı immobilize enzimlerin kullanımı artmaktadır.

β -Galactosidase enzim immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar Bölüm 3.1’de; enzim immobilizasyon çalışmalarında literatürde taşıyıcı olarak kullanılan kabak lifi üzerine enzimlerin immobilizasyonuna ait çalışmalar Bölüm 3.2’de, taşıyıcı olarak kullanılan pirinç kabuğu üzerine enzimlerin immobilizasyonuna ait çalışmalar ise Bölüm 3.3’te özetlenmiştir.

3.1 β -Galactosidase Enzimi ile Yapılan İmmobilizasyon Çalışmaları

Endüstride kullanılan enzimler için optimum şartların belirlenmesi birçok araştırmacının ilgisini çeken bir konu olmuştur. β -Galactosidase enzimi ile yapılan bazı literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Cargnin vd. 2020 [58] yaptıkları çalışmada pektin bazlı hidrojeller üzerine fiziksel yöntem ile β -galactosidase enzimini immobilize etmişlerdir. Hidrojellerin enzim immobilizasyon kapasitesini belirleyerek elde ettikleri immobilize β -galactosidase enzimi ile laktoz hidrolizi gerçekleştirmişlerdir. Optimum immobilizasyon proses parametreleri olarak sıcaklığı 44 ± 1 °C, başlangıç enzim konsantrasyonunu % 7, pH’ı ise 6.4 olarak belirlemişlerdir. Laktoz hidroliz proseslerinde kullandıkları immobilize β -galactosidase enzimlerinin miktarının artırılması ile laktoz hidrolizi sonucu oluşan glukoz miktarının arttığını belirtmişlerdir.

Wolf vd. 2019 [59] yaptıkları çalışmada β -galactosidase enzimini arap sakızı kullanarak hazırladıkları hidrojel kapsüller üzerinde ve kitosan kullanarak hazırladıkları hidrojel kapsüller üzerinde immobilize etmişler ve immobilize β -galactosidase enzimini tutan hidrojel kapsülleri dondurarak kurutmuşlardır. İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini 6.5 olarak, maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini ise 25 °C olarak saptamışlardır. Kurutulmuş hidrojel kapsüllerini laktoz hidroliz prosesinde kullanmışlardır. Arap sakızı kullanarak elde ettikleri hidrojeller

üzerine immobilize ettikleri β -galactosidase enzimi ile uzun ömürlü sütteki laktozun hidroliz kapasitesini 151 mg/g, kitosan kullanarak oluşturdıkları hidrojel üzerine immobilize ettikleri β -galactosidase enzimi ile uzun ömürlü sütteki laktozun hidroliz kapasitesini ise 189.23 mg/g olarak tespit etmişlerdir.

Souza vd. 2018 [60] yaptıkları çalışmada *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -galactosidase enzimini ticari karajenan ve sodyum aljinat ile oda sıcaklığında nötral pH'ta karıştırmış daha sonra ortam pH'sını HCl kullanarak asidik ortam olarak değiştirmişlerdir. Ortama farklı oranlarda polisakkarit ekleyerek β -galactosidase enzimine etkisini incelemişlerdir. Hem serbest β -galactosidase enziminin, hem de kompleks yöntemle elde ettikleri immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değerini 5, optimum sıcaklık değerini ise 35 °C olarak belirlemişlerdir.

Hassan vd. 2018 [61] yaptıkları çalışmada Aljinat/H0 (acrylamide-co-acrylic acid) jel boncukları üretilip, polietilenimin (PEI) ve glutaraldehit (GA) çözeltisi içinde modifiye ederek β -galactosidase enzim immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanmışlardır. Maksimum immobilizasyon verimini % 3.5'lik PEI çözeltisinde 5 saat beklettikleri jel boncuklar üzerinde elde ederek, immobilizasyon verimini % 78.2 olarak hesaplamışlardır. Modifiye ettikleri Aljinat/H0 jel boncuklar üzerindeki immobilize β -galactosidase enziminin yedi kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 100'ünü koruduğunu saptamışlardır.

Ansari vd. 2015 [62] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin glutaraldehit ile aktive edilmiş karbon nano partiküller (NDs) üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Immobilizasyon işleminde tampon çözelti olarak 100 mM sodyum asetat kullanmışlardır. Immobilizasyonda 8500 U β -galactosidase ve 1 g modifiye edilmiş karbon nanapartikülleri 1 gece boyunca sodyum asetat tamponunda karıştırmışlardır (pH 4.5, sıcaklık 4 °C). Immobilizasyon sonucunda elde ettikleri immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH'ını 4.5 olarak, optimum sıcaklığını ise 50 °C olarak saptamışlardır.

Prieto vd. 2014 [63] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin immobilizasyonu için kullandıkları karbona, H₂SO₄ veya HCl asit çözeltisi (1.2 ve 4 M) içinde ön işlem uygulamışlardır. Ön işlem görmüş karbon üzerinde enzim immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Tampon çözelti olarak farklı molarite

değerlerindeki asetat tamponu (pH 4.5) kullanmışlardır. İmmobilizasyon işleminde 10 mL'lik β -galactosidase çözeltisini şu şekilde hazırlamışlardır; ön işlem görmüş karbon konsantrasyonu için 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 (% ağırlık) değerlerini, başlangıç enzim konsantrasyonu için 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 gL⁻¹, sıcaklık için 25, 30, 40, 50 °C, pH için 4.5 ve karıştırıcı hızı için 150 rpm'i kullanmışlardır. β -Galactosidase enzim immobilizasyon proses parametreleri olarak karbon konsantrasyonunu 1.0 (% ağırlık), enzim başlangıç konsantrasyonunu 0.12 gL⁻¹ olarak, proses sıcaklığını ise 30 °C, karıştırıcı hızını ise 150 rpm olarak belirlemişlerdir. Beş dakikalık immobilizasyon prosesi sonundaki enzim immobilizasyon verimini % 54 olarak saptamışlardır.

Ansari vd. 2012 [64] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin gümüş nano partiküller üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İmmobilizasyon işlemini, 2400 U β -galactosidase enzimi ile 10 mg modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş (ayrı ayrı) gümüş nano partiküllerle, sodyum asetat tamponunda (0.1 M, pH 4.5) 30 °C'de 1 gece magnetik karıştırıcıda muamele ederek belirlemişlerdir. İmmobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını 50 °C, optimum pH'sını ise 4.5 olarak tespit etmişlerdir.

Jochems vd. 2011 [65] yaptıkları çalışmada, *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -galactosidase enziminin zirkonyum dioksit içeren karışık matris membran üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Tampon çözelti olarak 50 mM NaCl ve 50 mM MgCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl tampon çözelti kullanmışlardır. İmmobilizasyon işlemini 1.5 mL'lik tüplerde Tris-HCl tampon ile seyreltilmiş 0.6 mL enzim çözeltisi ile 1 cm²'lik membran kullanılarak yaklaşık 50 rpm'deki karıştırıcıda 120 dakika süresince gerçekleştirmişler ve immobilizasyon için optimum süreyi 60 dakika olarak saptamışlardır. Membran üzerinde adsorbe olan maksimum β -galactosidase enzim miktarını 1.6 g/m² olarak belirlemişlerdir. İmmobilize β -galactosidase enzimi maksimum aktiviteyi 0.5 g/m²'deki enzim konsantrasyonunda göstermiştir. Serbest β -galactosidase enziminin ve immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH'ını ve optimum sıcaklığını; 6.5 ve 25 °C olarak saptamışlardır. İmmobilize β -galactosidase enziminin düşük sıcaklıkta bile etkisini sürdürdüğünü ve immobilize β -galactosidase enzime ait Michealis Menten sabitinin serbest β -galactosidase enzime göre sekiz kat artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Husain vd. 2011 [66] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin ZnO nanopartikülleri (ZnO-Np) üzerinde adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Adsorpsiyon işlemi için 4800 U β -galactosidase enzimi ile 1'er gram doğal ZnO ve ZnO-Np karıştırılarak bir gece sodyum asetat tamponda pH 4.5 ve 30 °C'de beklettikten sonra 20 dakika santrifüj uygulayarak partikülleri toplamışlardır. Immobilizasyon işleminden sonra immobilize β -galactosidase enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 50 °C ve 60 °C olarak belirtmişlerdir. Serbest β -galactosidase enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin ise 50 °C olduğunu; maksimum aktivite gösterdiği pH değeri için ise hem serbest hem de immobilize β -galactosidase enzimi için aynı pH değerinin (4.5) bulunduğunu belirtmişlerdir.

Song vd. 2010 [67] yaptıkları çalışmada, *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -galactosidase enziminin glutaraldehit ile aktifleştirdikleri silikajel ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. β -Galactosidase için ön işlem uygulamışlardır. Bu amaçla; pH'sı 7.2 olan 0.1 M sodyum fosfat tampon çözelti içeren % 10'luk (v/v) 20 mL β -galactosidase çözeltisine 30 mM laktoz ekleyip karışımı 37 °C'de 150 rpm'de 1 saat inkübe etmişlerdir. Immobilizasyon işlemi için % 10'luk (v/v) 20 mL β -galactosidase çözeltisine aktifleştirilmiş silikajeli ekleyerek 20 °C'de, 12 saat boyunca sabit hızda karıştırmışlar ve immobilize β -galactosidase enzimi içeren preparatları 0.1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi ile yıkadıktan sonra filtrasyon uygulamışlardır. Serbest β -galactosidase enziminin optimum pH'sı 7.0, immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH'sı ise 7.5 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık değeri için ise serbest ve immobilize β -galactosidase enzimi için sırasıyla 32 ve 37 °C olarak tespit etmişlerdir.

Ansari ve Husain 2010 [68] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin conconavalin A-selüloz üzerinde çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Adsorpsiyon işlemi için 1954 U β -galactosidase ve Con-A selülozu bir gece magnetik karıştırıcıda 30 °C sıcaklıkta pH'sı 4.6 olan sodyum asetat tamponda bekletmişlerdir. Daha sonra 20 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulamışlardır. Çapraz bağlama işlemini üç aşamada gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak santrifüjle toplanan preparatları 4 °C'de % 0.5 (v/v) glutaraldehit ile 2 saat muamele etmişlerdir. İkinci aşamada % 0.01 (v/v) etanolamin ile 30 °C'de 90 dakika

muamele etmişlerdir. Son olarak, 1 M metil- α -D-glukopironosit ile 2 saat inkübe etmişlerdir. İmmobilizasyon işleminden sonra hem immobilize hem de serbest β -galactosidase enziminin optimum pH'sını 4.6 olarak tespit etmişlerdir. Optimum sıcaklık değerini ise serbest β -galactosidase enzimi için 50 °C, immobilize β -galactosidase enzimi için ise 60 °C olarak saptamışlardır.

Haider ve Husain 2009 [69] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin, Con-A'yı kalsiyum aljinat hibrit boncukları şeklinde kullanarak çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çapraz bağlama işlemini üç aşamada gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak; ön işlem uyguladıkları boncukları 4 °C'de % 0.5 (v/v) glutaraldehit ile 2 saat muamele etmişlerdir. İkinci aşamada % 0.01 (v/v) etanolamin ile 30 °C'de 90 dakika muamele etmişlerdir. Son olarak, 1 M metil- α -D-glukopironosit ile 2 saat inkübe etmişlerdir. Serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığı 50 °C ve immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını ise 60 °C olarak saptamışlardır.

Neri vd. 2008 [70] yaptıkları çalışmada, *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -galactosidase enziminin polisiloksan-polivinil alkol magnetik parçacıkları (POS-PVA) ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Partikülleri aktifleştirmek için 10 mg magnetik partiküller, % 2.5 (v/v) glutaraldehit (100 μ L) içeren, 900 μ L'lik 0.1 M H₂SO₄ çözeltisinde, 25 °C'de 2 saat boyunca 200 rpm'deki karıştırıcıda inkübe etmişler ve inkübasyon işlemi sonunda partikülleri 20 mM sitrat-fosfat tamponla 5 kez yıkamışlardır. İmmobilizasyon işlemi için magnetik partikülleri aynı tamponun farklı konsantrasyonlarındaki 1 mL'lik β -galactosidase çözeltisinde, 4 °C'de, 200 rpm'de, 18 saat boyunca inkübe etmişlerdir. İmmobilizasyon işleminden sonra, serbest ve immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını 50 °C olarak saptamışlardır. Optimum pH değeri için ise hem immobilize hem de serbest β -galactosidase enzimi için aynı değer (pH 6.5) olduğunu belirtmişlerdir.

Bayramoğlu vd. 2007 [71] yaptıkları çalışmada, *Escherichia coli* kaynaklı β -galactosidase enziminin magnetik boncuklar ile kovalent immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş tanelerin 50 mM ve pH 8'deki 10 mL'lik fosfat tamponda 4 saat dengelenmesini sağladıktan sonra 4 °C'deki 0.1-1.0 mg/mL konsantrasyonlarında β -galactosidase enzimini içeren enzim çözeltisine ilave

etmişlerdir. İmmobilizasyon işlemini 4 °C’de 150 rpm’lik karıştırıcıda 18 saat boyunca sürdürmüşlerdir. Serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını 30 °C, immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını ise 35 °C olarak tespit etmişlerdir. Serbest β -galactosidase enziminin optimum pH’sını 7.5, immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH’sını ise 7.5 olarak saptamışlardır.

Ovsejevi vd. 1995 [72] yaptıkları çalışmada, *Escherichia coli* kaynaklı β -galactosidase enziminin Tiyolsulfonat-agaroz ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 2 Gram Tiyosulfonat-jeli, 7.5 mL’lik β -galactosidase çözeltisinde (protein içeriği sırasıyla 0.9, 3.9, 11.8, 46.2 mg) 0.1 M potasyum fosfat tamponda inkübe etmişlerdir. İmmobilizasyon işlemini pH 7’de, 4 °C sıcaklıkta, 16 saat boyunca gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığını 50 °C, optimum pH’ını ise 7 olarak saptamışlardır.

Literatürde yer alan; β -galactosidase enzimi ile yapılan immobilizasyon çalışmaları Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1 Literatürde yer alan β -Galactosidase enzimi ile yapılan immobilizasyon çalışmaları

Referans	β -Galactosidase enziminin kaynağı	Taşıyıcı	Tampon çözelti	İmmobilizasyon yöntemi	Optimum değerler	
					İmmobilize enzim	Serbest enzim
Cargnin vd. (2020) [58]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Pektin bazlı hidrojeller	Fosfat tampon pH = 6.4 T = 44±1 °C	Fiziksel yöntem	-	-
Wolf vd. (2019) [59]	-	Hidrojel kapsüller	-	Çapraz bağlama	pH = 7 T = 35 °C	pH = 7 T = 35 °C
Souza vd. (2018) [60]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Sodyum aljinat ve Karajenan	Sodyum fosfat pH = 7 T = 23 °C	Kompleks yöntem	pH = 5 T = 35 °C	pH = 5 T = 35 °C
Hassan vd. (2018) [61]	-	Modifiye edilmiş aljinat jel boncuklar	Sitrat-fosfat tampon pH = 4.5 T = 25°C	Kovalent bağlama	-	-
Ansari vd. (2015) [62]	<i>Aspergillus oryzae</i>	Karbon nano partiküller	100 mM sodyum asetat pH = 4.5 T = 4 °C	Adsorpsiyon (glutaraldehit ile yüzey aktifleştirme)	pH = 4.5 T = 50 °C	pH = 4.5 T = 50 °C

Tablo 3.1 Literatürde yer alan β -Galactosidase enzimi ile yapılan immobilizasyon çalışmaları (devamı)

Referans	β -Galactosidase enziminin kaynağı	Taşıyıcı	Tampon çözelti	İmmobilizasyon yöntemi	Optimum değerler	
					İmmobilize enzim	Serbest enzim
Prieto vd. (2014) [63]	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ön işlem görmüş karbon	0.05 M Asetat tamponu pH = 4.5 T = 30 °C	Adsorpsiyon	-	-
Ansari vd. (2012) [64]	<i>Aspergillus oryzae</i>	Gümüş nano partiküller	0.1 M Sodyum asetat tampon pH = 4.5 T = 30°C	Adsorpsiyon (glutaraldehit ile yüzey aktifleştirme)	pH = 4.5 T = 50 °C	pH = 4.5 T = 50 °C
Jochems vd. (2011) [66]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Zirkonyum dioksit içeren karışık matriks membran	50 mM Tris-HCl tampon	Fiziksel yöntem	pH = 6.5 T = 25 °C	pH = 6.5 T = 25 °C
Husain vd. (2011) [66]	<i>Aspergillus oryzae</i>	ZnO nanopartiküller	0.1 M Sodyum asetat pH = 4.5 T = 30 °C	Fiziksel yöntem	pH = 4.5 T = 50-60 °C	pH = 4.5 T = 50 °C
Song vd. (2010) [67]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Silika Jel	0.1 M Sodyum fosfat pH = 7.2 T = 20 °C	Çapraz bağlama	pH = 7.5 T = 37 °C	pH = 7.0 T = 32 °C

Tablo 3.1 Literatürde yer alan β -Galactosidase enzimi ile yapılan immobilizasyon çalışmaları (devamı)

Referans	β -Galactosidase enziminin kaynağı	Taşıyıcı	Tampon çözelti	İmmobilizasyon yöntemi	Optimum değerler	
					İmmobilize enzim	Serbest enzim
Ansari ve Husain (2010) [68]	<i>Aspergillus oryzae</i>	Konkonavalin A-selüloz	0.1 M Sodyum asetat pH = 4.6 T = 30 °C	Çapraz bağlama	pH = 4.6 T = 60 °C	pH = 4.6 T = 50 °C
Haider ve Husain (2009) [69]	<i>Aspergillus oryzae</i>	Con-A tabakalı kalsiyum aljinat hibrit boncuklar	0.1 M sodyum asetat pH = 4.6 T = 30 °C	Çapraz bağlama	T = 60 °C	T = 50 °C
Neri vd. (2008) [70]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Polisililokzan-polivinil alkol manyetik parçacık	20 mM sitrat-fosfat (4mM MgCl ₂ içeren) pH = 6.5 T = 50 °C	Çapraz bağlama	pH = 6.5 T = 50 °C	pH = 6.5 T = 50 °C
Bayramoğlu vd. (2007) [71]	<i>Escherichia coli</i>	Manyetik poli boncukları	50 mM fosfat tampon pH = 8.0 T = Bilgi yok	Kovalent bağlama	pH = 7.5 T = 35 °C	pH = 7.5 T = 30 °C
Ovsejevi vd. (1995) [72]	<i>Escherichia coli</i>	Tiyolsulfonat-agaroz	0.1 M fosfat tampon pH = 7 T = 4 °C	Fiziksel yöntem	pH = 7 T = 50 °C	-

3.2 Kabak Lifi ile Yapılan Enzim İmmobilizasyon Çalışmaları

Enzim immobilizasyon yöntemlerinde kabak lifinin taşıyıcı olarak kullanılmasının sebepleri adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması, maliyetinin düşük olması, doğada kolay bulunabilir olmasıdır. Kabak lifi üzerine farklı yöntemler ile enzim immobilizasyon çalışmalarının yer aldığı literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Lai ve Lin 2018 [73] yaptıkları çalışmada kabak lifini hidrosietil ile muamele ettikten sonra metal giderimi için adsorban olarak kullanmışlardır. Kabak lifinin hidroksietil ile muamelesi ile şelatlama kapasitesinin 2520 ± 45 $\mu\text{mol/g}$ 'dan 5478 ± 77 $\mu\text{mol/g}$ 'a arttığını belirtmişlerdir. HEC olarak adlandırdıkları adsorban üzerinde trehalaz enzimini immobilize etmişlerdir. Maltozun trehaloza dönüşümünde kullandıkları immobilize trehalaz enziminin 20 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 70'sini koruduğunu belirtmişlerdir.

Gong vd. 2013 [74] yaptıkları çalışmada sodyum periodat oksitlemesi ile aktifleştirdikleri kabak lifi üzerine lipaz enzimini kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Oksitleme prosesi için 0.5 gram kabak lifini 10 mg/mL konsantrasyonunda sodyum periodat içeren 100 mL pH 4'teki 0.1 M asetik asit tampon içinde karanlıkta ve karıştırarak gerçekleştirmişlerdir. Oksitlenmiş kabak lifini soğuk distile su ile birkaç kez yıkadıktan sonra kurutmuşlardır. İmmobilizasyon prosesi için oksitlenmiş kabak lifini lipaz çözeltisi içinde (1:60, w/v) oda sıcaklığında 1.5 saat boyunca karıştırarak gerçekleştirmişlerdir. İmmobilizasyon prosesi sonrasında immobilize enzimleri, yıkama suyunda enzim aktivitesi kalmayana kadar yıkamışlardır. Elde ettikleri immobilize lipaz enziminin ve serbest lipaz enziminin optimum pH'ını 7.5 olarak saptamışlardır. İmmobilize lipaz enziminin optimum sıcaklık değerini 40 °C olarak, serbest lipaz enziminin optimum sıcaklık değerini ise 37 °C olarak tespit etmişlerdir.

Morais vd. 2013 [75] yaptıkları çalışmada, kabak lifi içeren sebzeleri kullanarak *Bacillus Licheniformis* kaynaklı α -amilaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kabakları elle soyarak çekirdeklerini çıkartmışlar ve kalan lifleri musluk suyunda, kirlilikler temizlenene kadar 12 saat boyunca yıkamışlardır. Daha sonra lifleri kurutarak polipropilen poşetlerde oda sıcaklığında muhafaza etmişlerdir. İmmobilizasyon işlemi için 1.2 mL amilaz çözeltisini 125 mg kabak lifi ile 4 °C'de 12 saat muamele ettikten

sonra, çözeltiden aldıkları kabak liflerini 0.1 molL^{-1} fosfat tampona (pH 7.5) dört defa 1 dakika süreliğine daldırmışlardır. α -Amilaz enzimini adsorbe eden kabak liflerini polipropilen kaplarda oda sıcaklığında saklamışlardır. Elde ettikleri immobilize α -amilaz enzimini nişasta hidroliz prosesinde kullanmışlardır. Immobilize α -amilaz enzimi ile oda sıcaklığında gerçekleştirdikleri 5 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında, immobilize α -amilaz enziminin başlangıç aktivitesinin % 97'sini koruğunu belirtmişlerdir. Farklı kaynaklardan elde edilen nişastaların immobilize α -amilaz enzimi ile hidroliz prosesleri sonucunda, mısır nişastasında % 93.96, buğday nişastasında % 85.24, manyok nişastasında % 79.03 hidroliz kapasitesi elde etmişlerdir.

Zhu vd. 2013 [76] yaptıkları çalışmada, kabak lifi üzerinde lipaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kabak liflerine ön işlem uygulamışlardır. Bu amaçla; kabak liflerini 1 cm uzunluğunda, 7 cm genişliğinde kesmişler ve kaynayan suda 30 dakika bekletmişlerdir. Musluk suyunda yıkadıktan sonra 24 saat boyunca distile suya bırakmışlardır. $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gece boyunca desikatörde kuruttuktan sonra desikatörde muhafaza etmişlerdir. Kabak liflerini şu şekilde aktifleştirmişlerdir; kesilmiş lifleri 0.2 M sitrik asite ekleyerek 30 dakika karıştırmışlar ve karışımı $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat boyunca kurutmuşlardır. Sitrik asit ve selüloz arasındaki optimum termokimyasal esterleşme süresini $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 60 dakika olarak belirtmişlerdir. Aktifleştirdikleri kabak liflerini reaktif olmayan sitrik asitlerden uzaklaştırmak için distile su ile yıkamışlardır. İmmobilizasyon işlemi için, 0.1 gram esterleşmiş kabak lifini 10 mg EDC (1-etil-3-dimetil amino propil carbodiimide) ve 6 mg NHS (N-hydroxysuccinimide) içeren pH 5.5'deki 50 mM fosfat tampona eklemişlerdir. Elde ettikleri çözeltiyi oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırdıktan sonra, aktifleşmiş kabak lifini çözeltiden ayırarak fosfat tampon çözelti ile yıkamışlar ve 6 mL'lik enzim çözeltisi içine eklemişlerdir. İmmobilizasyon prosesini aktifleşmiş kabak lifini içeren enzim çözeltisini 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırarak gerçekleştirmişlerdir. İmmobilizasyon prosesi sonrasında, immobilize enzimi tutan kabak liflerini çözeltiden ayırdıktan sonra yıkama suyunda enzim aktivitesi kalmayana kadar distile su ile yıkamışlardır. Immobilize lipazın maksimum enzim aktivitesini 45.8 U/g olarak hesaplamışlardır. Elde ettikleri immobilize lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak, maksimum aktivite gösterdiği pH'ı ise 8 olarak belirlemişlerdir. Serbest lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerini ise sırası ile $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve 7.5 olarak saptamışlardır.

Mahmoud vd. 2011 [77] yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* NRRL3 kültüründen elde ettikleri inülinaz enzimini kabak lifi üzerine adsorpsiyon ve kovalent bağlama olmak üzere iki farklı şekilde immobilize etmişlerdir. Fiziksel yöntem ile inülinaz enzim immobilizasyon prosesini, hazırladıkları enzim çözeltisini 4 °C’de bir gece boyunca bekleterek gerçekleştirmişler, kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon prosesini ise kabak lifini 2 saat boyunca 30 °C’deki % 2.5’lik glutaraldehit çözeltisi ile muamele ederek gerçekleştirmişlerdir. Glutaraldehit ile muamele sonrasında kabak liflerini distile su ile yıkayarak fazla glutaraldehitin uzaklaşmasını sağlamışlardır. Glutaraldehit ile muamele edilen kabak liflerini enzim çözeltisi içinde bir gece boyunca 4 °C’de bekleterek kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. Bağlanmayan enzimin uzaklaşması için kabak liflerini distile su ile yıkamışlardır. Kabak lifi üzerine adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyon verimini % 24, kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyon verimini ise % 81 olarak saptamışlardır. İmmobilize enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi çalışmalarını kovalent bağlama yöntemi ile elde ettikleri immobilize inülinaz enzimi için gerçekleştirmişlerdir. Serbest inülinaz enziminin optimum sıcaklık değeri ile kabak lifi üzerine kovalent bağlama yöntemi ile immobilize ettikleri inülinaz enziminin optimum sıcaklık değerini 55 °C olarak, serbest inülinaz enziminin optimum pH değerini 4.8, immobilize inülinaz enziminin optimum pH değerini ise 6.2 olarak belirlemişlerdir.

Ahmed vd. 2007 [78] yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis* ATCC 21415’den elde ettikleri alkalın protease enzimini fiziksel ve kimyasal yöntem olmak üzere iki farklı yöntem ile kabak lifi üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Fiziksel yöntem ile immobilizasyon prosesinde 1 gram kabak lifini 1 mL enzim solüsyonu (220 U) içinde bir gece boyunca 4 °C’de bekleterek gerçekleştirmişlerdir. Kimyasal yöntem olarak kullandıkları kovalent bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyon prosesi için, 1 gram kabak lifini 30 °C’deki 2 mL % 2.5’lik (v/v) glutaraldehit çözeltisinde 2 saat boyunca bekletmişlerdir. Fazla glutaraldehitin uzaklaşması için kabak liflerini distile su ile yıkamışlardır. Islak kabak liflerini 1 mL’lik enzim solüsyonunda (220 U) 6 saat boyunca 30 °C’de inkübe etmişlerdir. Alkalın proteaz enziminin kabak lifi üzerine fiziksel yöntem ile immobilizasyon verimini % 70.5 olarak hesaplamışlardır. Alkalın proteaz enziminin kabak lifi üzerine kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon verimini ise % 57 olarak belirlemişlerdir. Fiziksel yöntem ile gerçekleştirilen alkalın proteaz enzim

immobilizasyon veriminin, kimyasal yöntem ile gerçekleştirilen alkalın proteaz enzim immobilizasyon verimine göre daha iyi sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. Serbest alkalın proteaz enziminin optimum sıcaklık değerini 70 °C olarak, kabak lifi üzerine fiziksel yöntem ile immobilize ettikleri alkalın proteaz enziminin optimum sıcaklık değerini ise 80 °C olarak saptamışlardır. Serbest alkalın proteaz enziminin optimum pH'sını 10, kabak lifi üzerine fiziksel yöntem ile immobilize ettikleri alkalın proteaz enziminin optimum pH'sını ise 10.5 olarak kaydetmişlerdir.

Literatürde yer alan; kabak lifi üzerine immobilize edilen çeşitli enzimler ve immobilizasyon yöntemlerini içeren bazı çalışmalar Tablo 3.2'de özetlenmiştir.

Tablo 3.2 Literatürde yer alan kabak lifi üzerine immobilize edilen çeşitli enzimler ve immobilizasyon yöntemleri

Referans	Enzim	İmmobilizasyon yöntemi
Lai ve Lin (2018) [73]	Trehalaz	Şelatlama
Gong vd. (2013) [74]	Lipaz	Kovalent bağlama
Morais vd. (2013) [75]	α -Amilaz	Fiziksel yöntem
Zhu vd. (2013) [76]	Lipaz	Kovalent bağlama
Mahmoud vd. (2011) [77]	Ünilinaz	Kovalent bağlama
Ahmed vd. (2007) [78]	Alkalın proteaz	Fiziksel yöntem ve kovalent bağlama

3.3 Pirinç Kabuğu ile Yapılan Enzim İmmobilizasyon Çalışmaları

Doğada kolay bulunabilen pirinç kabuğu üzerine çeşitli enzimlerin immobilizasyonuna ait literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Lima vd. 2018 [79] yaptıkları çalışmada glutaraldehit ile aktifleştirilmiş pirinç kabuğunu ticari *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı lipaz enzimi ile muamele ederek immobilize lipaz enzimi elde etmişlerdir. Aktifleştirme işlemi için 10 gram pirinç kabuğunu 16.8 mL % 25'lik glutaraldehit çözeltisi ve 11.2 mL pH 7'deki 200 mM sodyum fosfat çözeltisinde 200 rpm'de 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırmışlardır. Daha sonra pirinç kabuğunu distile su ile yıkayarak fazla glutaraldehitin uzaklaşmasını sağlayarak 1 gece 4 °C'de bekletmişlerdir. İmmobilizasyon işlemi, 10 gram aktifleştirilmiş pirinç kabuklarının 22.2 mL ticari lipaz enzim çözeltisi ile 67.8 mL pH 7'deki 100 mM fosfat tampon içerisinde 200 rpm'deki karıştırıcı hızında 48 saatlik inkübasyon işlemi ile gerçekleştirilmiştir.

Optimum reaksiyon koşullarında hekzan içerisinde % 90 verimle dönüşüm gerçekleştirilmiştir. Diğer tarafta solvent içermeyen sistemde de 24 saat sonucunda benzer bir verim elde edilmiştir. Hazırlanan biyokatalizör, 12 çevrim sonrasında da oldukça kararlı bir yapı göstermiştir.

Cespugli vd. 2018 [80] yaptıkları çalışmada, *Candida antarctica*'den elde edilen ticari lipaz enzimi ön işleme tabi tutulmuş pirinç kabuğu üzerine kovalent bağlama metodu ile immobilize etmişlerdir. Pirinç kabuklarının ön işlemi için, 200-400 µm boyutlarında olan 2 gram pirinç kabuğunu H₂O:ethanol 50:50 (3×3 mL) karışımı ile yıkamışlar, daha sonra 50 mL 0.20 M NaIO₄ (sodyum iyodat) çözeltisi ilavesi ile 22 saat boyunca karanlıkta 25 °C'de karıştırılmasını sağlamışlardır. Taşıyıcı olarak kullanılan pirinç kabuklarının işlem sonrasında koyu kahverengi bir renk aldığını belirtmişlerdir. Reaksiyon sonunda pirinç kabuklarını filtrasyon yöntemi ile ayırmışlar ve nötralleşene kadar saf su ile yıkamışlardır. Oksitlenmiş pirinç kabuklarının amin gruplarının aktifleştirilmesi için pH 8'deki 0.05 M fosfat tampon çözeltisinde hazırlanan 50 mL % 1.25 (v/v)'lik glutaraldehit çözeltisi ile 25 °C'de 5 saat boyunca aktifleştirmişlerdir. Bağlanmayan glutaraldehitin uzaklaştırılması için aynı tampon çözelti ile pirinç kabuklarını yıkamışlardır. Aktifleştirilmiş pirinç kabukları 24 ve 48 saat boyunca pH 8'deki 0.5 M fosfat tamponunda hazırlanan 10000 U/g aktivitesindeki enzim çözeltisinde muamele ederek

immobilizasyon prosesini gerçekleştirmişlerdir. 24 saatlik immobilizasyon prosesi sonrasında protein cinsinden immobilizasyon verimi % 33, 48 saatlik immobilizasyon prosesi sonundaki protein cinsinden immobilizasyon verimini ise % 72 olarak belirlemişlerdir.

Abdulla vd. 2017 [81] yaptıkları çalışmada glutaraldehit ile aktifleştirdikleri pirinç kabuğu üzerine lipaz enzimini adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon işlemini için, 1 gram pirinç kabuğu üzerine 500 µL % 25'lik glutaraldehit çözeltisi ekleyerek 5 dakika boyunca karıştırmışlar ve lipaz enzim solüsyonunu bu çözeltinin üzerine ekleyerek 20 dakikalık inkübasyon gerçekleştirmişlerdir. Pirinç kabuğu üzerinde lipaz enziminin immobilizasyon verimini % 81 olarak hesaplamışlardır. Elde ettikleri immobilize lipaz enziminin optimum pH değerini 8, optimum sıcaklık değerini ise 40 °C olarak saptamışlardır.

Seshabala vd. 2012 [82] yaptıkları çalışmada, üreaz enziminin pirinç kabuğu üzerine adsorpsiyon metodu ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Pirinç kabuğuna uyguladıkları ön işlem şu şekildedir; 100 parça pirinç kabuğunu yıkadıktan sonra iki gün boyunca güneş altında kurutmuşlar ve 2 mm'lik toz haline getirmişlerdir. Test tüplerinde enzim çözeltisi ve adsorbanı bir gece boyunca bekletmişler ve immobilizasyon prosesi sonrasında adsorbanı distile su ile yıkadıktan sonra enzim aktivite tayini gerçekleştirmişlerdir. 24 saat sonunda elde ettikleri immobilize üreaz enziminin optimum pH'ını 7.0, optimum sıcaklığını ise 35 °C olarak saptamışlardır.

D'Souza vd. 2002 [83] yaptıkları çalışmada pirinç kabuğu üzerine kovalent bağlama metodu ile intervaz enzimini immobilize etmişlerdir. Taşıyıcı olarak kullandıkları pirinç kabuğunu yıkayıp kuruttuktan sonra % 2'lik polietilen ile muamele etmişlerdir. Ön işlem görmüş pirinç kabuklarını aktifleştirmek için % 2'lik glutaraldehit çözeltisi kullanmışlardır. Immobilizasyon işlemini pirinç kabuğu ve enzim çözeltisini içeren proses bileşenlerinin 25-27 °C'deki oda sıcaklığında, 150 rpm'deki çalkalamalı inkübatörde karıştırılmasıyla 17 saat boyunca gerçekleştirmişlerdir. Enzim aktivitesini substrat olarak sukroz kullanarak hesaplamışlar ve immobilizasyon sonrasında invertaz enziminin aktivite cinsinden immobilizasyon verimini % 56 olarak saptamışlardır.

Literatürde yer alan; pirinç kabuğu üzerine immobilize edilen çeşitli enzimler ve immobilizasyon yöntemlerini içeren çalışmalar Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3 Literatürde yer alan pirinç kabuğu üzerine immobilize edilen çeşitli enzimler ve immobilizasyon yöntemleri

Referans	Enzim	İmmobilizasyon yöntemi
Lima vd. (2018) [77]	Lipaz	Kovalent bağlama
Marco vd. (2018) [78]	Lipaz	Kovalent bağlama
Abdulla vd. (2017) [79]	Lipaz	Kovalent bağlama
Seshabala vd (2012) [80]	Üreaz	Adsorpsiyon
D’Souza vd. (2002) [81]	İnvertaz	Kovalent bağlama

4.1 Kimyasallar

β -Galactosidase enzim immobilizasyon proseslerinde potasyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7) kullanılmıştır. Serbest β -galactosidase enziminin ve immobilize β -galactosidase enzimlerinin optimum pH değerlerinin belirlenmesi için farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltiler kullanılmıştır.

0.1 M Asetat Tamponu (pH 4.0): 1.02 gram stok $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 2.43 mL stok CH_3COOH çözeltisinden alınarak saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

0.1 M Asetat Tamponu (pH 5.0): 4.31 gram stok $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 1.03 mL stok CH_3COOH çözeltisinden alınarak saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

0.1 M Fosfat Tamponu (pH 6.0): 5.974 gram KH_2PO_4 ve 1.045 gram K_2HPO_4 suda çözülerek 500 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

0.1 M Fosfat Tamponu (pH 7.0): 2.667 gram KH_2PO_4 ve 5.293 g K_2HPO_4 suda çözülerek 500 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. 1 N NaOH ile pH ayarlanmıştır.

0.1 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.0): Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

0.1 M Tris-HCL Tamponu (pH:9.0): Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Taşıyıcı olarak kullanılan kabak lifi ve pirinç kabuğunun aktifleştirilmesinde % 2.5'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisi kullanılmıştır.

Glutaraldehit çözeltisi (% 2.5'lik): % 50'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisinden 5 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

β -galactosidase enzim aktivitesinin belirlenmesinde ONPG çözeltisinden yararlanılmış olup, reaksiyonun durdurulması için 1 M Na_2CO_3 çözeltisi kullanılmıştır.

ONPG çözeltisi: 300 mg ONPG, fosfat tamponu içinde çözülüp, fosfat tampon ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

1 M Na₂CO₃ çözeltisi: 10.59 gram Na₂CO₃ distile suda çözülüp, saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Laktoz hidroliz prosesleri için inek sütündeki %5'lik laktoz konsantrasyonu göz önünde bulundurularak % 5'lik laktoz çözeltisi hazırlanmıştır. Laktoz hidroliz prosesleri % 5'lik laktoz çözeltisinde ve anne sütünde gerçekleştirilmiştir. Hidroliz prosesleri boyunca laktoz konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan analiz yönteminde 5 N HCl çözeltisi kullanılmıştır.

Laktoz çözeltisi (% 5'lik): Stok laktoz monohidrat çözeltisinden 0.526 gram tartılarak pH 7'deki fosfat tampon çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

5 N HCl çözeltisi: % 37'lik HCl çözeltisinden 41.47 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Protein miktar tayini için Bradford Reagent Agent kiti (B 6916) kullanılmıştır.

Bradford Reagent Agent kiti (B 6916): Bradford Reagent Agent kiti (B 6916) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

β -Galactosidase enzimi: İmmobilizasyon prosesleri için ticari adı Maxilact LX 5000 olan, *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzimi (ürün kodu: EC 3.2.1.23) kullanılmıştır. *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzimi oldukça saflaştırılmış sıvı laktaz preparatı olup likit kıvamdadır. Açık kahverengi bir renge sahip, bulanık, viskoz bir sıvıdır. *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzimi DSM Food Specialties firmasından sağlanmış ve çalışmalar süresince 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

4.2 Cihazlar

Kullanılan cihazlar; çalkalamalı inkübatör, spektrofotmetre, su banyosu, hassas terazi, pH metre, etüv ve otoklavdır.

4.2.1 Çalkamalı İnkübatör

Sıcaklık, karıştırıcı hızı ve zaman kontrol modüllerinden oluşan IKA firmasından temin edilen çalkalamalı inkübatör (KS 4000 ic control) kullanılmıştır. Cihaz görsel olarak Şekil 4.1'de verilmiştir [84]. KS 4000 ic control çalkalamalı inkübatöre ait teknik bilgiler Tablo 4.1'de verilmiştir [84].



Şekil 4.1 KS 4000 ic control çalkalamalı inkübatör [84]

Tablo 4.1 KS 4000 ic control çalkalamalı inkübatöre ait teknik bilgiler [84]

Özellikler	Değerler
Çalkalayıcı hareketi	Orbital
Orbital çapı	20 mm
Maksimum çalkalama ağırlığı	20 kg
Isı kapasitesi	1000 W
Ayarlanabilir hız aralığı	10-500 rpm
Sıcaklık aralığı	5-80 °C

4.2.2 UV Spektrofotometre

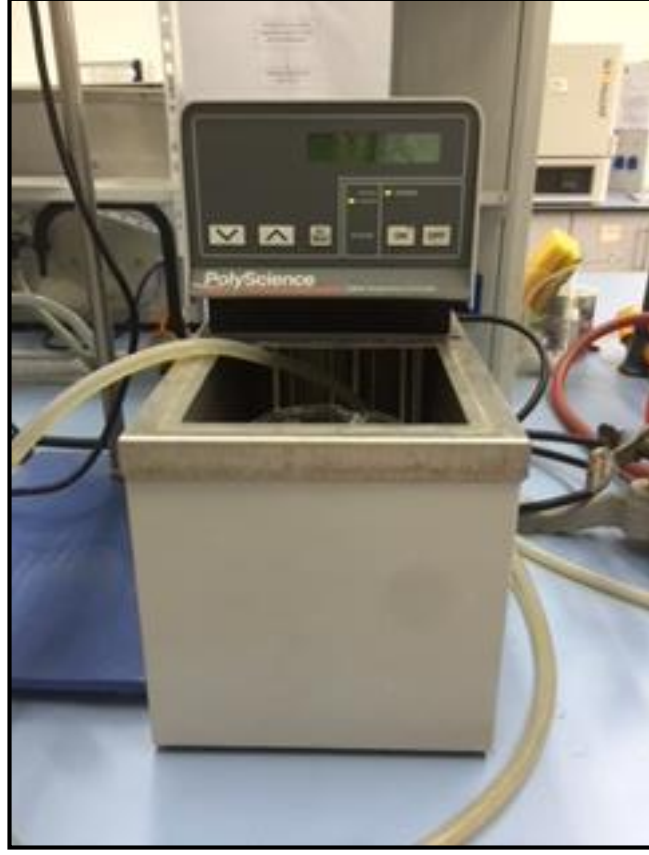
Örneklerin absorbans değerlerini okumak için Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınlı spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Şekil 4.2’de spektrofotometre cihazı gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınlı spektrofotometre

4.2.3 Su Banyosu

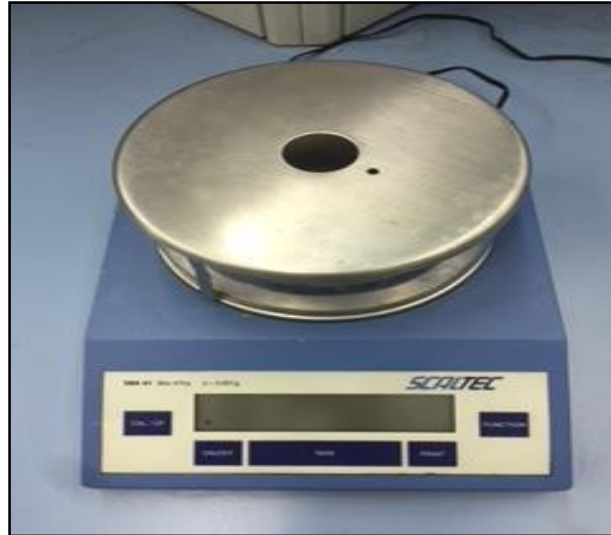
Laktoz hidroliz prosesleri boyunca gerçekleştirilen laktoz konsantrasyon tayini için 37 °C’deki inkübasyon ve β -galactosidase enzim aktivite tayinleri için 28 °C’deki inkübasyon için PolyScience marka su banyosu kullanılmıştır.



Şekil 4.3 PolyScience marka su banyosu

4.2.4 Hassas Terazı

Tartımların yapılması için Scaltec marka hassas tartı cihazı kullanılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Scaltec marka hassas tartı cihazı

4.2.5 pH Metre

Çözeltilerin pH ayarlarının yapılması için WTW marka pH metre cihazı kullanılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 WTW marka pH metre cihazı

4.2.6 Etüv

Kabak lifi ve pirinç kabuklarına uygulanan ön işlem aşamasında taşıyıcıların kurutulması için Memmert marka etüv kullanılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Memmert marka etüv

4.2.7 Otoklav

Kabak lifi ve pirinç kabuklarına uygulanan ön işlemlerde OT O12 marka otoklav cihazı kullanılmıştır. şekil 4.7’de OT O12 marka otoklav cihazı gösterilmiştir.



şekil 4.7 OT O12 marka otoklav cihazı

4.2.8 Fourier transform infrared (FTIR) spektrometresi

Taşıyıcı olarak kullanılan kabak lifi ve pirinç kabuğuna ait FTIR analizleri ile immobilize β -galactosidase enzimlerine ait FTIR analizleri için Perkin Elmer Spectrum One marka FTIR cihazı kullanılmıştır. Numuneler ağırlıkça % 5 örnek içeren KBr tabletler hazırlanarak analiz edilmiştir. Kaydedilen dalga boyu aralığı $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ’dir. şekil 4.8’de Perkin Elmer Spectrum One marka FTIR cihazı gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Perkin Elmer Spectrum One marka FTIR cihazı

4.2.9 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

Kabak lifine ait SEM görüntüleri ile kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait SEM görüntüleri 100 μm , 50 μm , 20 μm ve 5 μm boyutlarında olacak şekilde Tescan Vega3 marka SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9’da Tescan Vega3 marka SEM cihazı gösterilmiştir.



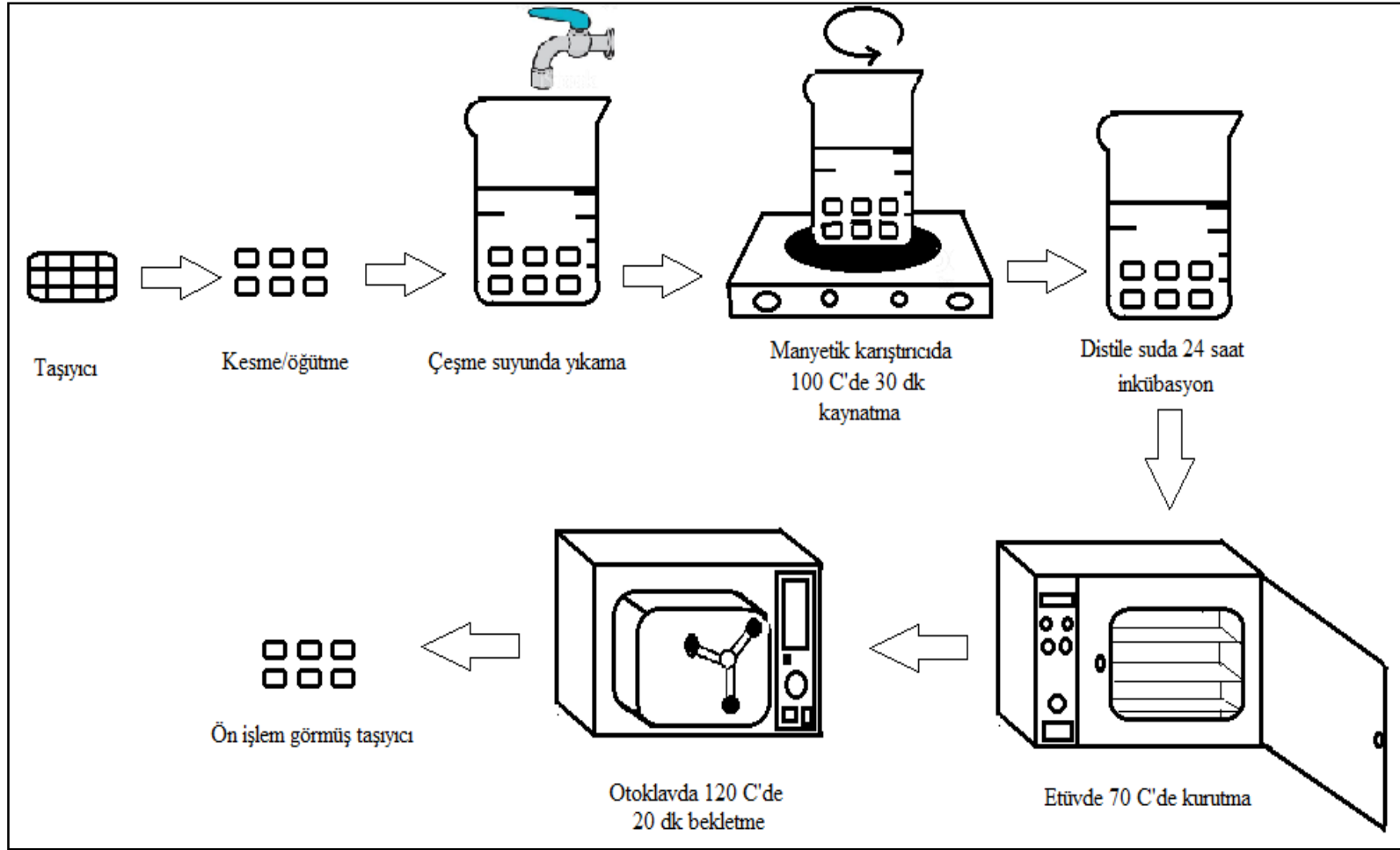
Şekil 4.9 Tescan Vega3 marka SEM cihazı

4.3 β -Galactosidase Enzim İmmobilizasyon Metotları

Doğada oldukça bol miktarda bulunan atıklardan kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enziminin immobilizasyonu iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. β -galactosidase enziminin immobilizasyon metotları “1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi” ve “2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi” olarak adlandırılmıştır. 1 Nolu immobilizasyon yöntemi gerçekleştirilmeden önce taşıyıcılara ön işlem uygulanmıştır. 2 Nolu immobilizasyon yöntemi gerçekleştirilmeden önce taşıyıcılara ön işlem uygulanmış olup ön işlem uygulanan taşıyıcıların glutaraldehit ile muamelesi gerçekleştirilmiştir.

Kabak lifine uygulanan ön işlem: Kabak lifleri yaklaşık olarak (5 mm)x(5 mm)x(5 mm) boyutlarında kesilmiştir. 30 dakika boyunca kaynayan musluk suyunda bekletilerek safsızlıklardan arındırılması sağlanmıştır. Kaynatılan kabak lifleri musluk suyunda yıkandıktan sonra, son olarak saf su ile yıkanmıştır. Kabak lifleri 24 saat boyunca saf suda bekletilmiş, bu süre zarfında üç kez suyu değiştirilmiştir [74]. Kabak lifleri etüvde 70 °C'de kurutulmuştur. Kurutulan kabak lifleri 120 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır.

Pirinç kabuğuna uygulanan ön işlem: Pirinç kabukları ilk olarak musluk suyunda yıkanmıştır. Daha sonra 30 dakika boyunca kaynayan musluk suyunda bekletilerek safsızlıklardan arındırılması sağlanmıştır. Kaynatılan pirinç kabukları musluk suyunda yıkandıktan sonra, son olarak saf su ile yıkanmıştır. Pirinç kabukları 24 saat boyunca saf suda bekletilmiş, bu süre zarfında üç kez suyu değiştirilmiştir. Pirinç kabukları etüvde 70 °C'de kurutulmuştur. Kurutulan pirinç kabukları, 120 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Taşıyıcılara uygulanan ön işlemin şematik gösterimi Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10 Taşıyıcılara uygulanan ön işlemin şematik gösterimi

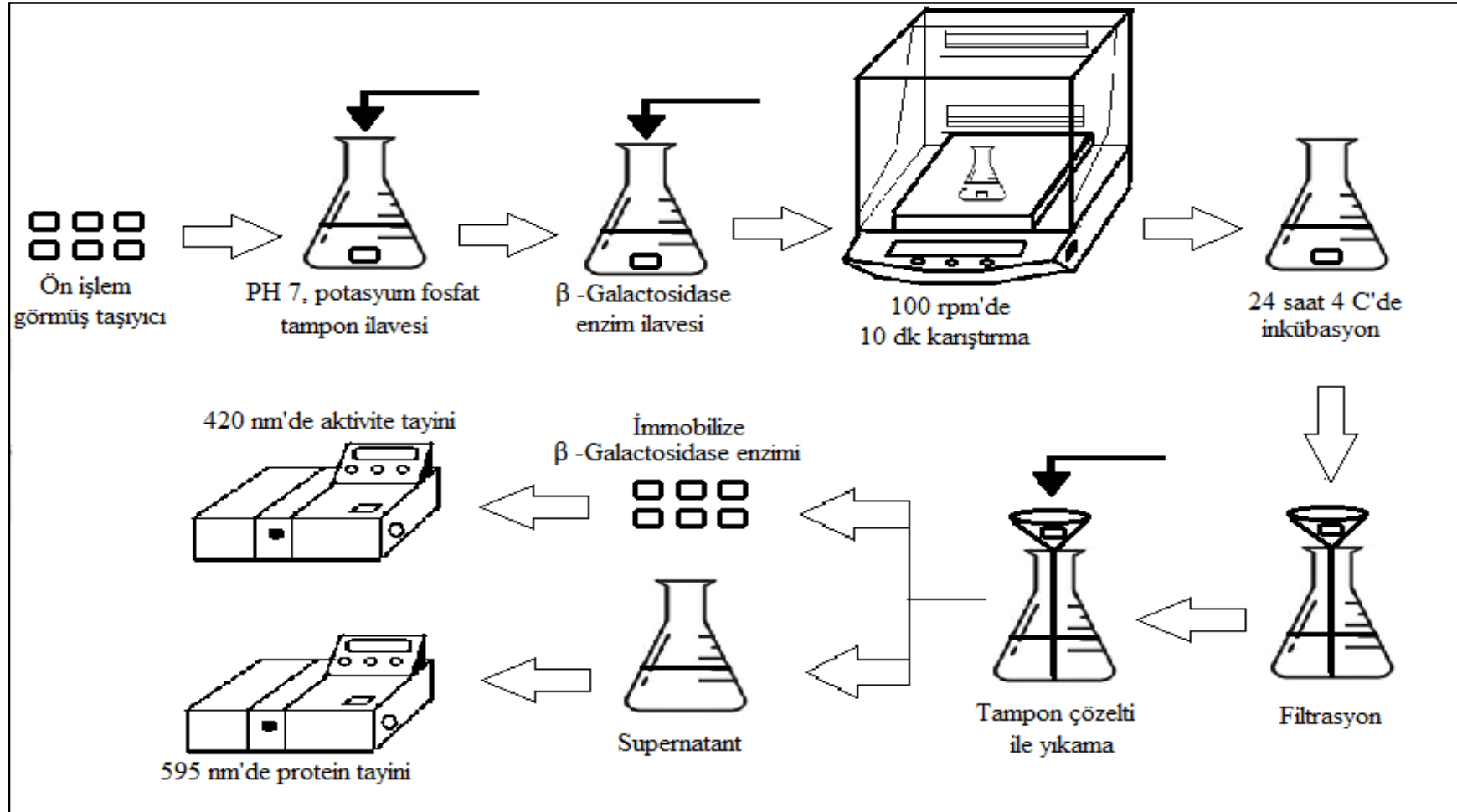
Glutaraldehit ile muamele: Ön işlem görmüş kurutulmuş taşıyıcılardan 0.1 gram tartılarak, 15 mL'lik % 2.5'lik glutaraldehit çözeltisi ile 2 saat boyunca 30 °C'de 150 rpm karıştırıcı hızında karıştırılmış ve böylece taşıyıcıların glutaraldehit ile muamelesi gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehitin fazlasının uzaklaştırılması için taşıyıcılar üç kez saf su ile yıkanmıştır.

1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi:

Ön işlem görmüş 0.1 gram kabak lifi içeren 5 mL pH 7'deki 0.1 M potasyum fosfat tamponu içerisine 100 µL enzim ilave edilmiş 100 rpm'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Çözeltiden alınan immobilize β -galactosidase enzimini tutan taşıyıcılar üç kez tampon çözelti ile yıkandıktan sonra filtrasyon yöntemi ile ıslak olarak elde edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra aktivite ve protein tayin işlemleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilize edilen β -galactosidase enzim numuneleri 4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Ön işlem görmüş 0.1 gram pirinç kabuğu içeren 5 mL pH 7'deki 0.1 M potasyum fosfat tamponu içerisine 100 µL enzim ilave edilmiş 100 rpm'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 °C'de bir gece buzdolabında bekletilmiştir. Çözeltiden alınan immobilize β -galactosidase enzimini tutan pirinç kabukları üç kez tampon çözelti ile yıkandıktan sonra filtrasyon yöntemi ile ıslak olarak elde edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra aktivite ve protein tayin işlemleri gerçekleştirilmiştir. 1 Nolu immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi Şekil 4.11'de verilmiştir.

Kabak lifi ve pirinç kabuğu haricinde barut ağacı, sinir otu, kırk kilit otu, cinnema otu, soğan kabuğu, malezya meyvesi kabuğu, hurma çekirdeği, deniz sünger taşıyıcı materyal olarak seçilmiştir. Ancak seçilen bu materyaller üzerine β -galactosidase enziminin 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilizasyonunun gerçekleşmediği tespit edilmiştir.

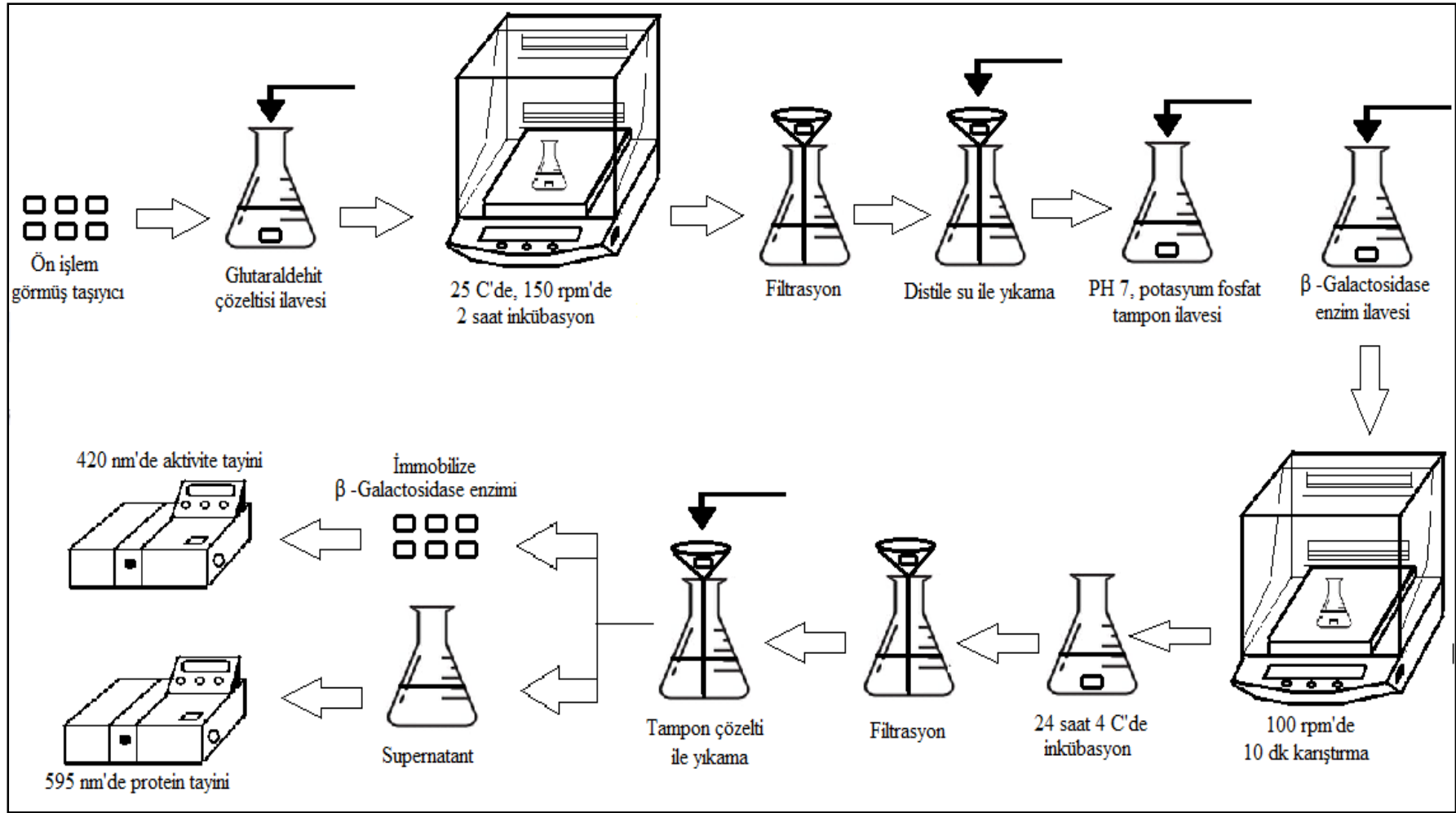


Şekil 4.11 1 Nolu immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi

2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi:

Glutaraldehit ile muamele edilmiş 0.1 gram kabak lifini içeren 5 mL pH 7'deki 0.1 M potasyum fosfat tamponu içerisine, 100 µL β-galactosidase enzimi ilave edilmiş, 100 rpm'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 °C'de bir gece buzdolabında bekletilmiştir. Çözeltiden alınan immobilize β-galactosidase enzimini tutan pirinç kabukları üç kez tampon çözelti ile yıkandıktan sonra filtrasyon yöntemi ile ıslak olarak elde edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra aktivite ve protein tayin işlemleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilize edilen β-galactosidase enzim numuneleri 4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Glutaraldehit ile muamele edilmiş 0.1 gram pirinç kabuğu içeren 5 mL pH 7'deki 0.1 M potasyum fosfat tamponu içerisine, 100 µL β-galactosidase enzimi ilave edilmiş, 100 rpm'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 °C'de bir gece buzdolabında bekletilmiştir. Çözeltiden alınan immobilize β-galactosidase enzimini tutan pirinç kabukları birkaç kez tampon çözelti ile yıkandıktan sonra filtrasyon yöntemi ile ıslak olarak elde edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra aktivite ve protein tayin işlemleri gerçekleştirilmiştir. 2 Nolu immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi Şekil 4.12'de verilmiştir.



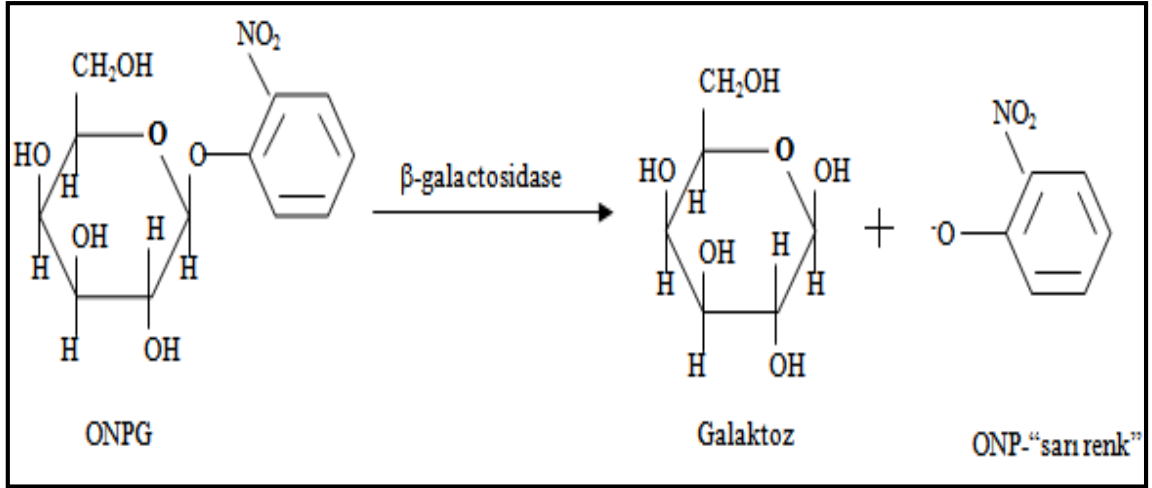
Şekil 4.12 2 Nolu immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi

4.4 Analiz Yöntemleri

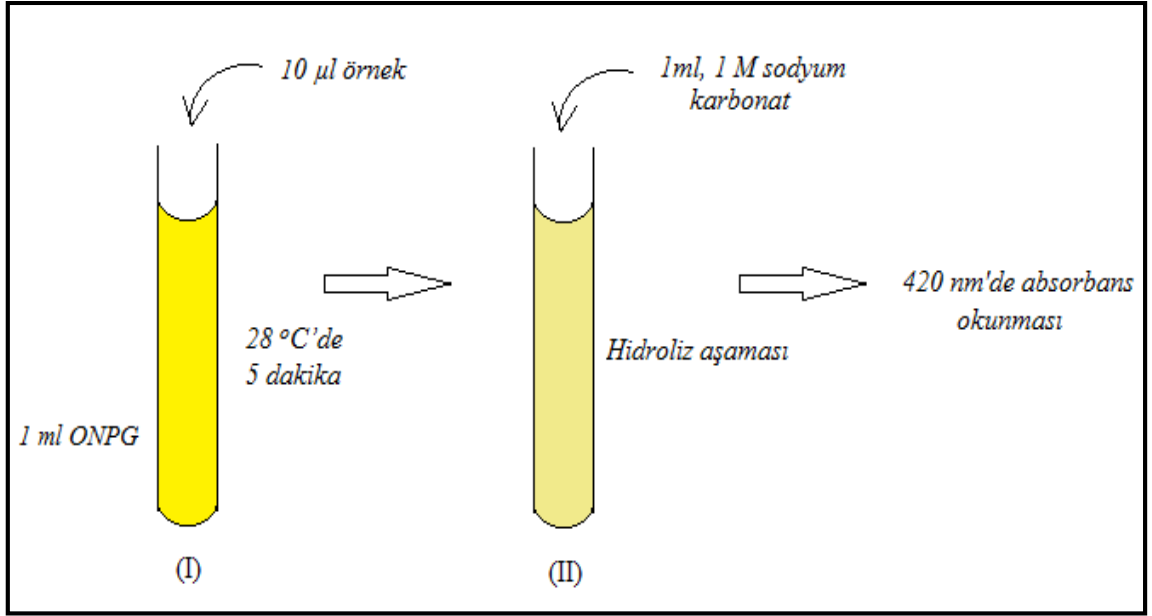
β -Galactosidase enzim aktivite tayini spektrofotometrik ölçüm metoduna dayanılarak gerçekleştirilmiş, protein miktar tayini ise Bradford metodundan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.1 β -Galactosidase Enzim Aktivite Tayini

β -Galactosidase enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki enzim aktivitesinin tayini için, işlem süresi boyunca belirli zaman aralıklarında çözeltilerden 10 μ L numune alınmış ve üzerine 1 mL ONPG çözeltisi ilave edilerek β -galactosidase ile ONPG'nin hidrolizi sağlanmış ve 28 °C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. 5 dakika sonunda karışım üzerine 1 mL 1 M Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Referans çözeltisi ise, 10 μ L β -galactosidase enzimi içermeyen numune üzerine 2 mL ONPG ve 1 mL 1 M Na_2CO_3 ilavesiyle hazırlanmıştır. ONPG hidrolizi sonunda oluşan ONP (orto-nitrophenol)'ye ait sarımsı renkten yararlanılarak 420 nm dalga boyunda Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınli spektrofotometrede, referans çözeltisine karşılık olarak örnek çözeltilerinin absorbans değerleri okunmuştur. ONPG'nin hidroliz işlemine ait reaksiyon Şekil 4.13'te verilmiştir. β -Galactosidase enzim aktivite tayininin şematik diyagramı Şekil 4.14'te verilmiştir.

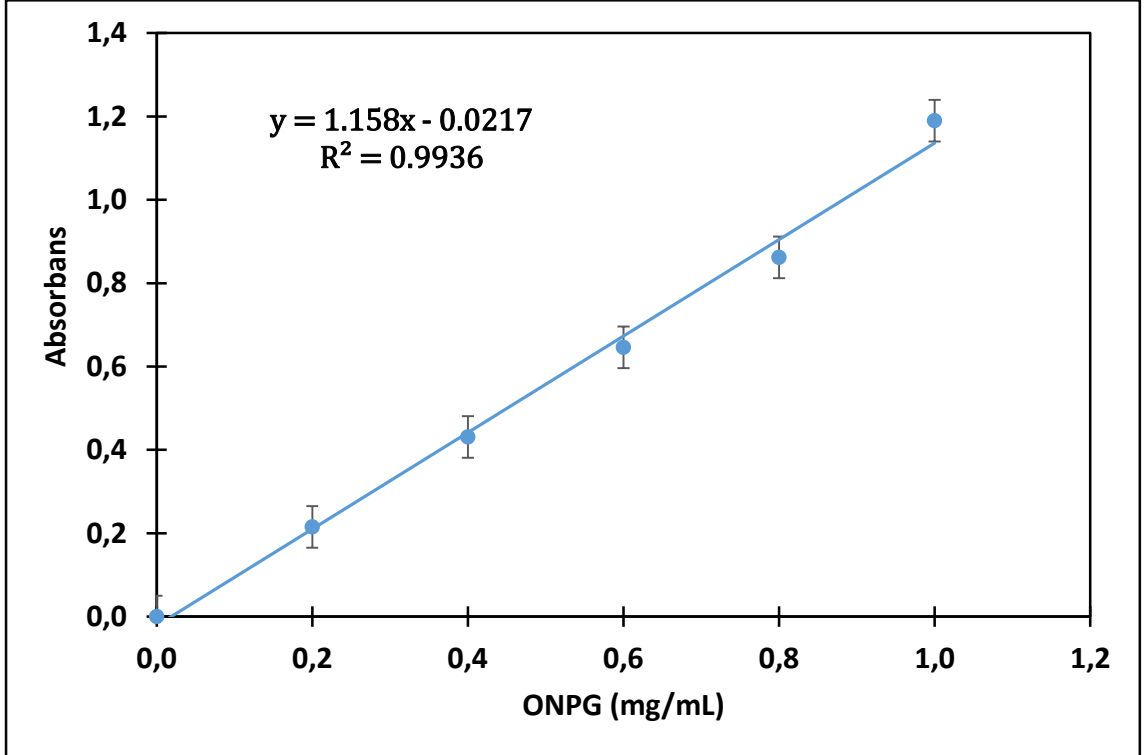


Şekil 4.13 ONPG'nin hidroliz işlemine ait reaksiyon



Şekil 4.14 β -Galactosidase enzim aktivite tayininin şematik diyagramı

Farklı ONPG konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri 420 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür ve elde edilen değerler (Tablo A.1) grafiksel olarak Şekil 4.15'te sunulmuştur.



Şekil 4.15 Farklı ONPG konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri

% β -Galactosidase enzim aktivite tayinlerinde Denklem 4.1 kullanılmıştır;

$$[A] = 100 \times ([A_1]/[A_0]) \quad (4.1)$$

Burada;

$[A_0]$ = t=0 anındaki ONP'nin absorbens değeri

$[A_1]$ = İşlem sonundaki ONP'nin absorbens değeri

$[A]$ = % β -Galactosidase enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır.

Standart koşullar altında 1 μ mol substratı 1 dakikada dönüşüme uğratan enzim miktarı 1 U (ünite) olarak tanımlanır.

Absorbans değerinin aktiviteye dönüştürülmesi için Denklem 4.2'den yararlanılmıştır.

$$Aktivite (U/mL/dk) = \frac{Abs (420 nm)}{ONP eğri eğimi} \times \frac{1}{t} \times \frac{V_1}{V_2} \times M \times 1000 \quad (4.2)$$

Burada;

Abs (420 nm) = Numunenin 420 nm dalga boyundaki absorbens değeri

t = Reaksiyon süresi (dk)

V_1 = Reaksiyon hacmi (mL)

V_2 = Enzim hacmi (mL)

M = ONP molekül ağırlığı (g/gmol)

Aktivite değerinin U/mg taşıyıcı olarak ifade edilmesi Denklem 4.3 ile sağlanmıştır.

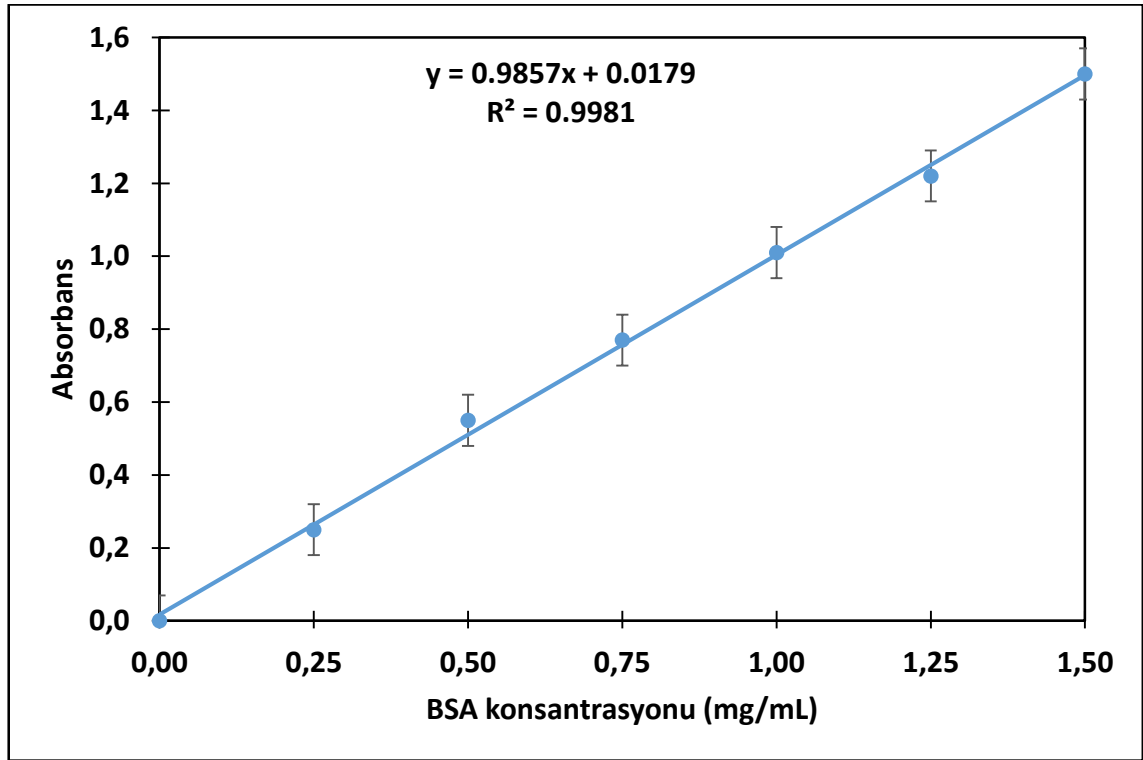
$$1 U/mg taşıyıcı = (U/mL enzim) / (mg taşıyıcı/mL enzim) \quad (4.3)$$

4.4.2 Protein Miktarı Tayini

Protein tayini, Bovine Serum Albumin standardı kullanılarak, Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [85]. Bradford yönteminin uygulanmasında Bradford Reagent Agent kiti (B 6916) kullanılmıştır. Protein tayini yapılacak olan çözeltiden 50 mL alınmış,

üzerine 1.5 mL Bradford Reagent Agent kiti (B 6916) eklenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra enzim içermeyen referans çözeltisine karşılık 595 nm’de spektrofotometrede absorbands ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Protein standart eğri grafiğinin çizilmesi için, BSA çözeltisi mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış, hazırlanan çözeltiden 0.25-1.5 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışma çözeltileri oluşturulmuştur. Bu standart çözeltilere Bradford deneyi uygulanmış, deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Bradford deneyi için Sigma firmasından temin edilen Bradford Reagent Agent kiti (B 6916) kullanılmıştır. 595 nm’de ölçülen absorbands değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak regresyon denklemi hesaplanmış ve grafik çizilmiştir. BSA standart grafiği için elde edilen veriler (Tablo A.2) grafiksel olarak Şekil 4.16’da sunulmuştur.



Şekil 4.16 Farklı BSA konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbands değerleri

4.4.3 β -Galactosidase Enzim İmmobilizasyon Değerlerinin Hesaplanması

β -Galactosidase enzim immobilizasyonu Bölüm 4.2’de belirtildiği üzere iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. 1 Nolu immobilizasyon yöntemi ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait aktivite cinsinden % geri kazanım (GK_A) değerleri Denklem 4.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

% Geri kazanım (aktivite cinsinden);

$$\% GK_A = \frac{A_{im}}{A_0} \times 100 \quad (4.4)$$

Burada;

A_{im} = İmmobilize enzim aktivitesi (U/mg)

A_0 = Başlangıç enzim aktivitesi (U/mg)

1 Nolu immobilizasyon yöntemi ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait aktivite cinsinden % etkinlik oranı (EO_A) Denklem 4.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

% Etkinlik oranı (aktivite cinsinden);

$$\% EO_A = \frac{A_{im}}{A_0 - A_S} \times 100 \quad (4.5)$$

Burada;

A_{im} = İmmobilize enzim aktivitesi (U/mg)

A_0 = Başlangıç enzim aktivitesi (U/mg)

A_S = Serbest enzim aktivitesi (U/mg)

1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemlerinin uygulanması ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait protein cinsinden % geri kazanım (GK_P) değerleri Denklem 4.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

% Geri kazanım (protein cinsinden);

$$\% GK_P = \frac{P_{im}}{P_0} \times 100 \quad (4.6)$$

Burada;

P_{im} = İmmobilize protein miktarı (mg)

P_0 = Başlangıç protein miktarı (mg)

4.4.4 Laktoz Hidrolizi

İnek sütünde bulunan % 5'lik laktoz konsantrasyonu göz önünde bulundurularak, 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisinde ve başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütünde, hazırlanan immobilize β -galactosidase enzimleri kullanılarak laktoz hidrolizi gerçekleştirilmiştir.

Laktoz hidroliz prosesleri için 10'ar mL'lik 50 g/L başlangıç konsantrasyonundaki laktoz çözeltisine ve başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütüne ayrı ayrı hazırlanmış immobilize β -galactosidase enzimleri eklenmiş, 300 rpm'de 37 °C'de deneyler gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerden 30 dakika boyunca belirli aralıklarla alınan numunelerde laktoz konsantrasyon tayini ve β -galactosidase enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir [7].

Ortamda kalan laktoz miktarının tayini için, 30 dakikalık işlem süresi boyunca 5 dakika aralıklarla 10 mL'lik reaksiyon çözeltisinden 250 μ L numune alınmış, 25 μ L 5 N HCL ilavesi ile reaksiyon durdurulmuştur. Ayrıca; 250 μ L'lik numuneler, 2.5 mL saf su ilave edilerek seyreltilmiştir. Elde edilen son karışımdan, 15 μ L örnek alınarak, üzerine 1.5 mL reaktif çözeltisi ilave edilmiştir. Buna ek olarak, 15 μ L standart çözeltisi üzerine, 1.5 mL reaktif çözeltisi ilave edilmiştir. Referans çözeltisi de, 15 μ L saf su üzerine 1.5 mL reaktif çözeltisi ilavesiyle hazırlanmıştır. Bu işlemlerin sonucunda; referans, standart ve örnek çözeltileri 10 dakika süreyle 37 °C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra, 500 nm dalga boyunda Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınli spektrofotometrede, referans çözeltisine karşılık olarak, standart ve örnek çözeltilerinin absorbans değerleri okunmuştur. Okunan absorbans değerleri ortamda bulunan glukoz aittir. Glukoz miktarından yararlanılarak ortamda kalan laktoz miktarı hesaplanmıştır [7].

Anne sütündeki başlangıç laktoz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla; 10 mL anne sütü, 300 rpm karıştırıcı hızı ve 37 °C sıcaklığa getirildikten sonra 1 mL/L aşırı enzim ilavesi ile süt içeriğindeki laktozun tümünün parçalanması sağlanmıştır. Hidroliz reaksiyonu 30 dakika sürmüştür.

300 rpm ve 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca 10, 20 ve 30. dakikalarda numuneler alınarak % hidroliz derecesi belirlenmiştir. % Hidroliz derecesinin belirlenmesinde kullanılan eşitlik Denklem 4.7'de verilmiştir.

% Hidroliz derecesi;

$$[H] = 100x \left(\frac{[S_1]}{[S_0]} \right) xf \quad (4.7)$$

Burada;

[H] = Hidroliz derecesi

[S₁] = t=0 anındaki laktoz konsantrasyonu (g/L)

[S₁] = İşlem sonunda ortamda kalan laktoz konsantrasyonu (g/L)

f = Seyreltme faktörü

4.4.5 İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel verilerin hesaplanması için Curve Expert 1.4 programı kullanılarak deneysel ve teorik değerler arasındaki sapma, en küçük kareler metodu ile hesaplanmıştır. İstatistiksel değerler Denklem 4.8 ve 4.9'da sunulmuştur.

$$SSR = \sum_{m=1}^{N_d} (C_m^{obs} - C_m^{cal})^2 \quad (4.8)$$

$$\delta^2 \cong s^2 = \frac{(SSR)_{min}}{(m - p)} \quad (4.9)$$

Burada;

m = Gözlem sayısı

N_d = Toplam deney sayısı

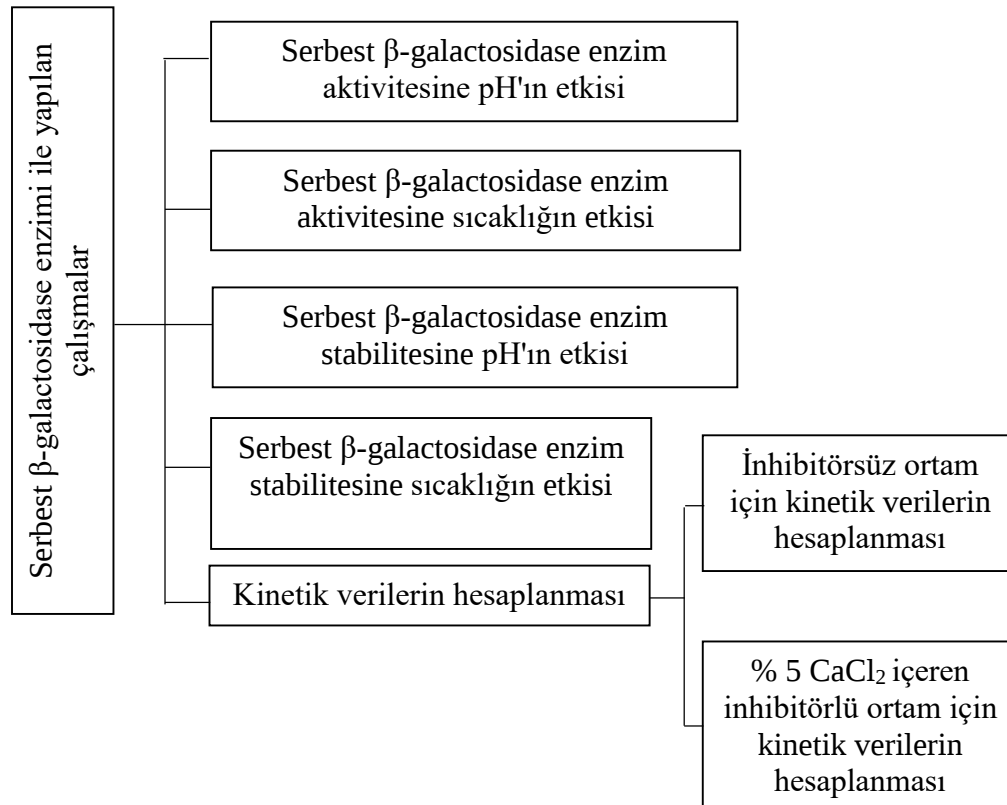
P = Parametre sayısı

δ = Standart sapma, olarak tanımlanmıştır.

4.5 Deneysel Çalışmalar

Serbest β -galactosidase enzimi ile yapılan çalışmalara ait akış şeması Şekil 4.17’de verilmiş olup gerçekleştirilen deneysel çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

- Serbest β -galactosidase enzim aktivitesine pH’ın etkisi
- Serbest β -galactosidase enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi
- Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine pH’ın etkisi
- Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi
- İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanması

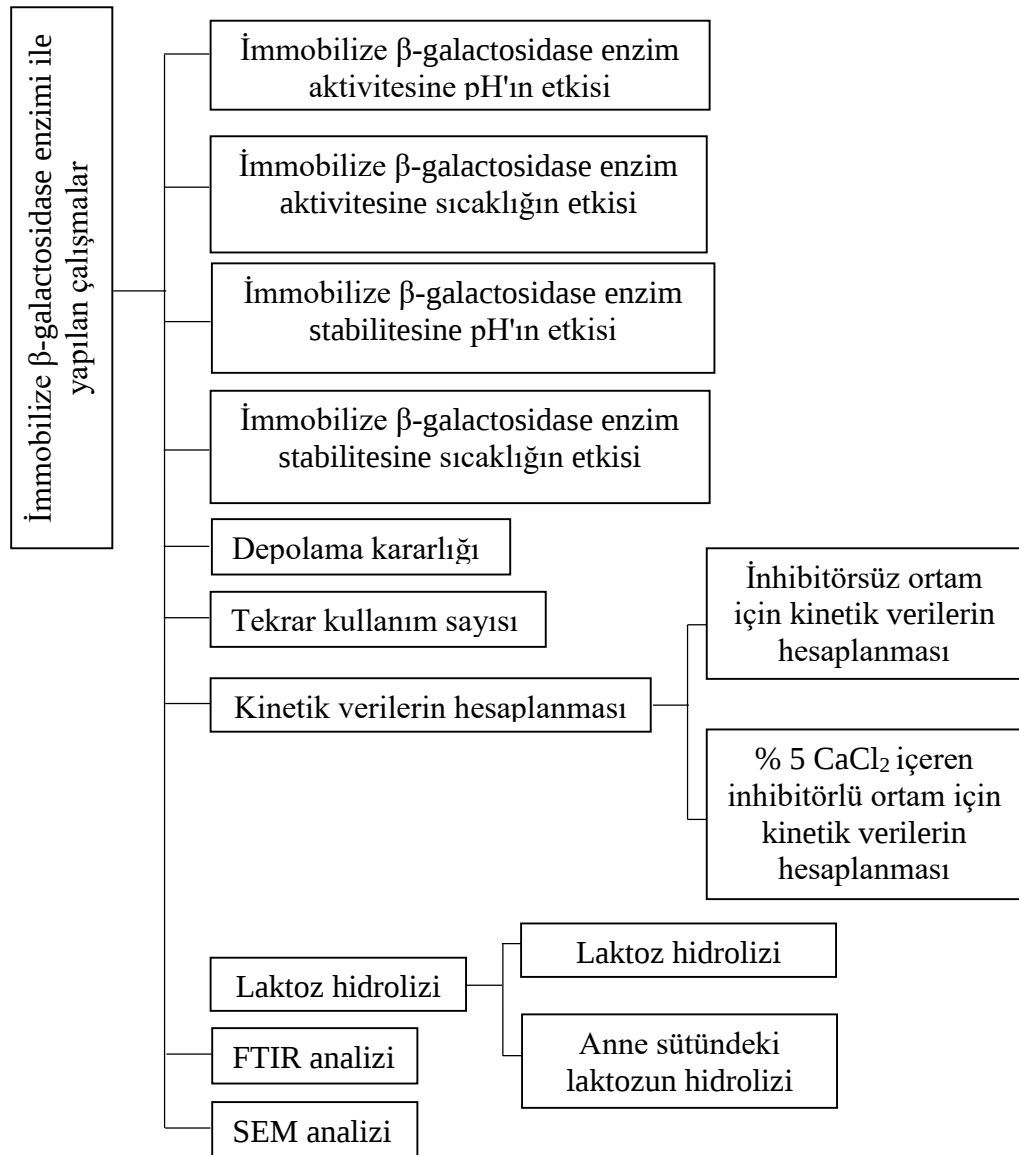


Şekil 4.17 Serbest β -galactosidase enzimi ile yapılan çalışmalara ait akış şeması

Elde edilen immobilize β -galactosidase enzimleri ile yapılan çalışmalara ait akış şeması Şekil 4.18’de verilmiş olup gerçekleştirilen deneysel çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

- Immobilize β -galactosidase enzim aktivitesine pH’ın etkisi
- Immobilize β -galactosidase enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi
- Immobilize β -galactosidase enzim stabilitesine pH’ın etkisi

- İmmobilize β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi
- Depolama kararlılığı
- Tekrar kullanım sayısı
- İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanması
- Laktoz çözeltisinde ve anne sütünde laktoz hidrolizi
- İmmobilize β -galactosidase enzim karakterizasyon çalışmaları



Şekil 4.18 İmmobilize β -galactosidase enzim numuneleri ile yapılan çalışmalara ait akış şeması

4.5.1 Serbest β -Galactosidase Enzimi ile Yapılan Çalışmalar

Serbest β -galactosidase enzimi için optimum pH, optimum sıcaklık değerleri saptanmış, serbest β -Galactosidase enzim stabilitesine pH'ın ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

4.5.1.1 Serbest β -Galactosidase Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

Serbest β -galactosidase enziminin farklı pH'lardaki aktivitelerini incelemek için pH 4-9 aralığındaki tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Serbest β -galactosidase enzim aktivitesine pH'ın etkisini incelemek amacıyla 5 mL tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra serbest β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak serbest β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir.

4.5.1.2 Serbest β -Galactosidase Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Serbest β -galactosidase enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivitelerini incelemek için 30, 35, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Serbest β -galactosidase enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla pH 7'deki 5 mL 0.1 M tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra serbest β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

4.5.1.3 Serbest β -Galactosidase Enzim Stabilitesine pH'ın Etkisi

Bir enzimin pH değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine pH'ın etkisini ifade eder. Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika süre ile inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile serbest β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır.

4.5.1.4 Serbest β -Galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [86]. Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için pH 7'deki 5 mL 0.1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase ilave edildikten sonra 30-50 °C aralığındaki sıcaklıklarda 30 dakika süre ile inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile serbest β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

4.5.2 İmmobilize β -Galactosidase Enzimleri ile Yapılan Çalışmalar

İmmobilize β -galactosidase enzimleri için optimum pH, optimum sıcaklık değerleri saptanmış, immobilize β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Ayrıca depolama kararlılığı, tekrar kullanım sayısı, laktoz hidrolizi incelenerek kinetik veriler hesaplanmıştır.

4.5.2.1 İmmobilize β -Galactosidase Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

İmmobilize β -galactosidase enziminin farklı pH'lardaki aktivitelerini incelemek için pH 5-9 aralığındaki tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. 5 mL 0.1 M tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir.

4.5.2.2 İmmobilize β -Galactosidase Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin farklı sıcaklıklardaki aktivitelerini incelemek için 30, 37, 40 ve 50 °C'deki sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilize β -galactosidase enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 5 mL'lik tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

4.5.2.3 İmmobilize β -Galactosidase Enzim Stabilitesine pH'nın Etkisi

Bir enzimin pH değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine pH'nın etkisini ifade eder. İmmobilize β -galactosidase enzim stabilitesine pH'nın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine pH'nın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır.

4.5.2.4 İmmobilize β -Galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [86]. İmmobilize β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra sonra 30-50 °C aralığındaki farklı sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

4.5.2.5 Depolama Kararlılığı

Depolama kararlılığı enzimin uzun süre saklanması durumunda aktivitesinin kaybının ölçümü olup enzimin kullanılabilirliğinin ve güvenilirliğinin önemini gösteren bir özelliktir. İmmobilize ve serbest β -galactosidase enzimlerinin depolama kararlılığının, yani raf ömrünün belirlenmesi için 28 gün içinde birer hafta aralıklarla Bölüm 4.1.1'de belirtilen yöntemle aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Birinci günde yapılan enzim aktivite tayin sonucu % 100 olarak kabul edilmiş, diğer haftalarda ölçülen enzim aktivite ölçüm sonuçları relatif olarak hesaplanmıştır. Depolama süresince serbest ve immobilize β -galactosidase enzimleri tampon çözelti içinde 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.5.2.6 Tekrarlı Kullanım Sayısı

İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacı ile immobilize β -galactosidase enzimlerinin dört defa ardışık olarak kullanıldığında substrat üzerinde gösterdiği aktivitesi Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde ölçülmüştür. İmmobilize

β -galactosidase enziminin aktivitesi ilk deneme sonucunda % 100 alınmış, tekrarlı kullanımlar sonrasında kalan relatif enzim aktivite değerleri optimum koşullar altında tayin edilmiştir.

4.5.2.7 Kinetik Verilerin Hesaplanması

Enzim konsantrasyonu enzimatik reaksiyonların hızı ile doğru orantılıdır. Fakat bu her zaman lineer bir ilişki gösteremeyebilir. Enzimlerin çoğunun içinde bulunan inhibitör ve aktivatörler ya da elde edilen ürünlerin inhibisyon özelliği içermesi bu lineer hattın görülmesine engel olabilirler. Dolayısı ile enzim konsantrasyonunun artması tepkimeyi hızlandıramayabilir. Substrat konsantrasyonun etkisi ise şu şekildedir; substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı belli bir noktaya kadar artar; substrat doygunluğa ulaştığında reaksiyonun hızı genellikle değişmez [4].

Kinetik verilerin hesaplanması için substrat çözeltileri için 0.2-1 mg/mL arasındaki farklı konsantrasyonlarda ONPG çözeltileri hazırlanmıştır. S değerleri hazırlanan ONPG çözeltilerinin konsantrasyon değerini (mg/mL), V ise ONPG değerlerine ait olan hız değerlerini (U/mL) göstermektedir. 1/S'e karşılık çizilen 1/V değerlerinden elde edilen grafiğin kesim noktası $1/V_{max}$ değerini vereceğinden, kesim noktasından yararlanılarak V_{max} değerleri hesaplanmış, grafiğin eğimi ise K_m/V_{max} değerini vereceğinden, grafiğin eğiminden yararlanılarak K_m değeri hesaplanmıştır.

Enzim aktivitesinin inhibisyonu çalışmaları genellikle enzim seçiciliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı ve reaksiyonun kinetik mekanizması hakkında bilgi verir. Ansari ve Husain 2020 [68] yaptıkları çalışmalarda CaCl_2 'nin β -galactosidase enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da CaCl_2 'nin serbest ve immobilize β -galactosidase enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi incelenmiştir. İnhibitör olarak CaCl_2 kullanılarak, % 5 CaCl_2 (w/v) varlığındaki substrat ortamında elde edilen kinetik dataların Michealis Menten eşitliğine (Denklem 2.3) uygun olması sebebiyle Linewear Burke grafikleri kullanılmış serbest ve immobilize β -galactosidase enzimleri için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize β -galactosidase enzimleri için inhibitörsüz ortam için K_m ve V_{max} değerleri Linewear Burke grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

4.5.2.8 İmmobilize β -Galactosidase Kullanılarak Laktozun Hidrolizinin İncelenmesi

İmmobilize β -galactosidase enzimleri ile laktozun hidroliz işlemi laktoz çözeltisi ve anne sütü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Laktoz çözeltisi için 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan 10 mL'lik laktoz çözeltisine immobilize β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. İmmobilize β -galactosidase enziminin laktoz çözeltisi içindeki 30 dakikalık inkübasyon işlemi süresi boyunca, 10, 20 ve 30. dakikalarda Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde immobilize β -galactosidase enzimlerinin aktivite ölçümü yapılmıştır. Hidroliz reaksiyonu boyunca 10, 20 ve 30. dakikalarda çözeltide bulunan laktoz konsantrasyonları Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Elde edilen veriler, immobilize β -galactosidase enzimlerinin laktoz hidroliz verileri ile karşılaştırılmıştır.

Anne sütündeki laktozun hidrolizlenmesi prosesi için, öncelikli olarak 10 mL'lik anne sütündeki başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenmiştir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenen anne sütüne immobilize β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. İmmobilize β -galactosidase enziminin anne sütü içindeki 30 dakikalık inkübasyon işlemi süresi boyunca 10, 20 ve 30. dakikalarda Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde immobilize β -galactosidase enzimlerinin aktivite ölçümü yapılmıştır. Hidroliz reaksiyonu boyunca 10, 20 ve 30. dakikalarda çözeltide bulunan laktoz konsantrasyonları Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Elde edilen veriler, immobilize β -galactosidase enzimlerinin laktoz hidroliz verileri ile karşılaştırılmıştır.

4.6 İmmobilize β -Galactosidase Enzimine ait Karakterizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada; Bölüm 4.2.1'de belirtilen taşıyıcıya uygulanan ön işlem aşaması, Bölüm 4.2.2'de belirtilen glutaraldehit ile muamele aşaması, Bölüm 4.3'te belirtilen 1 ve 2 nolu immobilizasyon proseslerinden sonra elde edilen immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin karakterizasyon çalışmaları için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, immobilize enzime ait yüzey görüntüsü ve yüzey farklılıklarını incelemek amacıyla, en yüksek laktoz hidrolizini sağlayan immobilize β -galactosidase enziminin

immobilize edildiği yüzeyin immobilizasyon öncesi ve immobilizasyon sonrası SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

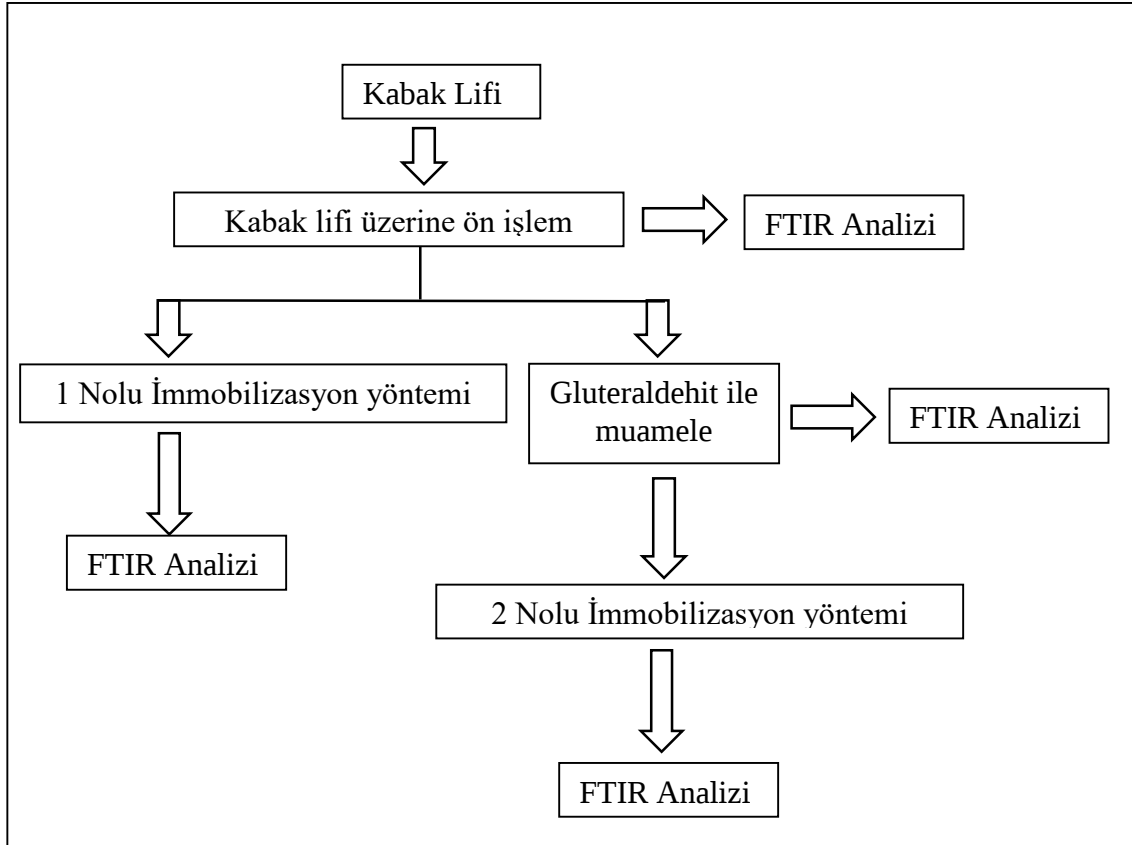
4.6.1 FTIR (Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre)

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik metottur. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 10-14000 cm^{-1} arasındadır ve üç ana bölgeden oluşur. Bunlar şu şekilde sıralanır:

- Yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; 4000~14000 cm^{-1})
- Orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; 400~4000 cm^{-1})
- Uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; 4~400 cm^{-1})

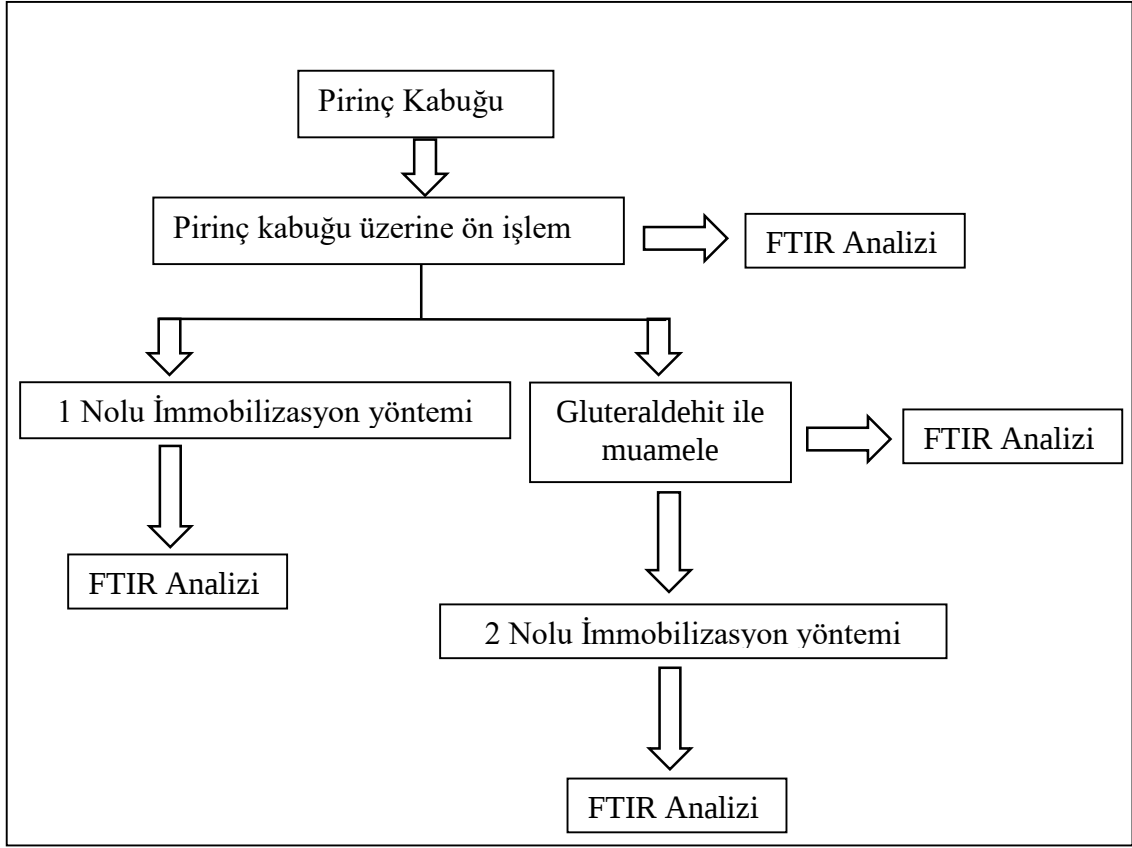
Absorpsiyon Işık Dizisi MIR spektroskopisi kimyasal olarak belirgin ve tekrarlanabilir biyokimyasal parmak izlerini oluşturan organik bileşenlerin belirlenmesi amacıyla kullanılır. 3600-1200 cm^{-1} ışık dizisi aralığı organik maddenin, ‘fonksiyonel gruplar bölgesi’ olarak adlandırılır. 1200-700 cm^{-1} arası ışık dizisi aralığı ise ikinci bölge parmak izi bölgesi olarak tanımlanır. Bu bölge, moleküldeki küçük yapısal değişiklikleri ve bileşim değişikliklerini incelemek amacıyla kullanılır. Molekülün yapısında ve bileşiminde meydana gelen küçük değişiklikler bile bu bölgedeki absorpsiyon piklerinin büyük ölçüde yer değiştirmesi ile sonuçlanır. Bu sebeple, ikinci bölge parmak izi bölgesinde iki ışık dizisinin çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı maddeye ait olduğunu gösteren bir işarettir. Tek bağların çok büyük bir kısmı bu bölgede veya aralıktaki absorpsiyon bantları verir. Bölgenin oldukça dar olması nedeniyle, bu bölgedeki titreşim frekansları, enerjilerinin birbirine çok yakın olması sebebiyle birbirlerini çok etkiler. Buna bağlı olarak maddeye ait ışık dizilerinde görülen absorpsiyon bantları sadece bir bağ frekansından oluşan saf bir absorpsiyon bandı olmayıp kompozit bantlardır. Bu nedenle elde edilen bilgiler ancak diğer bölgelerden elde edilen bilgiler de dikkate alınarak bir sonuca varılabilir. Bu bölge ışık dizisinin en karmaşık kısmıdır. Kızıl ötesi ışık dizisindeki bantların yoğunluğu madde miktarları ile de orantılı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu özellikten yararlanılarak maddelerin kantitatif analizlerinde de FTIR yönteminden yararlanılmaktadır [87].

Bu çalışmada β -galactosidase enziminin immobilize edildiği kabak lifi yüzeyi, taşıyıcıya uygulanan ön işlem sonrasında, glutaraldehit ile muamele sonrasında, 1 ve 2 nolu immobilizasyon prosesleri sonrasında FTIR analizleri ile incelenmiştir. Elde edilen analizler birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kabak lifi ile gerçekleştirilen β -galactosidase enzim immobilizasyon çalışmaları için FTIR analizlerinin gerçekleştirildiği adımlar Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.19 Kabak lifi üzerine β -galactosidase enzim immobilizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmalara ait FTIR analiz şeması

Bu çalışmada β -galactosidase enziminin immobilize edildiği pirinç kabuğu yüzeyi, taşıyıcıya uygulanan ön işlem sonrasında, glutaraldehit ile muamele sonrasında, 1 ve 2 nolu immobilizasyon prosesleri sonrasında, FTIR analizleri ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Pirinç kabuğu ile gerçekleştirilen β -galactosidase enzim immobilizasyon çalışmaları için FTIR analizlerinin gerçekleştirildiği adımlar Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20 Pirinç kabuğu üzerine β -galactosidase enzim immobilizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmalara ait FTIR analiz şeması

4.6.2 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

Görüntü elde etmek için ışıktan daha çok elektronları kullanan mikroskop Elektron Mikroskobu büyük bir alan derinliğine sahip olup yüksek büyütme sağlar. Rezolüsyon gücü 2-20 Å aralığında olan elektron mikroskobu yüksek görüntü kalitesi, detay zenginliği ve yüksek görüntü netliğine sahiptir. Scanning-Elektron Mikroskobu (SEM) elde edilen örnekleri yüzbin kez büyütürken yüzey yapılarını görüntüler ve yüzeydeki farklılıkları ortaya koyar. SEM tıp, biyoloji, madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri değerlendirmede yaygın olarak kullanılan bir elektron mikroskop çeşitidir [88]. Bu çalışmada elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerinden laktoz hidroliz proseslerinde hidroliz derecesi en yüksek olan immobilize β -galactosidase enziminin yüzey görüntüsünün değerlendirilmesi için taşıyıcının immobilizasyon prosesi öncesindeki yüzey görüntüsü ve immobilizasyon prosesi sonrasındaki yüzey görüntüsü incelenerek yüzey farklılıkları değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada doğada oldukça bol miktarda bulunan atıklardan kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine gıda endüstrisinde laktosuz ürünlerin üretilmesinde kullanılan *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enziminin immobilizasyonu, Bölüm 4.3'te belirtildiği üzere 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. β -Galactosidase enzim aktivite tayinlerinde spektrofotometrik yöntem kullanılması sebebiyle taşıyıcıların çözeltiye renk vermemesi gerekmektedir. Kabak liflerinin çözeltiye renk verip vermediğinin tespiti için spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Bu amaçla, enzim içermeyen 0.1 M pH 7'deki potasyum fosfat tampon içerisine kabak lifleri eklenerek 0, 15, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda numuneler alınmış ve spektrofotometrede 420 nm'de ölçüm yapılmıştır. Elde edilen ölçümler ile kabak lifinin çözeltiye renk vermediği ispatlanmıştır. Kullanılan kabak liflerine ait görseller Şekil 5.1'de gösterilmiştir.

Pirinç kabuklarının çözeltiye renk verip vermediğinin tespiti için spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Bu amaçla, enzim içermeyen 0.1 M pH 7'deki potasyum fosfat tampon içerisine pirinç kabukları eklenerek 0, 15, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda numuneler alınmış ve spektrofotometrede 420 nm'de ölçüm yapılmıştır. Elde edilen ölçümler ile pirinç kabuğunun çözeltiye renk vermediği ispatlanmıştır. Kullanılan pirinç kabuğuna ait görseller Şekil 5.2'de gösterilmiştir.

Çözeltiye renk vermediği ispatlanan kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzim numunelerinin aktivite cinsinden ve protein cinsinden geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Serbest β -galactosidase enzimi ve immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. Enzim stabilitelerine sıcaklık ve pH'ın etkileri incelenmiştir. İmmobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin depolama kararlılıkları, tekrarlı kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Ayrıca, inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için Linewear-Burke grafiği kullanılarak kinetik veriler hesaplanmıştır.

İmmobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisinde ve başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenen anne sütünde laktoz hidroliz prosesi gerçekleştirilmiştir. Laktoz hidroliz prosesi boyunca enzim aktivite tayini ve laktoz konsantrasyon tayini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1 Taşıyıcı olarak kullanılan kabak lifi



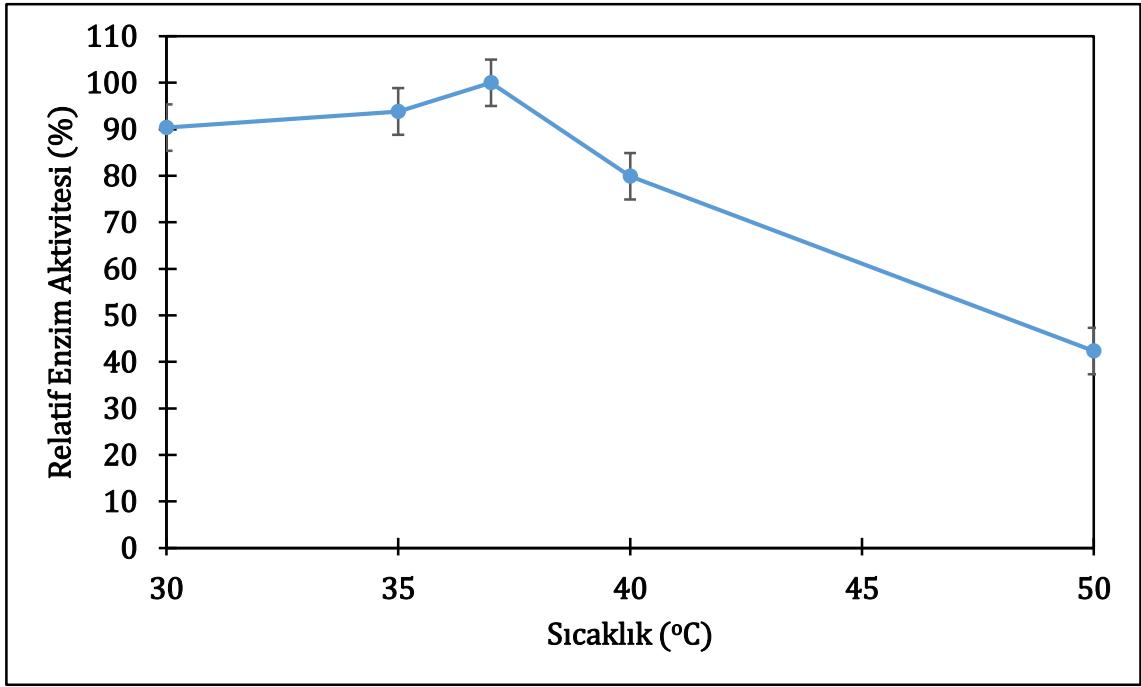
Şekil 5.2 Taşıyıcı olarak kullanılan pirinç kabuğu

5.1 Serbest β -Galactosidase Enzimi ile Yapılan Çalışmalar

Serbest β -galactosidase enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiş ve serbest β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

5.1.1 Serbest β -Galactosidase Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

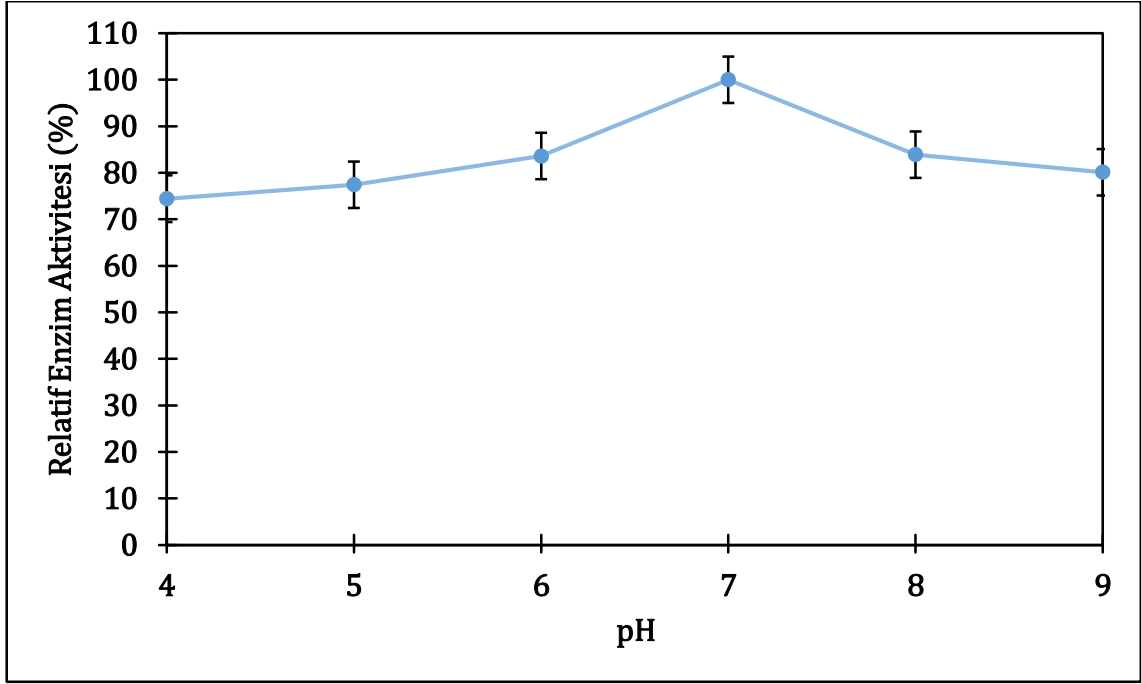
Serbest β -galactosidase enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivitelerini incelemek için 30, 35, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. pH 7'deki 5 mL tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra serbest β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Serbest β -galactosidase enziminin maksimum aktivite değerini 37 °C'de verdiği görülmüştür. Tablo A.3'te serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.3'te sunulmuştur.



Şekil 5.3 Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri (pH = 7, 300 rpm)

5.1.2 Serbest β -Galactosidase Enzimi Üzerine pH'ın Etkisi

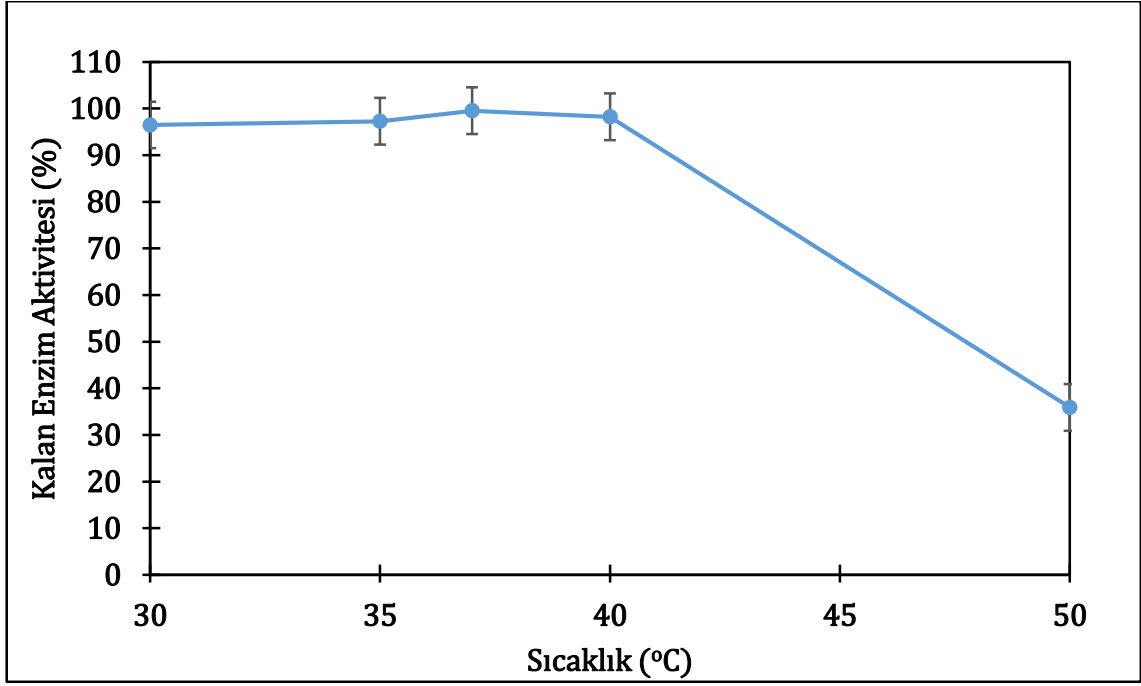
Serbest β -galactosidase enziminin farklı pH'lardaki aktivitelerini incelemek için pH 4-9 aralığındaki tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Serbest β -galactosidase enzim aktivitesine pH'ın etkisini belirlemek amacıyla 5 mL tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra serbest β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak serbest β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir. Serbest β -galactosidase enziminin optimum pH değeri 7 olarak saptanmıştır. Tablo A.4'te serbest β -galactosidase enziminin farklı pH'lardaki relatif enzim aktivite değerleri verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.4'te sunulmuştur.



Şekil 5.4 Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki relatif enzim aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

5.1.3 Serbest β -galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

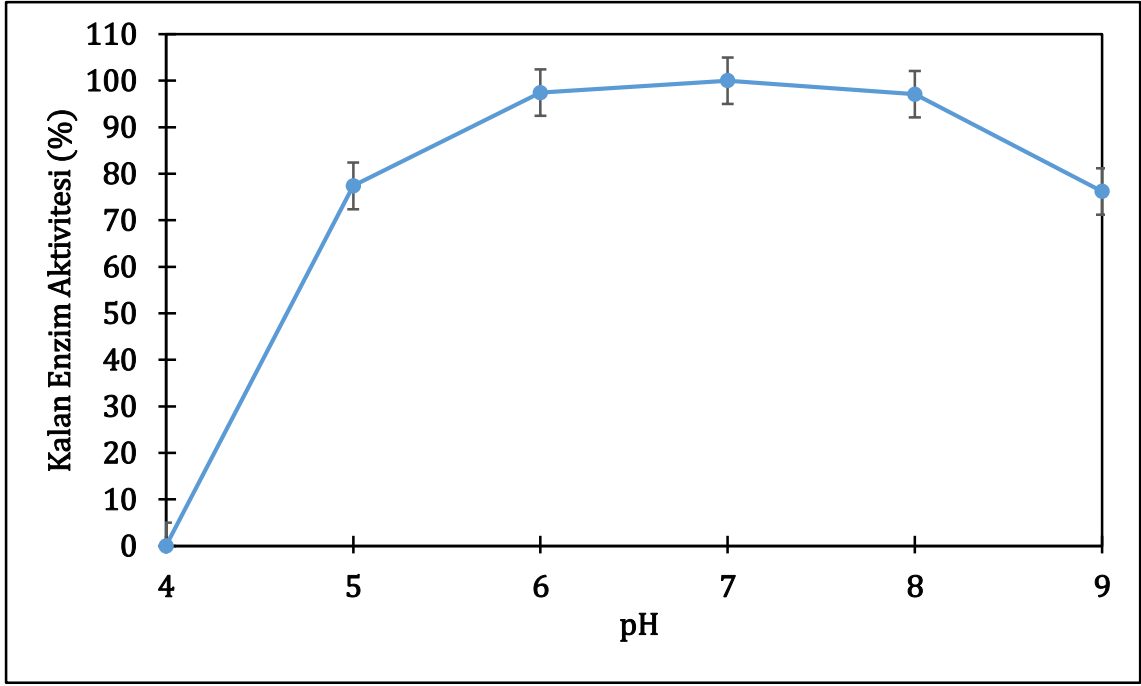
Bir enzimin substrat yokluğunda, sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [84]. Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için pH 7'deki 5 mL 0.1 M potasyum fosfat tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase ilave edildikten sonra 30-50 °C aralığındaki farklı sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile serbest β -galactosidase enzimin stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 35 ile 37 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde serbest β -galactosidase enzim stabilitesinin maksimum değerde olduğu görülmektedir. 35 °C'de kalan enzim aktivitesi % 97.22, 37 °C 'de ise % 99.53'tür. 40 °C'nin üzerine çıkıldığında serbest β -galactosidase enziminin aktivitesini hızla kaybettiği görülmektedir. 40 °C'de kalan enzim aktivitesi % 87.22, 50 °C 'de ise % 35.90'dır. Tablo A.5'te serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.5'te sunulmuştur.



Şekil 5.5 Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.1.4 Serbest β -galactosidase Enzim Stabilitesine pH'ın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda pH değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine pH'ın etkisini ifade eder. Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine 100 μ L serbest β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile serbest β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.6'da verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.6'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pH 7 olan nötr ortamda stabilitenin maksimum değerinde olduğu (% 100) , pH 4'te ise kalan enzim aktivitesinin sıfır olduğu görülmüştür. pH 6, 7 ve 8'deki ortamlarda sırasıyla % 97.43, % 100 ve % 97.08 değerleri ile birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. pH 8'in üzerine çıkıldığında serbest β -galactosidase enzim aktivitesinin düşüşe geçtiği görülmüştür.



Şekil 5.6 Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.2 Kabak Lifi Üzerine β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyon Çalışmaları

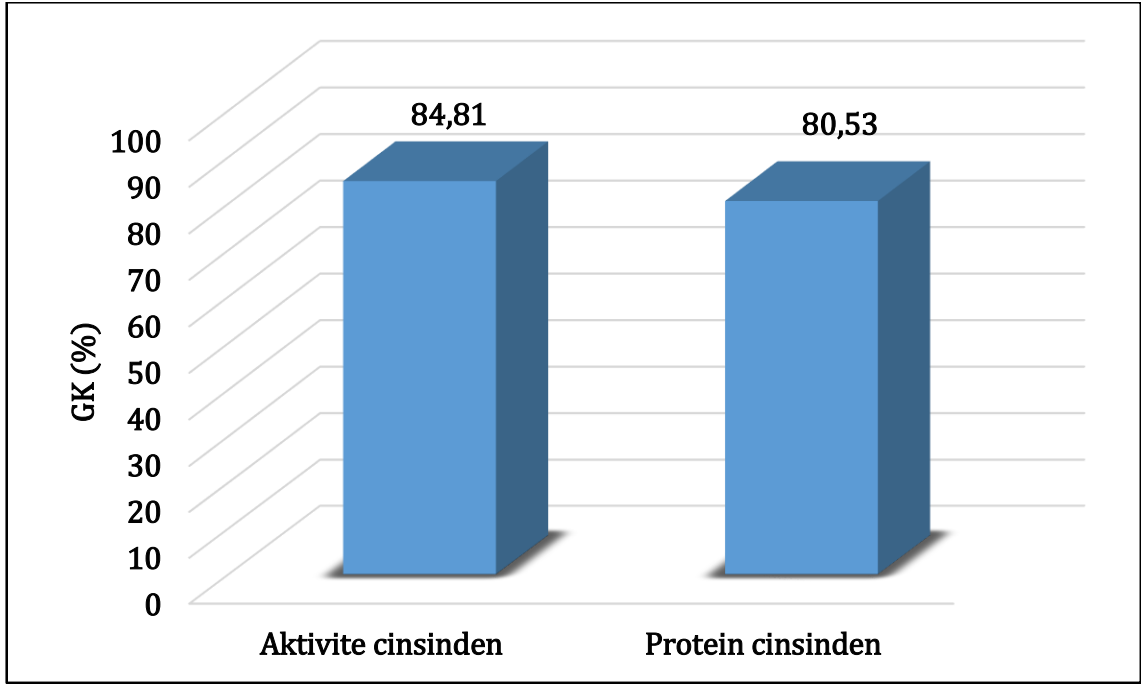
Kabak lifi üzerine β -galactosidase enziminin immobilizasyonu Bölüm 4.4'te belirtildiği üzere 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki farklı yöntem ile elde edilen immobilize β -galactosidase enzimine ait değerler, Bölüm 4.4.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

5.2.1 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile β -galactosidase enziminin immobilizasyonu sonucunda elde edilen immobilize β -galactosidase enziminin aktivite ve protein cinsinden geri kazanım değerleri Bölüm 4.4.1 ve Bölüm 4.4.2'de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri Tablo 5.1'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 5.7'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 84.81, protein cinsinden geri kazanım değeri % 80.53 ve aktivite cinsinden etkinlik oranı ise % 85.35 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.1 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri

A_s (U/mg)	A_{im} (U/mg)	GK_A (%)	GK_p (%)	EO_A (%)
0.00158	0.268	84.81	80.53	85.35

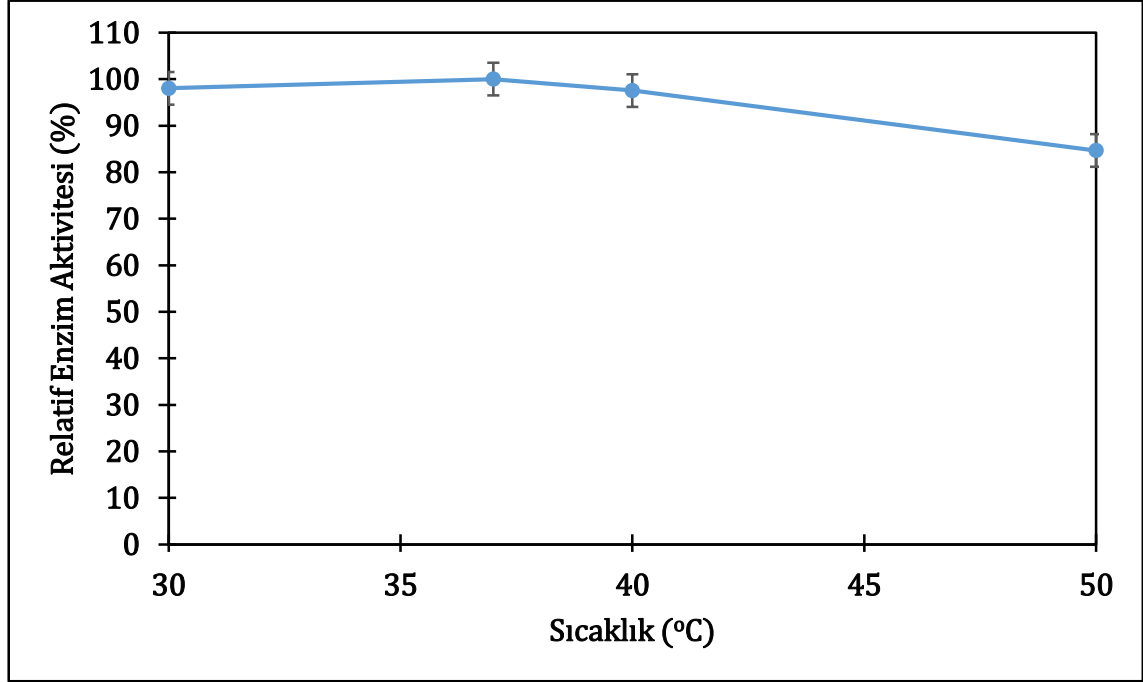


Şekil 5.7 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri

5.2.1.1 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimine Sıcaklığın Etkisi

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine sıcaklığın etkisini incelemek için 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. 5 mL'lik tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.7'de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.8'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara

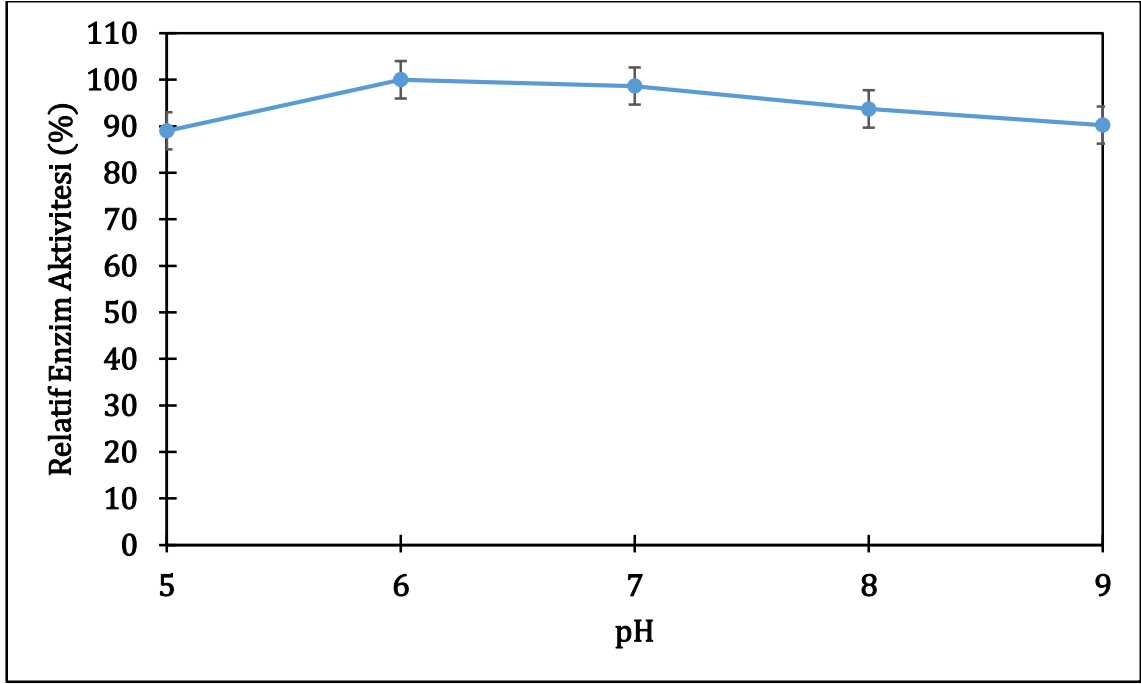
göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin maksimum aktivite değerini 37 °C’de verdiği görülmüştür.



Şekil 5.8 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri

5.2.1.2 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimine pH’ın Etkisi

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine pH’ın etkisini incelemek için pH 5-9 aralığındaki tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. 5 mL 0.1 M tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1’de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH’lardaki relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.8’de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.9’da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin optimum pH değeri 6 olarak saptanmıştır.

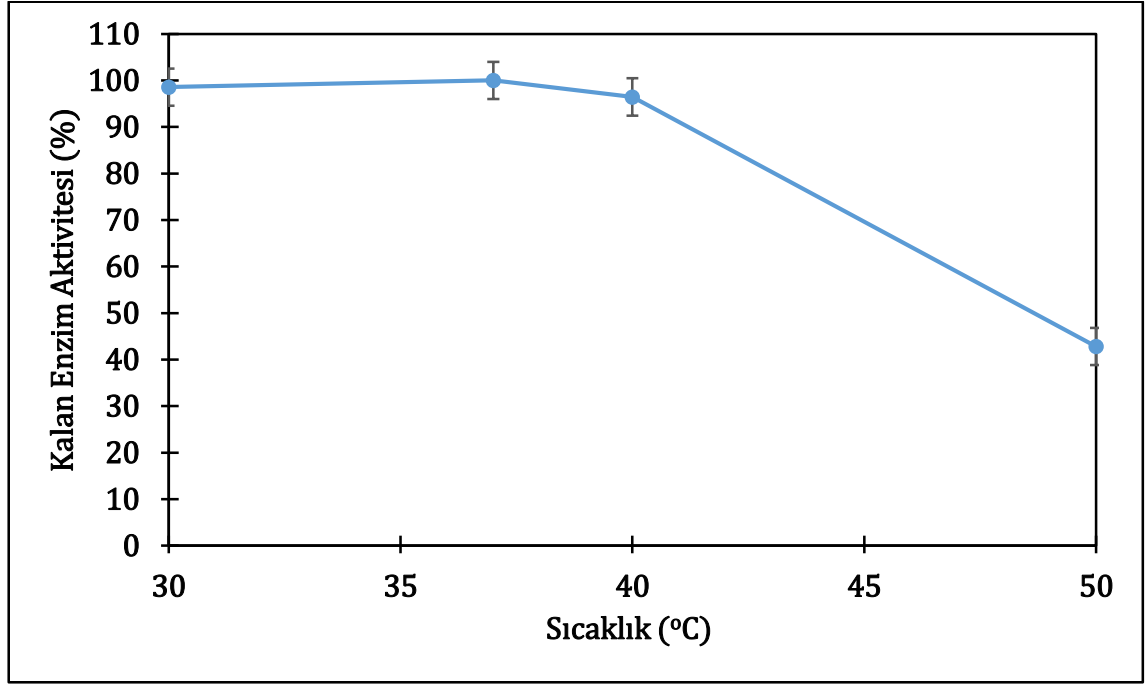


Şekil 5.9 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri

5.2.1.3 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda, sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [84]. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.9'da verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.10'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 30 ile 37 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde % kalan enzim aktivite değerlerinin diğer sıcaklıklarda elde edilen değerlere göre daha iyi olduğu görülmektedir. 30 °C 'de kalan enzim aktivitesi % 98.55, 37 °C 'deki kalan enzim aktivitesi ile % 100'dür. 40 °C'nin üzerine çıkıldığında kabak lifi üzerine 1 nolu

immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim aktivitesinin hızla düştüğü gözlemlenmiştir. 50 °C’de kalan enzim aktivitesinin % 42.80’e düştüğü görülmüştür.

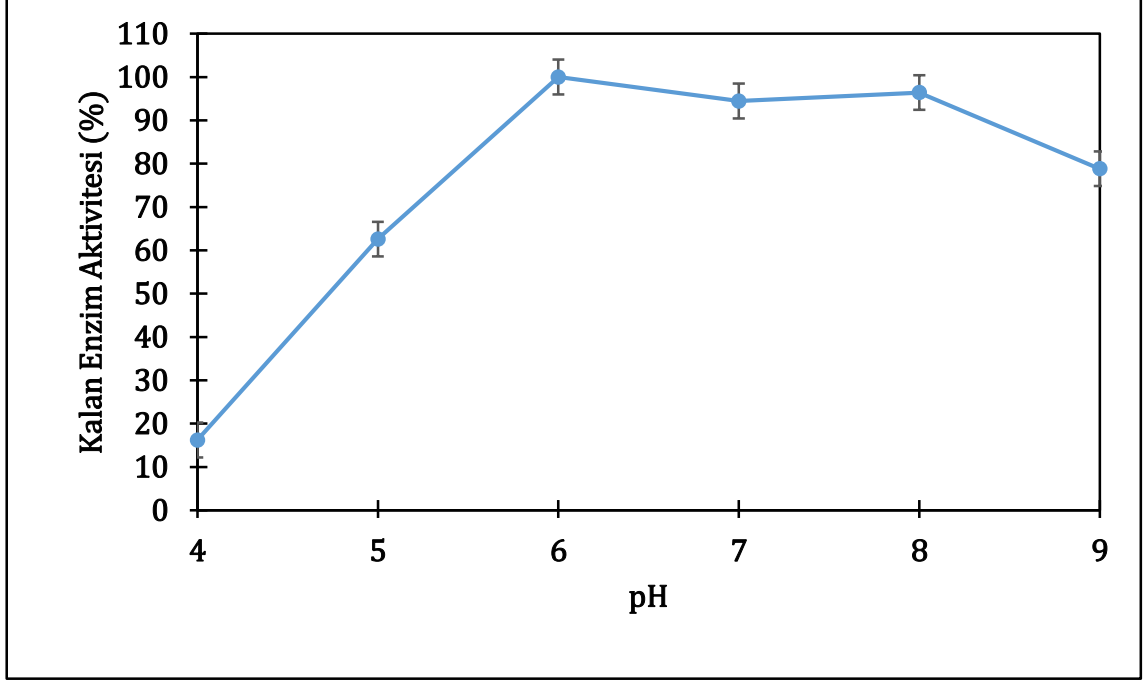


Şekil 5.10 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.2.1.4 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine pH’ın Etkisi

Bir enzimin pH değişimlerine dayanabilme özelliği, enzim stabilitesine pH’ın etkisini ifade eder. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin stabilitesine pH’ın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine pH’ın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH’lardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.10’da verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.11’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pH 4 olan asidik ortamda kalan enzim aktivitesinin % 16.21 olduğu görülmüş, pH 6’daki ortamda kabak

lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin kalan aktivitesinin maksimum değerde olduğu görülmüştür (% 100). Nötr ve pH 8'deki bazik ortamlardaki kalan enzim aktivitesinin % 96.46'ya düştüğü, pH 9'daki bazik ortamda ise kalan enzim aktivitesinin % 78.83'e düştüğü saptanmıştır.



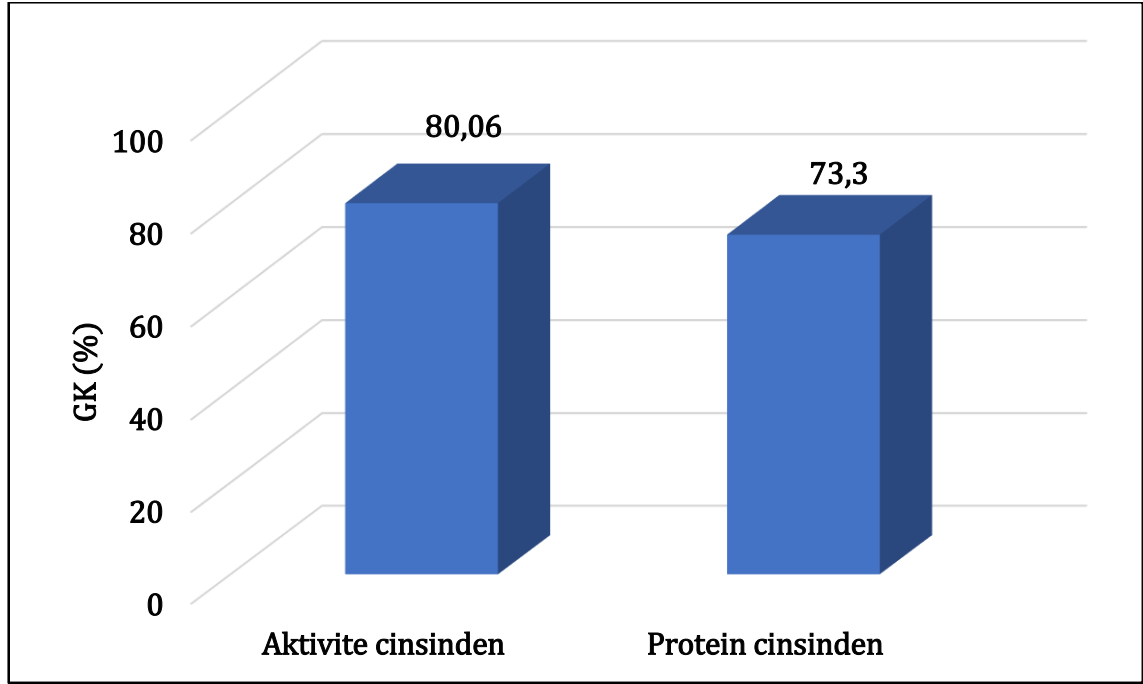
Şekil 5.11 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.2.2 Kabak Lifi Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile β -galactosidase enziminin immobilizasyonu sonucunda elde edilen immobilize β -galactosidase enziminin aktivite ve protein cinsinden geri kazanım değerleri Bölüm 4.4.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri Tablo 5.2'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 5.12'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 80.06, protein cinsinden geri kazanım değeri % 73.30 ve aktivite cinsinden etkinlik oranı ise % 85.15 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.2 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri

A_s (U/mg)	A_{im} (U/mg)	GK_A (%)	GK_p (%)	EO_A (%)
0.0189	0.253	80.06	73.30	85.15

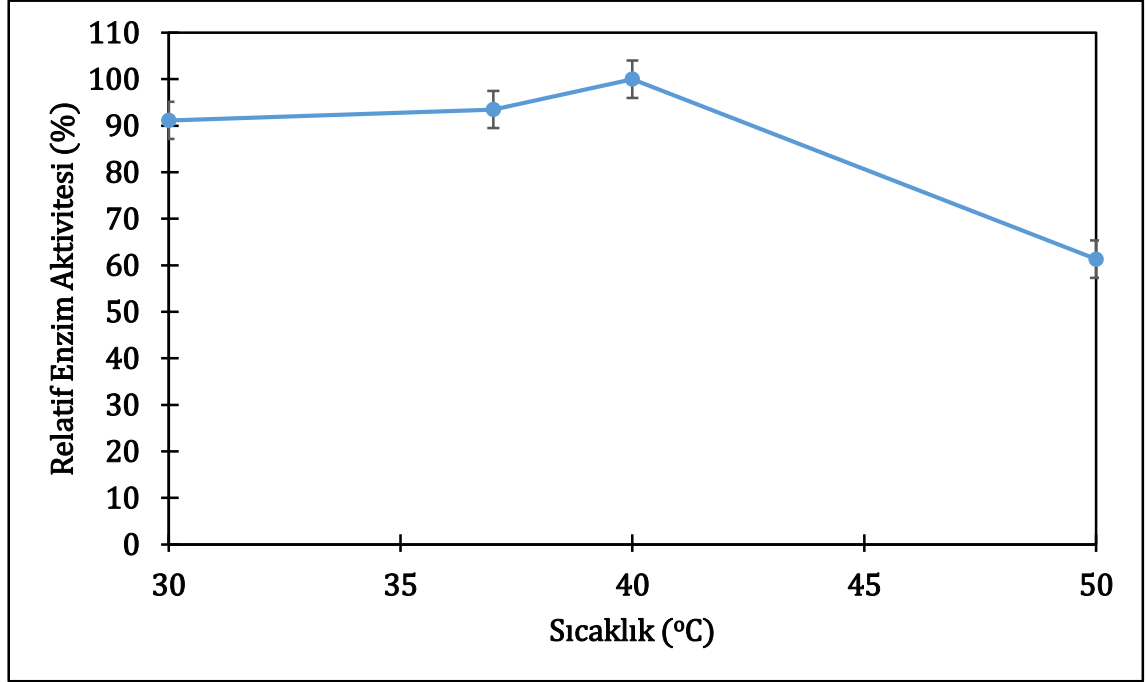


Şekil 5.12 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri

5.2.2.1 Kabak Lifi Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimine Sıcaklığın Etkisi

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine sıcaklığın etkisini incelemek için 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. 5 mL'lik tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen yöntem uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.11'de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.13'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen

β -galactosidase enziminin maksimum aktivite değerini 40 °C’de verdiği, buna karşılık 50 °C’de sıcaklık değerinde aktivitesini hızla kaybettiği görülmüştür.

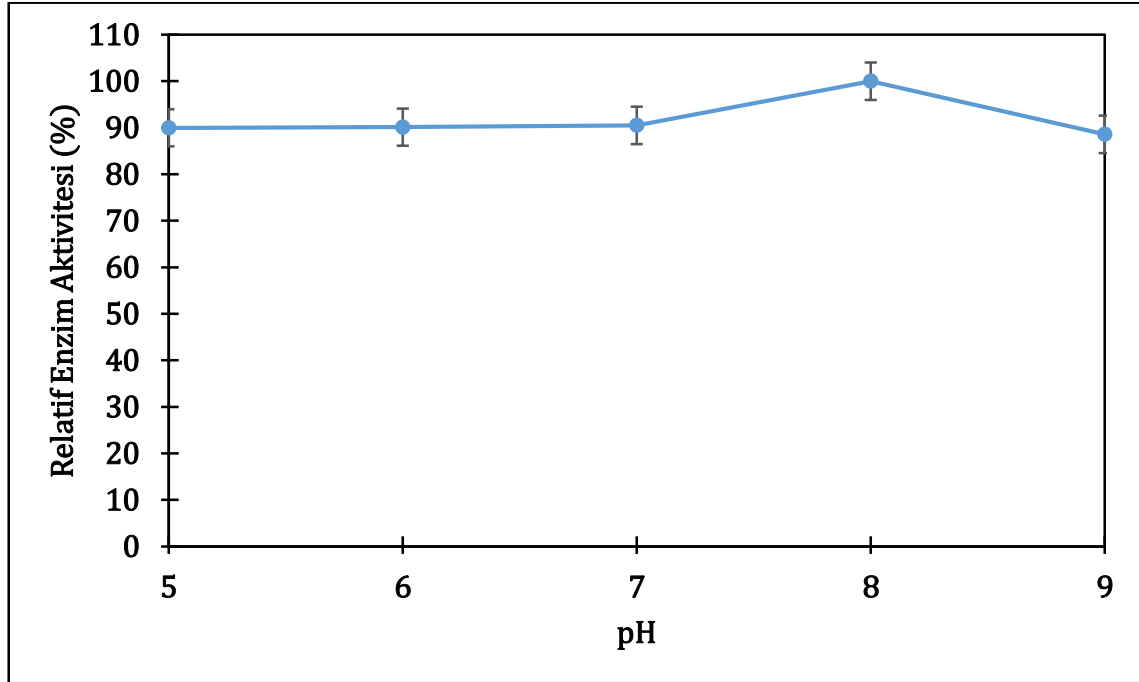


şekil 5.13 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri

5.2.2.2 Kabak Lifi  zerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -galactosidase Enzimine pH’ın Etkisi

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine pH’ın etkisini incelemek için pH 5-9 aralığındaki tampon   zeltiller kullanılmıştır. pH 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon   zeltilleri kullanılmıştır. 5 mL 0.1 M tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1’de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH’lardaki relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.12’de verilmiş olup grafiksel olarak şekil 5.14’te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8

olarak saptanmıştır. pH 8 değerinden daha yüksek veya düşük pH'a sahip ortamlardaki enzim aktivite değerleri daha düşük enzim aktivite değerleri olarak kaydedilmiştir.

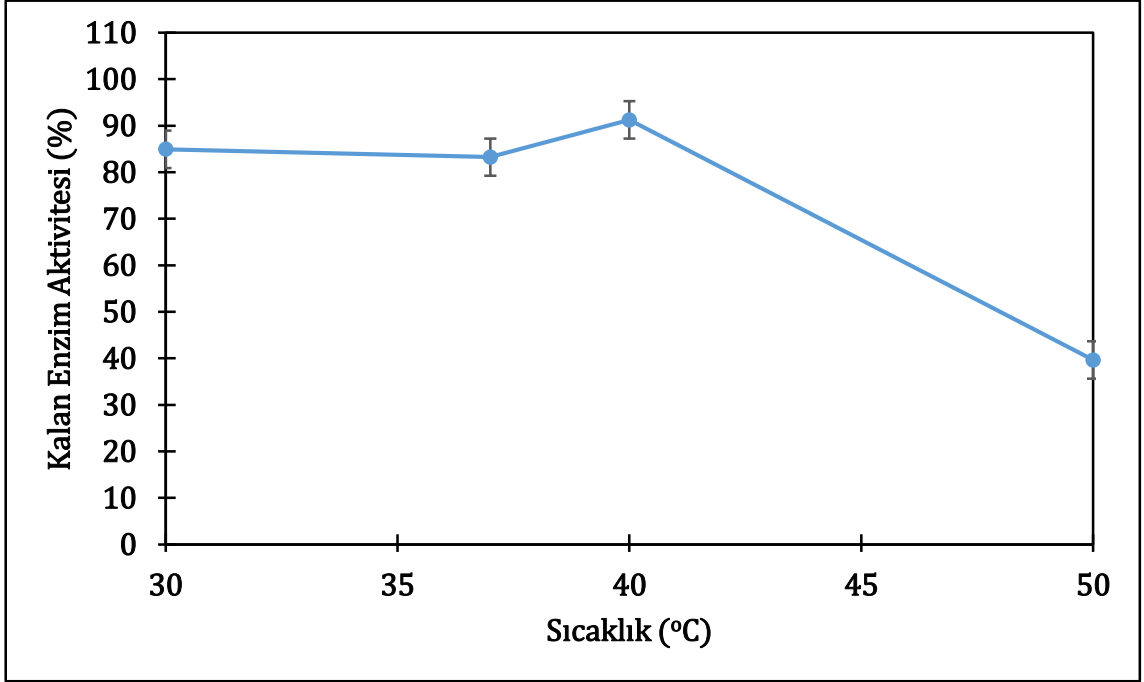


Şekil 5.14 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri

5.2.2.3 Kabak Lifi Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda, sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [84]. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra sonra 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.13'te verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.15'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 40 °C'de kalan enzim aktivite değerinin % 91.25 olduğu, 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda % enzim aktivite değerinin düştüğü görülmüştür. 30 ve

37 °C'deki kalan enzim aktivite değerlerinin ise sırası ile % 84.93 ve 83.26 değerleri ile birbirine yakın olduğu görülmüştür.

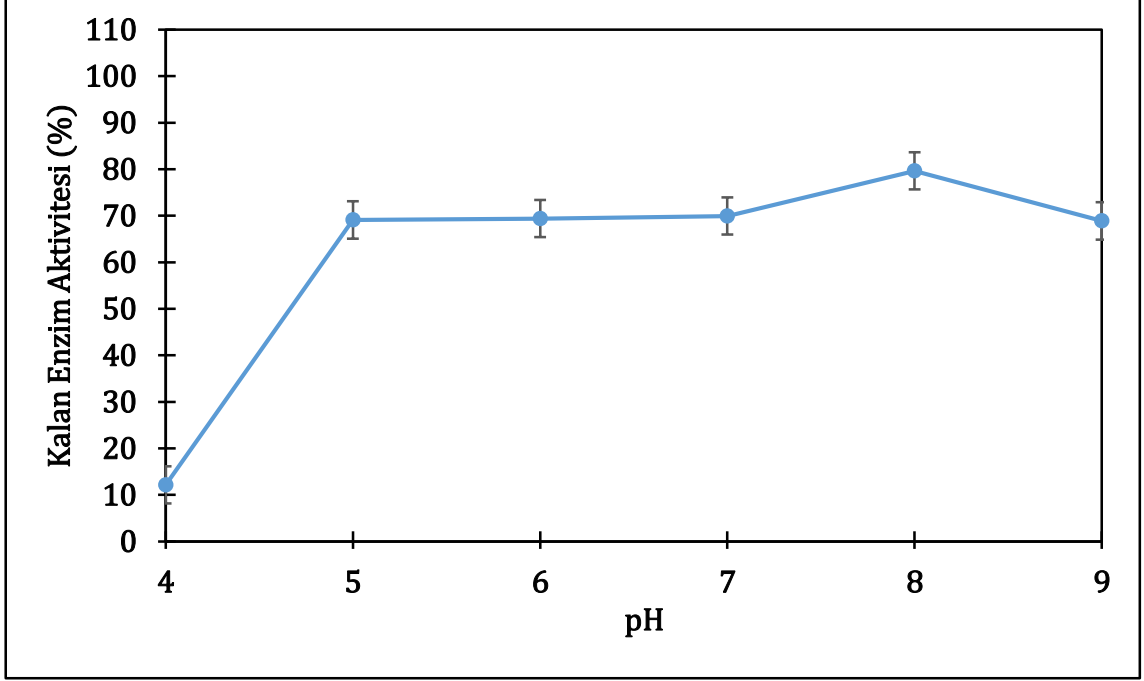


Şekil 5.15 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.2.2.4 Kabak Lifi Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine pH'ın Etkisi

Bir enzimin pH değişimlerine dayanabilme özelliği, enzim stabilitesine pH'ın etkisini ifade eder. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin stabilitesine pH'ın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.14'te verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.16'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pH 8 olan bazik ortamda % kalan enzim aktivitesinin 78.64 olduğu, pH 9'da 68.9'a düştüğü, pH 5-7 aralığındaki ortamlarda yaklaşık % 69 kalan enzim aktivite değerlerini verdiği

görölmüştü. pH 4 olan asidik ortamda ise % 12.15 değeri ile en düşük kalan enzim aktivite değeri verdiğini saptanmıştır.



Şekil 5.16 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.3 Pirinç Kabuğu Üzerine β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu Çalışmaları

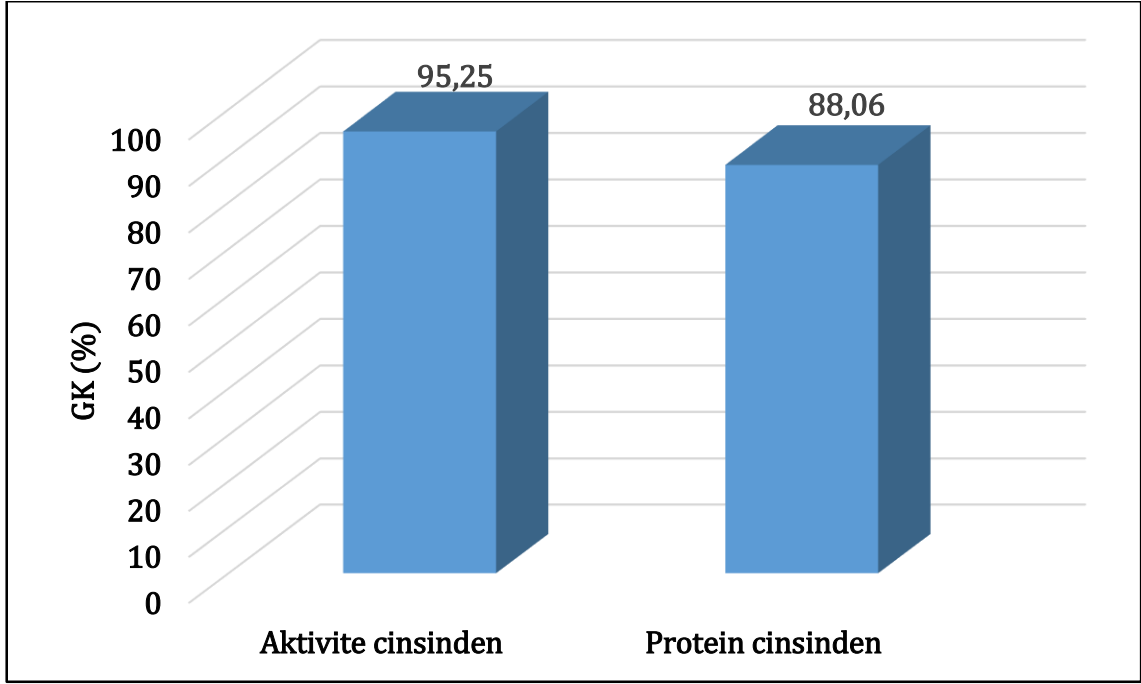
Pirinç kabuğu üzerine β -galactosidase enziminin immobilizasyonu Bölüm 3.4'te belirtildiği üzere 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki farklı yöntem ile elde edilen immobilize β -galactosidase enzimine ait değerler, Bölüm 4.4.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

5.3.1 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu

Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile β -galactosidase enziminin immobilizasyonu sonucunda elde edilen immobilize β -galactosidase enziminin aktivite ve protein cinsinden geri kazanım değerleri Bölüm 4.4.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri Tablo 5.3'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 5.17'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 95.25, protein cinsinden geri kazanım değeri ise % 88.06 ve aktivite cinsinden etkinlik oranı ise % 95.55 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.3 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri

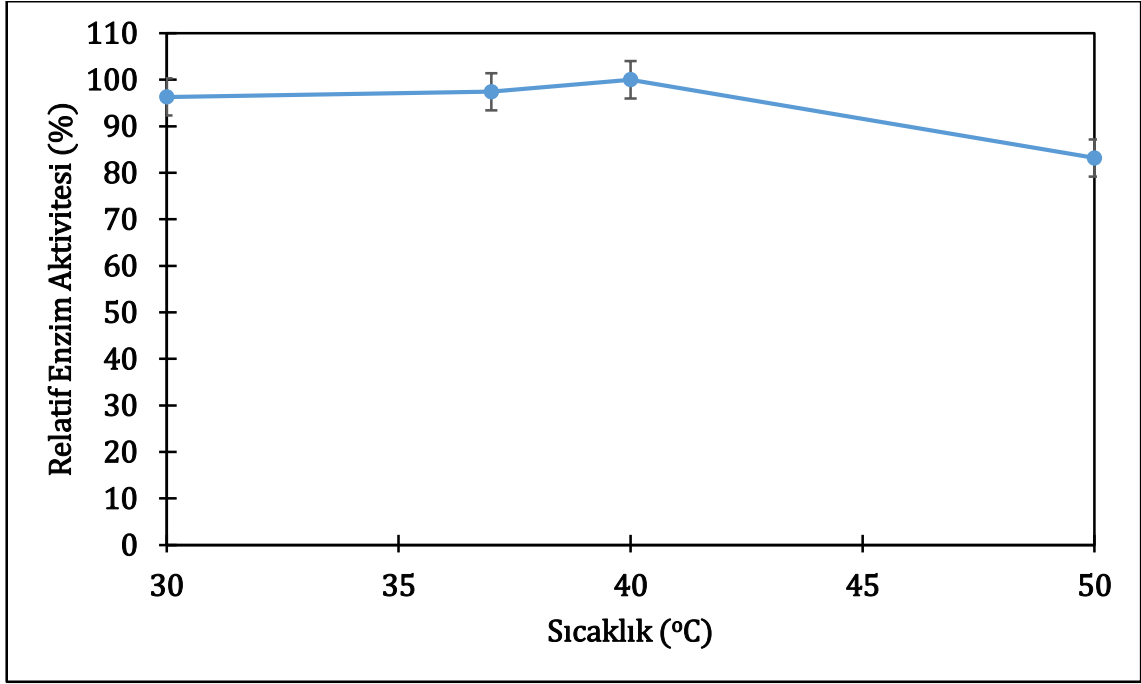
A_s (U/mg)	A_{im} (U/mg)	GK _A (%)	GK _p (%)	EO _A (%)
3.06×10^{-4}	0.301	95.25	88.06	95.55



Şekil 5.17 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri

5.3.1.1 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimine Sıcaklığın Etkisi

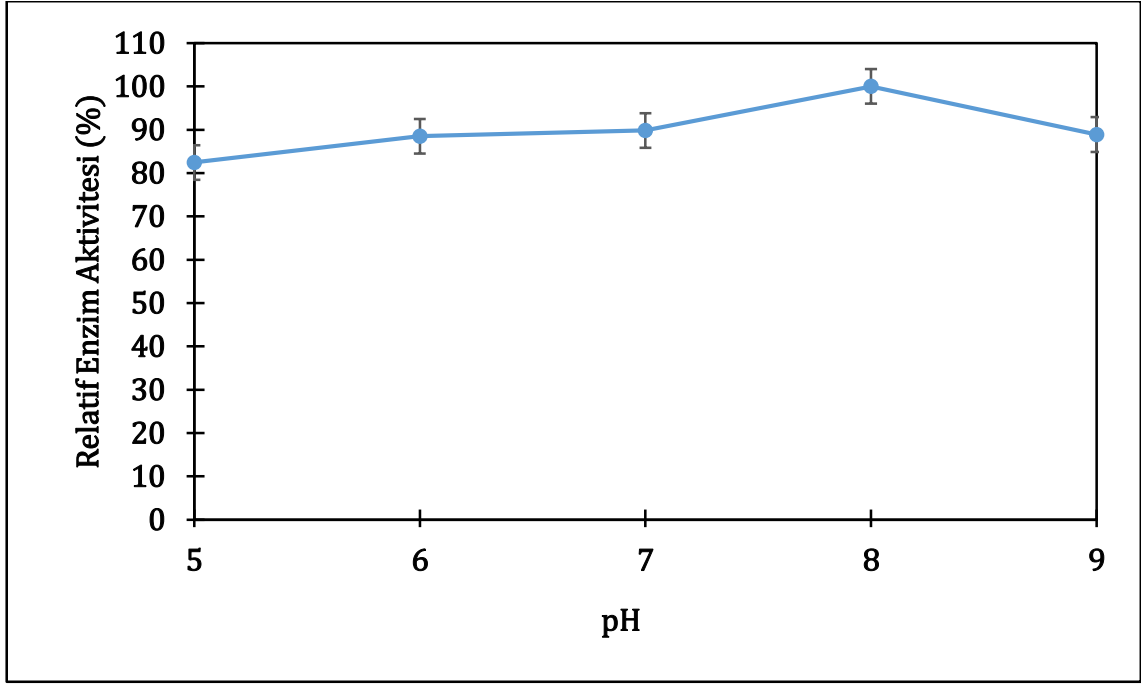
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine sıcaklığın etkisini incelemek için 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. 5 mL'lik tampon çözelti içerisine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.15'te verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.18'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 40 °C'de maksimum aktivite verdiği görülmüştür. 35 ve 37°C'de yaklaşık % 96 ve 97 relatif aktivite değerleri ile yakın sonuçlar verdiği görülmüş, 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise aktivitesini %83.19'a düşürdüğü saptanmıştır.



Şekil 5.18 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri

5.3.1.2 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -galactosidase Enzimine pH'ın Etkisi

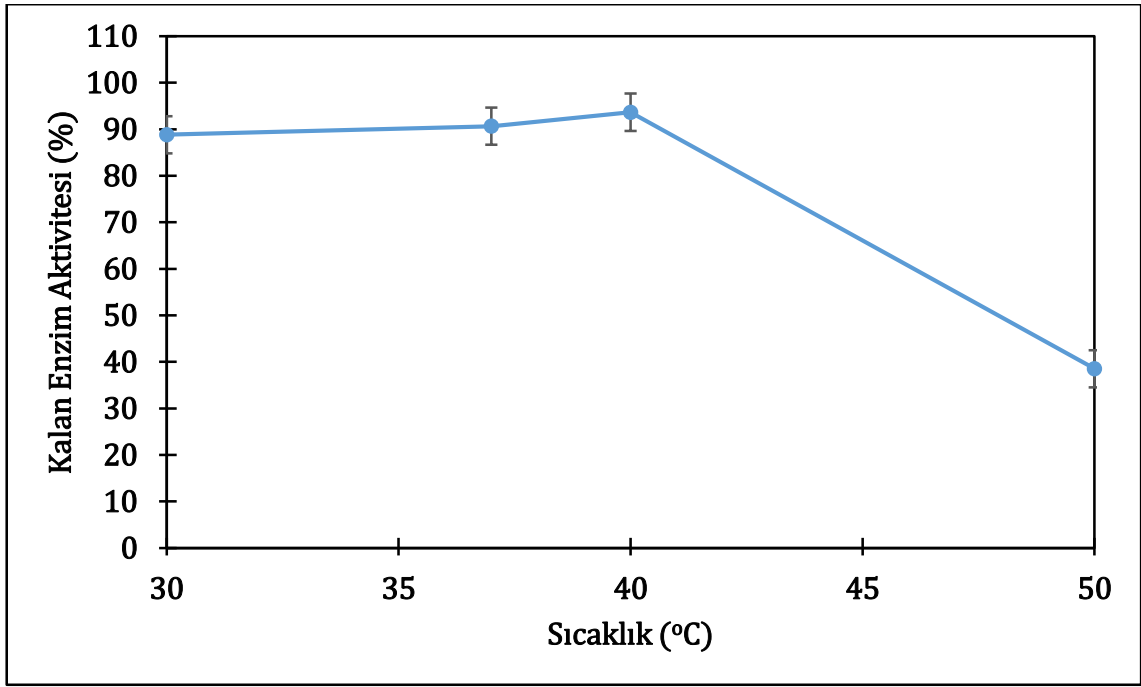
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine pH'ın etkisini incelemek için pH 5-9 aralığındaki tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. 5 mL 0.1 M tampon çözelti içine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.16'da verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.19'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olarak saptanmıştır. pH 5, 6, 7 ve 9'daki ortamlarda aktivite değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 5.19 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri

5.3.1.3 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

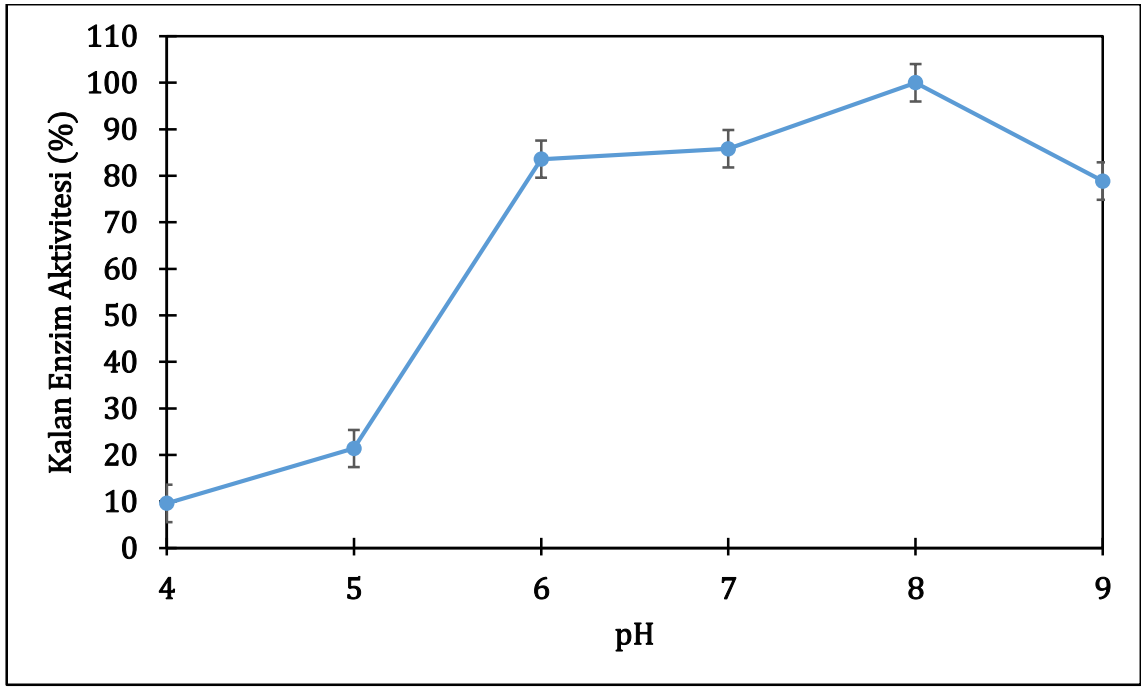
Bir enzimin substrat yokluğunda sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [84]. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra sonra 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.17'de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.20'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 30 ile 37 °C aralığındaki sıcaklıklarda sırasıyla % 88.82 ve % 90.65 değerleri ile birbirine yakın sonuçlar verdiği, en yüksek % kalan enzim aktivite değerini % 93.66 kalan aktivite değeri ile 40 °C'de verdiği görülmüştür. 40 °C'nin üzerine çıkıldığında pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim aktivitesinin hızla düştüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 5.20 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.3.1.4 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine pH'ın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda pH değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine pH'ın etkisini ifade eder. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.18'de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.21'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pH 4 ve 5'deki asidik ortamlarda kalan enzim aktivitesinin sırası ile % 9.59 ve 21.4 olduğu, pH 6 ve 7'deki ortamlarda sırası ile % 83.58 ve 85.82 ile yakın sonuçlar verdiği, pH 8'deki bazik ortamda maksimum değere sahip olduğu (% 100), pH 9'da ise kalan enzim aktivite değerinin % 78.87'ye düştüğü görülmüştür.



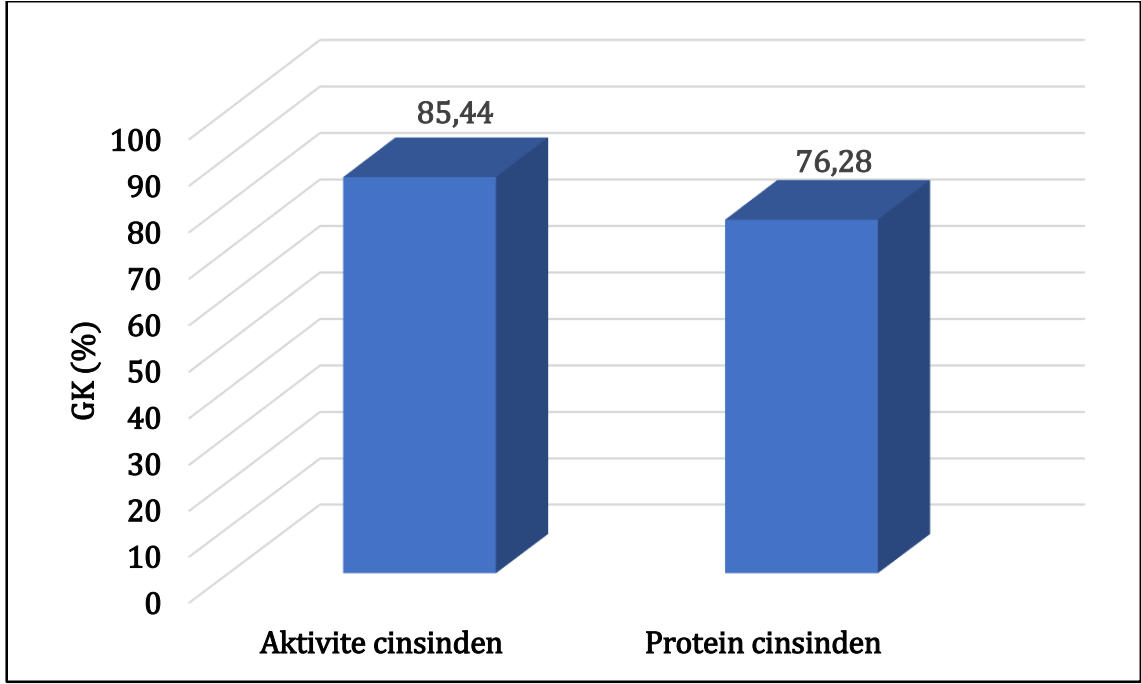
Şekil 5.21 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.3.2 Pirinç Kabuğu Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile β -Galactosidase Enziminin İmmobilizasyonu

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile β -galactosidase enziminin immobilizasyonu sonucunda elde edilen immobilize β -galactosidase enziminin aktivite ve protein cinsinden geri kazanım değerleri Bölüm 4.4.3'te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri Tablo 5.4'de verilmiş ve grafiksel olarak Şekil 5.22'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 85.44, protein cinsinden geri kazanım değeri % 76.28 ve aktivite cinsinden etkinlik oranı ise % 88.99 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.4 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım ve % etkinlik oranı değerleri

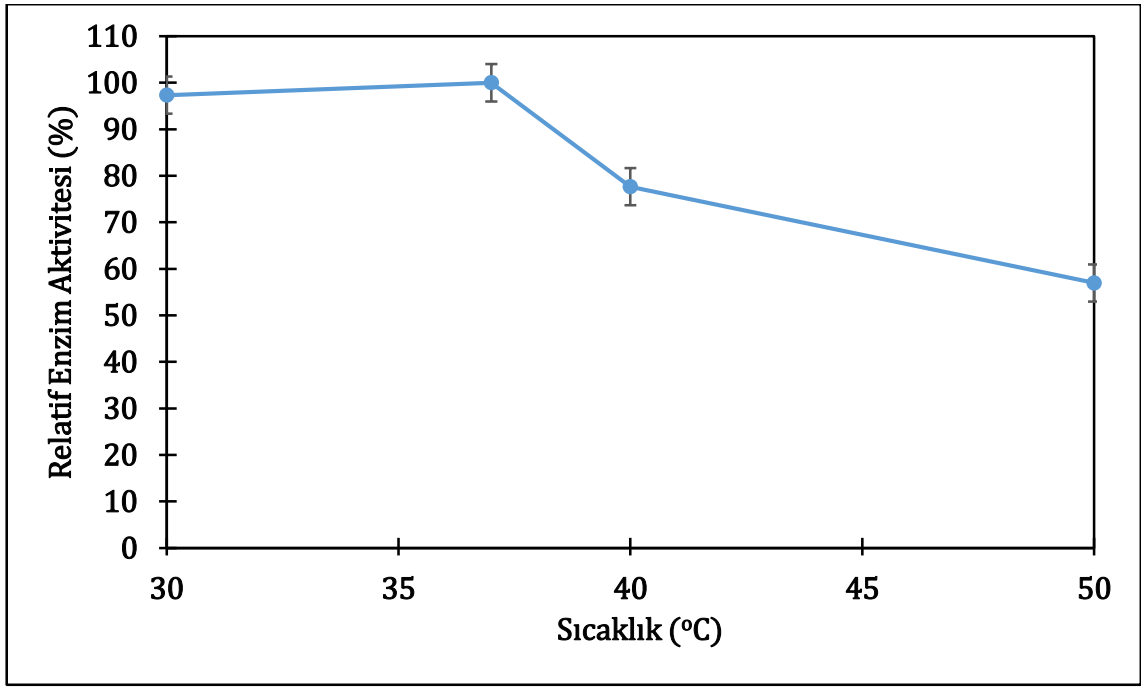
A_s (U/mg)	A_{im} (U/mg)	GK _A (%)	GK _p (%)	EO _A (%)
0.0126	0.270	85.44	76.28	88.99



Şekil 5.22 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % geri kazanım değerleri

5.3.2.1 Pirinç Kabuğu Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimine Sıcaklığın Etkisi

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine sıcaklığın etkisini incelemek için 30, 37, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. 5 mL’lik tampon çözelti içine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1’de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.19’da verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.23’te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 37 °C’de maksimum aktivite değerini verdiği, 37 °C’nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde ise aktivitesini hızla kaybettiği görülmüştür.

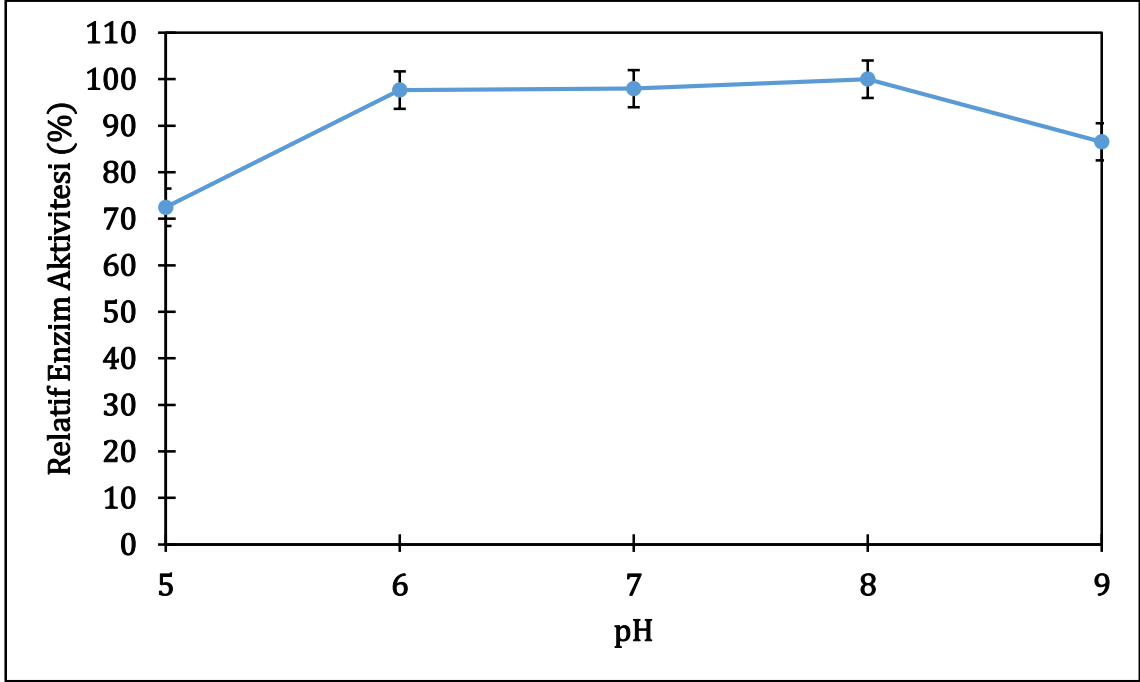


Şekil 5.23 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki relatif enzim aktivite değerleri

5.3.2.2 Pirinç Kabuğu Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimine pH'nın Etkisi

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine pH'nın etkisini incelemek için pH 5-9 aralığındaki tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. 5 mL 0.1 M tampon çözelti içine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra immobilize β -galactosidase enzim aktivite tayini için Bölüm 4.4.1'de belirtilen β -galactosidase enzim aktivite tayin yöntemi uygulanarak immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değeri belirlenmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.20'de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.24'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen immobilize β -galactosidase enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olarak saptanmıştır. pH 9'da relatif enzim aktivite değerinin % 86.54 olduğu, pH 6 ve 7'de sırası ile % 97.66 ve 97.98 ile yakın

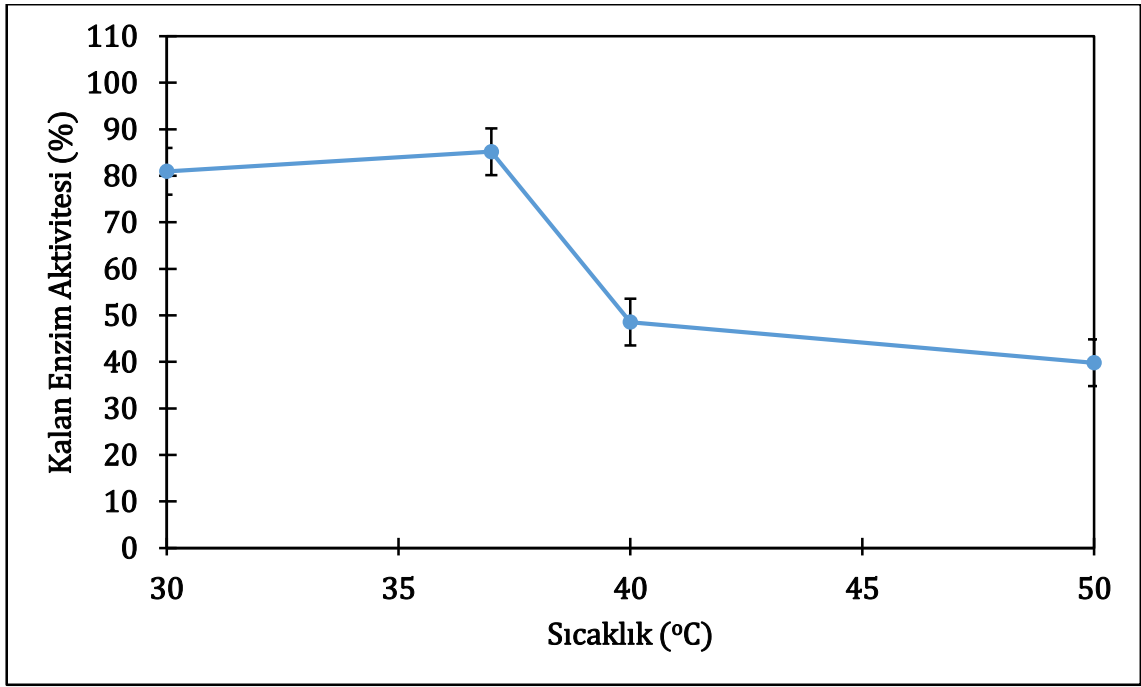
sonuçlar verdiği, pH 5'te ise % 72.47 ile minimum relatif aktivite değerini verdiği görülmüştür.



şekil 5.24 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki relatif enzim aktivite değerleri

5.3.2.3 Pirinç Kabuğu zerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine Sıcaklığın Etkisi

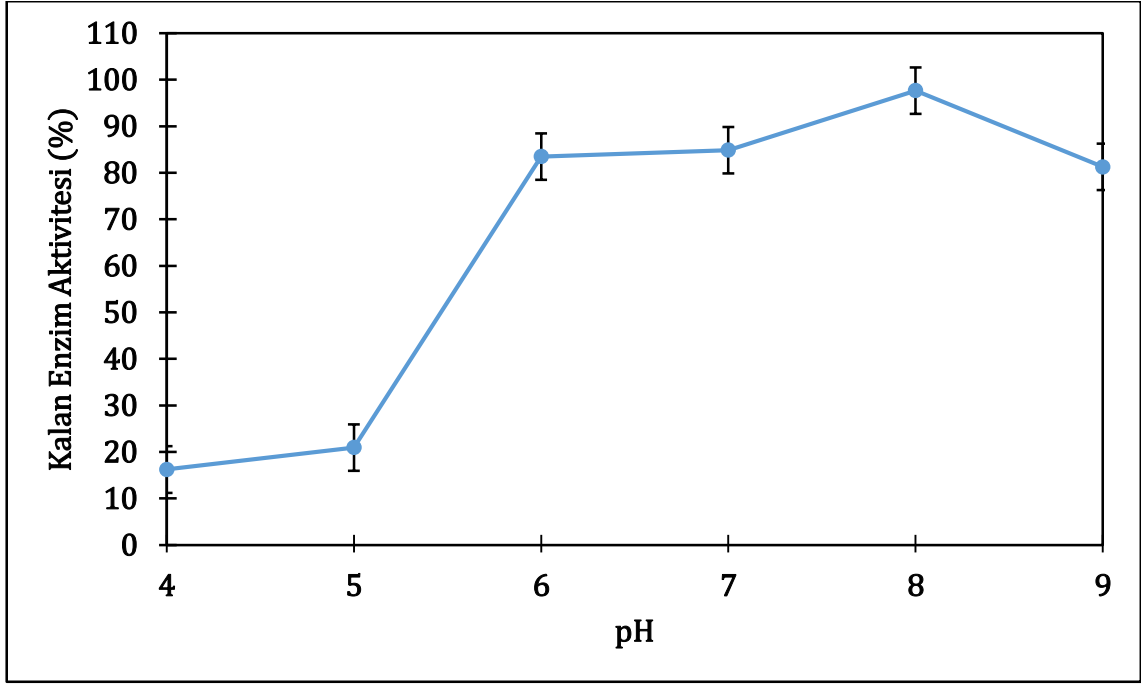
Bir enzimin substrat yokluğunda sıcaklık değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine sıcaklığın etkisini ifade eder [84]. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin stabilitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 mL tampon zlti içine immobilize β -galactosidase enzimi ilave edildikten sonra 30, 37, 40 ve 50 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri Tablo A.21'de verilmiş olup grafiksel olarak şekil 5.25'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de kalan enzim aktivite değerinin % 85.17 ile maksimum olduğu, 37 $^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise % kalan enzim aktivite değerlerinin düşüş gşterdiği gözlenmiştir.



Şekil 5.25 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

5.3.2.4 Pirinç Kabuğu Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzim Stabilitesine pH'ın Etkisi

Bir enzimin substrat yokluğunda pH değişimlerine dayanabilme özelliği enzim stabilitesine pH'ın etkisini ifade eder. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisini belirlemek için 5 mL tampon çözelti içine immobilize β -galactosidase ilave edildikten sonra 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında kalan immobilize β -galactosidase enzim aktivitesinin ölçümü ile immobilize β -galactosidase enzim stabilitesine pH'ın etkisi incelenmiştir. pH 4 ve 5 için 0.1 M asetat tampon, pH 6 ve 7 için 0.1 M potasyum fosfat tampon, pH 8 ve 9 için 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılmıştır. Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan aktivite değerleri Tablo A.22'de verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.26'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre pH 8 olan bazik ortamda kalan enzim aktivitesinin % 97.66 olduğu, pH 9'da % 81.26'ya düştüğü, pH 6 ve 7'de sırası ile % 83.49 ve 84.87 ile yakın sonucalar verdiği, pH 5'te % 20.94'e düştüğü, pH 4'te ise % 16.23 değeri ile minimum kalan enzim aktivite değerini verdiği görülmüştür.



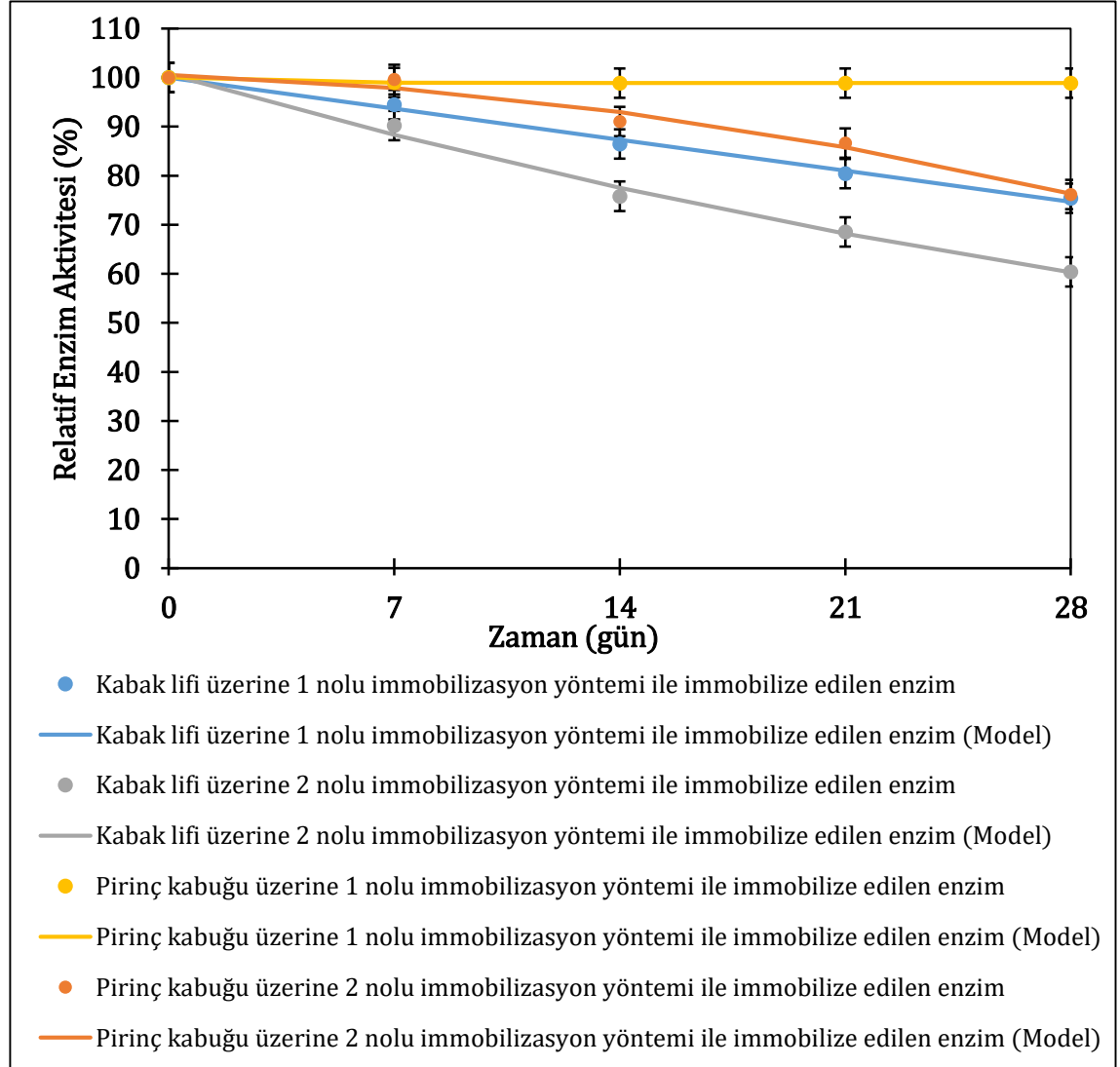
Şekil 5.26 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan aktivite değerleri

5.4 Serbest ve İmmobilize β -Galactosidase Enzim Numunelerinin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Depolama kararlılığı enzimin uzun süre saklanması durumunda aktivitesinin kaybının bir ölçüsü olup enzimin kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini gösterir. Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin depolama kararlılığının yani raf ömrünün belirlenmesi için optimum pH değerindeki tampon çözelti içinde 4 °C'de buzdolabında depolanan serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerine 28 gün içinde birer hafta aralıklarla Bölüm 4.4.1'de belirtilen yöntem ile aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. İlk günde yapılan enzim aktivite tayin sonucu % 100 olarak kabul edilmiş, diğer haftalarda ölçülen enzim aktivite ölçüm sonuçları relatif olarak hesaplanmıştır.

Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait 0, 7, 14, 21 ve 28. günde ölçülen % relatif enzim aktivite değerleri Tablo A.23'te verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.27'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 28. günün sonunda kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin relatif enzim aktivite değerlerinin sırası ile % 75.38, % 60.38 ve % 98.87,

% 76.16 olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre immobilize β -galactosidase enzim numuneleri içerisinde en güçlü depolama kararlılığını gösteren enzimin pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin (% 98.87) olduğu görülmektedir. Serbest β -galactosidase enziminin 28. günün sonunda aktivite kaybına uğramadığı görülmüştür.



Şekil 5.27 Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin depolama süreleri sonrasında relatif enzim aktivite değerleri

Elde edilen verilere göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin depolama süresi ve relatif enzim aktivite değeri arasındaki değişimin birinci derece kinetik modele uyduğu görülmüştür. Birinci derece kinetik model Denklem 5.1’de verilmiştir. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon

yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin depolama süresi ve relatif enzim aktivite değeri arasındaki değişimin ikinci derece kinetik modele uyduğu görülmüştür. İkinci derece kinetik model Denklem 5.2’de verilmiştir. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin depolama süresi ve relatif enzim aktivite değeri arasındaki değişimin Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele uyduğu görülmüştür. Sadana ve Henley [89] tarafından geliştirilen kinetik model Denklem 5.3’te verilmiştir.

Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin depolama süreleri sonrasında relatif enzim aktivite deneysel verilerine uyan matematiksel ifadeler ve istatistik veriler Tablo 5.5’te sunulmuştur.

$$y = a + bt \quad (5.1)$$

$$y = a + bt + ct^2 \quad (5.2)$$

$$A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1 \quad (5.3)$$

Tablo 5.5 Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin depolama süreleri sonrasında relatif enzim aktivite deneysel verilerine uyan matematiksel ifadeler ve istatistik veriler

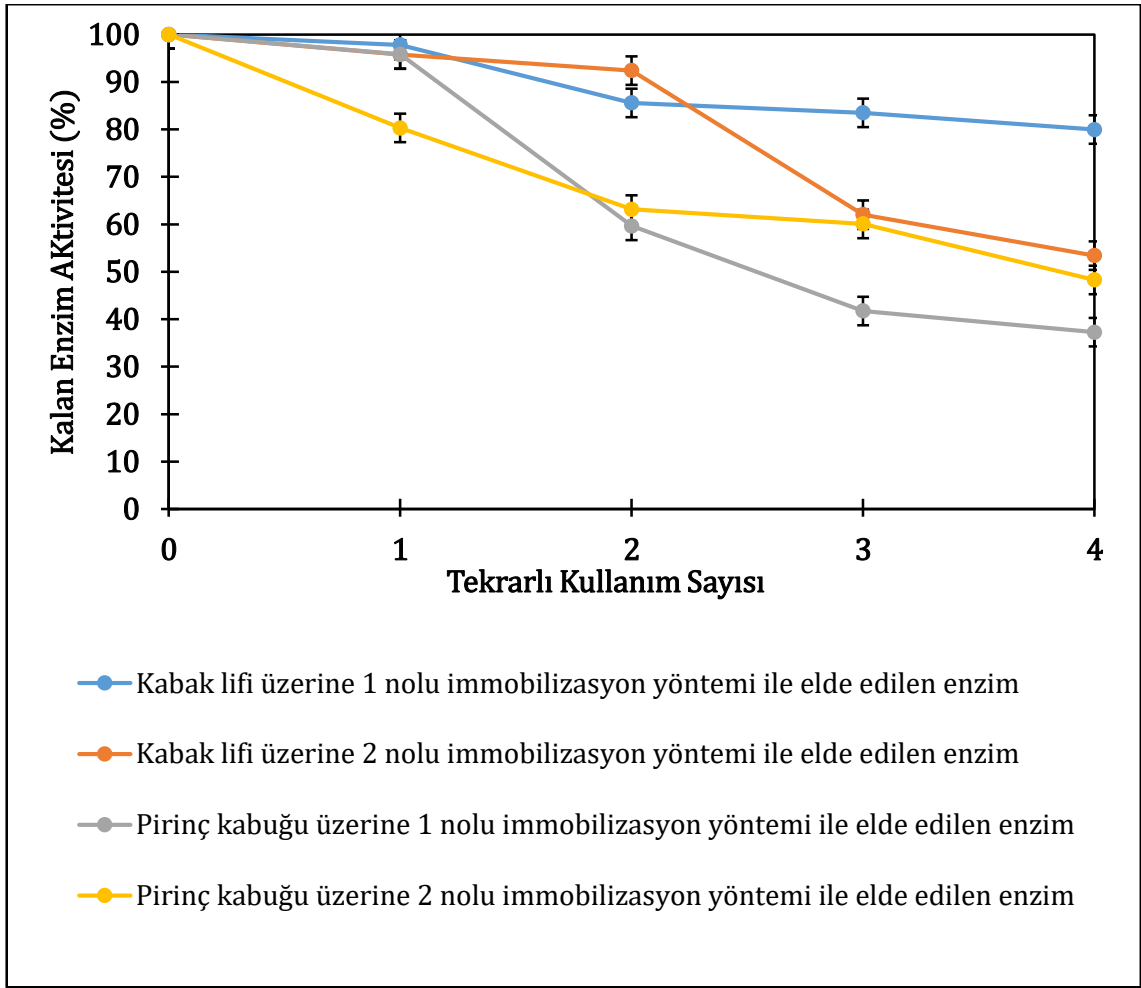
R^2	δ	Katsayılar*	Matematiksel Model	İmmobilize Enzim
0.9971	0.8691	$a_A = 99.98$ $b_B = -0.9041$	$y = a_A + b_A t$	Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi
0.9966	18.682	$a_B = 100.658$ $b_B = -1.8675$ $c_A = 0.0152$	$A = a_B + b_B t + c_A t^2$	Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi
0.9999	0.0033	$\alpha_1 = 99.8675$ $k_D = 0.3591$	$A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1$	Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi
0.9902	19.533	$a_C = 100.52$ $b_C = -0.2126$ $c_B = -0.0233$	$A = a_C + b_C t + c_B t^2$	Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi

*Katsayılara ait birimler; α_A , α_B , α_C : birimsiz; b_A , b_B , k_D , b_C : dakika⁻¹; c_A , c_B : dakika⁻²

5.5 İmmobilize β -Galactosidase Enzim Numunelerinin Tekrarlı Kullanımının İncelenmesi

Serbest β -galactosidase enzimi ile karşılaştırıldığında immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin tekrar kullanılabilir olması avantaj sağlamaktadır. İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacı ile immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin tekrarlı kullanımları sonunda substrat üzerinde gösterdikleri aktivite değerleri Bölüm 4.4.1’de belirtildiği şekilde ölçülmüştür. İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerinin aktivitesi ilk deneme sonucunda % 100 olarak kabul edilmiş, kalan enzim aktivite değerleri tekrarlı kullanım sonucunda % cinsinden hesaplanmıştır.

Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin dört defa ardışık olarak kullanımından sonra hesaplanan % kalan aktivite değerleri Tablo A.24’te verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.28’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre dördüncü tekrarlı kullanım sonunda kabak lifi üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin relatif enzim aktivite değerlerinin sırası ile % 79.98, % 53.42 olduğu saptanmıştır. Pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin relatif enzim aktivite değerlerinin ise sırası ile % 37.25, % 48.29 olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre immobilize β -galactosidase enzim numuneleri içerisinde en az aktivite kaybı gösteren enzimin kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin (% 79.98) olduğu saptanmıştır.



Şekil 5.28 Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin tekrarlı kullanımları sonrasında kalan enzim aktivite değerleri

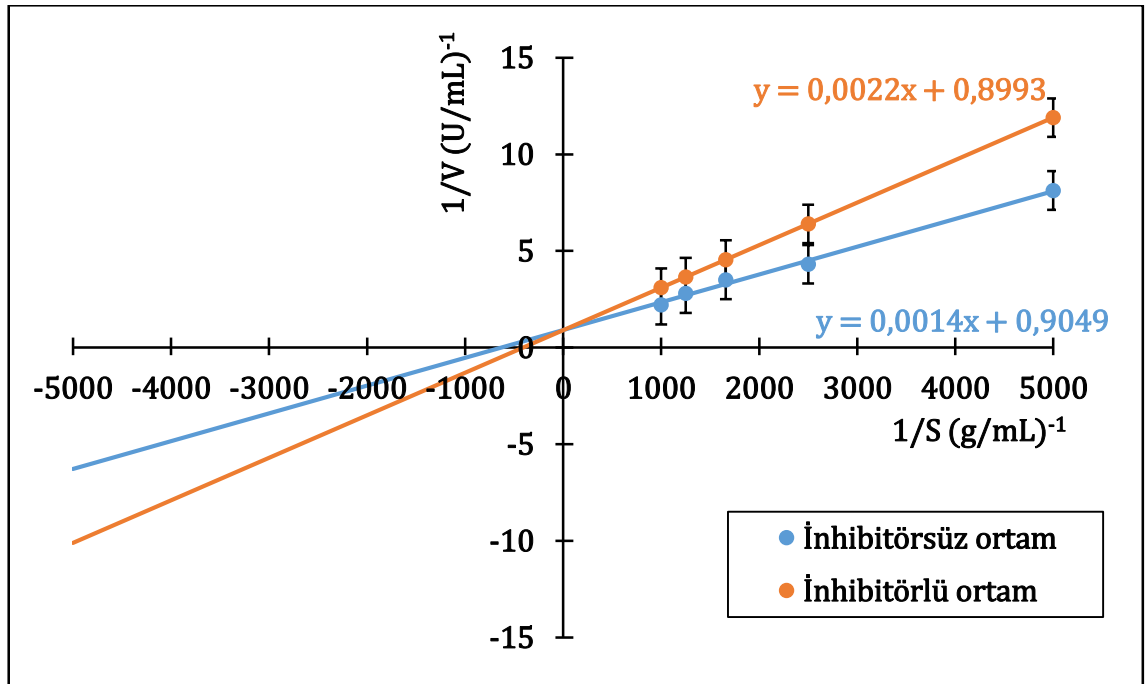
5.6 Serbest ve İmmobilize β -Galactosidase Enzim Numunelerine Ait Kinetik Verilerin Hesaplanması

Serbest ve immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait kinetik verilerin hesaplanması için Bölüm 4.4.3'te belirtildiği şekilde Linewear-Burke grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden yararlanılarak inhibitörsüz ortam ve inhibitörlü ortam için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Enzim aktivitesinin inhibisyonu çalışmaları genellikle enzim seçiciliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı ve reaksiyonun kinetik mekanizması hakkında bilgi verir. Ansari ve Husain 2020 [62] yaptıkları çalışmalarda CaCl_2 'nin β -galactosidase enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada; Ansari ve Husain'in yaptıkları çalışma referans alınarak CaCl_2 'nin serbest ve immobilize β -galactosidase enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi incelenmiştir.

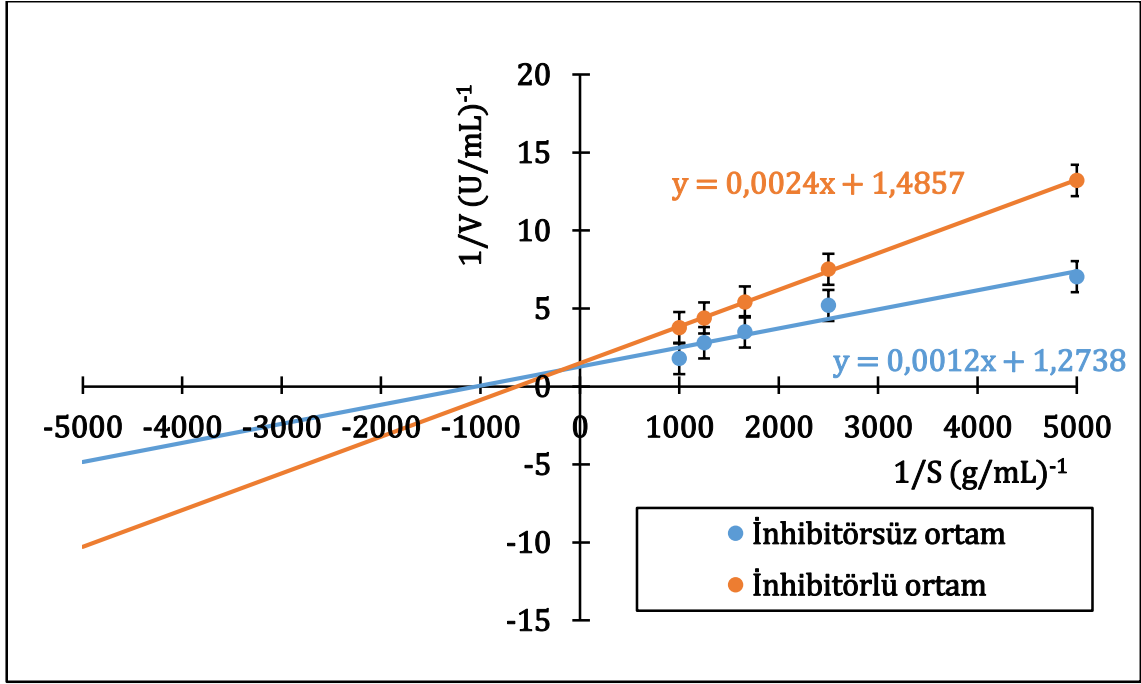
İnhibitör olarak CaCl_2 kullanılmış olup, % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numuneleri üzerinde Ca^{2+} iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir.

Serbest β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler Tablo A.25'te verilmiş olup elde edilen verilerden yararlanılarak oluşturulan Linewear-Burke grafiği ise Şekil 4.29'da sunulmuştur. Elde edilen istatistiksel veriler olarak R^2 ve δ (standart sapma) değerleri inhibitörsüz ortam için sırası ile 0.9974 ve 0.1919, % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için ise sırası ile 0.9999 ve 0.001 olarak hesaplanmıştır.



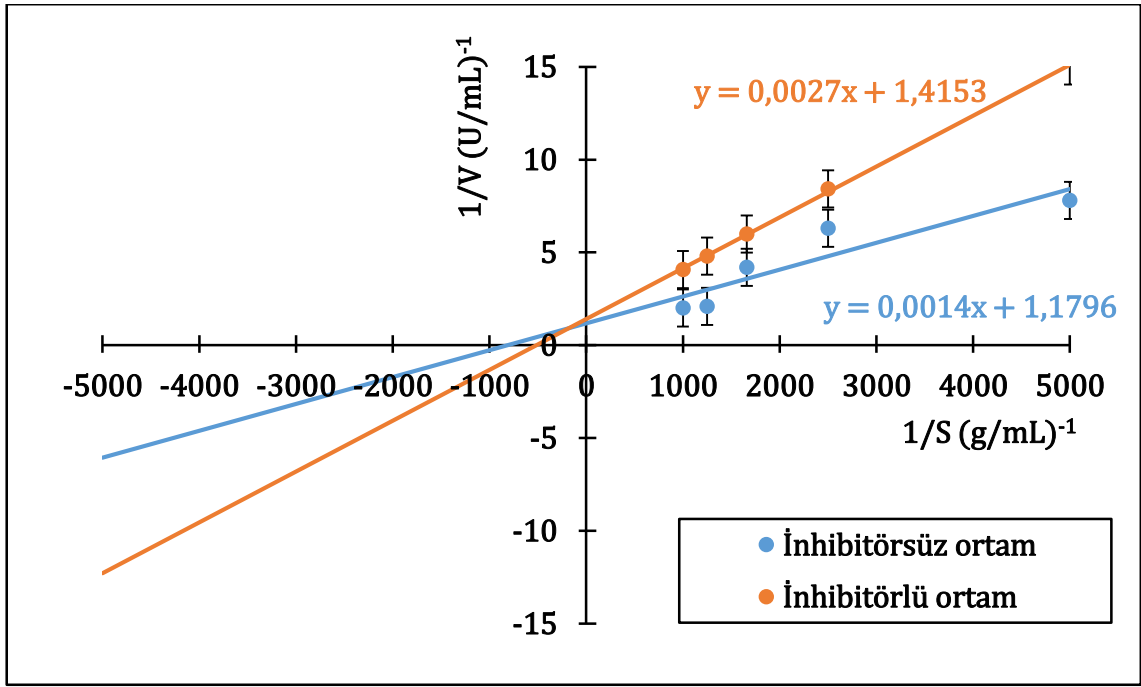
Şekil 5.29 Serbest β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Linewear-Burke grafiği

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler Tablo A.26'da verilmiş olup elde edilen verilerden yararlanılarak oluşturulan Linewear-Burke grafikleri ise Şekil 5.30'da sunulmuştur. Elde edilen istatistiksel veriler olarak R^2 ve δ (standart sapma) değerleri inhibitörsüz ortam için sırası ile 0.9584 ve 0.6831, % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için ise sırası ile 0.9997 ve 0.102 olarak bulunmuştur.



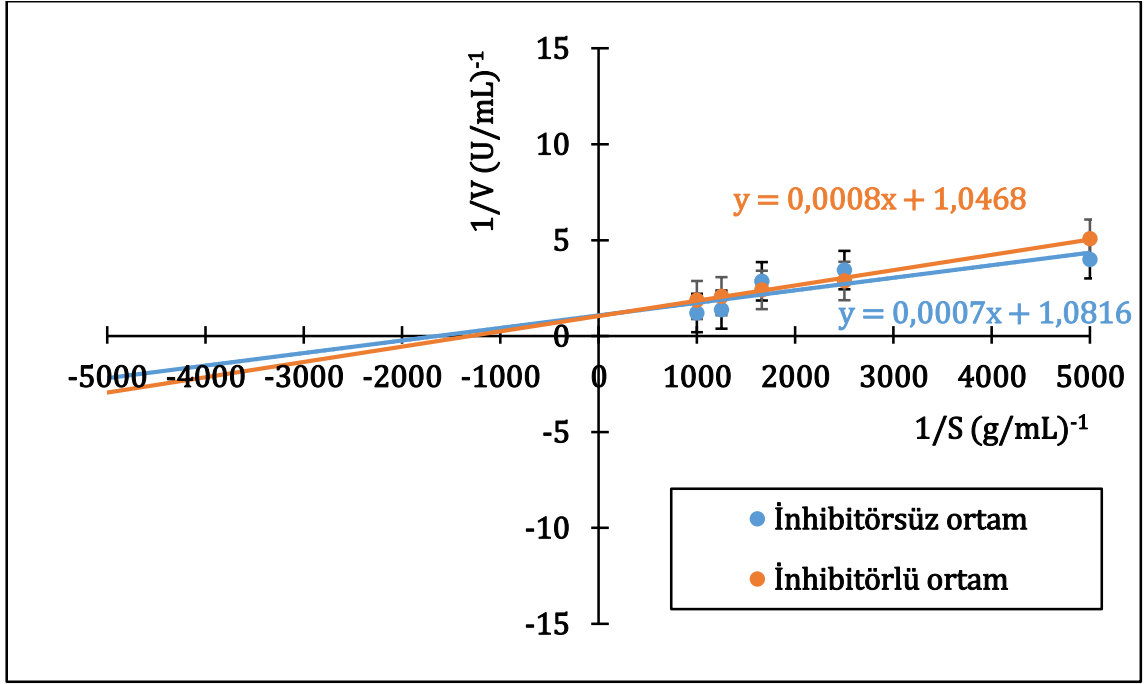
Şekil 5.30 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Lineweaver-Burke grafiği

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler Tablo A.27’de verilmiş olup elde edilen verilerden yararlanılarak oluşturulan Lineweaver-Burke grafikleri ise Şekil 5.31’de sunulmuştur. Elde edilen istatistiksel veriler olarak R^2 ve δ (standart sapma) değerleri inhibitörsüz ortam için sırası ile 0.9164 ve 1.1833, % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için ise sırası ile 0.9997 ve 0.1121 olarak bulunmuştur.



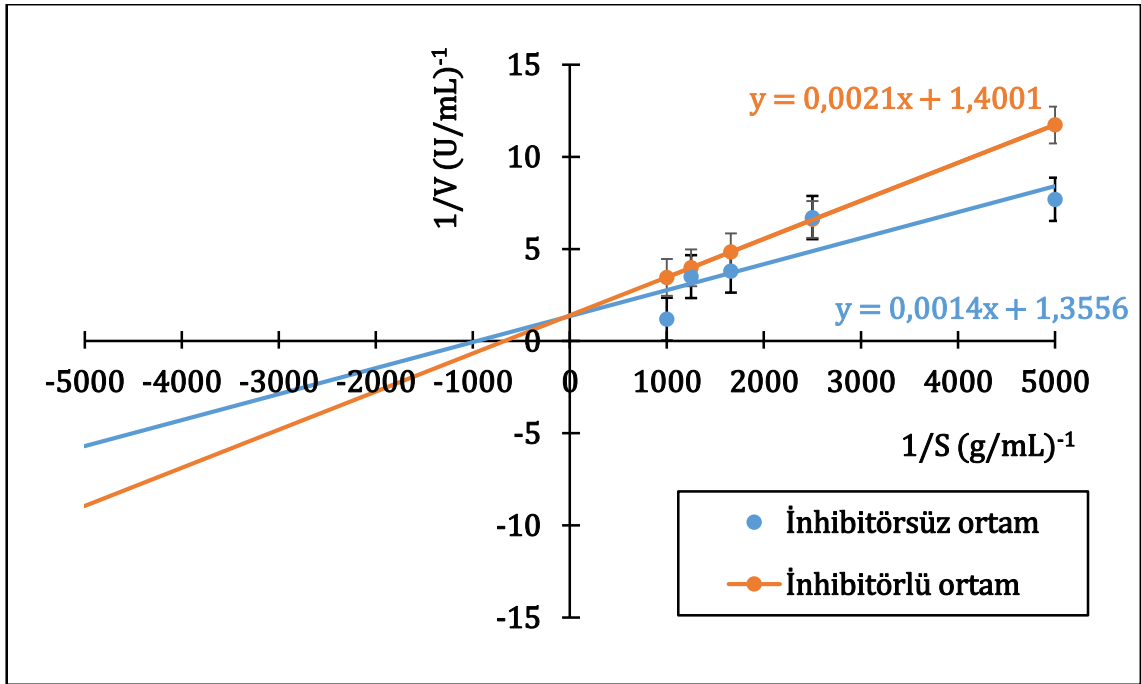
Şekil 5.31 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Lineweaver-Burke grafiği

Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler Tablo A.28’de verilmiş olup elde edilen verilerden yararlanılarak oluşturulan Lineweaver-Burke grafikleri ise Şekil 5.32’de sunulmuştur. Elde edilen istatistiksel veriler olarak R^2 ve δ (standart sapma) değerleri inhibitörsüz ortam için sırası ile 0.8541 ve 0.7459, % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için ise sırası ile 0.9976 ve 0.102 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.32 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Lineweaver-Burke grafiği

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler Tablo A.29’da verilmiş olup elde edilen verilerden yararlanılarak oluşturulan Lineweaver-Burke grafikleri ise Şekil 5.33’te sunulmuştur. Elde edilen istatistiksel veriler olarak R^2 ve δ (standart sapma) değerleri inhibitörsüz ortam için sırası ile 0.8743 ve 1.4675, % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için ise sırası ile 0.9999 ve 0.2156 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.33 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Lineweaver-Burke grafiği

Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen Lineweaver-Burke grafiklerinden yararlanılarak hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri Tablo 5.6'da verilmiştir.

Tablo 5.6 Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri

β -Galactosidase enzimi	İnhibitörsüz ortam		İnhibitörlü ortam	
	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)
Serbest enzim	1.54×10^{-3}	1.105	2.44×10^{-3}	1.110
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	9.42×10^{-4}	0.785	1.61×10^{-3}	0.673
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	1.18×10^{-3}	0.847	1.90×10^{-3}	0.706
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	6.47×10^{-4}	0.924	7.64×10^{-4}	0.955
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	1.03×10^{-3}	0.737	1.55×10^{-3}	0.714

5.7 Laktoz Hidrolizi

İmmobilize β -galactosidase enzim numuneleri ile inek sütünde bulunan % 5 oranındaki laktoz miktarı göz önünde bulundurularak 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisi ve 72.8 g/L başlangıç laktoz konsantrasyonuna sahip anne sütünde 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında 30 dakika boyunca laktoz hidroliz prosesleri gerçekleştirilmiştir.

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan çözeltideki laktozun hidrolizi:

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan 10 mL'lik laktoz çözeltisine immobilize β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda çözeltide bulunan immobilize β -galactosidase enzimine ait kalan enzim aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, kalan laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tayin edilmiştir.

Anne sütündeki laktozun hidrolizi:

Anne sütündeki laktozun hidroliz prosesi için, anne sütüne ait başlangıç laktoz konsantrasyonu Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde 72.8 g/L olarak tayin edilmiştir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan 10 mL'lik anne sütüne immobilize β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda anne sütü içinde bulunan immobilize β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tayin edilmiştir.

5.7.1 Kabak Lifi Üzerine İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi

Kabak lifi üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri ile elde edilen β -galactosidase enzimlerinin 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisine ve başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütüne ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmış, 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz prosesi boyunca β -galactosidase enzim aktivite tayini Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tayin edilmiştir.

5.7.1.1 Kabak Lifi Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan çözeltideki laktozun hidrolizi:

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan 10 mL'lik laktoz çözeltisine kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda çözeltide bulunan kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.30'da sunulmuştur. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri Şekil 5.32'de, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz

hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.33’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile 50 g/L başlangıç konsantrasyonundaki laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; laktoz konsantrasyonu 12.06 g/L (Şekil 5.34), hidroliz derecesi ise % 75.88 (Şekil 5.35) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 39.15’ini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 60.85’ni korumuştur (Şekil 5.35).

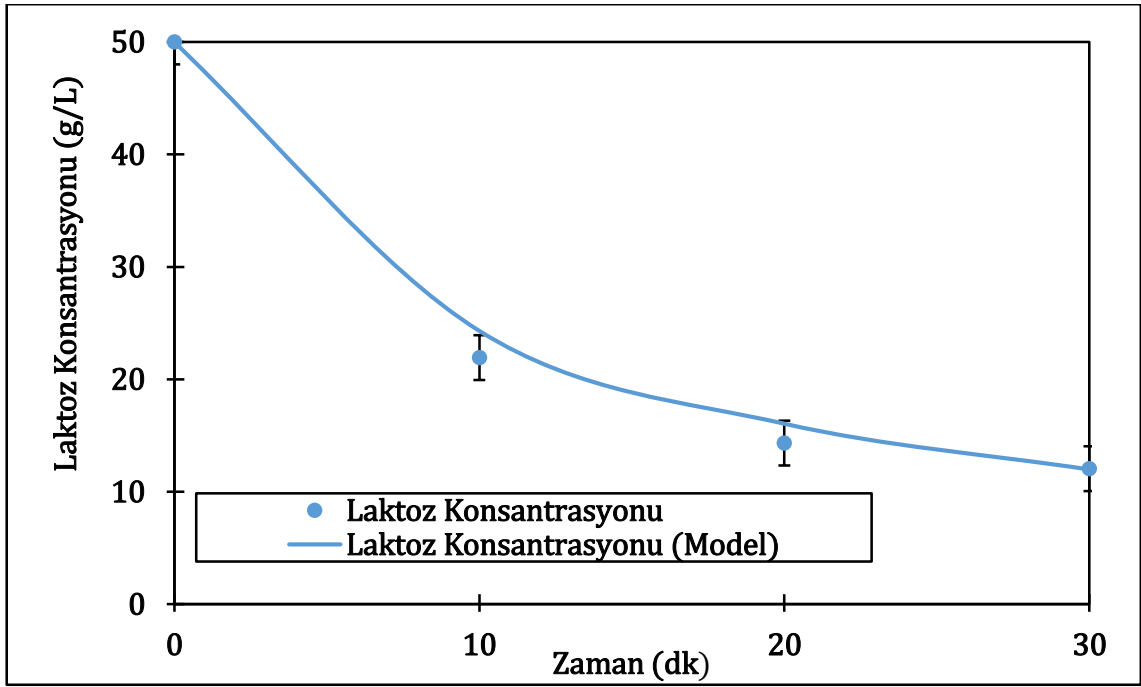
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen 50 g/L başlangıç konsantrasyonuna sahip laktoz çözeltisindeki laktoz konsantrasyon değerlerinin birinci derece kinetik modele (Denklem 5.1) uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Exponential Association modele (Denklem 5.4), enzim aktivitesi değerlerinin ise Sadana ve Henley (1987) (Denklem 5.3) tarafından türetilen kinetik modele uygun olduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.7’de verilmiştir.

$$y = a(1 - e^{-bt}) \quad (5.4)$$

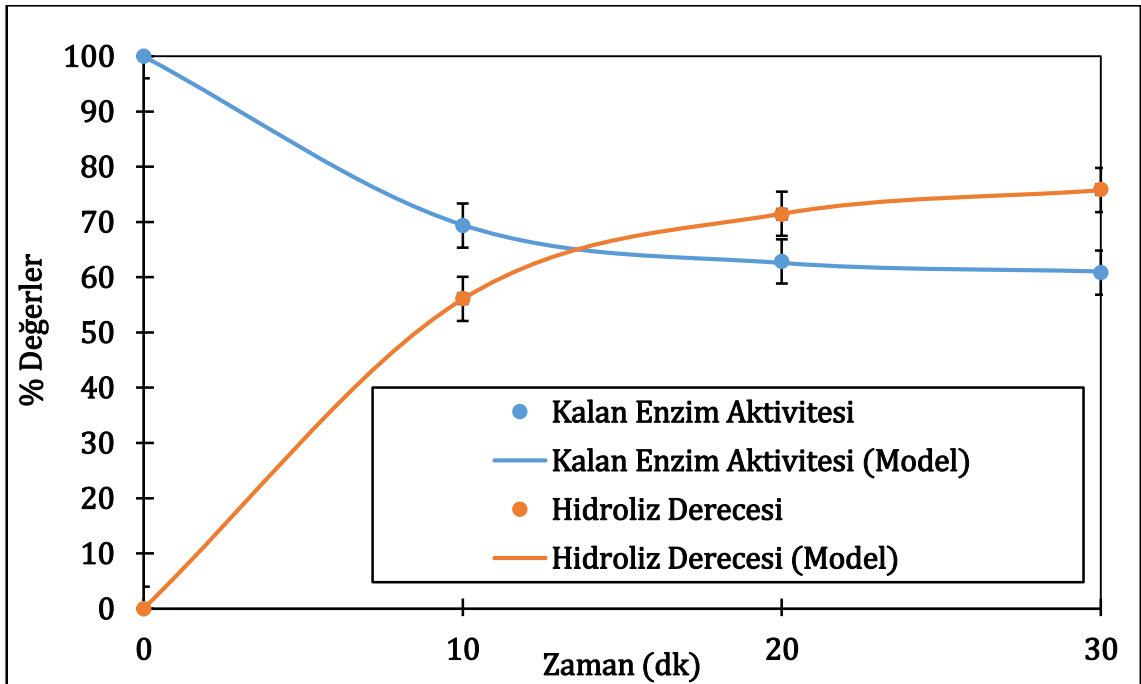
Tablo 5.7 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler (T = 37 °C, 300 prm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R^2
Laktoz Konsantrasyonu $[C_L] = a + b[C_{L0}]$	$a = 0.0226$ $b = 0.0021$	0.0046	0.9905
Hidroliz derecesi $[H] = a_A(1 - e^{-b_A t})$	$a_A = 77.4$ $b_A = 0.1288$	0.1161	0.9999
Enzim Aktivitesi $A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1$	$\alpha_1 = 60.5971$ $k_D = 0.1490$	0.2549	0.9999

*Katsayılarla ait birimler; a: g. laktoz L⁻¹, a_A, b, α_1 : birimsiz; k_D, b_A: dakika⁻¹



Şekil 5.34 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T=37 °C, 300 rpm)



Şekil 5.35 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

Anne Sütündeki Laktozun Hidrolizi:

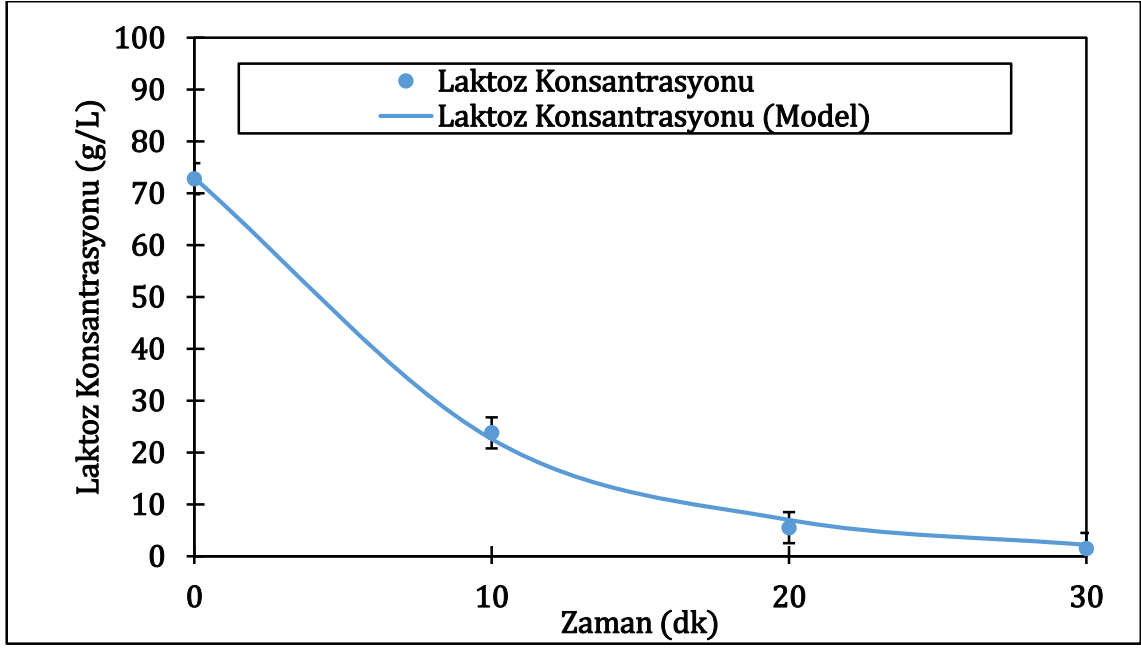
Anne sütündeki laktozun hidrolizlenmesi prosesi için, 10 mL'lik anne sütündeki başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenmiştir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g /L olarak bulunan anne sütüne kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda anne sütünde bulunan kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait, anne sütündeki laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.31'de verilmiştir. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri grafiksel olarak Şekil 5.36'da, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.37'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütünün 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; kalan laktoz konsantrasyonu 0.15 g/L (Şekil 5.36), hidroliz derecesi ise % 97.93 (Şekil 5.37) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 28.40'ını kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 71.60'ını korumuştur (Şekil 5.37).

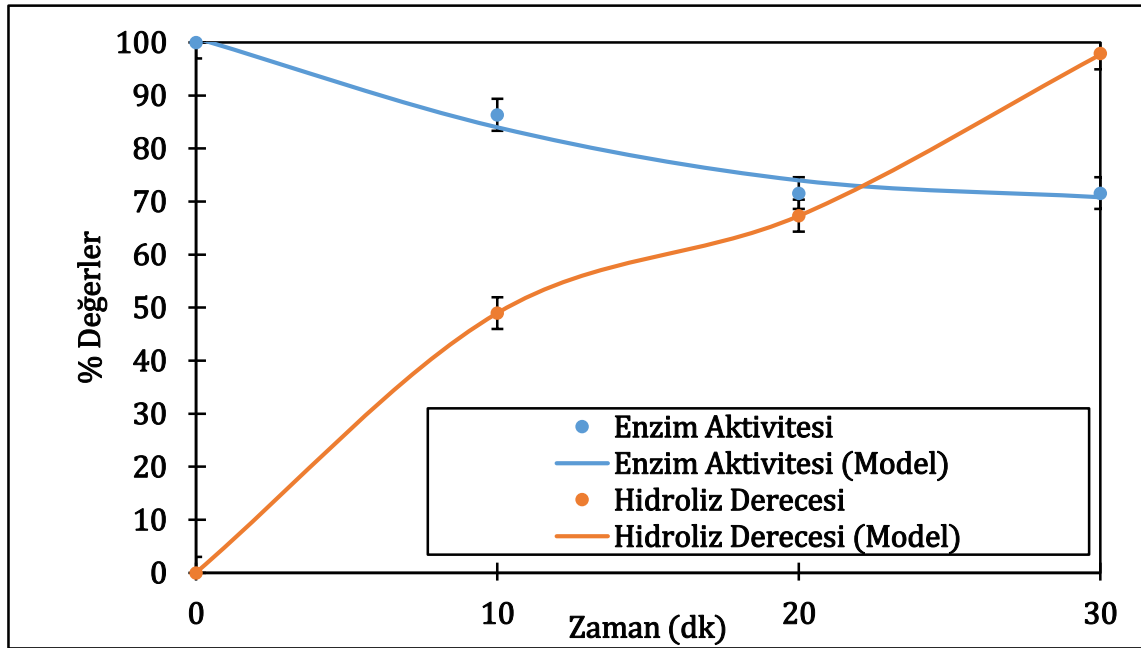
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda, zamana karşılık elde edilen anne sütündeki laktoz konsantrasyon değerlerinin Exponential Fit kinetik modele (Denklem 5.5) uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Rasyonel Fonksiyon modeline (Denklem 5.6) uyduğu, enzim aktivitesi değerlerinin ise ikinci dereceden kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.8'de verilmiştir.

$$y = a x e^{bt} \quad (5.5)$$

$$y = \frac{a + bt}{1 + ct + dt^2} \times 100 \quad (5.6)$$



Şekil 5.36 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)



Şekil 5.37 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

Tablo 5.8 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler (T = 37 °C, 300 rpm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R ²
Laktoz Konsantrasyonu $[C_L] = a \times e^{bt}$	a = 72.98 b = -0.1172	1.4421	0.9993
Hidroliz derecesi $[H] = \frac{a_A + b_A t}{1 + ct + dt^2}$	$a_A = 3.26 \times 10^{-12}$ $b_A = 35.5965$ c = 0.7752 d = -0.0148	0.000	1.0000
Enzim Aktivitesi $A = a_B + b_B t + ct^2$	$a_B = 100.79$ $b_B = -2.0222$ c = 0.0341	3.5508	0.9886

*Katsayılarla ait birimler; a: g. laktoz L⁻¹; a_A , a_B :. birimsiz; b, b_A b_B : dakika⁻¹; c: dakika⁻²

5.7.1.2 Kabak Lifi Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi

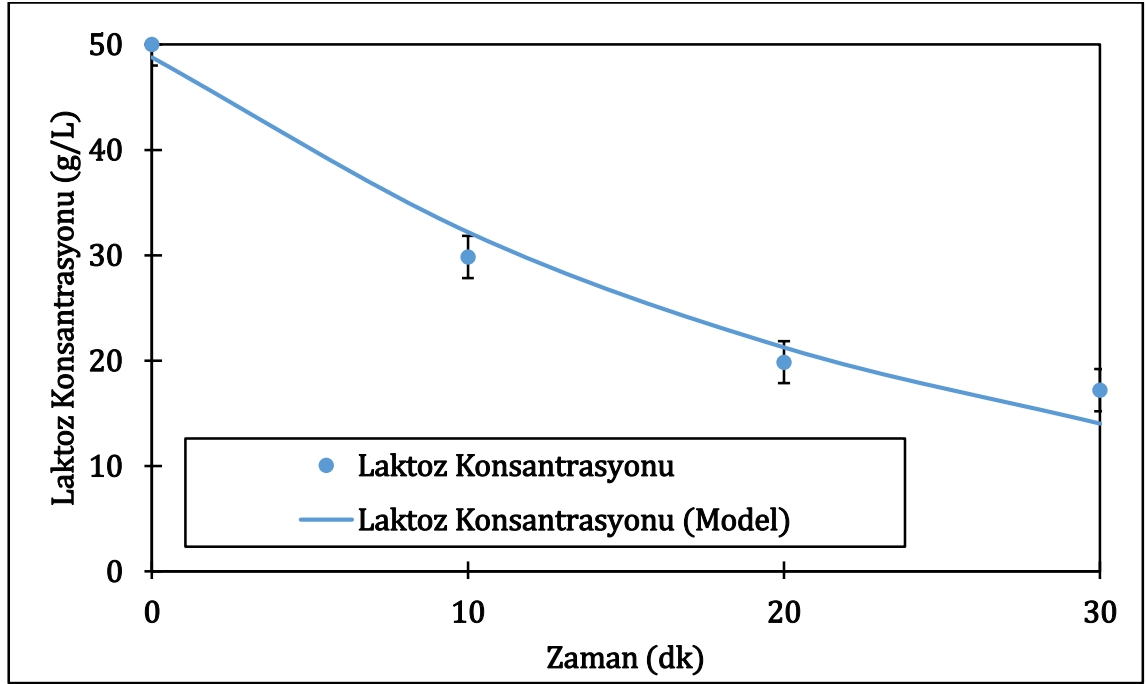
50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan çözeltideki laktozun hidrolizi:

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan 10 mL’lik laktoz çözeltisine kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda çözeltide bulunan kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1’de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4’te belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

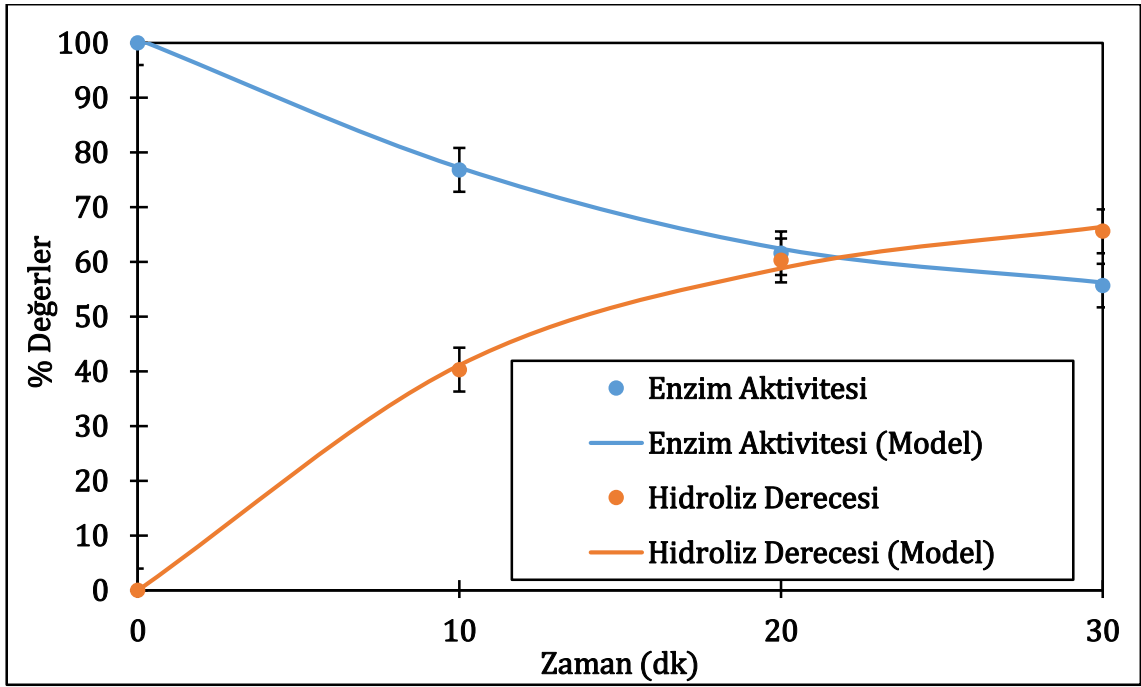
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.32’de sunulmuştur. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri Şekil 5.38’de, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.39’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile 50 g/L başlangıç konsantrasyonundaki laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; kalan laktoz konsantrasyonu 17.20 g/L (Şekil 5.38), hidroliz derecesi ise

% 65.60 (Şekil 5.37) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 44.32'sini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 55.68'ini korumuştur (Şekil 5.39).

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen 50 g/L başlangıç konsantrasyonuna sahip laktoz çözeltisindeki laktoz konsantrasyon değerlerinin Exponential Fit kinetik modele (Denklem 5.5) uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Exponential Association modele (Denklem 5.4) uyduğu, enzim aktivitesi değerlerinin ise ikinci dereceden kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.38 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)



Şekil 5.39 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

Tablo 5.9 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler (T = 37 °C, 300 prm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R^2
Laktoz Konsantrasyonu $[C_L] = a \times e^{bt}$	$a = 48.7692$ $b = -0.0415$	3.0860	0.9855
Hidroliz derecesi $[H] = a_A(1 - e^{-b_A t})$	$a_A = 72.095$ $b_A = 0.0845$	1.3176	0.9993
Enzim Aktivitesi $A = a_B + b_B t + ct^2$	$a_B = 100.067$ $b_B = -2.7778$ $c = 0.0432$	0.2996	0.9999

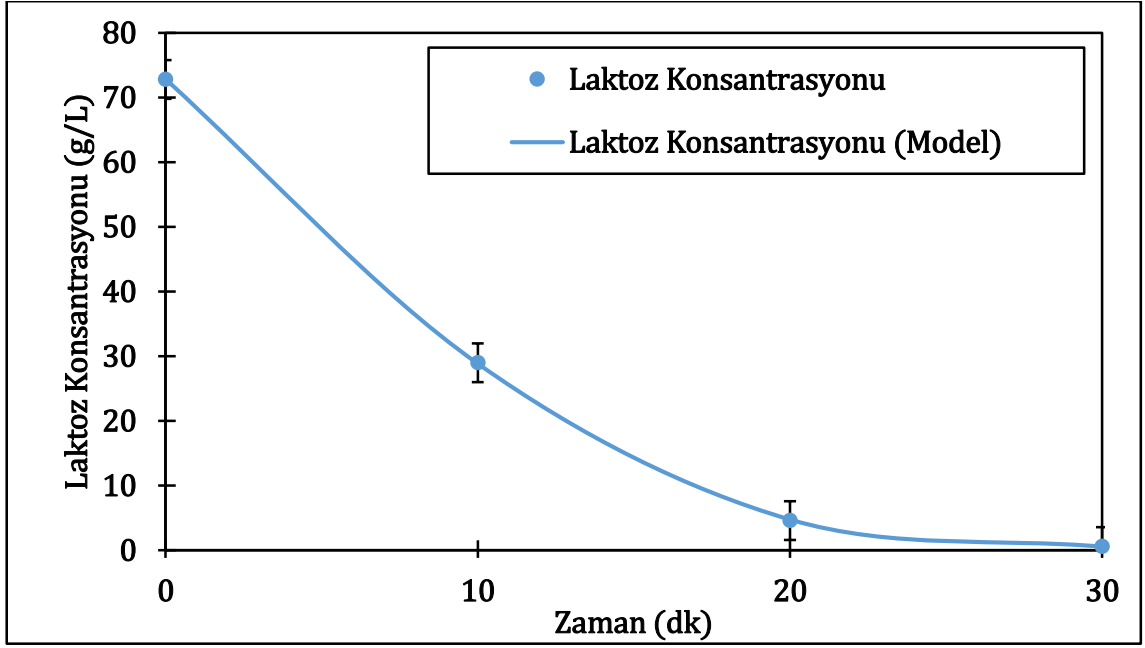
*Katsayılar a ait birimler; a: g. laktoz. L^{-1} ; a_A, a_B : birimsiz; b, b_A, b_B : dakika $^{-1}$; c: dakika $^{-2}$

Anne Sütündeki Laktozun Hidrolizi:

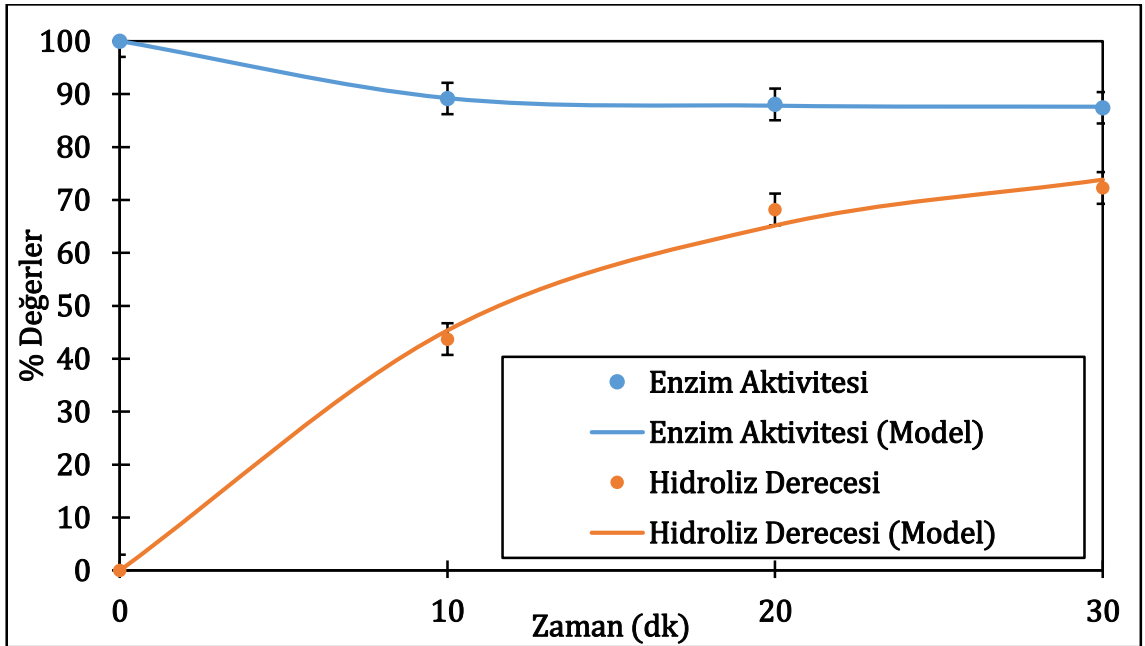
Anne sütündeki laktozun hidrolizlenmesi prosesi için, 10 mL'lik anne sütündeki başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenmiştir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g /L olarak bulunan anne sütüne kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda anne sütünde bulunan kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.33'te verilmiştir. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri grafiksel olarak Şekil 5.40'ta, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.41'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütünün 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; kalan laktoz konsantrasyonu 0.60 g/L (Şekil 5.40), hidroliz derecesi ise % 99.17 (Şekil 5.41) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 12.58'ini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 87.42'sini korumuştur (Şekil 5.41).

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen anne sütündeki laktoz konsantrasyon değerlerinin ikinci dereceden kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Exponential Association modele (Denklem 5.4) uyduğu, enzim aktivitesi değerlerinin ise Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele (Denklem 5.3) uyduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.10'da verilmiştir.



Şekil 5.40 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)



Şekil 5.41 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

Tablo 5.10 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler (T = 37 °C, 300 rpm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R^2
Laktoz Konsantrasyonu $[C_L] = a + bt + ct^2$	a = 72.8500 b = -5.3950 c = 0.0995	0.2236	0.9999
Hidroliz derecesi $[H] = a_A(1 - e^{-b_A t})$	$a_A = 80.5721$ $b_A = 0.0828$	2.6714	0.9978
Enzim Aktivitesi $A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1$	$\alpha_1 = 87.5849$ $k_D = 0.2018$	0.2248	0.9995

*Katsayılarla ait birimler; a: g. laktoz. L⁻¹; b: g. laktoz. L⁻¹.dakika⁻¹; c: g. laktoz. L⁻¹.dakika⁻²; a_A , α_1 : birimsiz; b_A , k_D : dakika⁻¹

5.7.2 Pirinç Kabuğu Üzerine İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi

Pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri ile elde edilen β -galactosidase enzimlerinin, 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisine ve başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütüne ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmış, 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz prosesi boyunca β -galactosidase enzim aktivite tayini Bölüm 4.4.1’de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4’te belirtildiği şekilde tayin edilmiştir.

5.7.2.1 Pirinç Kabuğu Üzerine 1 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan çözeltideki laktozun hidrolizi:

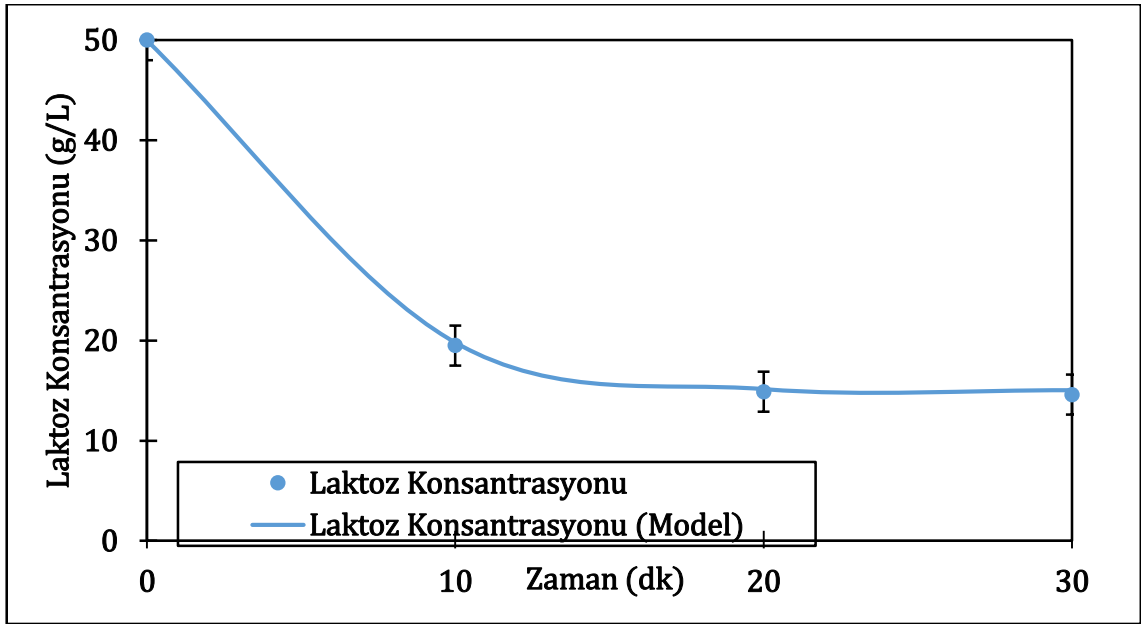
50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan 10 mL’lik laktoz çözeltisine, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda, çözeltide bulunan, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize

edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1’de belirtildiği Şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4’te belirtildiği Şekilde tespit edilmiştir.

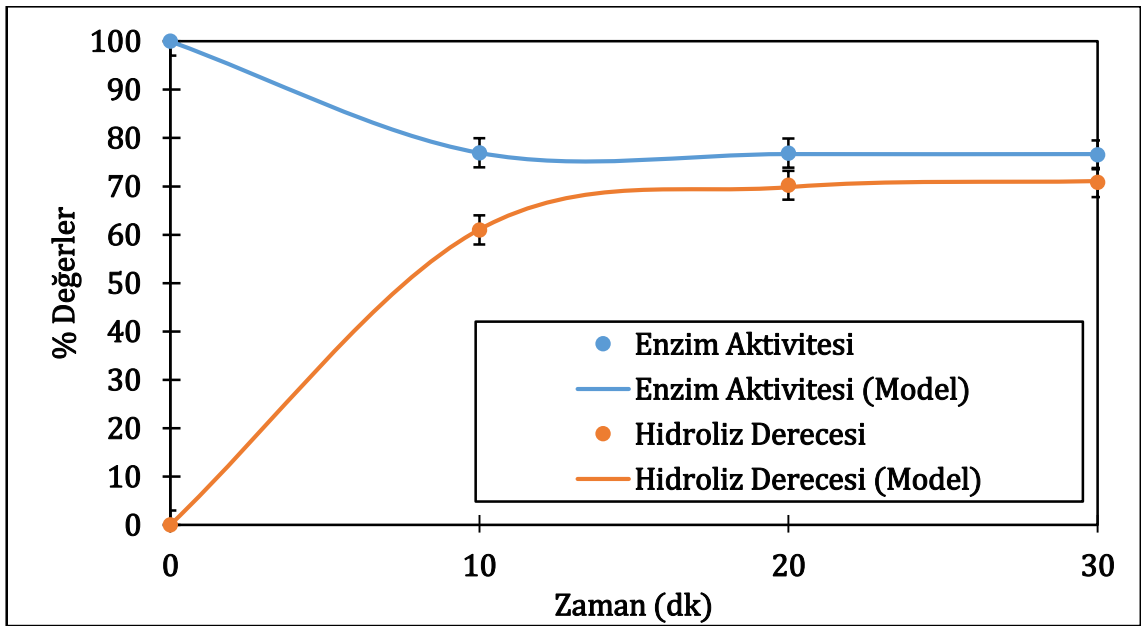
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.34’te verilmiştir. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri grafiksel olarak Şekil 5.42’de, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.43’te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile 50 g/L başlangıç konsantrasyonundaki laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; kalan laktoz konsantrasyonu 14.60 g/L (Şekil 5.42), hidroliz derecesi ise % 70.80 (Şekil 5.43) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 23.48’ini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 76.52’sini korumuştur (Şekil 5.43).

Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen, 50 g/L başlangıç konsantrasyonuna sahip laktoz çözeltisindeki laktoz konsantrasyon değerlerinin Reciprocal Quadratic kinetik modele (Denklem 5.7) uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Exponential Association modele (Denklem 5.4) enzim aktivitesi değerlerinin ise Sadana ve Henley (1987) (Denklem 5.3) tarafından türetilen kinetik modele uygun olduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.11’de verilmiştir.

$$y = \frac{1}{1 + bt + ct^2} \quad (5.7)$$



Şekil 5.42 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 rpm)



Şekil 5.43 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 rpm)

Tablo 5.11 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler (T = 37 °C, 300 rpm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R ²
Laktoz Konsantrasyonu $[C_L] = \frac{1}{a + b[C_{L0}] + c[C_{L0}]^2}$	a = 0.0200 b = 0.0038 c = 0.00007	0.0487	0.9999
Hidroliz derecesi $[H] = a_A(1 - e^{-b_A t})$	a _A = 71.3138 b _A = 0.1942	0.3563	0.9999
Enzim Aktivitesi $A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1$	α_1 = 76.6867 k _D = 0.4507	0.1686	0.9999

*Katsayılarla ait birimler; a: L.gram laktoz⁻¹; b: L².gram laktoz⁻²; c: L³.gram laktoz⁻³; a_A, α_1 : birimsiz; b_A, k_D: dakika⁻¹

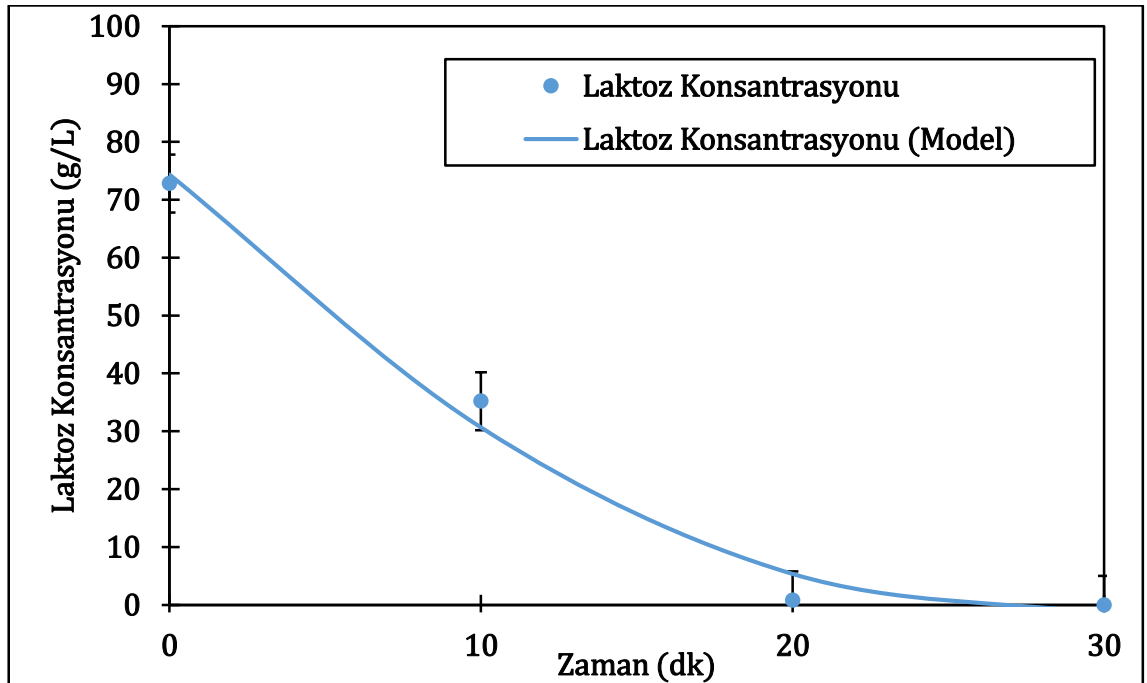
Anne Sütündeki Laktozun Hidrolizi:

Anne sütündeki laktozun hidrolizlenmesi prosesi için, 10 mL'lik anne sütündeki başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenmiştir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g /L olarak bulunan anne sütüne pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda anne sütünde bulunan pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

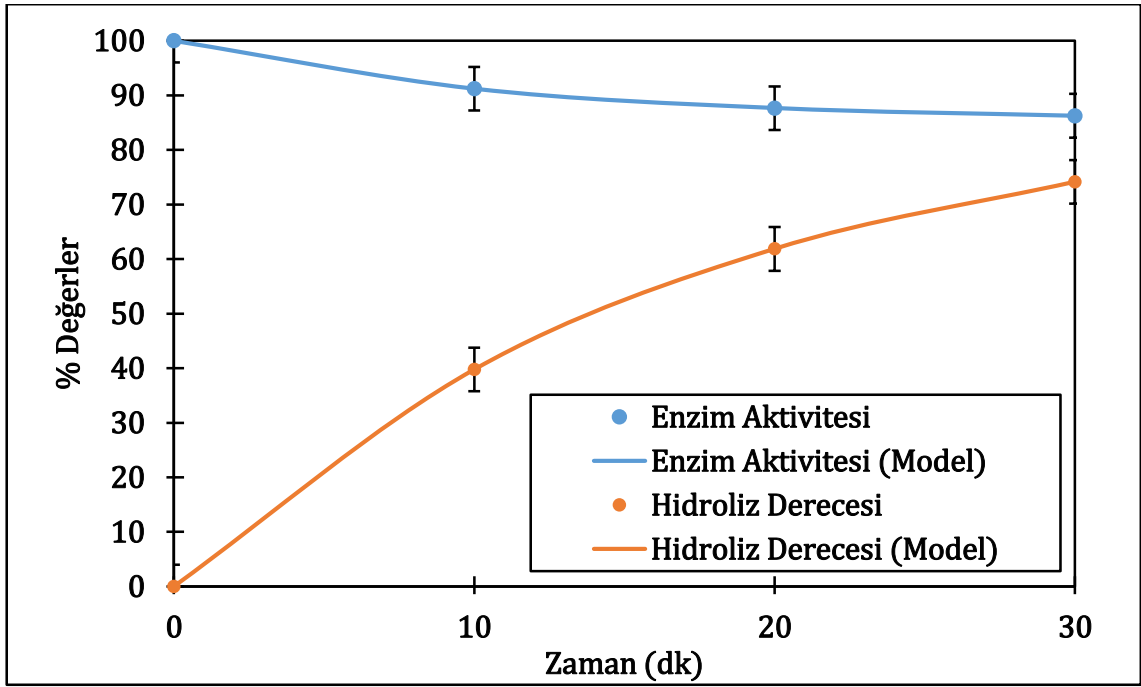
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait, laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.35'te verilmiştir. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri grafiksel olarak Şekil 5.44'te, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.45'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütünün 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; ortamdaki laktozun tamamen hidrolizlendiği görülmüştür. Bu değer hidroliz derecesinin %100 olduğunu göstermektedir (Şekil 5.45). Hidroliz işlemi sonunda

immobilize enzim aktivitesinin % 13.75'ini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 86.25'ini korumuştur (Şekil 5.45).

Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen anne sütündeki laktoz konsantrasyon değerlerinin ikinci dereceden kinetik modele uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Exponential Association modele (Denklem 5.4) uyduğu, enzim aktivitesi değerlerinin ise Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele (Denklem 5.3) uyduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.12'de verilmiştir.



Şekil 5.44 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)



Şekil 5.45 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 rpm)

Tablo 5.12 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 pm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R^2
Laktoz Konsantrasyonu $A = a + bt + ct^2$	$a = 74.3215$ $b = -5.2888$ $c = 0.0920$	6.8043	0.9935
Hidroliz derecesi $[H] = a_A(1 - e^{-b_A t})$	$a_A = 89.5420$ $b_A = 0.0587$	2.8320	0.9975
Enzim Aktivitesi $A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1$	$\alpha_1 = 85.2732$ $k_D = 0.0909$	0.0215	0.9999

*Katsayılar a ait birimler; a: gram. laktoz. L^{-1} ; a_A , α_1 : birimsiz; b: g. laktoz. $L^{-1}.dakika^{-1}$; c: g. laktoz. $L^{-1}.dakika^{-2}$; b_A , k_D : $dakika^{-1}$

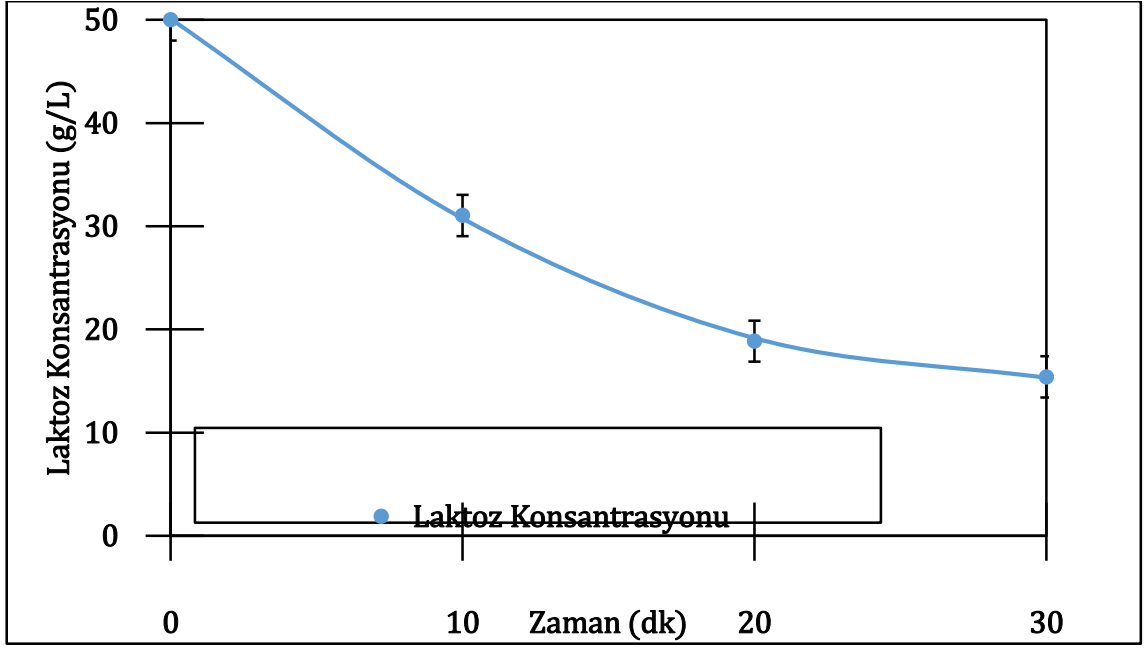
5.7.2.2 Pirinç Kabuğu Üzerine 2 Nolu İmmobilizasyon Yöntemi ile İmmobilize Edilen β -Galactosidase Enzimi ile Laktoz Hidroliz Prosesi

50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan çözeltideki laktozun hidrolizi:

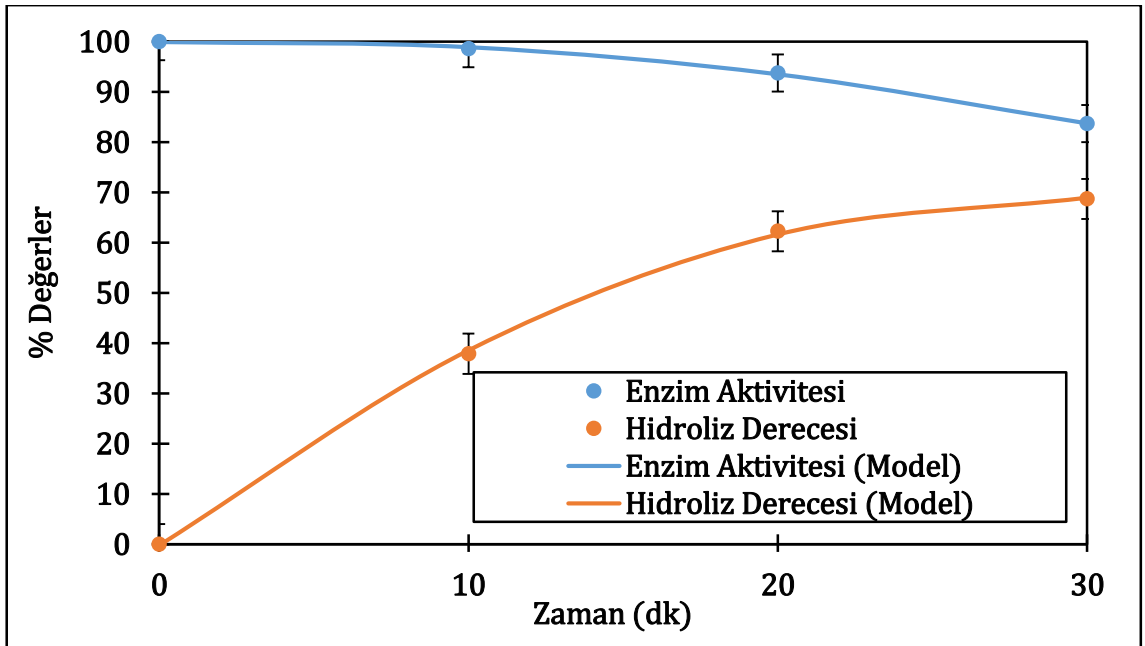
50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan 10 mL'lik laktoz çözeltisine pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda çözeltide bulunan pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1'de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4'te belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.36'da sunulmuştur. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri Şekil 5.46'da, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.47'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile 50 g/L başlangıç konsantrasyonundaki laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında; kalan laktoz konsantrasyonu 15.64 g/L (Şekil 5.46), hidroliz derecesi ise % 68.72 (Şekil 5.47) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 16.31'ini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 83.69'unu korumuştur (Şekil 5.47).

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen 50 g/L başlangıç konsantrasyonuna sahip laktoz çözeltisindeki laktoz konsantrasyon değerlerinin, hidroliz derecesi değerlerinin ve enzim aktivitesi değerlerinin ikinci dereceden kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.13'te verilmiştir.



Şekil 5.46 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 rpm)



Şekil 5.47 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile çözeltideki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ($T = 37^\circ\text{C}$, 300 rpm)

Tablo 5.13 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile laktoz çözeltisi için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler (T = 37 °C, 300 prm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R^2
Laktoz Konsantrasyonu $A = a + bt + ct^2$	a = 50.0970 b = -2.3223 c = 0.0385	0.4337	0.9998
Hidroliz derecesi $A = a_A + b_A t + c_A t^2$	a _A = -0.2180 b _A = 4.6662 c _A = -0.0787	0.9749	0.9998
Enzim Aktivitesi $A = a_B + b_B t + c_B t^2$	a _B = 99.92 b _B = 0.1158 c _B = -0.0218	0.3667	0.9995

*Katsayılar a ait birimler; a: g. laktoz. L⁻¹; b: g. laktoz. L⁻¹.dakika⁻¹; c: g. laktoz. L⁻¹.dakika⁻²; a_A, a_B: birimsiz; b_A, b_B: dakika⁻¹; c_A, c_B: dakika⁻²

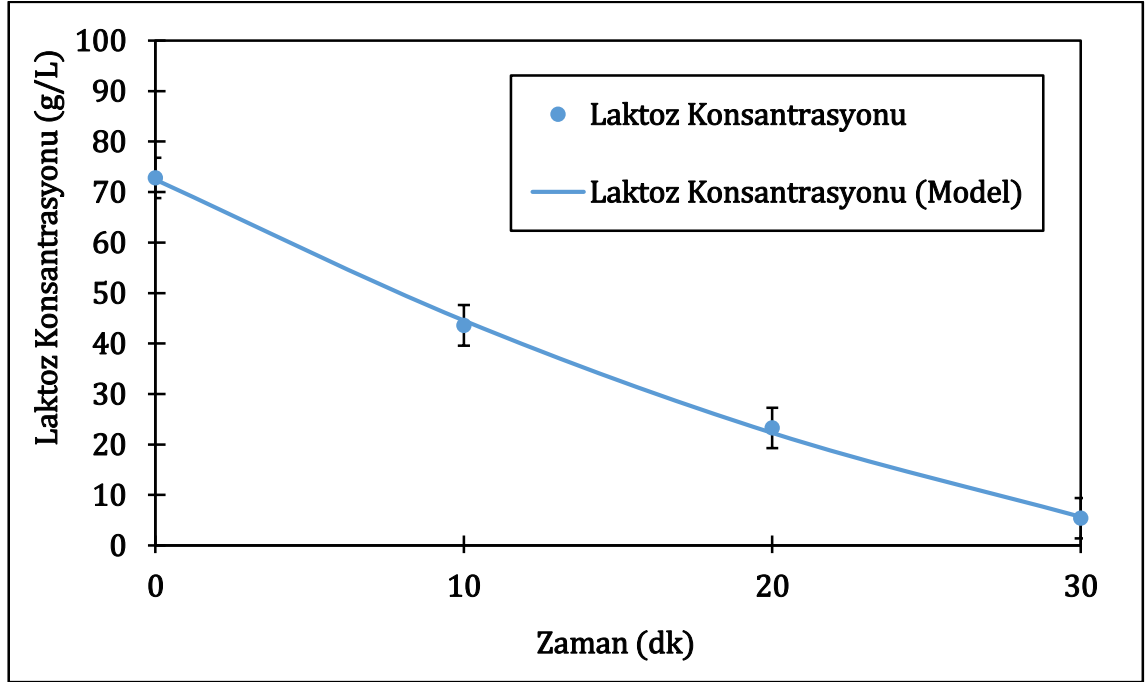
Anne Sütündeki Laktozun Hidrolizi:

Anne sütündeki laktozun hidroliz prosesi için, 10 mL’lik anne sütündeki başlangıç laktoz konsantrasyonu belirlenmiştir. Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g /L olarak bulunan anne sütüne, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim ilavesi ile laktoz hidroliz prosesi başlatılmıştır. 37 °C sıcaklıkta ve 300 rpm karıştırıcı hızında gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz reaksiyonu boyunca; 10, 20 ve 30. dakikalarda anne sütünde bulunan pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait aktivite değerleri Bölüm 4.4.1’de belirtildiği şekilde, laktoz konsantrasyonları ise Bölüm 4.4.4’te belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

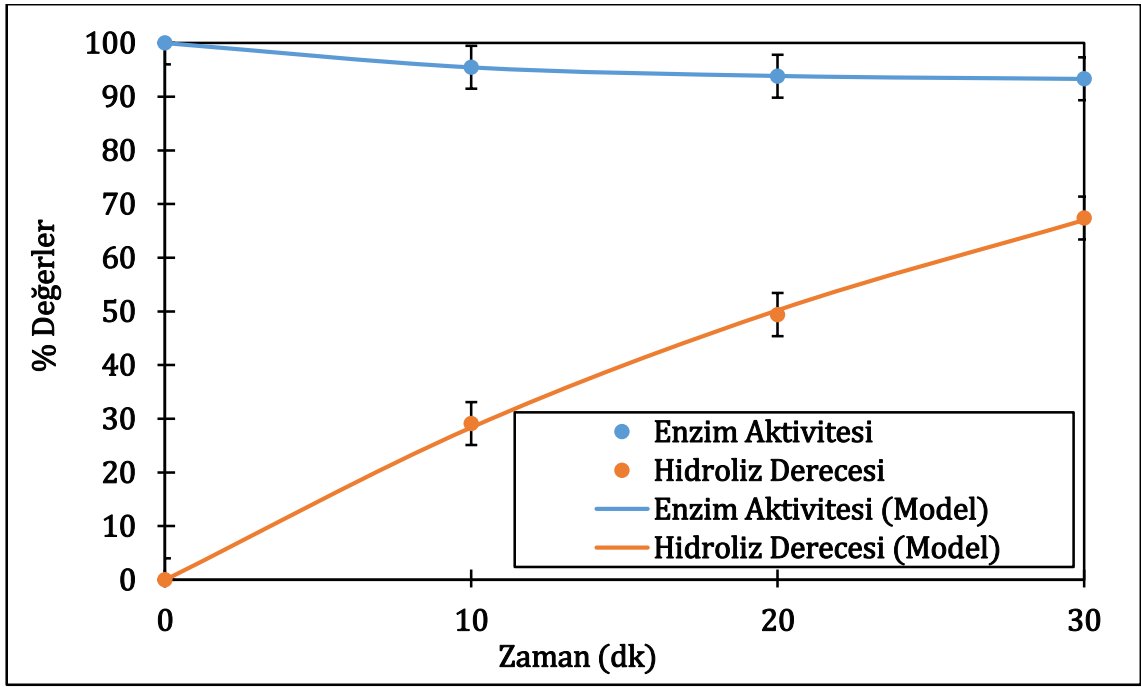
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz hidrolizi için elde edilen değerler Tablo A.37’de sunulmuştur. Kalan laktoz konsantrasyonu değerleri Şekil 5.48’de, % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ise Şekil 5.49’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütünün 30 dakikalık hidroliz prosesi sonrasında;

kalan laktoz konsantrasyonu 5.43 g/L (Şekil 5.48), hidroliz derecesi ise % 92.54 (Şekil 5.49) olarak hesaplanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 6.68'ini kaybetmiş olup başlangıç aktivitesinin % 93.32'sini korumuştur (Şekil 5.49).

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi elde edilen β -galactosidase enzimine ait deneysel verilere dayanılarak yapılan matematiksel modelleme sonucunda zamana karşılık elde edilen anne sütündeki laktoz konsantrasyon değerlerinin ikinci dereceden kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu, hidroliz derecesi değerlerinin Exponential Association modele (Denklem 5.4) uyduğu, enzim aktivitesi değerlerinin ise Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele (Denklem 5.3) uyduğu görülmüştür. Kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen istatistik veriler Tablo 5.14'te verilmiştir.



Şekil 5.48 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda kalan laktoz konsantrasyon değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)



Şekil 5.49 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütündeki laktozun hidrolizi sonucunda % kalan enzim aktivitesi ve % laktoz hidroliz derecesi değerleri ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 rpm)

Tablo 5.14 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile anne sütü için kurulan matematiksel modellere ait katsayılar ve istatistiksel veriler ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 prm)

Matematiksel Model	Katsayılar*	δ	R^2
Laktoz Konsantrasyonu $A = a + bt + ct^2$	$a = 72.4750$ $b = -3.0725$ $c = 0.0282$	1.4534	0.9995
Hidroliz derecesi $[H] = a_A(1 - e^{-b_A t})$	$a_A = 122.79$ $b_A = 0.0263$	0.8120	0.9997
Enzim Aktivitesi $A = (100 - a_1) \exp(-k_D t) + a_1$	$\alpha_1 = 92.9961$ $k_D = 0.1048$	0.0331	0.9999

*Katsayılarla ait birimler; a: g. laktoz. L^{-1} ; b: g. laktoz. $L^{-1} \cdot \text{dakika}^{-1}$; c: g. laktoz. $L^{-1} \cdot \text{dakika}^{-2}$; a_A , α_1 : birimsiz; b_A , k_D : dakika^{-1}

5.8 Karakterizasyon Çalışmaları

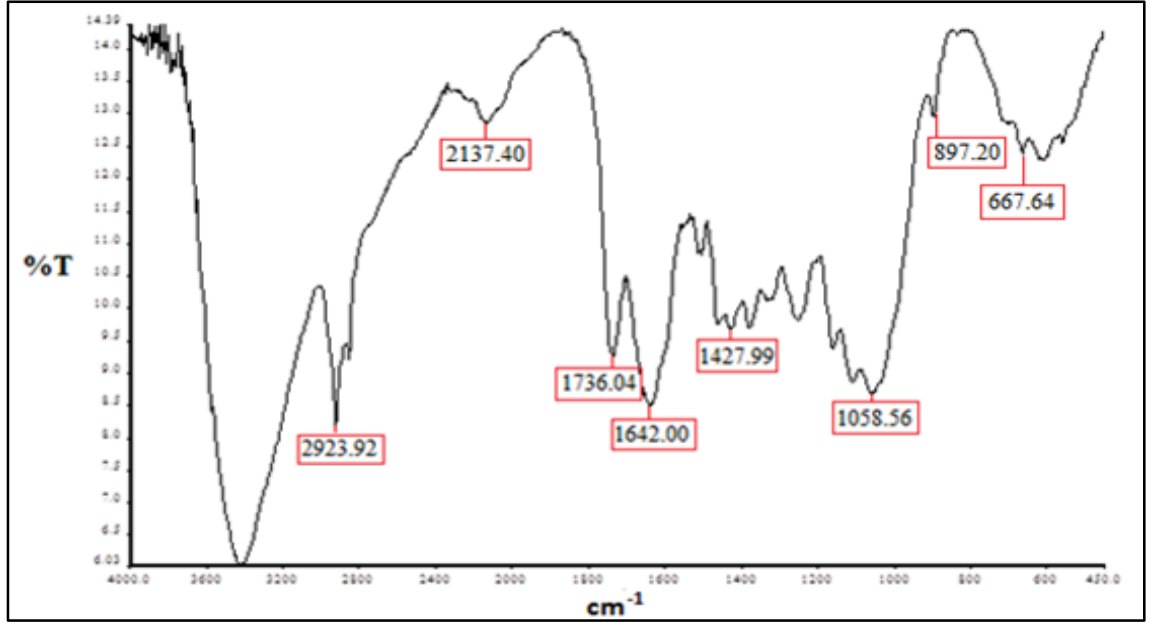
İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait FTIR analizleri Bölüm 4'te yer alan Şekil 5.17 ve Şekil 5.18'de gösterilen adımlarda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri, elde edilen immobilize β -galactosidase enzimleri içerisinde yalnızca birinde gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri için seçilen numune, 50 g/L konsantrasyonundaki laktoz çözeltisini en yüksek hidroliz derecesi ile hidrolizleyen immobilize β -galactosidase enzimidir. SEM analizleri, taşıyıcı üzerine β -galactosidase enziminin immobilizasyon prosesinden önce ve sonra olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

5.8.1 FTIR Analizi

β -Galactosidase enzim immobilizasyonun kabak lifi üzerinde gerçekleştirildiği çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları Bölüm 5.8.1.1'de, β -galactosidase enzim immobilizasyonun pirinç kabuğu üzerinde gerçekleştirildiği çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları ise Bölüm 5.8.1.2'de verilmiştir.

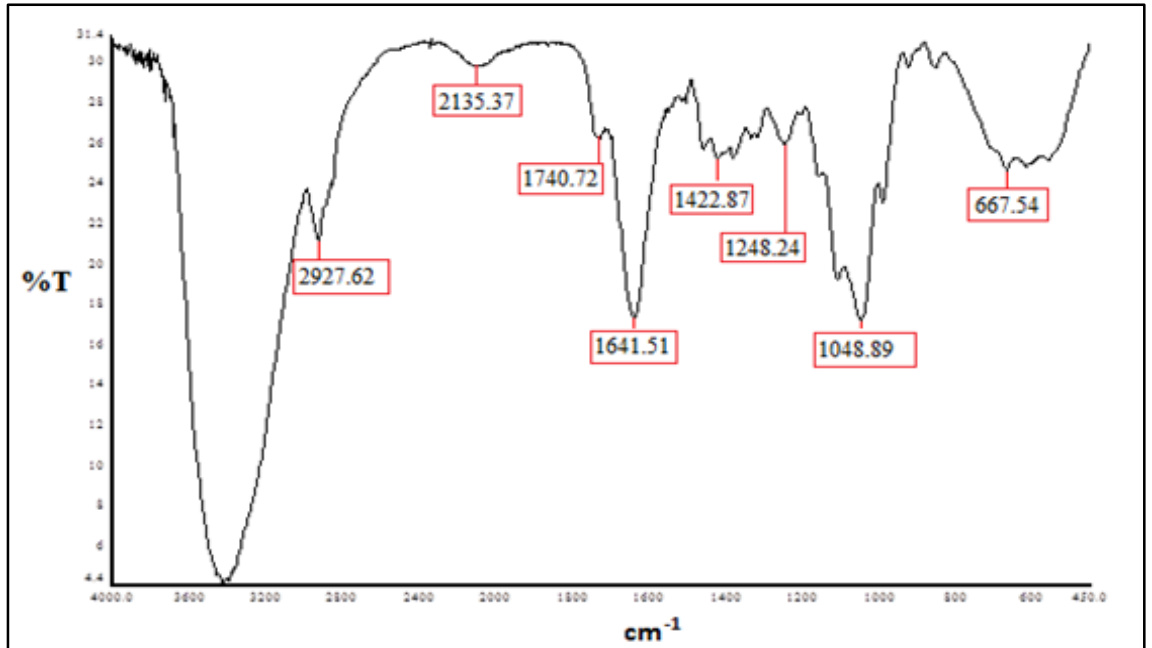
5.8.1.1 Kabak Lifi Üzerine β -Galactosidase Enzim İmmobilizasyonunun Gerçekleştirildiği Çalışmalara Ait FTIR Analizi

Bölüm 4.3.1'de belirtilen ön işlem uygulanmasından sonra kabak lifi için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu Şekil 5.50'de verilmiştir.



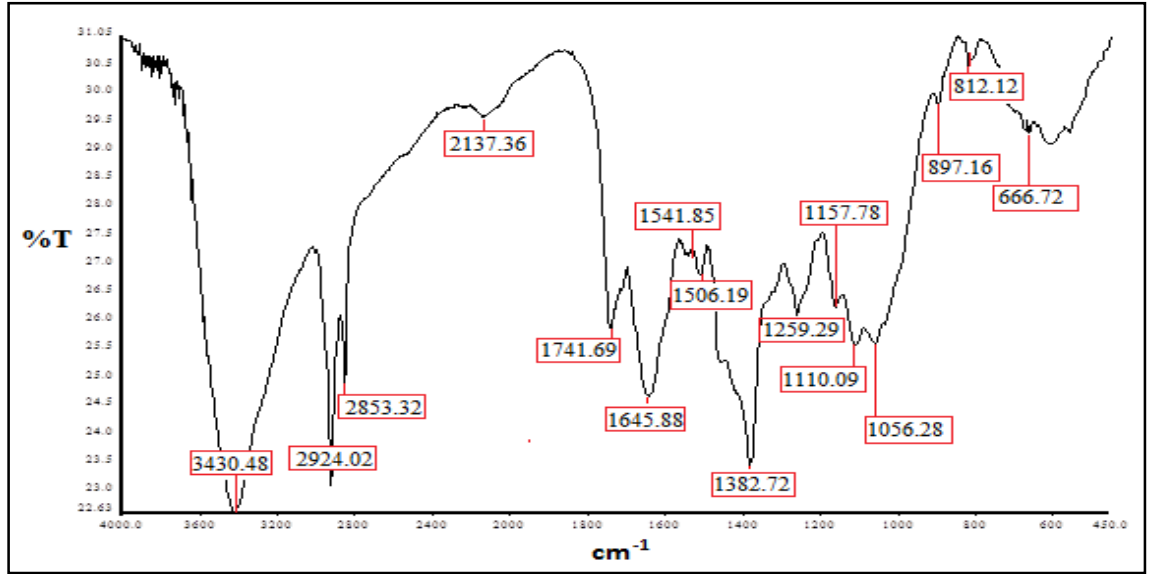
Şekil 5.50 Ön işlem görmüş kabak lifine ait FTIR analizi

Bölüm 4.3'te belirtilen kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu Şekil 5.51'de verilmiştir.



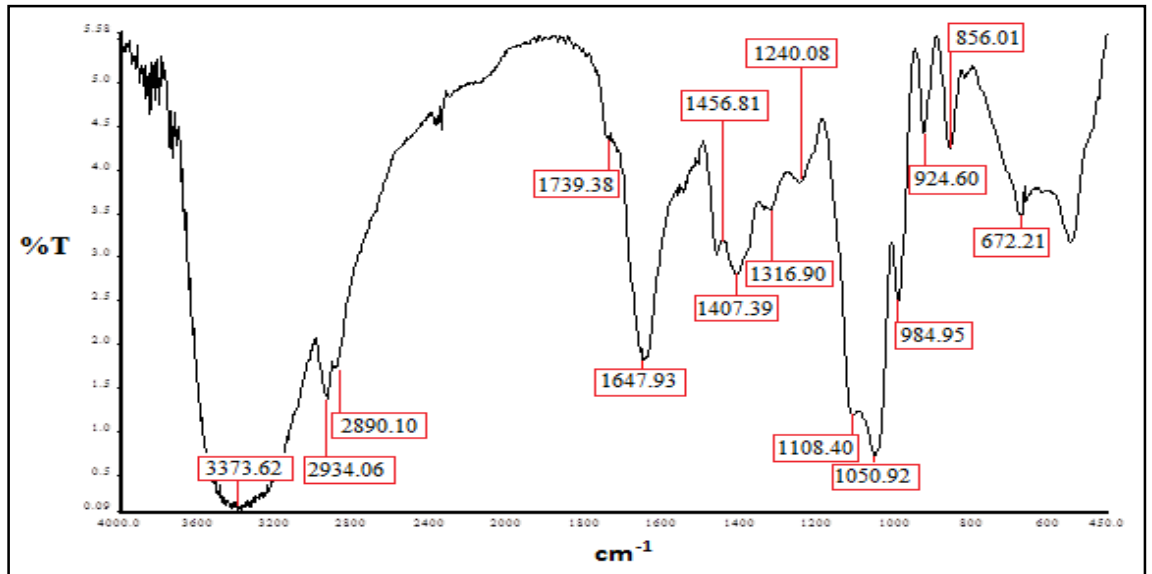
Şekil 5.51 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi

Bölüm 4.3.2’de belirtilen glutaraldehit ile muamelesinden sonra kabak lifi için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu Şekil 5.52’de verilmiştir.



Şekil 5.52 Glutaraldehit ile muamele edilmiş kabak lifine ait FTIR analizi

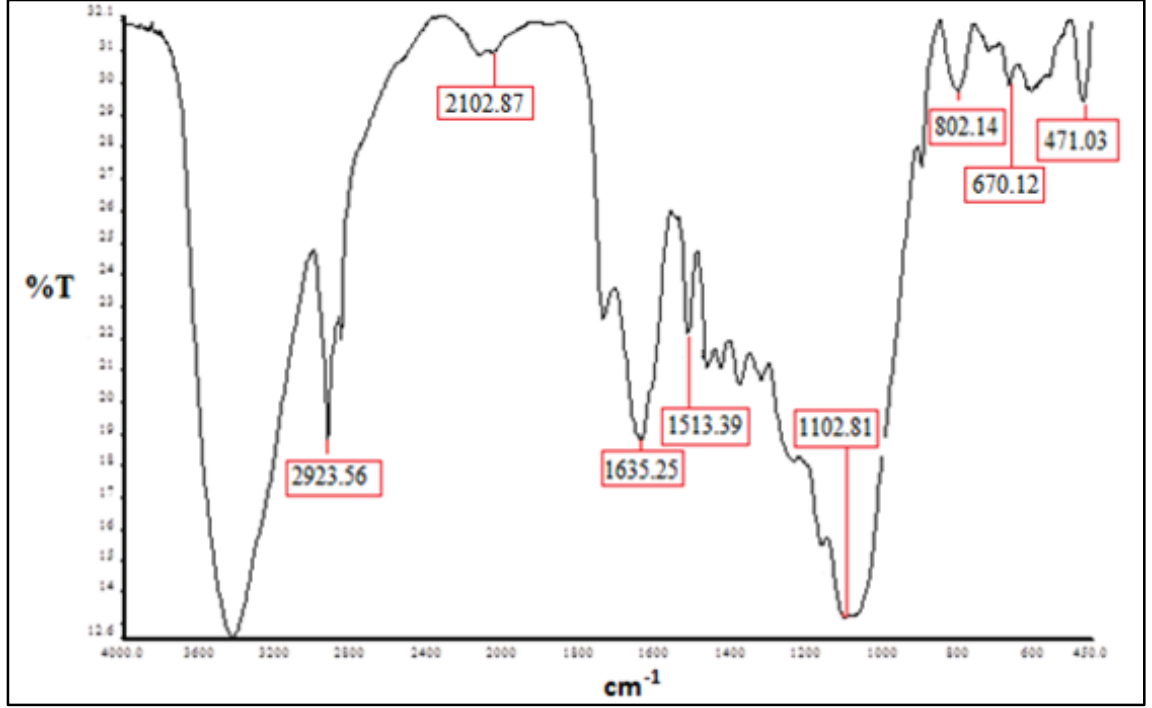
Bölüm 4.3’te belirtilen kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu Şekil 5.53’te verilmiştir.



Şekil 5.53 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi

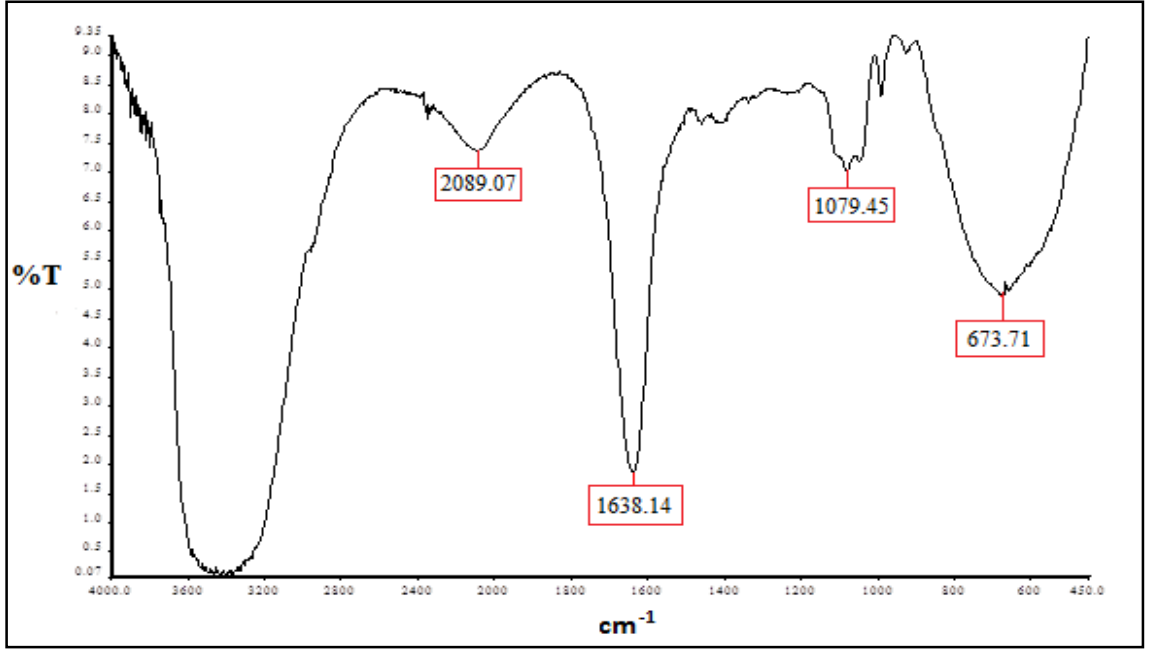
5.8.1.2 Pirinç Kabuğu zerine ̢-Galactosidase Enzim İmmobilizasyonunun Gerçekleştirildiği alışmalara Ait FTIR Analizi

Bölüm 4.3.1’de belirtilen ön işlem uygulanmasından sonra pirinç kabuğu için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu şekil 5.54’te verilmiştir.



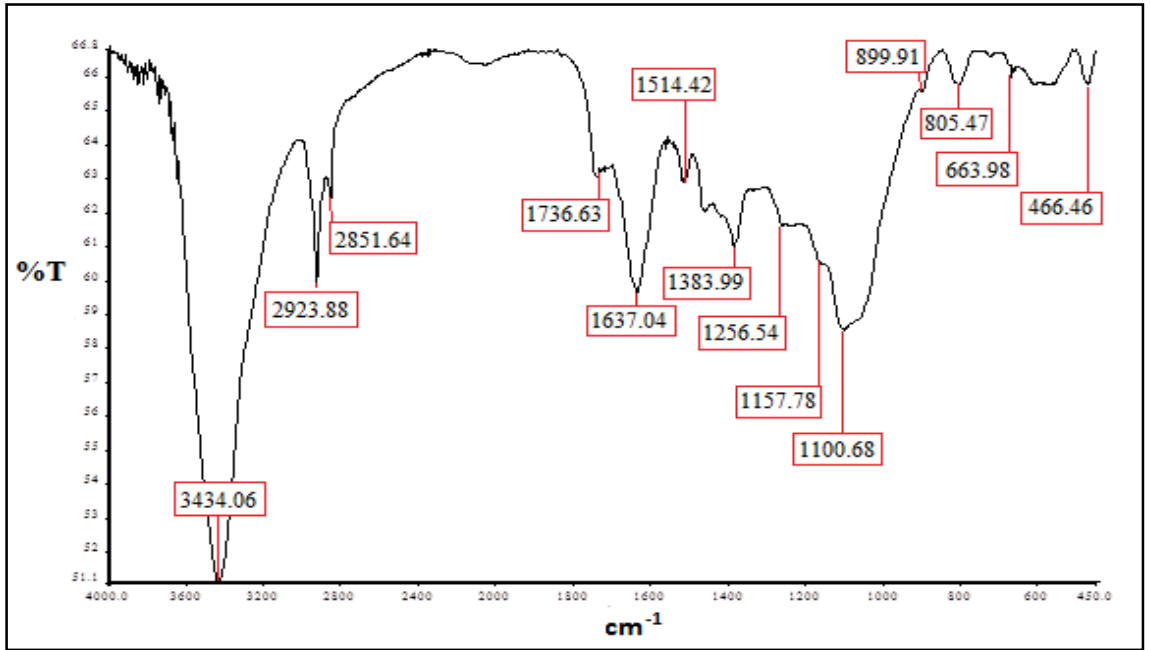
şekil 5.54 ön işlem görmüş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi

Bölüm 4.3’te belirtilen pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen ̢-galactosidase enzimi için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu şekil 5.55’te verilmiştir.



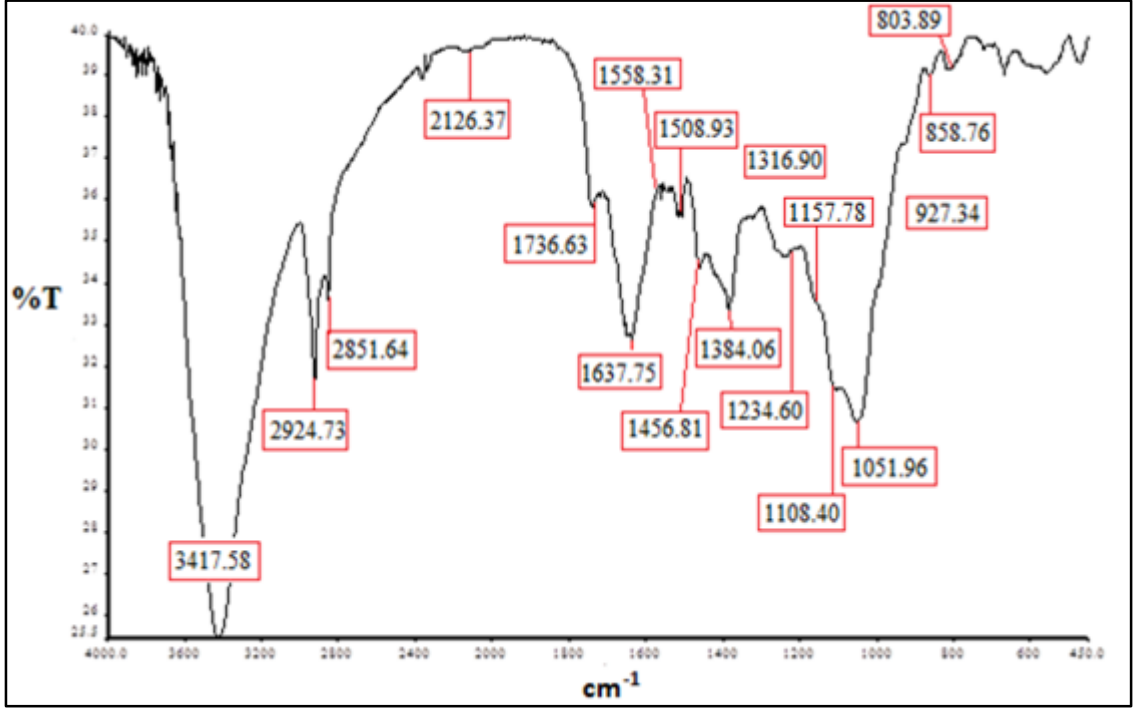
Şekil 5.55 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi

Bölüm 4.3.2’de belirtilen glutaraldehit ile muamelesinden sonra pirinç kabuğu için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu Şekil 5.56’da verilmiştir.



Şekil 5.56 Glutaraldehit ile muamele edilmiş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi

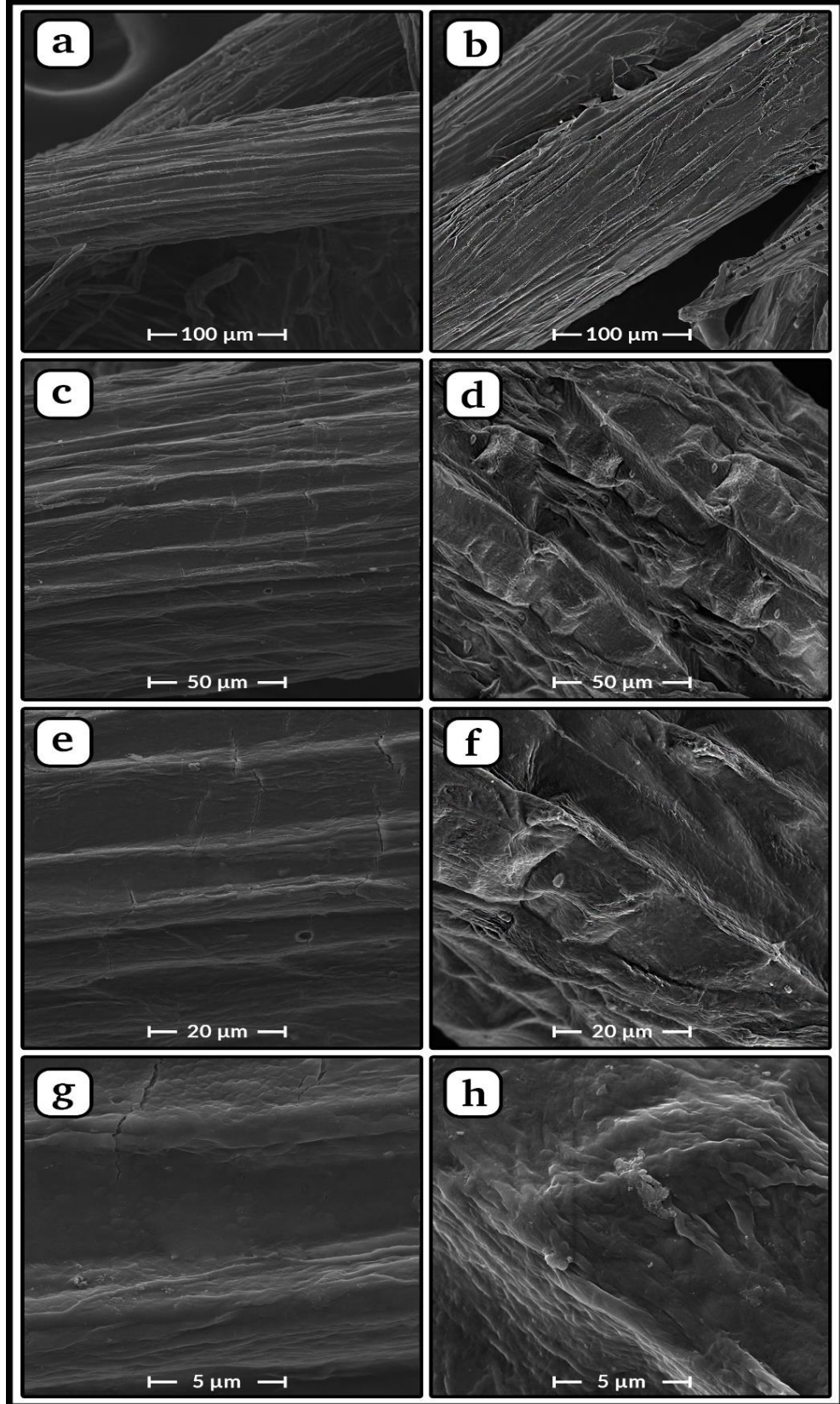
Bölüm 3.3'te belirtilen pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için gerçekleştirilen FTIR analiz sonucu Şekil 5.57'de verilmiştir.



Şekil 5.57 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi

5.8.2 SEM Analizi

Bu çalışmada 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisindeki laktozu, elde edilen immobilize β -galactosidase enzimleri içerisinde en yüksek verim olan % 75.88 hidroliz derecesi ile hidrolizleyen immobilize enzim, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimidir. Başlangıç konsantrasyonu 50 g/L olan laktoz çözeltisindeki laktozun 37.94 g/L'si hidrolizlenmiş, 30 dakikalık hidroliz prosesi sonucunda ise immobilize β -galactosidase enziminin başlangıç aktivitesinin % 60.85'ini koruduğu görülmüştür. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait SEM görüntüleri immobilizasyon prosesi öncesi ve sonrası olmak üzere Şekil 5.58'de verilmiştir.



Şekil 5.58 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait SEM görüntüleri
(a, c, g, e: immobilizasyon öncesi; b, d, f, h: immobilizasyon sonrası)

5.9 Genel Değerlendirme

İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre daha kararlı olması, uzun ömürlü olması, çözeltilerden kolayca uzaklaştırılabilmesi ve tekrar kullanılabilir olması özellikleri nedeni ile daha çok tercih edilmektedir. Özellikle üretimi zor ve pahalı olan enzimler için bu konu daha önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu çalışmada endüstriyel anlamda kullanımı yaygın olan β -galactosidase enziminin pirinç kabuğu ve kabak lifi olmak üzere iki farklı taşıyıcıya iki farklı yöntem ile enzim immobilizasyon prosesleri uygulanarak dört farklı immobilize β -galactosidase enzimi elde edilmiştir.

β -Galactosidase enziminin fiziksel yöntemle kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine immobilizasyonu 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile, β -galactosidase enziminin glutaraldehit ile muamele edilmiş kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine immobilizasyonu ise 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerinin immobilizasyon kinetikleri ve laktoz hidroliz performansları incelenmiştir.

Aktivite ve protein cinsinden % geri kazanım oranları incelendiğinde; dört farklı immobilize β -galactosidase enzim numunesi için Tablo 5.15'te verilen değerler elde edilmiştir.

İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait aktivite cinsinden % geri kazanım değerleri incelendiğinde; en yüksek değere sahip olan immobilize enziminin pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi olduğu görülmektedir (% 95.60). Taşıyıcı olarak kullanılan pirinç kabuğuna 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım değerinin, 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait değerden yaklaşık % 10 daha az olduğu görülmektedir. 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile elde edilebilecek daha yüksek immobilizasyon verimi değerleri farklı glutaraldehit konsantrasyonu, farklı sıcaklık, farklı pH değeri, farklı inkübasyon işlemi sürelerinde β -galactosidase enzim immobilizasyon prosesleri gerçekleştirilerek ya da glutaraldehite alternatif olarak farklı bağlayıcı maddeler kullanılarak sağlanabilir.

Tablo 5.15 İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait % geri kazanım değerleri

β-Galatosidase enzimi	GK_A (%) Aktivite cinsinden	GK_P (%) Protein cinsinden
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	84.90	80.53
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	80.25	73.30
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	95.60	88.06
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	85.66	76.28

Aynı immobilizasyon şartları ile farklı taşıyıcıların gösterdiği aktivite cinsinden % geri kazanım oranlarının farklılığı taşıyıcıların sahip olduğu farklı yapılardan kaynaklanabilir. Taşıyıcıların sahip olduğu lignin, selüloz gibi içerikler ve taşıyıcının farklı kimyasal özellikleri β -galactosidase enziminin bağlanabilme potansiyeli üzerinde etkili olabilmektedir.

1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri incelendiğinde; 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile enzimin taşıyıcıya bağlanması adsorpsiyon ile gerçekleştiği için Van Der Waals kuvvetlerinin olduğu söylenebilir. Aktivite cinsinden % geri kazanım oranları kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin % 84.90, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ise % 95.60'tır. Bu değerler β -galactosidase enziminin taşıyıcılar üzerine adsorpsiyonunun iyi olduğunu göstermektedir. 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimleri ile hesaplanan aktivite cinsinden % geri kazanım değerleri 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile elde edilen değerlerden daha düşüktür. Bu durum, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehitin kabak lifi ve pirinç kabuğunun enzim bağlama özelliğine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile elde edilen % geri kazanım değerleri kadar etkili olmadığını göstermektedir.

İmmobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait protein cinsinden % geri kazanım değerleri incelendiğinde; en yüksek değere sahip olan enzimin pirinç kabuğuna 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin olduğu görülmektedir (% 88.06). En düşük % GK_p değerine sahip olan β -galactosidase enzimi ise kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimidir (% 73.30). Proteinlerin bağlanması; ortam pH'ı, sıcaklığı, inkübasyon işlemi süresi ve taşıyıcıların fiziksel, kimyasal ve morfolojik özelliklerine bağlıdır. Aynı immobilizasyon şartlarında elde edilen farklı protein bağlanma verimleri taşıyıcıların sahip oldukları özelliklere göre değişiklik gösterebilir.

Ansari ve Husain (2012) [90] yaptıkları çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enziminin immobilizasyonu Concavalin-A celite 545 üzerine adsorpsiyon yöntemi ve glutaraldehit ile muamele ederek gerçekleştirmişlerdir. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 78, glutaraldehit ile muamele ederek immobilize ettikleri β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım değerini ise % 71 olarak saptamışlardır. Adsorpsiyon yöntemi ile karşılaştırıldığında, glutaraldehit ile muamele edilerek gerçekleştirilen immobilizasyon prosesinde, enzimin aktivite kaybının % 8.98 daha fazla olduğunu kaydetmişlerdir.

Bu çalışmada ise, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 84.90, kabak lifi üzerine glutaraldehit ile muamele edilerek gerçekleştirilen 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım değeri ise % 80.25 olarak bulunmuştur. Kabak lifi ile gerçekleştirilen çalışmalarda, 1 nolu immobilizasyon yöntemi ve glutaraldehit ile muamele edilerek gerçekleştirilen immobilizasyon prosesleri karşılaştırıldığında, glutaraldehit ile muamele edilerek gerçekleştirilen immobilizasyon prosesindeki enzimin aktivite kaybının, 1 nolu immobilizasyon prosesindeki enzimin aktivite kaybına göre % 5.48 daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım değeri % 95.60, pirinç kabuğu üzerine glutaraldehit ile muamele edilerek gerçekleştirilen 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin aktivite cinsinden geri kazanım

değeri ise % 85.66 olarak bulunmuştur. Pirinç kabuğu ile gerçekleştirilen çalışmalarda, 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile 2 nolu immobilizasyon yöntemi karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde % 10.4'lük kayıp olduğu tespit edilmiştir. Ansari ve Husain (2012) [90] tarafından yapılan çalışmada adsorpsiyon ve glutaraldehit ile muamele edilerek gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemlerinden elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerine ait aktivite cinsinden % geri kazanım değerleri ile bu çalışmada kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait % geri kazanım değerleri Tablo 5.16'da verilmiştir.

Tablo 5.16 Ansari ve Husain 2012 [90] tarafından yapılan çalışmada elde edilen % geri kazanım değerleri ile bu çalışmadan elde edilen değerlerin karşılaştırılması

β-Galactosidase Enzim Immobilizasyon Yöntemi	Aktivite cinsinden % geri kazanım (% GKA)		
	Ansari ve Husain 2012 [90] (Concavalin-A celite 545) (<i>Aspergillus oryzae</i> kaynaklı enzim)	Bu çalışma (Kabak lifi) (<i>Kluyveromyces marxianus</i> kaynaklı enzim)	Bu çalışma (Pirinç kabuğu) (<i>Kluyveromyces marxianus</i> kaynaklı enzim)
Adsorpsiyon ile immobilizasyon	78 $\pm$ 0.93	84.90	95.60
Glutaraldehit ile muamele sonrası immobilizasyon	71 $\pm$ 0.55	80.25	85.66
% GKA değişimi	% 8.98 azalış	% 5.48 azalış	% 10.4 azalış

Serbest β -galactosidase enzimi ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerine ait optimum pH ve sıcaklık değerleri Tablo 5.17'de verilmiştir. Optimum pH değerleri incelendiğinde; serbest β -galactosidase enziminin nötral ortamda aktivitesinin maksimum değerde olduğu görülmektedir. Immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinden kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin pH 6'da, diğer tüm immobilize enzimlerin ise pH 8'de maksimum aktivite değerini verdiği görülmektedir. Bu durum, immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin yapısının serbest β -galactosidase enziminin yapısından daha farklı olduğunu, asidik ve bazik ortamlarda farklı aktivite değerlerine sahip olduğunu göstermektedir. Song vd. (2010) [66] yaptıkları çalışmada *Kluyveromyces lactis* kaynaklı

serbest β -galactosidase enziminin optimum pH değerini 7, immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değerini ise 7.5 olarak tespit etmişlerdir [66]. Literatürde immobilize β -galactosidase enzimlerinin, serbest β -galactosidase enzimi ile aynı optimum pH değerini gösterdiği enzimler de bulunmaktadır. Ansari ve Husain (2010) [68] yaptıkları çalışmada *Aspergillus oryzae* kaynaklı serbest β -galactosidase enzimi ve elde ettikleri immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değerini 4.6 olarak tespit etmişlerdir. Neri vd. (2008) [69] yaptıkları çalışmada *Klyveromyces lactis* kaynaklı serbest β -galactosidase enzimi ve elde ettikleri immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değerini 6.5 olarak tespit etmişlerdir.

Tablo 5.17 Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numuneleri için elde edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri

β -Galactosidase enzimi	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)
Serbest enzim	7	37
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	6	37
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	8	40
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	8	40
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	8	37

β -Galactosidase enzim numunelerinin optimum sıcaklık değerleri incelendiğinde, serbest β -galactosidase enzimi, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için aynı optimum sıcaklık değeri saptanmış olup, bu değer 37 °C'dir. Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ve pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerinin

optimum sıcaklık değerinin serbest β -galactosidase enzimine ait optimum sıcaklık değerinden daha yüksek bulunmuştur (40 °C). Bu durum, serbest β -galactosidase enziminin aktivitesini kaybetmeye başladığı 40 °C sıcaklık değerinde, immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin aktivitelerini koruduğunu göstermektedir.

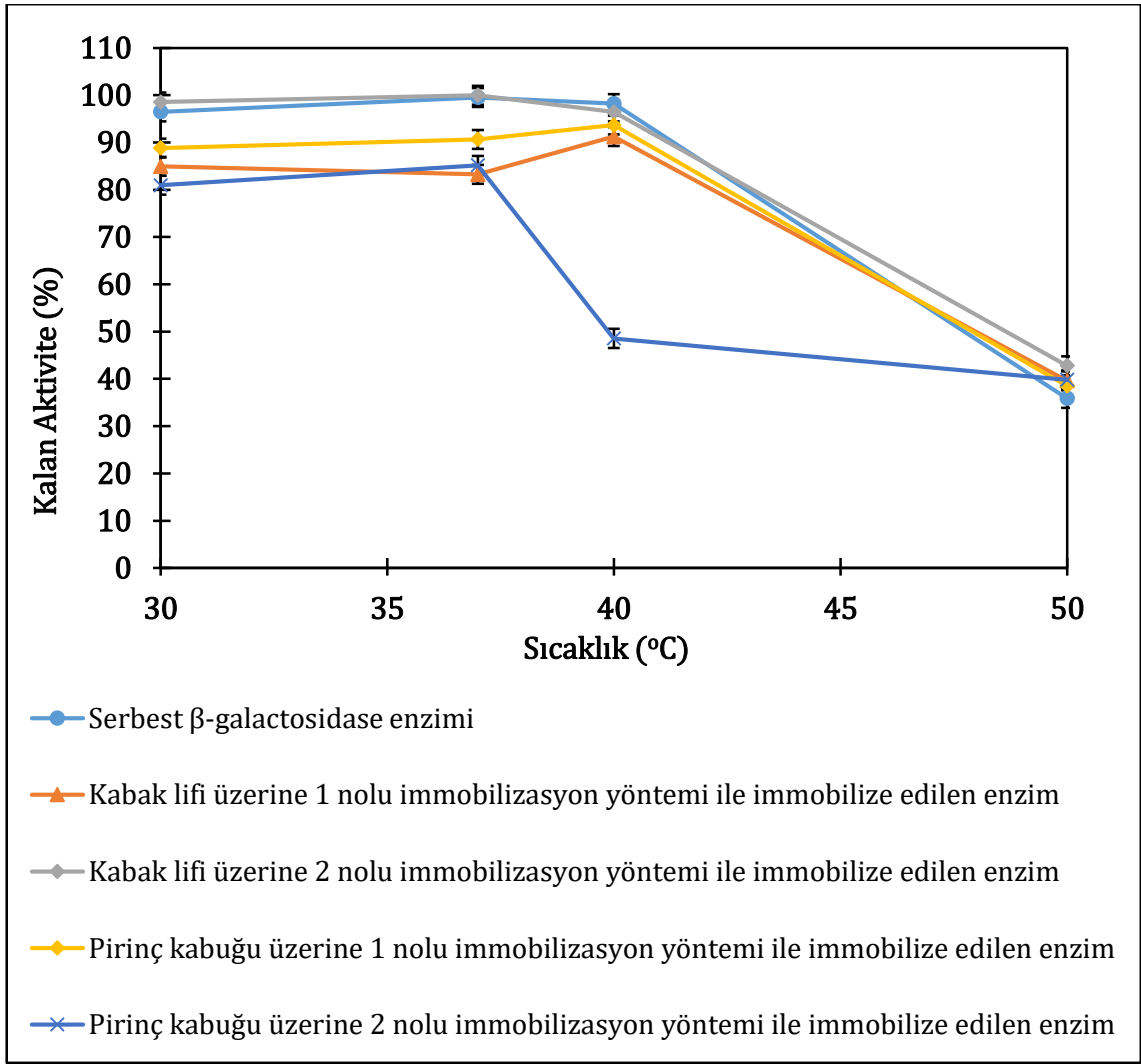
Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Akgül vd. (2012) [7] yaptıkları çalışmada β -galactosidase enzimi ile yağsız sütte laktöz hidrolizi gerçekleştirmişler ve hidroliz derecesinin optimum sıcaklığını 37 °C olarak belirlemişlerdir. Ansari ve Husain (2010) [68] *Aspergillus oryzae* kaynaklı β -galactosidase enzimini Concalvalin A üzerine immobilize etmişler; serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını 50 °C, immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını ise 60 °C olarak saptamışlardır. Song vd. (2010) [66] yaptıkları çalışmada, *Kluyveromyces lactis* kaynaklı β -galactosidase enziminin kovalent bağlama metodu ile silikajel üzerine immobilize etmişler; serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını 32 °C, immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığını ise 37 °C olarak kaydetmişlerdir. Literatürde serbest β -galactosidase enzimi ve elde ettikleri immobilize β -galactosidase enziminin aynı optimum pH'ı gösterdiği çalışmalar da mevcuttur. Husain vd. (2011) [65] yaptıkları çalışmada serbest β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değerini 50 °C ve elde ettikleri immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklık değerini ise 50 ve 60 °C olarak kaydetmişlerdir.

Serbest β -galactosidase enzim stabilitesi ve immobilize β -galactosidase enzim stabilitelerine farklı sıcaklıkların etkisini ifade eden % kalan β -galactosidase enzim aktiviteleri Tablo 5.18'de gösterilmiş ve grafiksel olarak Şekil 5.59'da sunulmuştur. Elde edilen değerler incelendiğinde serbest β -galactosidase enzimi için 50 °C'deki % kalan enzim aktivitesinin 35.9 olduğu görülmektedir. 30, 37 ve 40 °C'deki % kalan enzim aktivite değerlerinin yaklaşık % 96-99 aralığında olduğu gözlenmiştir. İmmobilize β -galactosidase enzim stabilitelerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde, 30 ve 37 °C'deki sıcaklıklarda kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait % kalan enzim aktivite değerlerinin, serbest β -galactosidase enzimine ait % kalan enzim aktivite değerlerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 50 °C sıcaklıkta tüm immobilize β -galactosidase enzim stabilitelerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde, immobilize β -galactosidase enzimlerine ait % kalan enzim aktivite değerlerinin, serbest β -galactosidase enzimine ait % kalan enzim aktivite değerinden (%)

35.9) daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin yapılarının yüksek sıcaklıklarda daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.18 Serbest ve immobilize β -galactosidase enzimlerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

β -Galactosidase enzimi	Kalan enzim aktivitesi (%)			
	30 °C	37 °C	40 °C	50 °C
Serbest enzim	96.48	99.53	98.22	35.9
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	84.93	83.26	91.25	39.64
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	98.55	100	96.44	42.80
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	88.82	90.65	93.66	38.53
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	80.96	85.17	48.56	39.82

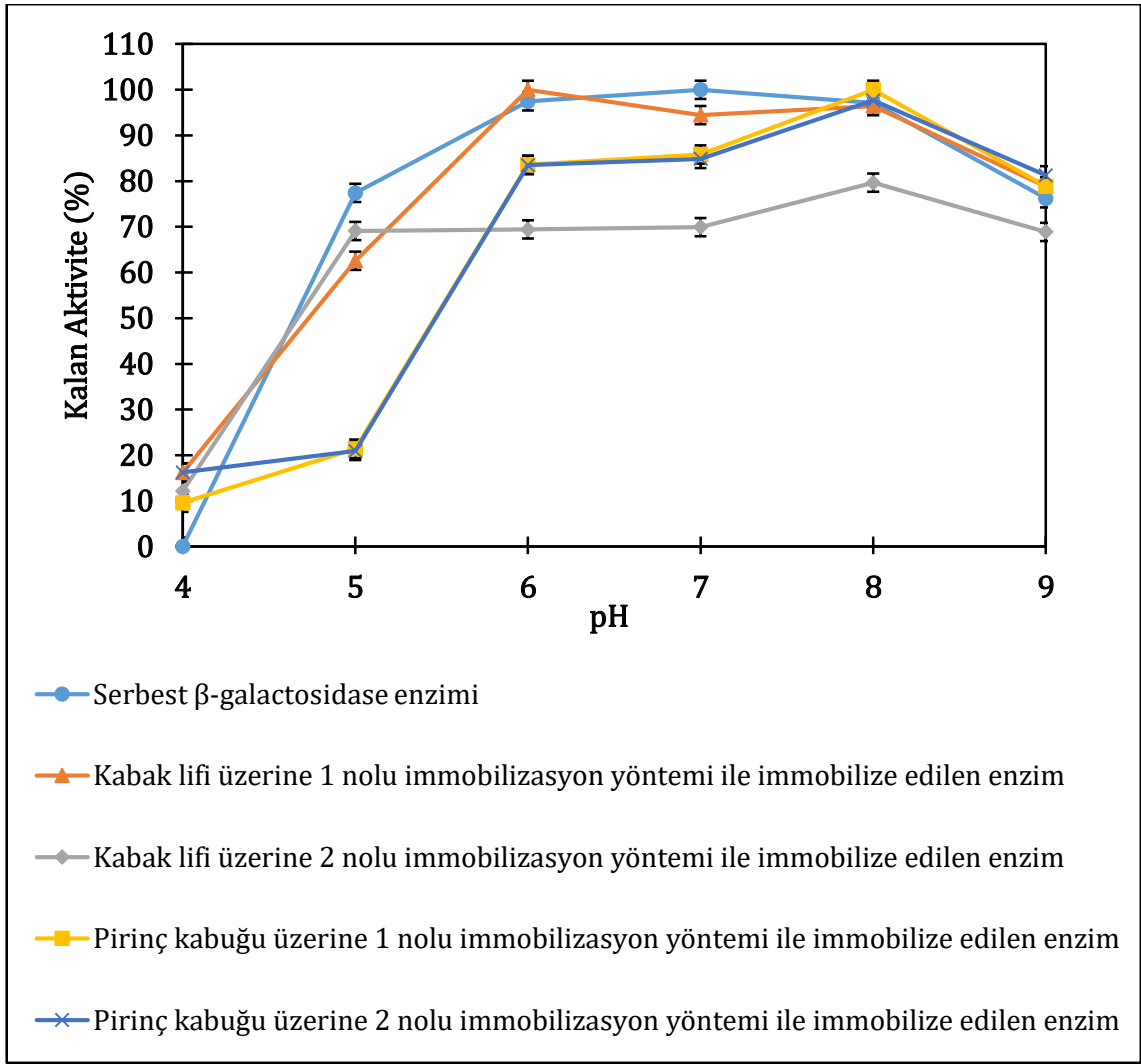


Şekil 5.59 Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri

Serbest β -galactosidase ve immobilize β -galactosidase enzim stabiliteğine pH'ın etkisi incelendiğinde % kalan aktivite değerleri arasında farklılıklar görülmüştür. Bu değerler immobilize β -galactosidase enzimlerinin yapısının serbest β -galactosidase enziminin yapısından farklı olduğunun bir göstergesidir. Farklı taşıyıcılara farklı yöntemlerle immobilize edilen enzimler, farklı pH'larda farklı enzim aktivitesi göstermişlerdir. Örneğin kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi pH 6'daki asidik ortamda dayanıklı iken, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile elde edilen β -galactosidase enziminin yaklaşık % 30 daha dayanıksız olduğu görülmektedir. Elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerine ve serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivitelerini gösteren değerler Tablo 5.19'da verilmiş olup grafiksel olarak Şekil 5.60'ta sunulmuştur.

Tablo 5.19 Serbest ve immobilize β -galactosidase enzimlerine ait farklı pH’lardaki % kalan enzim aktivite değerleri

β -Galactosidase enzimi	Kalan enzim aktivitesi (%)					
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Serbest enzim	0	77.39	97.43	100	97.08	76.20
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	16.21	62.59	100	94.46	96.42	78.83
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	12.15	69.10	69.40	69.94	79.64	68.90
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	9.59	21.40	83.58	85.82	100	78.87
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	16.23	20.94	83.49	84.87	97.66	81.26



Şekil 5.60 Serbest ve immobilize β -galactosidase enzim stabiliteelerine ait farklı pH'lardaki % kalan aktivite değerleri

Tablo 5.19 incelendiğinde serbest β -galactosidase enziminin pH 4 olan asidik ortamda 30 dakika sonunda aktivitesi sıfır iken, tüm immobilize β -galactosidase enzimlerin yaklaşık % 10-17 arasında enzim aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu da immobilize β -galactosidase enzimlerinin asidik ortamda serbest β -galactosidase enzime göre daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. pH 5 ve 7 değerindeki ortamlarda % kalan enzim aktivite değeri en yüksek olan enzim serbest β -galactosidase enzimi iken, pH 6 değerindeki asidik ortamda % kalan enzim aktivite değeri en yüksek olan enzim, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimidir. pH 8'deki bazik ortamda % kalan enzim aktivite değeri en yüksek olan enzim, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, pH 9 'daki bazik ortamda % kalan enzim aktivite değeri en

yüksek olan enzim ise pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimidir.

İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin depolama kararlılıkları incelendiğinde dört haftanın sonunda minimum aktiviteye sahip olan β -galactosidase enziminin % 60.38 kalan aktivite ile kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi olduğu, maksimum aktiviteyi gösteren enzimin ise % 98.87 kalan aktivite ile pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin olduğu görülmektedir.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilir olması serbest enzimler ile karşılaştırıldığında avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrar kullanımları sonrasında % kalan aktivite değerleri Tablo 5.20’de verilmiştir. İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrar kullanımları sonrasında kalan aktiviteleri incelendiğinde kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin dört kullanımdan sonra kalan aktivitesinin yaklaşık % 80 olduğu görülmektedir. Bu değer immobilize β -galactosidase enziminin endüstriyel alanda tekrar kullanılabilirliğini ve serbest β -galactosidase enzimine göre daha avantaj sağlayacağını göstermektedir.

Dört kez kullanım sonrasında ile kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi immobilize edilen β -galactosidase enziminin kalan aktivitesinin % 53.42, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin kalan aktivitesinin % 37.25, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin kalan aktivitesinin ise % 48.29 olduğu görülmektedir. Bu değerler karşılaştırıldığında bahsedilen üç farklı immobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrar kullanılabilirliğinin dört kez tekrar kullanıma uygun olduğu görülmektedir. Elde edilen değerler karşılaştırıldığında immobilize β -galactosidase enzimlerinin aktivitesinde en az kaybı gösteren enzimin kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin olduğu görülmektedir.

Tablo 5.20 İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrarlı kullanımları sonrasında % kalan enzim aktivite değerleri

β -Galactosidase enzimi	Kalan enzim aktivitesi (%) (Tekrarlı kullanım sayısı)				
	0	1	2	3	4
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	100	97.79	85.58	83.49	79.98
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	100	95.77	92.40	62.06	53.42
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	100	95.80	59.66	41.75	37.25
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	100	80.29	63.15	60.11	48.29

Serbest ve immobilize β -galactosidase enzimlerine ait kinetik veriler inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için incelenmiştir. Literatürde Ca^{+2} kaynağının inhibitör ve aktivatör olarak davranış sergilediği çalışmalar mevcuttur. Tablo 5.21’de literatürde yer alan aktivatör ya da inhibitör olarak β -galactosidase enzim aktivitesini etkileyen çalışmalar verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde; ortamda bulunan % 5 CaCl_2 ’nin (w/v) inhibitör etkisi oluşturarak β -galactosidase enzim aktivitesini düşürdüğü görülmüştür.

İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için serbest β -galactosidase enziminin kinetik davranışları incelendiğinde elde edilen K_m ve V_{max} değerlerindeki % değişim miktarları Tablo 5.22’de verilmiştir.

İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin kinetik davranışları incelendiğinde elde edilen K_m ve V_{max} değerlerindeki % değişim miktarları kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için Tablo 5.14’te verilmiştir.

İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin kinetik davranışları incelendiğinde elde edilen K_m ve V_{max} değerlerindeki % değişim miktarları kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için Tablo 5.24’te verilmiştir.

Tablo 5.21 Farklı kaynaklı β -galactosidase enzimlerine Ca^{2+} iyonunun etkisi

Referans	Enzim kaynağı	Ca^{2+} kaynağı	Aktivatör	İnhibitör
Demirhan (2007) [91]	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ca^{2+}		X
Pal vd. (2013) [92]	<i>Amygdalus communis</i>	Ca^{2+}	X	
Ansari ve Husain (2010) [64]	<i>Aspergillus oryzae</i>	CaCl_2		X
Otieno (2010) [93]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ca^{2+}		X
Michova ve Rosenberg (2006) [94]	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Ca^{2+}		X
Karunakaran ve Devi (1994) [95]	<i>Aeromonas caviae</i>	Ca^{2+}	X	
Banerjee vd. (1982) [96]	<i>Saccharomyces anamensis</i>	Ca^{2+}	X	
Bu çalışma	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CaCl_2		X

Tablo 5.22 Serbest β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları

Serbest β -galactosidase enzimi	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)
İnhibitörsüz ortam	1.54×10^{-3}	1.105
% 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam	2.44×10^{-3}	1.110
% Değişim oranı	% 58 artış	% 1 artış

Tablo 5.23 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)
İnhibitörsüz ortam	9.42×10^{-4}	0.785
% 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam	1.61×10^{-3}	0.673
% Değişim oranı	% 70 artış	% 15 azalış

Tablo 5.24 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)
İnhibitörsüz ortam	1.18×10^{-3}	0.847
% 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam	1.90×10^{-3}	0.706
% Değişim oranı	% 61 artış	% 17 azalış

İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin kinetik davranışları incelendiğinde elde edilen K_m ve V_{max} değerlerindeki % değişim miktarları pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için Tablo 5.25'te verilmiştir.

İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin kinetik davranışları incelendiğinde elde edilen K_m ve V_{max} değerlerindeki % değişim miktarları pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi için Tablo 5.26'da verilmiştir.

Tablo 5.25 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları

Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)
İnhibitörsüz ortam	6.47×10^{-4}	0.924
% 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam	7.64×10^{-4}	0.955
% Değişim oranı	% 18 artış	% 3 artış

Tablo 5.26 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim numunelerine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için hesaplanan K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim oranları

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	K_m (g/mL)	V_{max} (U/mL)
İnhibitörsüz ortam	1.03×10^{-3}	0.737
% 5 CaCl ₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam	1.55×10^{-3}	0.714
% Değişim oranı	% 50 artış	% 4 azalış

Tablo 5.22, 5.23, 5.24, 5.25 ve 5.26 incelendiğinde; tüm immobilize β -galactosidase enzimlerine ait K_m değerlerinin hem % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam hem inhibitörsüz ortam için serbest β -galactosidase enzimine ait K_m değerlerinden daha düşük olduğu görülmektedir. K_m değerlerinin düşmesi enzimin substrata olan ilgisinin arttığını göstermektedir.

İnhibitörsüz ortam için V_{max} değerleri incelendiğinde; serbest β -galactosidase enziminin V_{max} değerinin 1.105 U/mL iken % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için V_{max} değerinin 1.110 U/mL'ye arttığı görülmektedir. Bu artış % 1'lik bir değeri gösterdiğinden hızının çok değişmediği şeklinde yorumlanabilir. Tüm immobilize β -galactosidase

enzimlerinin K_m değerlerinin % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortamda artış gösterdiği saptanmıştır.

İnhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için elde edilen V_{max} hızları incelendiğinde; kabak lifi üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimlerinin V_{max} değerlerinde sırasıyla % 15 ve % 17 azalış, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin V_{max} değerinde % 4 azalış, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin V_{max} değerinde ise inhibitörsüz ortama göre % 3 artış olduğu tespit edilmiştir.

İnhibitörsüz ortam ile % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortamlarda elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerine ait K_m değerleri incelendiğinde, elde edilen tüm immobilize β -galactosidase enzimlerine ait K_m değerlerinin inhibitör varlığında artış gösterdiği görülmüştür. İnhibitör varlığında K_m değerinin artış göstermesi inhibitörün substratın bağlanmasını engelleyecek bir şekilde enzime bağlandığını ifade eder. K_m değerinin artış göstermesi yarışmalı inhibisyonu göstermektedir. Yarışmalı inhibitörün etki şekli farklı şekillerde olabilir; tek bir bağlanma merkezi için substratla yarışabilir, sterik bir etki oluşturarak substrat bağlanmasını engelleyebilir, ortak bir bağlanma merkezi için sterik etki veya rekabet oluşturabilir, bağlanma merkezleri girişebilir, allosterik bir etki ile enzim konformasyonunda değişiklik yapabilir [4].

Zolnere vd. (2017) [97] yaptıkları çalışmada; ticari Lactozym Pure 6500 L enziminin Ca^{+2} varlığındaki V_{max} değerinin inhibitörsüz ortam için elde edilen V_{max} değerine göre değişmediğini, K_m değerinin ise inhibitörsüz ortam için elde edilen K_m değerine göre yaklaşık % 42 artış gösterdiğini saptanmıştır. Yine aynı çalışmada; NOLA Fit 5500 ticari enziminin Ca^{+2} varlığındaki V_{max} değerinin inhibitörsüz ortam için elde edilen V_{max} değerine göre yaklaşık % 15 azalma olduğunu ve Ca^{+2} varlığındaki K_m değerinde ise inhibitörsüz ortam için elde edilen K_m değerine göre yaklaşık % 11 azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Laktoz hidroliz çalışmalarına ait sonuçlar incelendiğinde; 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltisinde kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin % 75.88 hidroliz derecesine, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin

% 65.60 hidroliz derecesine, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin % 70.80 hidroliz derecesine, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ise % 68.72 hidroliz derecesine sahip olduğu görülmüştür. Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütünde elde edilen hidroliz dereceleri, laktoz çözeltisinde elde edilen hidroliz derecelerine göre daha yüksektir. Anne sütünde elde edilen hidroliz dereceleri kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile % 97.93, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile % 99.17, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile % 100, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile ise % 92.54 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen verilere göre pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 30 dakika süre sonunda anne sütündeki laktozun tamamını hidrolizlediği görülmüştür. İmmobilize β -galactosidase enzimleri kullanılarak laktoz çözeltisindeki ve anne sütündeki laktozun 30 dakikalık hidrolizi sonrasında % kalan laktoz miktarları Tablo 5.27’de verilmiştir.

Tablo 5.27 İmmobilize β -galactosidase enzimleri kullanılarak laktoz çözeltisindeki ve anne sütündeki laktozun 30 dakikalık hidrolizi sonrasında % kalan laktoz miktarları

β-Galactosidase enzimi	Kalan laktoz miktarı (%)	
	Laktoz çözeltisi	Anne sütü
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	24.12	2.07
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	34.40	0.83
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	29.20	0
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	31.28	7.46

Tablo 5.28’de immobilize β -galactosidase enzimleri kullanılarak hem laktoz çözeltisinde hem de anne sütünde 30 dakikalık hidroliz prosesi sonunda kalan % laktoz hidroliz dereceleri verilmiştir.

Tablo 5.28 Laktoz hidroliz prosesleri sonucunda elde edilen % laktoz hidroliz dereceleri

β -Galactosidase enzimi	Laktoz hidroliz derecesi (%)	
	Laktoz çözeltisi	Anne sütü
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	75.88	97.93
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	65.60	99.17
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	70.80	100
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	68.72	92.54

Tablo 5.29’da immobilize β -galactosidase enzim numuneleri kullanılarak hem laktoz çözeltisinde hem de anne sütünde 30 dakikalık hidroliz prosesi sonunda % kalan enzim aktivite değerleri verilmiştir.

Tablo 5.29 Laktoz hidroliz prosesleri sonucunda β -galactosidase enzimine ait % kalan aktivite değerleri

β -Galactosidase enzimi	Kalan enzim aktivitesi (%)	
	Laktoz çözeltisi	Anne sütü
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	60.85	71.60
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	55.68	87.42
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	76.52	86.25
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen enzim	83.69	93.32

Bu çalışmada; tüm immobilize β -galactosidase enzim numunelerinin laktoz hidroliz performanslarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 5.28). Laktoz çözeltisini 30 dakika sonunda en iyi hidrolizleyen immobilize enzimin kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin olduğu saptanmıştır (% 75.88). Puri ve Gupta (2010) [98] yaptıkları çalışmada; recombinant *Pseudoalteromonas sp.* 22b β -galactosidase enzimini kitosan boncuklar üzerine immobilize etmişler ve immobilize β -galactosidase enzimi ile gerçekleştirdikleri hidroliz prosesinde laktoz hidroliz derecesini % 58 olarak tespit etmişlerdir.

Akgül vd. (2012) [7] yaptıkları çalışmada; yağsız sütteki laktoz hidroliz çalışmasında 30 dakikalık hidroliz prosesi sonunda laktoz hidroliz derecesini biyoreaktörde % 89, sonikatörde % 89 ve homojenizatörde % 54 olarak hesaplamışlardır. Bayramoğlu vd. (2007) [71] yaptıkları çalışmada *E.coli* kaynaklı β -galactosidase enzimini manyetik poli boncuklara immobilize etmişler ve elde ettikleri immobilize β -galactosidase enzimi ile gerçekleştirdikleri laktoz hidrolizi sonucunda immobilize β -galactosidase enziminin başlangıç aktivitesinin % 88'inini koruduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen hidroliz dereceleri ve hidroliz sonrasında kalan β -galactosidase enzim aktivite değerleri, Puri ve Gupta (2010) [98], Akgül vd. (2012) [7], Bayramoğlu vd. (2007) [71] tarafından yapılan β -galactosidase enzimi ile laktoz hidrolizi içeren çalışmalarla kıyaslandığında, bu çalışmadan elde edilen laktoz hidroliz dereceleri ile kalan enzim

aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmada; infrared radyasyonunun dalga boyu ve yoğunluğunun neden olduğu bağ oluşumunu tespit ederek protein yüzey etkileşimi oluşumunu değerlendirmek için FTIR analizleri yapılmıştır.

Kabak lifi ile yapılan çalışmalara ait; 1) Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde ön işlem görmüş kabak lifine ait FTIR analizi, 2) Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi, 3) Glutaraldehit ile muamele edilmiş kabak lifine ait FTIR analizi, ve 4) Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi şekil 5.61'de verilmiştir.

Bölüm 4.3'te belirtildiği şekilde ön işlem görmüş kabak lifine ait absorpsiyon bantlarında 667 cm^{-1} 'de C-H deformasyonu olduğu görülmektedir [99]. Piklerden 897 cm^{-1} C-H gerilmesini, 1058 cm^{-1} C-O gerilmesini, 1427 cm^{-1} C=O ve COOH bağını, 1624 cm^{-1} amid-I bağını, 2923 cm^{-1} asimetrik metil gerilmelerini ifade etmektedir [61, 99, 101, 104]. 1736 cm^{-1} 'deki pik ise karakteristik nanofiberin yapısına işaret etmektedir [104].

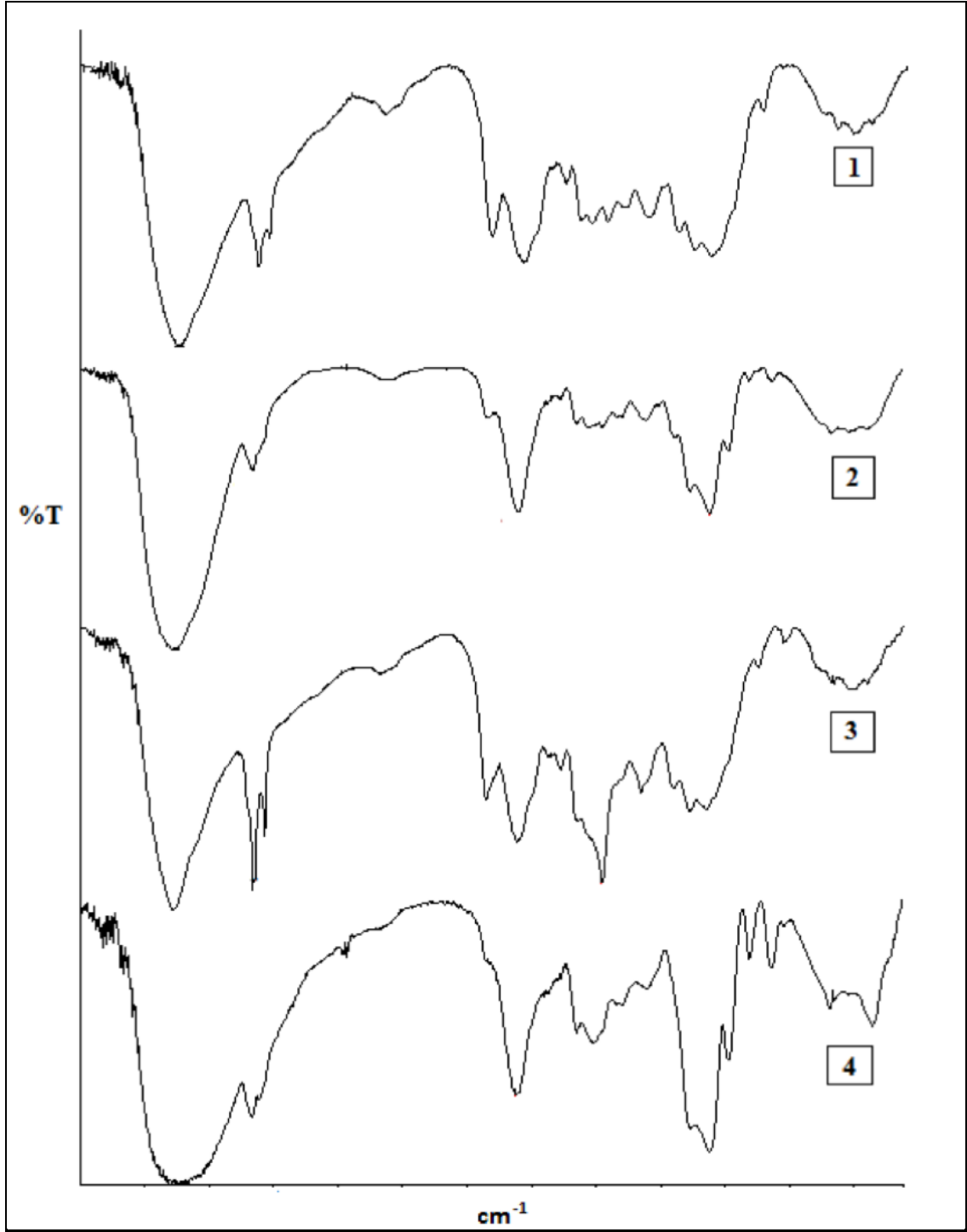
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait absorpsiyon bantları incelendiğinde; ön işlem görmüş kabak lifine ait relatif pik integrallerinde değişikliklerin meydana geldiği görülmektedir. 1641 cm^{-1} 'deki pik kabak lifi üzerine elde immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait amid-II pikini, 1248 ile 1422 cm^{-1} aralığı β -galactosidase enzimine ait -CH gerilmelerini, $790\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki eğilme pikleri ise kabak lifi üzerine immobilize edilen β -galactosidase enziminin -C=O gerilme bağlarını ifade etmektedir [103].

Glutaraldehit ile muamele edilmiş kabak lifine ait FTIR analizi incelendiğinde; ön işlem görmüş kabak lifine ait piklerden farklı olarak 1157 cm^{-1} 'deki pik göze çarpmaktadır. Bu pik kabak lifi içerisinde yer alan selüloz ile glutaraldehit arasındaki çapraz bağ oluşumunu göstermekte olup çapraz bağlanmadan kaynaklanan O-H bağlarını, 2853 cm^{-1} 'deki pik ise çapraz bağlama moleküllerinin C-H gerilmelerini ifade etmektedir [100].

Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait absorpsiyon bantları incelendiğinde; glutaraldehit ile muamele edilen kabak lifine ait FTIR analiz sonuçları ile benzer pikler elde edilerek, ön işlem görmüş kabak lifine ait piklerin alanında 2 nolu immobilizasyon prosesi sonrasında değişikliklerin olduğu görülmüştür. 924 ve 984 cm^{-1} 'deki pikler alifatik N-O gruplarını işaret etmektedir.

1382 cm^{-1} 'deki pik immobilizasyon sonrasında kaybolmuş, 1407 cm^{-1} 'deki pik ise daha belirgin bir hal almıştır. Bu pikler O-H düzlemsel gerilmesini ifade etmektedir [96].

Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait piklere benzer şekliyle; 1647 cm^{-1} 'deki pik kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait amid-II pikini, 1240 cm^{-1} 'deki pik β -galactosidase enzimine ait -CH'ı, 790-800 cm^{-1} aralığındaki pikler kabak lifi üzerindeki immobilize β -galactosidase enziminin -C=O bağlarını, 3000-3500 cm^{-1} aralığındaki spektrum ise β -galactosidase enziminin O-H ve -NH gruplarını ifade etmektedir [102]. Tablo 5.30'da, kabak lifi ile yapılan immobilizasyon çalışmalarına ait FTIR analizlerinden elde edilen absorpsiyon pikleri ve bu piklere karşılık gelen bağlar detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 5.61 Kabak lifi ile yapılan çalışmalara ait FTIR analizleri 1) Ön işlem görmüş kabak lifi, 2) Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, 3) Glutaraldehit ile muamele edilen kabak lifi, 4) Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi

Tablo 5.30 Kabak lifi ile yapılan çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları

	Ön işlem sonrası	1 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Glutaraldehit ile muamele sonrası	2 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Referans
C-H deformasyonu	667.64	667.54	666.72	672.21	[99]
-C=O			812.12	856.01	[103]
C-H gerilme alanları			897.16	856.01	[99]
Alifatik N-O				924.60, 984.95	[99]
C-O gerilmesi	1058.56	1048.89	1110.09,1056.28	1108.40,1050.92	[99]
Çapraz bağ oluşumu			1157.78		[100]
O-H gerilmesi		1248.24	1259.29	1240.08	[100]
O-H düzlemsel gerilmesi			1382.72	1316.90, 1407.39	[99]
C=O, COOH	1427.99	1422.87			[61]

Tablo 5.30 Kabak lifi ile yapılan çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları (devamı)

	Ön işlem sonrası	1 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Glutaraldehit ile muamele sonrası	2 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Referans
Amid-II bağı, N-H gerilmesi			1506.19	1456.81	[101, 100]
Amid-II bağı			1541.85		[102]
Amid-I bandı	1642.00	1641.51	1645.88	1647.93	[103, 101]
Karakteristik nanofiber	1736.04		1741.69	1739.38	[104]
-N=C=O gerilmesi			2137.36		[100]
Çapraz bağlama moleküllerinin C-H gerilmesi			2853.02	2890.10	[99]
Asimetrik metil gerilmeleri, -C-H	2923.92	2927.62	2924.02	2934.06	[101, 100]
Absorbe suyun O-H gerilmesi			3430.48	3373.62	[99]

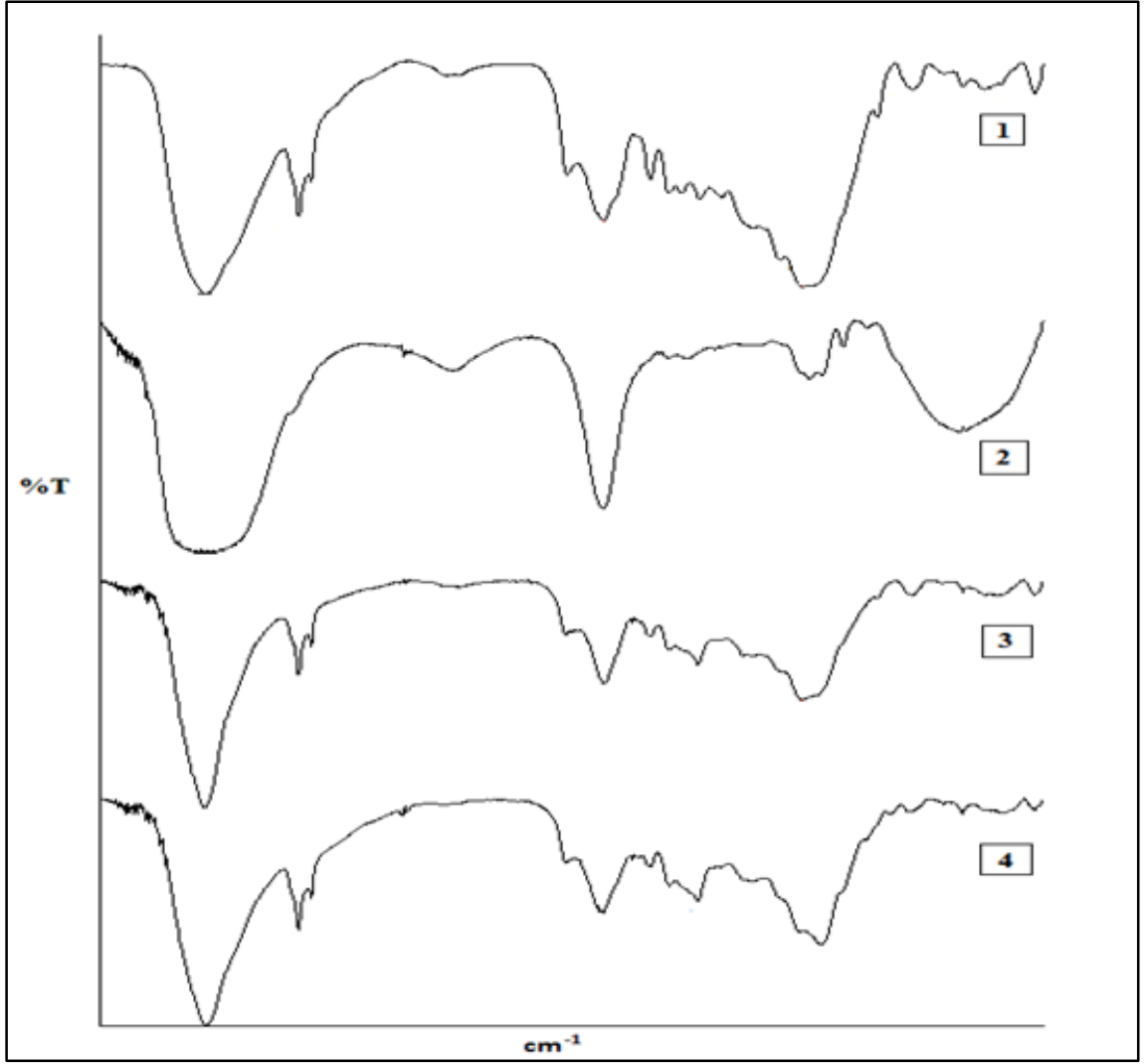
Pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalara ait; 1) Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde ön işlem görmüş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi, 2) Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi, 3) Glutaraldehit ile muamele edilmiş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi, ve 4) Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi Şekil 5.62'de verilmiştir.

Şekil 5.62'deki FTIR analiz sonuçları incelendiğinde; 466-470 cm^{-1} aralığındaki pikler karakteristik SiO_2 bandını göstermektedir. Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait absorpsiyon bantları incelendiğinde; 1638 cm^{-1} 'deki pik pirinç kabuğu üzerine immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait amid-II bağı, 1248 ile 1422 cm^{-1} aralığındaki sık aralıklı pikler ise β -galactosidase enzimine ait -CH₁, 3000-3500 cm^{-1} aralığındaki spektrum ise β -galactosidase enziminin O-H ve -NH gruplarını ifade etmektedir [102].

Glutaraldehit ile muamele edilmiş pirinç kabuğuna ait FTIR analizi incelendiğinde, 1157 cm^{-1} 'deki pik pirinç kabuğu ile glutaraldehit arasındaki çapraz bağ oluşumunu ifade etmektedir [99].

Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait FTIR analizi incelendiğinde; 1051 ve 1736 cm^{-1} 'deki pik pirinç kabuğunun glutaraldehit ile muamelesinden sonra β -galactosidase enziminin pirinç kabuğuna bağlandığını göstermektedir. 1637 cm^{-1} 'deki pik pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin amid-II grubunu, 1256 ile 1383 cm^{-1} 'deki pik pirinç kabuğu üzerine bağlanan β -galactosidase enziminin -CH bağı, 2851 ile 2924 cm^{-1} 'deki pikler çapraz bağlama moleküllerinin C-H gerilmelerini ve N-CH₃ gerilmelerini işaret ederken, 3000-3500 cm^{-1} aralığındaki spektrum ise pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin O-H ve -NH gruplarının gerilme bantlarını ifade etmektedir [99, 100, 101, 102].

Tablo 5.31'de, pirinç kabuğu ile yapılan immobilizasyon çalışmalarına ait FTIR analizlerinden elde edilen absorpsiyon pikleri ve bu piklere karşılık gelen bağlar detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 5.62 Pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalara ait FTIR analizleri 1) Ön işlem görmüş pirinç kabuğu, 2) Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, 3) Glutaraldehit ile muamele edilen pirinç kabuğu, 4) Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi

Tablo 5.31 Pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları

	Ön işlem sonrası	1 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Glutaraldehit ile muamele sonrası	2 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Referans
G.A.'in silisyumu aktifleştirmesi	471.03	470.01	466.46	466.46	[99, 100]
C-H deformasyonu		673.71	663.98	666.72	[99]
-C=O	802.14		805.47	803.89	[103]
C-H gerilme alanları			899.91	858.76	[99]
Alifatik N-O				993.18, 927.34	[99]
C-O gerilmesi	1102.81	1079.45	1100.68	1108.40, 1051.96	[99]
Çapraz bağ oluşumu			1157.78	1157.78	[100]
O-H gerilmesi			1256.54	1234.60	[100]
O-H düzlemsel gerilmesi			1383.99	1384.06, 1316.90	[99]

Tablo 5.31 Pirinç kabuğu ile yapılan çalışmalara ait FTIR analiz sonuçları (devamı)

	Ön işlem sonrası	1 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Glutaraldehit ile muamele sonrası	2 Nolu immobilizasyon yöntemi sonrası	Referans
Amid-II bağı, N-H gerilmesi	1513.39		1514.42	1456.81	[101, 100]
Amid-II bağı				1558.31, 1508.93	[102, 101]
Amid-I bağı, N-H	1635.25	1638.14	1637.04	1637.75	[103, 101]
Karakteristik nanofiber			1736.63	1736.63	[104]
-N=C=O gerilmesi	2102.87	2089.07		2126.37	[99]
Çapraz bağlama moleküllerinin C-H gerilmesi			2851.64	2851.64	[100]
Asimetrik metil gerilmeleri, -C-H	2923.56		2923.88	2924.73	[101,100]
Absorbe suyun O-H gerilmesi			3434.06	3417.58	[99, 98]

SEM analizleri elde edilen immobilize β -galactosidase enzimleri içinden bir tanesi seçilerek gerçekleştirilmiştir. Bunun için, 50 g/L konsantrasyonunda hazırlanan laktoz çözeltilisindeki hidroliz prosesi sonucu, % 75.88 hidroliz derecesi değeri ile, elde edilen diğer immobilize β -galactosidase enzimlere göre en yüksek hidroliz derecesine sahip olan, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi kullanılmıştır. SEM analizlerinden elde edilen yüzey görüntüleri incelendiğinde, immobilizasyon öncesi ön işlem görmüş kabak lifinin yüzey pürüzlülüğünün, β -galactosidase enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra arttığı görülmüştür. Bu durum, *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enziminin ön işlem görmüş kabak lifi yüzeyine adsorbe olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada; kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilen *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enzim numuneleri için elde edilen veriler; Tablo 6.1-6.4'te özetlenmiştir.

Tablo 6.1 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler

Özellik	Değerler
Optimum değerler	pH = 6 T = 37 °C
Depolama kararlılığı	28. günün sonunda kalan enzim aktivitesi = % 75.38
Tekrar kullanım	4. Kullanım sonunda kalan enzim aktivitesi = % 79.98
Laktoz hidrolizi	<u>Laktoz çözeltisinde (50 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 12.06 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 60.85 Hidroliz derecesi = % 75.88 <u>Anne sütünde (72.8 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 1.5 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 71.6 Hidroliz derecesi = % 97.93
Kinetik veriler	<u>İnhibitörsüz ortam:</u> $K_m = 9.42 \times 10^{-4}$ g/mL $V_{max} = 0.785$ U/mL <u>İnhibitörlü ortam:</u> $K_m = 1.61 \times 10^{-3}$ g/mL $V_{max} = 0.673$ U/mL

Tablo 6.2 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler

Özellik	Değerler
Optimum değerler	pH = 8 T = 40 °C
Depolama kararlılığı	28. günün sonunda kalan enzim aktivitesi = % 60.38
Tekrar kullanım	4. Kullanım sonunda kalan enzim aktivitesi = % 53.42
Laktoz hidrolizi	<u>Laktoz çözeltisinde (50 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 17.20 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 55.68 Hidroliz derecesi = % 65.60 <u>Anne sütünde (72.8 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 0.6 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 87.42 Hidroliz derecesi = % 99.17
Kinetik veriler	<u>İnhibitörsüz ortam:</u> $K_m = 1.18 \times 10^{-3}$ g/mL $V_{max} = 0.847$ U/mL <u>İnhibitörlü ortam:</u> $K_m = 1.90 \times 10^{-3}$ g/mL $V_{max} = 0.706$ U/mL

Tablo 6.3 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler

Özellik	Değerler
Optimum değerler	pH = 8 T = 40 °C
Depolama kararlılığı	28. günün sonunda kalan enzim aktivitesi = % 98.87
Tekrar kullanım	4. Kullanım sonunda kalan enzim aktivitesi = % 37.25
Laktoz hidrolizi	<u>Laktoz çözeltisinde (50 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 14.60 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 76.52 Hidroliz derecesi = % 70.80 <u>Anne sütünde (72.8 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 0 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 86.25 Hidroliz derecesi = % 100
Kinetik veriler	<u>İnhibitörsüz ortam:</u> $K_m = 6.47 \times 10^{-4}$ g/mL $V_{max} = 0.924$ U/mL <u>İnhibitörlü ortam:</u> $K_m = 7.64 \times 10^{-4}$ g/mL $V_{max} = 0.955$ U/mL

Tablo 6.4 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait veriler

Özellik	Değerler
Optimum değerler	pH = 8 T = 37 °C
Depolama kararlılığı	28. günün sonunda kalan enzim aktivitesi = % 76.16
Tekrar kullanım	4. Kullanım sonunda kalan enzim aktivitesi = % 48.29
Laktoz hidrolizi	<u>Laktoz çözeltisinde (50 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 15.64 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 83.69 Hidroliz derecesi = % 68.72 <u>Anne sütünde (72.8 g laktoz/L) hidroliz:</u> Kalan laktoz konsantrasyonu = 5.43 g/L Kalan enzim aktivitesi = % 93.32 Hidroliz derecesi = % 92.54
Kinetik veriler	<u>İnhibitörsüz ortam:</u> $K_m = 1.03 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ $V_{max} = 0.737 \text{ U/mL}$ <u>İnhibitörlü ortam:</u> $K_m = 1.55 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ $V_{max} = 0.714 \text{ U/mL}$

A. β -galactosidase enziminin kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilmesi ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular;

- 1) Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimleri için proses sonrası aktivite cinsinden geri kazanım değerleri sırasıyla, % 84.90 ve % 95.60'tır.
- 2) Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimleri için proses sonrası protein cinsinden geri kazanım değerleri sırasıyla, % 80.53 ve % 88.06'dır.

- 3) Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimleri için proses sonrası aktivite cinsinden geri kazanım değerleri sırasıyla, % 80.25 ve % 95.66'dır.
- 4) Kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimleri için proses sonrası protein cinsinden geri kazanım değerleri sırasıyla, % 73.30 ve % 76.28'dir.
- 5) Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin optimum pH'ı 6 iken, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin, pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize β -galactosidase enziminin optimum pH değeri 8 olarak saptanmıştır. Serbest β -galactosidase enziminin optimum pH'ı ise 7 olarak belirlenmiştir.
- 6) Serbest β -galactosidase enzimi, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile elde edilen immobilize β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığı 37 °C iken, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile β -galactosidase enzimi ve pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin optimum sıcaklığı ise 40 °C olarak saptanmıştır.
- 7) 28. Günün sonunda kalan enzim aktivite değerleri, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 75.38, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 60.38, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde %98.87, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde ise % 76.16'dır.
- 8) 4. Kullanım sonunda kalan enzim aktivitesi, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 79.98, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 53.42, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde %

37.25, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde ise % 48.29'dur.

- 9) 50 g/L Konsantrasyonundaki laktoz çözeltisinde gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz prosesi sonunda elde edilen hidroliz dereceleri, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 75.88, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 65.60, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 70.80, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde ise % 68.72'dir.
- 10) Anne sütünde gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz prosesi sonunda elde edilen hidroliz dereceleri, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 97.93, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 99.17, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 100, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminde % 92.54'tür.
- 11) İnhibitörsüz ortamda kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 9.42×10^{-4} g/mL, 0.785 U/mL, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 1.18×10^{-3} g/mL, 0.847 U/mL, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 6.47×10^{-4} g/mL, 0.924 U/mL, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 1.03×10^{-3} g/mL, 0.737 U/mL olarak saptanmıştır.
- 12) % 5 CaCl_2 varlığındaki inhibitörlü ortamda, kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 1.61×10^{-3} g/mL, 0.673 U/mL, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m

ve V_{max} değerleri sırasıyla; 1.90×10^{-3} g/mL, 0.706 U/mL, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 7.64×10^{-4} g/mL, 0.955 U/mL, pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 1.55×10^{-3} g/mL, 0.714 U/mL olarak saptanmıştır.

- 13) İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin FTIR analizleri incelenmiş olup immobilizasyon öncesi kabak lifi ve pirinç kabuğundaki bağlar ile immobilizasyon sonrasındaki bağlar belirlenmiştir. Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait SEM analizi ile immobilizasyon sonrası kabak lifinin yüzey pürüzlülüğünün arttığı grlmştir.

B. Matematiksel modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular;

- 1) İmmobilize β -galactosidase enzimlerinin depolama süreleri sonrasında elde edilen relatif enzim aktivite deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 1. derece kinetik modele (Denklem 5.1), kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 2. derece kinetik modele, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele (Denklem 5.3) uyduğu grlmştir.
- 2) Başlangıç laktoz konsantrasyonu 50 g/L olan laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi ile elde edilen laktoz konsantrasyon deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 1. derece kinetik modele (Denklem 5.1), kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Exponential Fit kinetik modele (Denklem 5.5), pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Reciprocal Quadratic kinetik modele (Denklem 5.7),

pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ise 2. derece kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu görülmüştür.

- 3) Başlangıç laktoz konsantrasyonu 50 g/L olan laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi ile elde edilen hidroliz derecesi deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin, kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ve pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Exponential Association kinetik modele (Denklem 5.4), pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin ise 2. derece kinetik modele uyduğu görülmüştür.
- 4) Başlangıç laktoz konsantrasyonu 50 g/L olan laktoz çözeltisinin 30 dakikalık hidroliz prosesi ile elde edilen enzim aktivitesi deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele (Denklem 5.3), kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ile pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 2. derece kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu görülmüştür.
- 5) Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütündeki 30 dakikalık hidroliz prosesi ile elde edilen laktoz konsantrasyon deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Exponential Fit kinetik modele (Denklem 5.5), kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 2. derece kinetik modele (Denklem 5.2) uyduğu görülmüştür.

- 6) Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütündeki 30 dakikalık hidroliz prosesi ile elde edilen hidroliz derecesi deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Rasyonel Fonksiyon kinetik modele (Denklem 5.6), kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Exponential Association kinetik modele (Denklem 5.4) uyduğu görölmüştür.
- 7) Başlangıç laktoz konsantrasyonu 72.8 g/L olan anne sütündeki 30 dakikalık hidroliz prosesi ile elde edilen enzim aktivitesi deneysel verilerine uyan matematiksel modellemelerde; kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin 2. derece kinetik modele (Denklem 5.2), kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi, pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi ve pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enziminin Sadana ve Henley tarafından geliştirilen kinetik modele (Denklem 5.3) uyduğu görölmüştür.

Sonuç olarak; kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine 1 ve 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı β -galactosidase enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilerek özellikleri iyileştirilmeye çalışılmıştır. Immobilizasyon prosesinde kullanılan kabak lifi ve pirinç kabuğunun doğada kolay bulunması, elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerinin tekrar kullanılabilir olması, çözeltiden kolaylıkla ayrılabilirliği, laktozu hidrolizlemesi gibi avantajları sebebiyle bu çalışmada elde edilen immobilize β -galactosidase enzimlerinin gıda endüstrisinde laktozsuz gıda ürünlerinin üretiminde kullanılabilirliği görölmüştür. Böylece laktoz intoleransına sahip kişilerin tüketebileceği gıda çeşitliliğinin artmasına katkı sağlanabilecektir.

Elde edilen immobilize β -galactosidase enzimleri ile anne sütünde gerçekleştirilen 30 dakikalık hidroliz proseslerinden elde edilen hidroliz dereceleri % 92.54-100 aralığındadır. Laktoz intoleransı olan bebeklerin anne sütündeki laktoz sebebi ile anne sütü tüketmelerine engel olacak durumu, anne sütündeki laktozu dış ortamda parçalayarak önlemek mümkün olabilecektir. Anne sütündeki laktozun dış ortamda hidrolizlenmesi kabak lifi ve pirinç kabuğu üzerine immobilize edilen *Kluyveromyces marxianus* kaynaklı immobilize β -galactosidase enzimi ile sağlanabilecektir.

Bundan sonraki çalışmalar için öneriler;

- 1) İmmobilizasyon prosesi için ticari β -galactosidase enzimi yerine, laboratuvar ortamında enzim üretimi gerçekleştirildikten sonra enzim immobilizasyonu sağlanabilir.
- 2) Farklı immobilizasyon yöntemleri denenebilir.
- 3) Elde edilen immobilize β -galactosidase enzimleri ile yağlı süt, yağsız süt, peynir altı suyu gibi farklı ürünlerin laktoz hidroliz prosesleri gerçekleştirilebilir.
- 4) İmmobilizasyon için farklı adsorbanlar kullanılabilir.
- 5) Çapraz bağlama malzemesi olarak glutaraldehit dışında farklı bağlayıcılar denenebilir.

- [1] M. Atasağungil, Enzimler, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Sayı 8, Ankara, 1965.
- [2] J. E. Bailey ve D. F. Ollis, Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw Hill Book Co., Second edition, New York, 1986.
- [3] A. Demirsoy, Genel Biyoloji/Genel Zooloji, cilt 1, Meteksan A. Ş., Ankara, 1989.
- [4] A. Telefoncu, Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 1997.
- [5] J. M. Berg, J. L. Tymoczko ve L. Stryer, Biochemistry, 5th edition, New York: W. H. Freeman, 2002.
- [6] Enzimler,
https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/65271/mod_resource/content/1/Enzimler-2%20pdf.pdf, 13.03.2020.
- [7] F. B. Akgul, E. Demirhan, B. Özbek, "A Modelling study on skimmed milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability using three reactor types," International Journal of Dairy Technology, 65(2):217-231, 2012.
- [8] D. S. Clark, "Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity?" Trends in Biotechnology, 12:439-443, 1994.
- [9] A. Telefoncu, Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 1995.
- [10] B. Bozan, Tutuklanmış Enzim, Ders Notları, Anadolu Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 2011.
- [11] R. K. Sandwick ve K. J. Schray, "Conformational states of enzymes bound to surfaces," Journal of Colloid Interface Science, 121:1-12, 1988.
- [12] R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, "Immobilisation of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports," Chemical Physics, 93:185-197, 1998.
- [13] A. Akova ve G. Üstün, "Activity and adsorption of lipase from nigella sativa seeds on celite at different pH values," Biotechnology Letters, 22:355-359, 2000.
- [14] S. A. Costa, H. S. Azevedo, R. L. Reis, "Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications," Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1(4):301-324, 2004.
- [15] F. López-Gallego, T. Montes, M. Fuentes, N. Alonso, V. Grazu, L. Betancor, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports," Journal of Biotechnology, 116:1-10, 2005.
- [16] D. Alagöz, β -Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi Ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.

- [17] S. Soni, J. D. Desai, S. Devi, "Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports," *Journal of Applied Polymer Science*, 82:1299-1305, 2001.
- [18] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Buchmann, M. R. Kula, "Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NADH regeneration," *Biotechnology and Bioengineering*, 23:2789-2802, 1981.
- [19] M. E. Hassan, T. M. Tamer, A. M. Omer, "Methods of enzyme immobilization," *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(6):385-392, 2016.
- [20] G. B. Brown, G. Mancke, L. B. Wingard, "Enzyme Engineering", Plenum Press, New York, 4, 1978.
- [21] T. M. S. Chang, "Removal of urea and ammonia," *Enzyme Engineering*, 5:225-230, 1980.
- [22] A. G. Walton, J. Balckwell, S. H. Carr, "Biopolymers, Chitin", Academic Press, Newyork, 474, 1973.
- [23] R. Satar, M. A. Jafri, M. Rasool, S. A. Ansari, "Role of glutaraldehyde in imparting stability to immobilized β -galactosidase systems," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, V.60, 2017.
- [24] J. Rojas ve E. Azevedo, "Functionalization and crosslinking of microcrystalline cellulose in aqueous media: a safe and economic approach," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Volume 8, Issue 1, 2011.
- [25] Q. Husain, " β Galactosidases and their potential applications: a review," *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1):41-62, 2010.
- [26] P. S. Panesar, S. Kumarive, R. Panesar, "Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries," *Enzyme Research*, 2010.
- [27] P. P. Chikode, S. J. Pawar, V. J. Fulari, M. B. Dongre, "Determination of diffusion coefficient of lactose solution," *Journal of Holography and Speckle*, 4:1-7, 2007.
- [28] Y. Numanoğlu ve S. Sungur, " β -Galactosidase from *kluveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system," *Process Biochemistry*, 39:703-709, 2004.
- [29] B. Y. Köse ve Y. Ölmez, "Laktoz intoleransı ve diyet", *Güncel Gastroenteroloji*, 20/3, 2016.
- [30] M. Ladero, A. Santos, J. L. Garcia, F. Garcia-Ochoa, "Activity over lactose and onpg of a genetically engineered β -galactosidase from *escherichia coli* in solution and immobilized: kinetic modelling," *Enzyme and Microbial Technology*, 29:181-193, 2001.
- [31] A. Bayhan ve G. Yentür, "Laktoz intoleransı", *Gıda*, 18(6):385-388, 1993.
- [32] P. Hughes, D. Risner, L. M. Goddik, "Whey-biological properties and alternative uses," 2018, <https://www.intechopen.com/books/whey-biological-properties-and-alternative-uses>, 13.03.2020.
- [33] M. Üçüncü, A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir, 2004.

- [34] Sütün Bileşimi ve Özellikleri,
<http://cv.ankara.edu.tr/duzenleme/kisisel/dosyalar/06012015013030>, 13.03.2020.
- [35] N. Araş, “Anne sütünün oluşumu ve içeriği,” Türk Dünyası Uygulama ve Araştırma Merkezi Yenidoğan Dergisi, Ankara, 130-153, 2017.
- [36] G. Samur, “Anne Sütü”, Sağlık Bakanlığı Yayın No:726, Ankara, 2008.
- [37] S. Yin, H. Wang, J. Li., R.O. Ritchie, J. Xu, “Light but tough bio-inherited materials: Luffa sponge based nickel-plated composites,” Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 94:10-18, 2019.
- [38] M. Akgül, S. Korkut, O. Çamlıbel, Ü. Ayata, “Some chemical properties of luffa and its suitability for medium density fiberboard (MDF) production,” BioResources, 8(2):1709-1717, 2013.
- [39] J. Shen, Y. M. Xie, X. Huang, S. Zhou, D. Ruan, “Mechanical properties of luffa sponge,” Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 15:141-152, 2012.
- [40] X. Li, D. Liao, X. Xu, Q. Yang, “Kinetic studies for the biosorption of lead and copper ions by penicillium simplicissimum immobilized within loofa sponge,” Journal Hazardous Materials, 159:610-615, 2008.
- [41] R. Pazzetto, T. C. O. Delani, V. C. Fenelon, G. Matioli, “Cyclodextrin Production by Bacillus Firmus Strain 37 Cells Immobilized on Loofa Sponge,” Process Biochemistry, 46:46-51, 2011.
- [42] S. A. Meleigh ve M. A. Khalaf, “Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant fusarium moniliforme cells immobilized on loofa sponge,” Biosource Technology, 100:374-379, 2009.
- [43] I. O. Oboh, E. O. Aluyor, T. O. K. Audu, “Application of luffa cylindrica in natural form as biosorbent to removal of divalent metals from aqueous solutions-kinetic and equilibrium study,” Waste Water-Treatment and Reutilization, 195-212, 2011.
- [44] M. Iqbal ve R. G. J. Edyvean, “Loofa sponge immobilized fungal biosorbent: a robust system for cadmium and other dissolved metal removal from aqueous solution,” Chemosphere, 61:510-518, 2005.
- [45] I. O. Mazali ve O. L. Alves, “morphosynthesis: high fidelity inorganic replica of the fibrous network of loofa sponge (luffa cylindrica),” Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 77:25-31, 2005.
- [46] H. Demir, U. Atikler, D. Balköse, D. Tihminlioğlu, “The effect of fiber surface treatments on the tensile and water sorption properties of polypropylene-luffa fiber composites,” Composites Part A: Applied Science and Manufacturing 37:447-456, 2006.
- [47] V. Ajwe, G. Ndukwe, I. Anyadiegwu, “Vegetable diesel fuels from luffa cylindrica oil, its methyl ester and ester-diesel blends,” Chemistry Class Journal, 2:1-4, 2005.

- [48] Z. Shamsollahia ve A. Partoviniab, "Recent advances on pollutants removal by rice husk as a bio-based adsorbent: A critical review," *Journal of Environmental Management*, 246:314-323, 2019.
- [49] T. G. Korotkova, S. J. Ksandopulo, A. P. Donenko, S. A. Bushumov, A. S. Danilchenko, "Physical properties and chemical composition of the rice husk and dust," *Oriental of Journal Chemistry*, 32(6), 2016.
- [50] H. Ummah, A. D. Suriamihardja, M. Selintung, A. W. Wahab, "Analysis of chemical composition of rice husk used as absorber plates sea water into clean water," *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 10:14, 2015.
- [51] V. Vadivelan ve K. V. Kumar, "Equilibrium, kinetics, mechanism and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk," *J. Colloid Interface Sci.*, 286:90-100, 2005.
- [52] S. Chandrasekhar ve P. N. Pramada, "Rice husk as has an adsorbent for methylene blue effect of ashing temperature," *Adsorption*, (12):27-43, 2006.
- [53] X. G. Chen, S. S. Lv, S. T. Liu, P. P. Zhang, A. B. Zhang, J. Sun, Y. Ye, "Adsorption of methylene blue by rice hull ash," *Separ. Sci. Technol.*, 47:147-156, 2012.
- [54] V. S. Mane, I. D. Mall ve V. C. Srivastava, "Kinetic and equilibrium isotherm studies for the adsorptive removal of brilliant green dye from aqueous solution by rice husk ash," *J. Environ. Manag.*, 84:390-400, 2007.
- [55] S. Chakraborty, S. Chowdhury, P. D. Saha, "Adsorption of crystal violet from aqueous solution on to NaOH-modified rice husk," *Carbohydr. Polym.*, 86:1533-1541, 2011.
- [56] C. R. T. Tarley, S. L. C. Ferreira, M. A. Z. Arruda, "Use of modified rice husks as a natural solid adsorbent of trace metals: characterisation and development of an online preconcentration system for cadmium and lead determination by FAAS," *Microchem. J.*, 77:163-175, 2004.
- [57] M. Akhtar, S. Iqbal, A. Kausar, M. I. Bhanger, M. A. Shaheen, "An economically viable method for the removal of selected divalent metal ions from aqueous solutions using activated rice husk," *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 75:149-155, 2010.
- [58] Cargnin, M. A., Gasparin, B. C., Paulino, A. T., "Hydrolysis of lactose using β -D-galactosidase immobilized in pectin-based hydrogels: Modeling and optimization by factorial design", *LWT-Food Science and Technology*, 132, 2020.
- [59] M. Wolf ve A. T. Paulino, "Full-factorial central composite rotational design for the immobilization of lactase in natural polysaccharide-based hydrogels and hydrolysis of lactose," *International Journal of Biological Macromolecules*, 135:986-997, 2019.
- [60] C. J. F. Souza, E. E. Garcia-Rojas, C. S. Favaro-Trindade, "Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity," *Food Hydrocolloids*, 83:88-96, 2018.

- [61] M. E. Hassan, A. G. Ibrahim, H. A. El-Wahab, F. A. Hai, H. Mahmoud, G. E. A. Awad, "Covalent Immobilization of β -galactosidase enzyme onto modified alginate gel beads," *J. Mater. Environ. Sci.*, 9(9):2483-2492, 2018.
- [62] S. A. Ansari, R. Satar, S. K. Zaidi, M. I. Naseer, S. Karim, M. H. Alqahtani, M. Rasool, "Nanodiamonds as an effective and novel matrix for immobilizing β galactosidase," *Food and Bioproducts Processing*, 95:298-303, 2015.
- [63] L. M. Prieto, R. G. Ricordi, R. C. Kuhn, E. L. Foletto, M. A. Mazutti ve C. A. V. Burkert, "Evaluation of β -galactosidase adsorption into pre-treated carbon," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3:26-29, 2014.
- [64] S. A. Ansari, R. Satar, F. Alam, M. H. Alqahtani, A. G. Chaudhary, M. I. Naseer, S. Karim, I. A. Sheikh "Cost effective surface functionalization of silver nanoparticles for high yield immobilization of *aspergillus oryzae* β -galactosidase and its application in lactose hydrolysis," *Process Biochemistry*, 47:2427-2433, 2012.
- [65] P. Jochems, Y. Satyawali, S. A. Roy, W. Doyen, L. Diels, W. Dejonghe, "Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane," *Enzyme and Microbial Technology*, 49:580-588, 2011.
- [66] Q. Husain, S. A. Ansari, F. Alam, A. Azam, "Immobilization of *aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism," *International Journal of Biological Macromolecules*, 49:37-43, 2011.
- [67] Y. S. Song, J. H. Lee, W. Kang, S. W. Kim, "Performance of β -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilization process," *Food Chemistry*, 123:1-5, 2010.
- [68] S. A. Ansari ve Q. Husain, "Lactose hydrolysis by β -galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode," *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, 63:68-74, 2010.
- [69] T. Haider ve Q. Husain, "Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk," *International Dairy Journal*, 19:172-177, 2009.
- [70] D. F. M., Neri, V. M. Balcao, M. G. C. Cunha, J. L. B. Carvalho, J. A. Teixeira, "Immobilization of β -galactosidase from *kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinil alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis," *Catalysis Communications*, 9:2334-2339, 2008.
- [71] G. Bayramoğlu, Y. Tunali, M. Y. Arica, "Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor," *Catalysis Communications*, 8:1094-1101, 2007.
- [72] K. Ovjesevi, B. Breana, F. Batista-Viera, J. Carlsson, "Immobilization of β -galactosidase on thiolsulfonate-agarose," *Enzyme and Microbial Technology*, 17:151-156, 1995.

- [73] W. J., Lai ve S. C., Lin, "Hydroxyethyl cellulose-grafted loofa sponge-based metal affinity adsorbents for protein purification and enzyme immobilization", *Process Biochemistry*, 74:141-147.
- [74] R. Gong, J. Zhang, J. Zhu, J. Wang, Q. Lai, B. Jiang, "Loofah sponge activated by periodate oxidation as a carrier for covalent immobilization of lipase," *Korean J. Chem. Eng.*, 30(8):1620-1625, 2013.
- [75] R. R. Morais, A. M. Pascoal, S. S. Caramori, F. M. Lopes, K. F. Ferandes, "Immobilization of α -amylase onto luffa operculata fibers", *Enzyme Research*, 2013:803415, 2013.
- [76] J. Zhu, J. Zhang, J. Q. Lai, B. Jiang, R. Gong, "Covalent immobilization of lipase onto citric acid-esterified loofah ponge," *Bio Resources*, 8(3):3289-3298, 2013.
- [77] D. A. R. Mahmoud, H. W. Refaat, A. F. Abdel-Fattah, E. S. M. E. Mahdy, W. G. Shousha, "Novel application of luffa cylindrica in production of fructose," *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(12):2127-2137, 2011.
- [78] S. A. Ahmed, S. A. Saleh, A. F. Abdel-Fattah, "Stabilization of *bacillus licheniformis atcc 21415* alkaline protease by immobilization and modification", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(3): 313-322, 2007.
- [79] L. C. D. Lima, D. G. C. Peres, A. A. Mendes, "Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41:991–1002, 2018.
- [80] M. Cesugli, S. Lotteria, L. Navarini, V. Lonzarich, L. D. Terra, F. Vita, M. Zwyer, G. Baldini, V. Ferrario, C. Ebert, L. Gardossi, "Rice husk as an inexpensive renewable immobilization carrier for biocatalysts employed in the food, cosmetic and polymer sectors," *Catalysts*, 8:471, 2018.
- [81] R. Abdulla, S. A. Sanny, E. Derman, "Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane," *Materials Science and Engineering*, 206:012032, 2017.
- [82] P. Seshabala, A. V. S. Prabhakar Rao, K. Mukkanti, "Rice Husk: a potent source for life sustainability," *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, Vol. 1, Issue 8, 2012.
- [83] S.F. D'Souza ve S. S. Godbole, "Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 52:59-62, 2002.
- [84] IKA Designed for Scientists, <https://www.ika.com/en/Products-Lab-Eq/Shakers-Vortex-mixer,-Lab-shakers-csp-179/KS-4000-ic-control-Downloads-cpdl-3510100/>, 13.03.2020
- [85] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254, 1976.
- [86] H. N. Bhatti, M. Asgher, A. Abbas, R. Nawaz, M. A. Sheikh, "Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from fusarium solani", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4617-4623, 2006.

- [87] G. B. Kılıç, A. G. Karahan, "Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması," *Gıda*, 35(6):445-452, 2010.
- [88] K. Kapakin, "Scanning-elektron mikroskobu," *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 17(1-2):55-58, 2006.
- [89] A. Sadana ve J. M. Henley, "Single step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics", *Biotechnology and Bioengineering*, 30:717-723, 1987.
- [90] S. A. Ansari ve Q. Husain, "Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous by concanavalin a-celite 545 immobilized aspergillus oryzae β -galactosidase," *Food and Biorproduct Processing*, 90:351-359, 2012.
- [91] E. Demirhan, *Peynir Altı Suyundan Elde Edilen Laktozun Enzimatik Hidrolizinin İncelenmesi ve Modellenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- [92] A. Pal, M. Lobo, F. Khanum, "Extraction, purification and thermodynamic characterization of almond (*amygdalus communis*) β -galactosidase for the preparation of delactosed milk," *Food Technology and Biotechnology*, 51(1):53-61, 2013.
- [93] D. O. Otieno, "Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5):471-482, 2010.
- [94] Z. Mlichová ve M. Rosenberg, "Current trends of β -galactosidase application in food technology," *Journal of Food and Nutrition Research*, 45 (2):47–54, 2006.
- [95] T. Karunakaran ve B. G. Devi, "Factors influencing β -galactosidase activity of *aeromonas caviae*," *Journal of Basic Microbiology*, 34:245-252, 1994.
- [96] M. Banerjee, A. Chakrabarty, S. K. Majumdar, "Immobilization of yeast cells containing," *Biotechnology and Bioengineering*, 24(8):1839-1850, 1982.
- [97] K. Zolnere, J. Liepins, I. Ciprovica, "The impact of calcium ions on commercially available β -galactosidase", *Foodbalt 2017*, 27-30, 2017.
- [98] M. Puri, S. Gupta, P. Pahuja, A. Kaur, J. R. Kanwar, J. F. Kennedy, "Cell disruption, optimization and covalent immobilization of β -D-galactosidase from *kluveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160:98-108, 2010.
- [99] D. Kishore, M. Talat, O. N. Srivastava, A. M. Kayastha, "Immobilization of β -galactosidase onto functionalized graphene nano-sheets using response surface methodology and its analytical applications," *Plos one*, 7(7), 2012.
- [100] R. F. Dahari, C. M. Ongkudon, M. Misson, "Effect of crosslinkers on immobilization of β -galactosidase on polymethacrylate monolith," *Trasactions on Science and Technology*, 5(2):106-113, 2018.
- [101] C. J. F. Souza, E. E. Garcia-Rojas, C. S. F Souza, L. C. Vriesmann, J. Vicente, M. G. D. Carvalho, C. L. O. Petkowicz ve C. S. Favaro-Trindade, "Immobilization of β -galactosidase by complexation: effect of interaction on the properties of the enzyme", *International Journal of Biological Macromolecules*, 122:594-602, 2019.

- [102] S. A. Ansari, Q. Husain, S. Qayyum, A. Azam, "Designing and surface modification of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications," *Food and Chemical Toxicology*, 49:2107-2115, 2011.
- [103] M. L. Verma, C. J. Barrow, J. F. Kennedy, M. Puri, "Immobilization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis," *International Journal of Biological Macromolecules*, 50:432-437, 2012.
- [104] S. Haghju, M. R. Bari, M. A. Khaled-Abad, "Affecting parameters on fabrication of β -D-galactosidase immobilized chitosan/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers," *Carbohydrate Polymers*, 200:137-143, 2018.

Tablo A.1 Farklı ONPG konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin absorbens değerleri

ONPG (mg/mL)	Absorbans değeri (420 nm)
0.0	0.000
0.2	0.215
0.4	0.431
0.6	0.646
0.8	0.862
1.0	1.190

Tablo A.2 Farklı BSA konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin absorbens değerleri

BSA (mg/mL)	Absorbans değeri (595 nm)
0.0	0.00
0.25	0.25
0.50	0.55
0.75	0.77
1.00	1.01
1.25	1.22
1.50	1.50

Tablo A.3 Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 7, 300 rpm)

Sıcaklık (°C)	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
30	90.37
35	93.83
37	100.00
40	79.92
50	42.35

Tablo A.4 Serbest β -galactosidase enzimine ait farklı pH’lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

pH	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
4	74.43
5	77.44
6	83.60
7	100.00
8	83.90
9	80.12

Tablo A.5 Serbest β -galactosidase enzim stabilitesine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 7)

Sıcaklık (°C)	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
30	96.48
35	97.27
37	99.53
40	98.22
50	35.90

Tablo A.6 Serbest β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 37 °C)

pH	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
4	0.00
5	77.39
6	97.43
7	100.00
8	97.08
9	76.20

Tablo A.7 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 6, 300 rpm)

Sıcaklık (°C)	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
30	98.06
37	100.00
40	97.58
50	84.68

Tablo A.8 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

pH	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
5	89.00
6	100.00
7	98.63
8	93.73
9	90.25

Tablo A.9 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH =6)

Sıcaklık (°C)	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
30	98.55
37	100.00
40	96.44
50	42.80

Tablo A.10 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 37 °C)

pH	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
4	16.21
5	62.59
6	100.00
7	94.46
8	96.42
9	78.83

Tablo A.11 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 8)

Sıcaklık (°C)	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
30	91.13
37	93.49
40	100.00
50	61.32

Tablo A.12 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimin ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 40 °C)

pH	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
5	89.77
6	90.12
7	90.50
8	100.00
9	88.58

Tablo A.13 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 8)

Sıcaklık (°C)	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
30	84.93
37	83.26
40	91.25
50	39.64

Tablo A.14 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 40 °C)

pH	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
4	12.15
5	69.10
6	69.40
7	69.94
8	79.64
9	68.90

Tablo A.15 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 8, 300 rpm)

Sıcaklık (°C)	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
30	96.31
37	97.43
40	100.00
50	83.19

Tablo A.16 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 40 °C, 300 rpm)

pH	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
5	82.44
6	88.50
7	89.83
8	100.00
9	88.90

Tablo A.17 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 8)

Sıcaklık (°C)	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
30	88.82
37	90.65
40	93.66
50	38.53

Tablo A.18 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 40 °C)

pH	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
4	9.59
5	21.40
6	83.58
7	85.82
8	100.00
9	78.87

Tablo A.19 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı sıcaklıklardaki % relatif enzim aktivite değerleri (pH = 8, 300 rpm)

Sıcaklık (°C)	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
30	97.34
37	100.00
40	77.65
50	56.96

Tablo A.20 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait farklı pH'lardaki % relatif enzim aktivite değerleri (T = 37 °C, 300 rpm)

pH	Relatif Enzim Aktivitesi (%)
5	72.47
6	97.66
7	97.98
8	100.00
9	86.54

Tablo A.21 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı sıcaklıklardaki % kalan enzim aktivite değerleri (pH = 8)

Sıcaklık (°C)	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
30	80.96
37	85.17
40	48.56
50	39.82

Tablo A.22 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzim stabilitelerine ait farklı pH'lardaki % kalan enzim aktivite değerleri (T = 37 °C)

pH	Kalan Enzim Aktivitesi (%)
4	16.23
5	20.94
6	83.49
7	84.87
8	97.66
9	81.26

Tablo A.23 İmmobilize enzim numunelerinin depolama kararlılığına ait değerler

β-galactosidase enzimi	Kalan Enzim Aktivitesi (%)			
	0. gün	7. gün	14. gün	28. gün
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	94.46	86.45	75.38
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	90.21	75.80	60.38
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	98.96	98.87	98.87
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	99.59	91.05	76.16

Tablo A.24 İmmobilize enzim numunelerinin tekrar kullanımları sonucu elde edilen % kalan enzim aktivite değerleri

β-galactosidase enzimi	Kullanım Sayısı Sonrası Kalan Enzim Aktivitesi (%)				
	0	1	2	3	4
Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	97.79	85.58	83.49	79.98
Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	95.77	92.40	62.06	53.42
Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	95.80	59.66	41.75	37.25
Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimi	100	80.29	63.15	60.11	48.29

Tablo A.25 Serbest β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler

S (mg/mL)	1/S (mL/g) ⁻¹	İnhibitörsüz Ortam		İnhibitörlü Ortam	
		V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹	V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹
0.2	5000	0.123	8.13	0.084	11.90
0.4	2500	0.232	4.31	0.156	6.40
0.6	1660	0.285	3.50	0.219	4.55
0.8	1250	0.357	2.80	0.273	3.65
1.0	1000	0.454	2.20	0.322	3.10

Tablo A.26 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler

S (mg/mL)	1/S (mL/g) ⁻¹	İnhibitörsüz Ortam		İnhibitörlü Ortam	
		V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹	V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹
0.2	5000	0.142	7.04	0.075	13.21
0.4	2500	0.192	5.20	0.132	7.52
0.6	1660	0.285	3.50	0.184	5.42
0.8	1250	0.357	2.80	0.227	4.39
1.0	1000	0.555	1.80	0.265	3.77

Tablo A.27 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler

S (mg/mL)	1/S (mL/g) ⁻¹	İnhibitörsüz Ortam		İnhibitörlü Ortam	
		V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹	V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹
0.2	5000	0.128	7.8	0.066	15.05
0.4	2500	0.158	6.3	0.118	8.42
0.6	1660	0.238	4.2	0.167	5.99
0.8	1250	0.476	2.1	0.208	4.80
1.0	1000	0.500	2.0	0.246	4.07

Tablo A.28 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl_2 (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler

S (mg/mL)	1/S (mL/g) ⁻¹	İnhibitörsüz Ortam		İnhibitörlü Ortam	
		V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹	V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹
0.2	5000	0.25	4.00	0.196	5.08
0.4	2500	0.29	3.44	0.347	2.88
0.6	1660	0.35	2.85	0.416	2.40
0.8	1250	0.72	1.38	0.480	2.08
1.0	1000	0.83	1.20	0.532	1.88

Tablo A.29 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait inhibitörsüz ortam ve % 5 CaCl₂ (w/v) içeren inhibitörlü ortam için kinetik verilerin hesaplanmasında kullanılan veriler

S (mg/mL)	1/S (mL/g) ⁻¹	İnhibitörsüz Ortam		İnhibitörlü Ortam	
		V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹	V (U/mL)	1/V (U/mL) ⁻¹
0.2	5000	0.130	7.69	0.085	11.73
0.4	2500	0.149	6.70	0.151	6.60
0.6	1660	0.263	3.80	0.206	4.84
0.8	1250	0.285	3.50	0.251	3.98
1.0	1000	0.840	1.19	0.289	3.45

Tablo A.30 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/L)	50	21.94	14.30	12.06
Kalan enzim aktivitesi (%)	100	69.37	62.88	60.85
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0	56.12	71.4	75.88

Tablo A.31 Kabak lifi üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/ L)	72.80	23.80	5.50	1.50
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	86.36	71.60	71.60
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	48.97	67.35	97.93

Tablo A.32 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/L)	50.00	29.84	19.86	17.20
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	76.81	61.59	55.68
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	40.32	60.28	65.60

Tablo A.33 Kabak lifi üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/ L)	72.80	29.00	4.60	0.60
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	89.18	88.05	87.42
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	60.16	93.68	99.17

Tablo A.34 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/L)	50.00	19.50	14.88	14.60
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	76.94	76.86	76.52
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	61.00	70.24	70.80

Tablo A.35 Pirinç kabuğu üzerine 1 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/ L)	72.80	35.2	7.90	0.00
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	91.22	87.64	86.25
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	51.64	89.14	100.00

Tablo A.36 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait laktoz çözeltisindeki hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/L)	50.00	31.04	18.86	15.64
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	98.65	93.76	83.69
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	37.92	62.28	68.72

Tablo A.37 Pirinç kabuğu üzerine 2 nolu immobilizasyon yöntemi ile immobilize edilen β -galactosidase enzimine ait anne sütündeki laktoz hidroliz değerleri

Zaman (dk)	0	10	20	30
Laktoz konsantrasyonu (g/ L)	72.80	43.60	23.30	5.43
Kalan enzim aktivitesi (%)	100.00	95.47	93.82	93.32
Laktoz hidroliz derecesi (%)	0.00	40.00	67.87	92.54

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: fbetulakgul@yahoo.com

Konferans Bildirileri

1. **Taner, F.B.A.** ve **Özbek, B.**, (2018). “A study on the immobilization of β -galactosidase enzyme by covalent binding on loofa sponge and its application”, 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2018), Prag, Çek Cumhuriyeti, 25-29 Ağustos 2018, ss:177.
2. **Taner, F.B.A.** ve **Özbek, B.**, (2018). “Investigation of β -galactosidase enzyme immobilization by covalent binding on activated rice husk”, 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2018), Prag, Çek Cumhuriyeti, 25-29 Ağustos 2018, ss:178.